

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

УДК: 616-097-08+577.112

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Черешнев В.А., академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Гриценко В.А., доктор медицинских
наук, профессор

Екатеринбург – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

	С.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 – ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА – ГМ-КСФ (Обзор литературы)	12
1.1 – Структура и химические свойства ГМ-КСФ	12
1.2 – Основные механизмы действия и клеточные мишени для ГМ-КСФ	13
1.3 – Клеточный рецептор ГМ-КСФ	14
1.4 – Взаимодействия на уровне белок/клетка (GM-CSF/GM-CSFR)	15
1.5 – Трансляция сигналов GM-CSF	16
1.6 – GM-CSF клиническое применение как гематопэтина	19
1.7 – Фармакокинетика и фармакодинамика rhGM-CSF	20
1.8 – rhGM-CSF и rhG-CSF и лейкопения	21
1.9 – Роль ГМ-КСФ при воспалении	22
1.10 – Активация и регулирование иммунной системы и ГМ-КСФ	23
1.11 – Применение ГМ-КСФ в терапии различных заболеваний в эксперименте и клинике	25
1.12 – Профилактические вакцины при инфекционных заболеваниях, основанные на дополнительном использовании ГМ-КСФ	29
1.13 – Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ	31
ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	35
2.1 – Синтез пептидов	35
2.2 – Методы оценки иммуотропной активности синтетических пептидов ГМ-КСФ	36
2.2.1 – Оценка пролиферативной активности	36
2.2.2 – Оценка апоптоза моноцитов	37
2.2.3 – Оценка миграционной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови на синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ	40

2.2.4 – Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами <i>in vitro</i>	43
2.2.5 – Методы оценки антибактериальной активности	44
2.2.6 – Оценка кинетики роста микробных культур при воздействии пептидов активного центра ГМ-КСФ	44
2.2.7 – Статистические методы исследования	48
ГЛАВА 3 – ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ	50
3.1 – Исследование апоптоза моноцитов при действии пептида активного центра ГМ-КСФ	52
3.2 – Исследование локомоторной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови под действием пептида активного центра ГМ-КСФ	55
3.3 – Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии энтеробактерий <i>in vitro</i>	58
ГЛАВА 4 – АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ	69
4.1 – Оценка бактерицидной активности пептидов активного центра ГМ-КСФ на плотной питательной среде <i>in vitro</i>	69
4.2 – Исследование доза-зависимых эффектов синтетического пептида ГМ-КСФ рост бактериальных культур в жидкой питательной среде <i>in vitro</i>	73
4.3 – Влияние синтетического пептида ZP2 на рост музейных штаммов <i>Escherichia coli</i> K12 (ATCC 25922) и <i>Staphylococcus aureus</i> 209P (ATCC 6538-P)	74
4.4 – Исследование влияния косметического средства АЦЕГРАМ-спрей на рост и размножение грамотрицательных бактерий	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131
ПРИЛОЖЕНИЕ	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработки

Одной из важных задач современной иммунологии является получение новых химических соединений, обладающих иммуномодулирующей активностью, но при этом имеющих и другие полезные плеiotропные свойства. Необходимость создания новых иммунотропных соединений на основе эндогенных пептидных регуляторов обусловлена важной ролью иммунной системы в развитии, течении и исходе большинства известных патологических процессов, возникающих у человека [39, 64, 66, 67, 69]. В этой связи особый интерес представляют биологические регуляторные молекулы, продуцируемые клетками иммунной системы для поддержания гомеостаза организма, которые могут стать основой для создания новых лекарственных препаратов, влияющих на поврежденные звенья системы иммунитета. К таким веществам/препаратам в первую очередь относятся различные цитокины и, в частности, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), широко применяющийся для лечения нейтропений при лейкозах [21, 31, 33, 122, 134]. В 90-х годах из ГМ-КСФ были получены синтетические пептиды, обладающие сходной активностью, характерной для этого фактора [19, 25, 52]. Проведенные эксперименты стали основой для дальнейшего исследования различных механизмов действия, полученных синтетических пептидов.

В то же время известно, что 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 [23, 103, 198]. Последнее особенно актуально, поскольку продолжается интенсивное использование в клинической практике антибиотиков, для которых характерно формирование антибиотикорезистентных микроорганизмов, циркуляция которых представляет опасность не только для больных, инфицированных ими, но и для контактирующих с такими

пациентами лиц [9], и разработка новых антимикробных препаратов, в том числе на основе эндогенных антимикробных пептидов (АМП), представляется весьма перспективной [48, 53, 160].

АМП обладают важными преимуществами по сравнению с традиционными антибиотиками, которые состоят в более широком диапазоне антибактериального действия, проявлении активности при значительно более низких концентрациях, малой выраженности способности возбудителей формировать устойчивость к ним, а также в возможности синтеза аналогов природных пептидов с направленно-измененными биологическими свойствами [2, 3]. При исследовании ряда синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ (в том числе, синтетического пептида ZP2) 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 [21, 23]. Однако действие синтетического пептида ZP2 на грамотрицательные бактерии исследовано достаточно фрагментарно. Кроме того, дальнейшего анализа требуют биологические эффекты данного пептида в системе взаимодействия фагоциты-пептид-грамотрицательные бактерии.

Настоящее исследование и посвящено анализу данных вопросов.

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

Задачи исследования:

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

фагоциты-пептид-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 и личный вклад 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., профессором В.А. Черешневым и д.м.н., профессором В.А. Гриценко. Автором лично проведены все эксперименты; часть опытов выполнена совместно с сотрудниками ООО «Тюменский филиал института клинической иммунологии» (директор, д.м.н., профессор Суховой Ю.Г., сотрудники д.м.н., профессор 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. и др.), 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-корреспондент РАН, д.м.н., профессор 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.

Положения, выносимые на защиту:

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

2. Иммуотропная 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

Получены новые данные при исследовании иммуотропных 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.AB66.H00566 (№ 0203563) и РОСС RU.AB66.H00565 (№ 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 работ, в том числе: 11 статей в изданиях, рецензируемых 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 диссертации

Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из введения, главы «Обзор литературы», главы «Материалы и методы», 2 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций списка литературы, включающего 212 источников, из них 143 иностранных и 69 отечественных. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 14 таблицами, 5 приложениями.

ГЛАВА 1 – ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА – ГМ-КСФ (Обзор литературы)

1.1 – Структура и химические свойства ГМ-КСФ

GM-CSF – один из основных цитокинов – факторов роста и дифференцировки клеток, с молекулярным весом 22 кД. Аминокислотная последовательность этого белка включает 172 аминокислоты. Ген GM-CSF расположен на 5 хромосоме, локус 31. Прodуцируют GM-CSF большое количество клеток: Т-лимфоциты (T_H1, T_H2, T_H17), мультипотентные, мезенхимальные и стромальные стволовые клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки, нейтрофилы, эозинофилы и др. Интерлейкины 1, 4, 6, а также ФНО – стимулируют выработку GM-CSF [15, 31, 33, 85, 87, 168]. Данный фактор был получен из культур клеток сначала мышей, потом крыс и человека. По аминокислотному составу как мышинный, так и человеческий фактор имеют выраженные отличия [159, 172].

Учитывая, что GM-CSF и синтетические пептиды его активного центра являются предметом нашего повышенного интереса, остановимся на нём более подробно. Удаление гена 5q приводит к развитию острой миелоидной лейкемией (AML), но AML не всегда воспроизводится удалением 5q. В той же самой хромосоме местоположение генов связано с другими цитокинами в генетическом коде, такими как IL-4, IL-5 и IL-13, фактор стволовой клетки (SCF), лейкемию запрещающий фактор, лиганд Flt3(Flt3L), эритропоэтин (EPO), тромбопоэтин (TPO) и IL-3, IL-5, и IL-11, у которых, так же как и у GM-CSF была выявлена гемопоэтическая активность [85, 87, 193].

Однако не было явного функционального различия между GM-CSF и IL-3, пока не была расшифрована в 1985 структура человеческого GM-CSF в 1994 г. В 1986 методом клонирования было показано, что основным

человеческим фактором пролиферации и дифференцировки нейтрофилов был фактически G-CSF, который с тех пор значительно чаще используется в качестве основного гемопоэтического фактора для лечебных целей, хотя GM-CSF также широко применяется в клинической практике. Удаление генов для EPO, G-CSF, TPO или M-CSF приводит к выраженному сокращению суммы клеток, которые обычно стимулируются каждым из этих цитокинов. Однако удаление гена GM-CSF не так сильно сказывается на количестве клеток, а только уменьшает функции нейтрофилов [85, 87, 137, 193].

1.2 – Основные механизмы действия и клеточные мишени для ГМ-КСФ

Рассмотрим известные механизмы действия GM-CSF на клеточном и молекулярном уровнях. В ответ на воздействие GM-CSF активируется дифференцировка полипотентных клеток-предшественников и предшественников нейтрофилов. GM-CSF также стимулирует к пролиферации и зрелые клетки – дендритные клетки, моноциты, Т-лимфоциты, NK-клетки, нейтрофилы, эозинофилы. При стимуляции его продукции, большая часть механизмов его действия реализуется, в основном, в очаге воспаления. Главными клетками-мишенями (эффекторами) для GM-CSF являются: дендритные клетки (он вызывает их созревание и дифференцировку), гранулоциты (он активирует их, увеличивает сроки жизни и вызывает дифференцировку), моноциты (ускоряет дифференцировку моноцитов в тканевые макрофаги), альвеолярные макрофаги и купферовские клетки в печени, быстрое увеличение макрофагов в микроглии), NKT и NK клетки и ряд других клеток. То есть фактически GM-CSF является ростовым и дифференцировочным фактором очень большого количества клеток иммунной системы. Кроме того, у зрелых лимфоцитов и эндотелиальных клеток есть GM-CSF рецепторы (GM-CSFR), которые делают их восприимчивыми к стимуляции GM-CSF [15, 95, 101, 117, 121, 132, 138, 145].

1.3 – Клеточный рецептор ГМ-КСФ

GM-CSFR - гетеродимер, сформированный из 2 субъединиц – а (GM-CSFRa или CD116; м.м. 60-80 килодальтон) и р (GM-CSFRpс или CD131; м.м.120-140 килодальтон), разделенный с IL-3 и рецепторами IL-5 [136]. Обе субъединицы – тип I: трансмембранный гликопротеин, структурно характеризующийся присутствием модулей соответствия рецептора цитокина, состоит из двух областей фибронектина тип III [97, 203]. GM-CSFRa связывается со своим лигандом с низкой аффинностью ($KD = 0.2-100$ нмоль), но при выраженной близости GM-CSFRa со второй субъединицей GM-CSFRpс значительно увеличивается степень связывания до $KD = 100$ нмоль [97, 203]. Восемь конформационных вариантов были описаны для GM-CSFRa, но только два изомера биологически важны для его трансдукционного эффекта, $\alpha-1$ и $\alpha-2$ изоформы, которые содержат трансмембранные и цитоплазматические области, богатые серином и пролином. Важность GM-CSFRa доказана фактом, что полное удаление его цитоплазматической области приводит к отсутствию роста клеток и их дифференцировки. GM-CSFRpс – конститутивная субъединица, представлена на поверхности большой группы клеток [199]. Также как IL-3R и IL-5R, GM-CSFR – экспрессируется на очень низких уровнях, на поверхности гемопоэтических клеток с частотой 100-1 000 молекул на клетку [97, 203]. GM-CSFR также выявляется на гранулоцитах и клетках – предшественниках макрофагов, фетальных клетках, зрелых клетках, таких как нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки, мегакариоциты, плазматические клетки, Т-лимфоциты, эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта, клетки сосудистого эндотелия, астроциты, олигодендроциты и клетках микроглии [115, 145, 171].

1.4 – Взаимодействия на уровне белок/клетка (GM-CSF/GM-CSFR)

GM-CSF в состоянии связать GM-CSFR α в отсутствие GM-CSFR β , но гетеродимеризация с обеими субъединицами требуется для внутриклеточной трансдукции сигнала. Активация GM-CSFR происходит согласно общим правилам для рецепторов, а именно, в результате активации происходит димеризация и трансфосфорилирование остатков тирозина в рецепторе цитоплазмы. У GM-CSFR нет внутренней активности тирозинкиназы. Вместо этого требуется ассоциация GM-CSFR β с Jak-2 для трансфосфорилирования GM-CSFR β , включая две цепи β рецептора близко к цитоплазматическому региону [196]. Кристаллографические исследования показали, что GM-CSFR β фактически гомодимер, но его цитоплазматические области вполне отделены (120 Å), что делает трансфосфорилирование достаточно трудным [97, 171, 196, 203].

У комплекса GM-CSF/GM-CSFR была описана уникальная третичная структура. Для активации рецептора необходима скоординированная додекаэдрная структура. Взаимосвязь между GM-CSF и GM-CSFR включает три места взаимодействия. Первое взаимодействие между GM-CSF и GM-CSFR α , второе – между GM-CSF и двумя областями двух различных молекул GM-CSFR β , и третье – стабилизирующееся место, сформированное между GM-CSFR α и GM-CSFR β . Эти три комбинации способствуют тому, что формирование более высокого додекаэдр-комплекса, составленного двумя гексамерными комплексами, связанными четвертым местом взаимодействия. Антитела и мутации, направленные против четвертого места взаимодействия значительно уменьшают трансдукцию GM-CSF и вызывают потерю додекаэдрного комплекса [97, 203]. Эти взаимодействия, которые только наблюдаются в GM-CSFR, объясняют трансфосфорилирование GM-CSF/GM-CSFR, где Jak-2 связана с бета цепью, а додекаэдрная сложная структура перемещает более близкие две GM-CSFR β , на расстоянии 10Å,

инициирующая развитие трансфосфорилирования и активацию последующих сигнальных путей [97, 203].

1.5 – Трансляция сигналов ГМ-КСФ

Трансдукция GM-CSFR подобна активации, характерной для семейства регуляции интерферонов. Связывание GM-CSF с его рецептором приводит к активации киназ семьи Jak, которые преобразуют сигнал фосфорилата и активирует транскрипцию (STAT5-Bcl-2), которые мигрируют к ядру и связывают определенные элементы ДНК, направляющие транскрипцию определенных генов, активирующих уже собственно клеточную дифференцировку. GM-CSF вызывает пролиферацию клеток, главным образом, активацией и передачей сигналов киназы белка С, предотвращая некроз клеток киназой фосфатидилинозитол 3 и передачей сигналов Jak /STAT5-Bcl-2. GM-CSF вызывает активацию и стимуляцию ответов активированными митогеном киназ белка (MAPK) и активацию NFκB [135, 199].

GM-CSF стимулирует функции нейтрофилов и альвеолярных макрофагов. На этих клетках увеличивается экспрессия Толл-рецепторов (TLR4) и усиливается активность – NFκB. GM-CSF регулирует экспрессию TLR2 и TLR4 в нейтрофилах и TLR2 в моноцитах. Кроме того, GM-CSF вызывает секрецию IL-12 и ФНО-α и увеличивает секрецию моноцитами хемоаттрактантного белка MCP-1, Jak2-STAT5, являющимися сильным хемоаттрактантами для моноцитов и нейтрофилов [102, 173]. Недавно был описан специфический сигнальный путь для стимулирования классического фенотипа моноцитов (M0 или M1) и стимулирующего дендритные клетки (DC). Подобный SRC белок адаптера (SLAP) функционирует как отрицательный регулятор для созревания DC, вызванного GM-CSF. Потребность в действии SLAP предлагает определенный порог для правильной стимуляции GM-CSF для моноцитов и DC и их созревания [202].

Закрепление GM-CSF с GM-CSFR α вызывает большинство внутриклеточных сигналов, которые вызывают активацию, выживание клетки, дифференцировку и быстрое увеличение в количестве моноцитов и гранулоцитов. С-комплект и GM-CSFR α – известные маркеры гемопоэтической дифференцировки клеток. Стволовые гемопоэтические клетки регулируют С-комплект и GM-CSFR α , когда они запускают пролиферацию и дифференцировку гранулоцитов/макрофагов [90, 107]. У GM-CSFR α есть две изоформы. Стимуляция GM-CSFR α 1- изоформы вызывает увеличенную процессию CD86 и белков поверхности клеток, и это может также вызвать интенсивное фосфорилирование Jak-2 [105]. У изоформы GM-CSFR α 2 есть другая цитоплазматическая область, но она создается с GM-CSFR α 1 и в результате действует таким же образом, как и GM-CSFR α 1 [70]. В работе также обсуждаются другие изоформы обеих субъединиц, полученные из альтернативы mRNA соединений, но их функции пока не понятны [144, 163].

GM-CSF – мощный хемотаксический и хемокинетический фактор для человеческих нейтрофилов. Вызванный им хемотаксис – не зависит от времени и специфически нейтрализуется антителами к лиганду или его рецептору. Средняя действующая концентрация (EC₅₀) составляет 0,9 пикомолей; максимальный эффект вызывает доза 7 пикомолей. GM-CSF также вызывает быстрое увеличение полимеризации F-актина и образование местных контактных колец в нейтрофилах, предшествующих клеточной миграции [132].

Механизм GM-CSF-вызванного хемотаксиса реализуется через сигнальные молекулы, в частности, – рибосомальную p70B6-киназу и ее активность. Вследствие активации дифференцировки и пролиферации дендритных клеток – СБЦС(+) GM-CSF стимулирует развитие протективного иммунитета, в частности, противоракового [130].

Анализировали также активирующее иммунный ответ воздействие основных противовоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1, G-CSF, в

сравнении с GM-CSF. Главным этапом этого воздействия является активация p47(фокс), фосфорилирование которого – ключевой момент в активации NaDP-H-оксидазы. Авторы установили, что активацию p47 вызывали только TNF-а и GM-CSF, максимум эффекта наступал через 20 минут [204]. Кроме того, активация p47 – общий элемент примирования нейтрофилов молекулами TNF-а и GM-CSF.

Другими авторами показано, что гемопоэтические факторы (GM-CSF и IL- 3) в фактор-зависимых лейкоэмических клетках действуют через IRES- (internal ribosome entry site) – опосредованную трансляцию С-мус; через Р-13К путь [162].

Кроме того, в макрофагах, производных костного мозга, GM-CSF вызывает экспрессию моноцит-хемоаттрактанта-протеина (MCP)-1; матрикс-металлопротеиназы (MMP-12) и аргиназы-1 [106]. Все эти белки участвуют в регуляции ангиогенеза.

Наряду с активацией нейтрофилов GM-CSF, а также G-CSF, TNF-а [77, 204] вызывают деполимеризацию актина через активацию внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK) и/или p38 MAPK-митогенактивируемой протеинкиназы [77].

Показано [185], что GM-CSF вырабатывается моноцитами или гранулярными лимфоцитами с маркерами CD2⁺, CD16⁺ и HLA-DR⁺; но не Т-лимфоцитами. Экспрессия наступает в течение 24 часов после стимуляции клеток-предшественников, в культуральной жидкости GM-CSF определяется со 2 по 7 день.

Главной функцией GM-CSF на клеточном уровне является стимуляция дифференцировки и пролиферации гемопоэтических предшественников, а также созревания клеток [15, 76, 189]. Важность именно GM-CSF для гемопоэза подтверждается блокадой (*in vitro*) развития гемопоэтических предшественников антителами к белку GM-CSF [15]. GM-CSF, а также INF-а вызывают генерацию дендритных клеток из моноцитов периферической крови [99].

Эти же цитокины включают ВИЧ-специфический CD8-Т-клеточный ответ. Активирующее влияние GM-CSF на гемопоэз и, соответственно, иммунитет, реализуется, главным образом, при инфекционных и иных воспалительных процессах [15, 76, 77, 189].

В этом процессе участвуют NK-клетки, несущие рецепторы к GM-CSF, которые также способны к выработке этого цитокина. На клеточном уровне протективная роль GM-CSF при микробной инвазии проявляется в значительном усилении бактерицидности полиморфноядерных нейтрофилов.

Участвует GM-CSF и в реализации противоопухолевого иммунитета, главным образом, через стимуляцию NK-клеток, способных лизировать опухолевые клетки [15].

Противовоспалительная роль GM-CSF, в том числе при развитии противомикробного иммунного ответа опосредуется через увеличение экспрессии ключевых молекул класса II главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) – трансактиватора класса II; увеличение CD86 и CD40, но не дифференцировочных маркеров [189].

Главенствующей ролью GM-CSF в иерархии цитокинов (наряду с IL-1 и TNF) определяется его терапевтическое, лечебное применение, а также использование в диагностических системах *in vitro*, как ростового фактора с последующей индукцией дифференцировки. К нему чувствительны моноциты, миелоцитарные и промиелоцитарные лейкемические клеточные линии а также MPD – миелопролиферативная disorder cell линия [132].

1.6 – ГМ-КСФ и его клинические применение как гематопоетина

GM-CSF – фактор роста, наиболее экстенсивно, используемый в качестве гематопоетина в клинической практике. rhGM-CSF произведенный из модифицированной культуры *S. cerevisiae*, и его называют sargramostim или Leukine® (фармацевтические препараты Bayer Health Care, США). Его последовательность аминокислот идентична эндогенной человеческой GM-

CSF, за исключением лейцина вместо пролина в 23-м положении и различных гликозилированных окончаний. Степень гликозилирования затрагивает биологическую активность, антигенность, токсичность и фармакокинетику. Используются также рекомбинантный rhGM-CSF полученный из *E. coli*, называющийся molgramostim (Лаборатория Zenotech, Индия), а полученный из клеток яичника китайского хомячка называющийся regramostim (Len – ospharma Лаборатория, Китай) [83]. Sargramostim может помочь предотвратить инфекции, стимулировать функцию иммунцитов. Это – единственный фактор роста, одобренный в США для лечения пожилых людей с AML, после химиотерапии, чтобы сократить время восстановления нейтрофилов и уменьшить заболеваемость опасными для жизни инфекциями [83, 163]. Sargramostim также одобрен в США для миелоидного восстановления после аллогенной пересадки костного мозга, сингенной пересадки костного мозга или пересадки стволовых клеток периферической крови. Кроме того, sargramostim также одобрен для мобилизации стволовых клеток периферической крови, при неудачах пересадки костного мозга и задержке восстановления кроветворения [163, 181].

1.7 – Фармакокинетика и фармакодинамика rhGM-CSF

Когда sargramostim вводят пациентам внутривенным вливанием в течение 2 ч, в результате достигается средней период полужизни препарата приблизительно 60 минут. Пик концентрации GM-CSF наблюдается в образцах крови, полученных во время или немедленно после завершения вливания sargramostim, в то время как незначительные концентрации все еще обнаружены в крови через 6 ч от начала введения [83, 163]. GM-CSF также обнаружена в сыворотке после 15 минут подкожной инъекции sargramostim здоровым волонтерам. Затем средний полураспад препарата составляет приблизительно 162 минуты, и пиковые уровни достигаются после одной инъекции через 3ч и обнаруживаются в течение максимум 6ч.

Парентеральное введение rhGM-CSF изменяет кинетику миелоидных клеток - предшественников в костном мозгу, ускоряет вход их в клеточный цикл и уменьшает время клеточного цикла. Эти эффекты обратимы, как только введение препарата прекращается. Однако число мобилизованных клеток-предшественников, которые появляются в периферической крови GM-CSF, в 10 раз ниже, чем после введения G-CSF [140, 161].

1.8 - rhGM-CSF и rhG-CSF и лейкопения

Введение rhGM-CSF приводит к не выраженному увеличению числа периферических нейтрофилов и циркулирующих моноцитов. Это в настоящее время обозначается как лечение второй линии пациентов с тяжелой нейтропенией [83, 176]. rhGM-CSF также вызывает умеренное увеличение числа циркулирующих эозинофилов и базофилов, но при этом увеличивает фагоцитарную функцию нейтрофилов. Filgrastim (rhG-CSF) и pegfilgrastim (pegylat-редактор rhG-CSF) в настоящее время одобряются FDA для профилактики вызванной химиотерапией нейтропении [83, 89, 168].

Терапевтическое применение rhGM-CSF для лейкопении могло быть завышено. В то же время, при нарушении структуры и регуляции генов цитокинов, включая GM-CSF, могут появляться стимуляторы пролиферации опухолей. Гены GM-CSF, M-CSF и IL-3, расположенные на пятой хромосоме, вовлекаются в процесс аберрации этой хромосомы у больных острым миелолейкозом [15].

Описана спонтанная продукция GM-CSF В-лимфоцитами человека, трансформированными вирусом Эпштейна-Барр [15]. В опухолевых клетках при остром миелолейкозе в 11 из 22 случаев находят М-РНК GM-CSF. А цитомегаловирусная инфекция снижает продукцию GM-CSF сосудистыми эндотелиальными клетками [15].

Рекомбинантные GM-CSF и G-CSF применяют при лечении заболеваний крови, опухолевых процессов, а также для изоляции

предшественников из периферической крови для трансплантации [76]. Поскольку GM-CSF стимулирует гемопоэз, то он используется при противоопухолевой химиотерапии, в частности, лимфом, защищая пациента от инфекций [15].

При комплексном лечении опухолей используется и радиопротекторное действие GM-CSF. В то же время при остром миелоидном лейкозе GM-CSF может вызвать усиление процесса малигнизации [15]. Влияние GM-CSF на полиморфонуклеары может быть использовано для управления апоптозом и, соответственно, процессом воспаления [15]. В сходных случаях, а также при избыточном воспалении, возможно терапевтическое применение антител к цитокинам, в том числе и к GM-CSF [15]. В сочетании с эритропоэтином GM-CSF применяется при лечении миелодиспластического синдрома [15]. Наряду с другими цитокинами GM-CSF можно применять и местно [15].

Известно и о применении индукторов колониестимулирующих факторов, например, лейстродаксина «В» [15]. При применении рекомбинантного человеческого GM-CSF, как лечебного средства могут быть осложнения - снижение альбумина в плазме, задержка жидкости, синдром «просачивания» капилляров, уменьшение протромбинового времени [15].

1.9 – Роль ГМ-КСФ при воспалении

Вклад GM-CSF в воспаление был оценен *in vitro*. rhGM-CSF вызывает более длительное выживание моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, увеличивает сумму провоспалительных цитокинов, освобожденных этими клетками, и способствует устранению болезнетворных микроорганизмов и опухолей [108, 109]. Макрофаги более эффективно стимулируются вторичными стимулами, такими как LP и IFN- γ , когда они первоначально стимулируются GM-CSF. Внутривенное введение GM-CSF вызывает сильную миграцию человеческих макрофагов, и тогда человеческие и

крысиные моноциты показывают более высокий провоспалительный ответ, когда они стимулируются GM-CSF и затем повторно стимулируются [146, 197].

Одна из самых интересных особенностей GM-CSF наблюдалась у пациентов с синдромом Фелти (ревматоидный артрит, спленомегалия и нейтропения), которые получали rhGM-CSF. На фоне его применения артрит усиливался [96]. Кроме того, у пациентов с ревматоидным артритом (РА) также отмечалось усиление признаков артрита, когда им проводили введение rhGM-CSF после химиотерапии [119]. Также, увеличение признаков активации РА после введения ГМ-КСФ может быть воспроизведено в экспериментальных моделях [114, 131]. С другой стороны, введение препарата Mavrilimumab (человеческой моноклональные антитела к GM-CSFRa), вызывают быстрый и выраженный ответ, проявляющийся в снижении активности РА [110].

1.10 – Активация и регулирование иммунной системы и ГМ-КСФ

GM-CSF стимулирует экспрессию молекул адгезии, IgGFcR и активирует рецепторы на нейтрофилах, увеличивая их ответ на хемотаксические факторы, фагоцитоз, синтез лейкотриена В₄, арахидоновой кислоты и активацию выброса супероксид аниона. Кроме того, GM - CSF увеличивает выживание нейтрофилов и усиливает экспрессию МНС-II, позволяющую им активировать ответ Т-клеток на суперантигены [78, 116].

Альвеолярные макрофаги под воздействием GM-CSF активируют структурные и функциональные процессы репарации паренхимы, которые важны для гомеостаза [142]. Различные внеклеточные сигналы могут объединяться, чтобы развивать легочные фенотипы макрофагов, во время воспаления легких. Так TNF-а, секретируемый активированными альвеолярными макрофагами, вызывает увеличение продукции GM-CSF эпителиальными клетками, в результате чего начинается активное ускорение

увеличения числа альвеолярных клеток, что быстрее восстанавливает альвеолярную барьерную функцию [166]. Тип II пневмоциты имеют значительное количество рецепторов (GM-CSFR α и GM-CSFR β). Это означает, что тип II пневмоциты, активируясь GM-CSF, способны уходить в трансдифференцировку в тип I пневмоциты, происходящую в ответ на острое повреждение [142, 166].

GM-CSF регулирует активацию пути транскрипционного фактора киназы-STAT5 Jak, вызывая стимуляцию интерферонового регуляторного фактора 5 (IRF5). Высокое увеличение IRF5 GM-CSF или IFN- γ приводит к активации макрофагов M1 M0. Действия IRF5 вместе с RelA (белок NF κ B) стимулирование экспрессии гена TNF- α и IRF5 запрещают транскрипцию IL-10 и стимулируют продукцию IFN- γ [158]. Напротив, когда M-CSF преобладает, IRF4, вызывая активацию макрофагов с фенотипом M2 M0. Несколько типов клеток, включая фибробласты, эндотелиальные клетки, стромальные клетки и остеобласты, конститутивно производят M-CSF. Есть данные, установившие, что активация M-CSF, поворачивает M0 к формированию фенотипа M2 IRF4, вероятно, уравнивая провоспалительный эффект, связанный с увеличением продукции IL-12, IL-6 и IL-23, которые активируются в ответ на воздействие GM-CSF-стимуляции M0 [142, 158].

У GM-CSF есть важная роль в активации дендритных клеток (DC). При стимуляции GM-CSF DC, последние приобретают выраженную способность к антигенной презентации, формируя решающее хранилище профессиональных антиген представляющих клеток (APC). В типе 1 дифференцирования DC, стимулирование и активация STAT5 постепенно увеличиваются при активации GM-CSF во время ранней стадии развития DC. Параллельно, pSTAT активация этих клеток приводит к накоплению цитоплазматического цитокина в индуцибельной SH2-области (CISH) белок, на более поздней стадии дифференцировки DC [91]. Когда пороговая концентрация CISH достигнута, CISH запрещает фосфорилирование GM-

CSF-медиаторов STAT5, вызывая его дифференцировку по сильному типу 1 DC, выражено активируя экспрессию молекул класса I MHC. Таким образом, CISH может действовать как молекулярный выключатель от стадии прародителя DC до незрелого DC и контрольного пункта для цитостатической активации Т-лимфоцитов [91].

GM-CSF – цитокин DC-активации, вызывающий выраженную дифференцировку клеток типа Th1. GM-CSF увеличивает окислительный метаболизм, цитотоксичность и антителозависимый фагоцитоз [83, 145]. Человеческие моноциты и моноциты-предшественники, DC относятся к клеткам, которые при воздействии GM-CSF увеличивают экспрессию MHC-II, CD80, CD86 и CD40, тем самым увеличивая иммунную реакцию против антибактериальных антигенов [167, 189]. С другой стороны, GM-CSF вызывает усиление толерантности матери к плоду во время беременности на ранних ее сроках [125], GM-CSF направляет DC от центральной нервной системы (CNS) к запрещающему фенотипу. Напротив, у DC, активированной GM-CSF при попадании с периферии в ткань ЦНС, есть фенотип, который был связан с патогенезом аутоиммунного энцефаломиелита [150].

1.11 – Применение ГМ-КСФ в терапии различных заболеваний в эксперименте и клинике

GM-CSF-дефицитные мыши КО более восприимчивы, чем мыши дикого типа, к нескольким инфекциям и воспалению кишечника [111]. Принимая во внимание то, что продукция GM-CSF необходима, чтобы поддержать полностью функциональную врожденную устойчивость кишечника и облегчить рекрутацию и выживание DC кишечника, отсутствие GM-CSF может быть связано с иммунодефицитом, связанным с болезнью Крона [124]. Мутации во внутриклеточном рецепторе распознавания образов NOD2, также известным как белок воспалительного заболевания кишечника 1, были выявлены у пациентов с болезнью Крона. Эти пациенты секретируют

нормальные уровни ФНО- α , но они не секретируют достаточно GM-CSF [205]. Многоцентровые рандомизированные клинические исследования продемонстрировали, что подкожное введение GM-CSF вызывает манифестацию болезни Крона [190, 195].

На макроуровне GM-CSF играет важную роль в лёгочном гомеостазе с эффектами на альвеолярные макрофаги и эпителий. Чтобы доказать это, обычных мышей и трансгенных, с гиперпродукцией GM-CSF клетками эпителия лёгких, поместили в атмосферу с 95 % кислорода. Через 6 дней все дикие животные погибли, 70% мутантов жили и после 10 дней. Авторы предположили, что протективный эффект GM-CSF реализовался за счет снижения апоптоза клеток эпителия и сохранения барьера [207].

Еще один макроуровневый эксперимент продемонстрировал возможности GM-CSF в сочетании с трансформирующим ростовым фактором TGF- β 1 вызывать ангиогенез в ишемической модели при перевязке бедренной артерии [106], а в режиме моноприменения - дифференцировку печеночных предшественников в клетки островков Лангерганса [117].

РАР – другая болезнь, при которой секреция GM-CSF релевативна. РАР – смертельное заболевание легких, характеризуемое нарушением дыхания, с вторичным повреждением АМ0, отклонениям в иммунитете хозяина и накоплением белков сурфактанта [186]. Аутоантитела против GM-CSF и против GM-CSFR α или цепи РС были выявлены у пациентов с РАР [186]. Ингаляция rhGM-CSF помогает пациентам с РАР, и генотерапия с GM-CSFR ρ с с использованием кодирования вектора показала эффективность в результатах доклинических испытаний [120, 152].

GM-CSF и TNF были также исследованы у больных с различными хроническими воспалительными заболеваниями, показано, что эти цитокины влияют на функцию циркулирующих нейтрофилов и на воспаление в тканях [126].

Была показана роль GM-CSF при его применении при сепсисе [201]. Было также показано противовоспалительное действие GM-CSF на активность эндотелиальных клеток при хронической венозной недостаточности [123].

Учитывая иммуностимулирующее действие GM-CSF, доступность рекомбинантного белка, относительно давно применяемого, как лекарственного препарата для людей, GM-CSF может входить и уже входит в состав вакцин для людей, пока только противоопухолевых [92, 113, 130, 191, 192].

Недавние клинические данные показали, что стимуляция GM-CSF может увеличить иммунную реакцию на опухоли. Первая FDA одобрила вакцину против опухолей (Sipuleucel-T; Provenge®), индивидуально сделанную на заказ и основанную на вакцине DC, которая включает использование ключевого антигена рака простаты и GM-CSF, чтобы активировать DC *in vivo*, которая за счет активации DC стимулирует Т-цитотоксические клетки, разрушающие клетки опухоли простаты [153]. Другой подход терапии должен был уменьшить поднятые уровни продукции фактора роста (TGF)-p2, который часто связывают с иммуносупрессией у больных раком. Одновременно с регуляцией уровня TGF-p2 и введение плазмиды с GM-CSF и вакцины против рака, предназначены, чтобы увеличить взятые у той же особи лейкоциты для распознавания клеток опухоли [183]. Третий тип в настоящее время находится в клиническом испытании фазы III, чтобы оценить результаты введения GM-CSF вместе с IL-12 в аллогенных раковых клетках как лечение рака легких [84, 143]. Этот вид терапии может быть также эффективным против рака ободочной и прямой кишки, метастатической карциномы клетки почечного эпителия и аденокарциномы поджелудочной железы [71, 74, 184].

Например, описано применение с положительным результатом (депрессия опухоли) комплексной вакцины от рака легкого [141]. Вакцина содержит опухолевые клетки, включающие геном GM-CSF; липосомальный

МИС-1 пептид; антиидиотипические антитела к CD₃, Magl-3 пептидам и мутантные по p53 дендритные клетки.

Другая противоопухолевая вакцина включала плазмидную ДНК, кодирующую белки ГКГС класса I и класса II. Крысам вводили ДНК опухолевых белков с растворимыми GM-CSF или ИЛ-12. Отметили продукцию специфических цитотоксических Т-лимфоцитов. Предложена дозировка GM-CSF, как адьюванта, в составе вакцин - 1×10^{-7} ед/мг - 1×10^{-5} ед/мг [15].

Экспериментальные исследования GM-CSF кодирования аденовируса вместе с аденовирусом, кодирующим p16 ген-супрессор опухоли, вызывает сильный ответ против опухоли, увеличивая стимуляцию МНС I молекул и цитостатическую активность CD8 Т-клеток [79]. Кроме того, применение терапевтических вакцин с плазмидами, кодирующими GM-CSF и антигены опухоли, увеличивает антигенность противоопухолевого ответа IgG антител, а также IFN- γ и производство IL-6 [93, 157]. Другой интересной стратегией, все еще в экспериментальной фазе, является объединение аппликации с онко-аденовирусом, введение IL-12 и GM-CSF с радиотерапией, чтобы подавить первичную гепатокарциному у мышей [73].

В условиях *in vitro* и *in vivo* деятельность микробоцидных нейтрофилов и M0 усиливается под действием GM-CSF. GM-CSF также предотвращает эффект иммунодепрессанта дексаметазона, позволяя эффективно усилить ответ против *Aspergillus fumigatus hyphae* [128]. Предварительная инкубация нейтрофилов с GM-CSF увеличивает фунгицидную активность против *Candida glabrata* и *Histoplasma capsulatum* [83, 129, 178]. Но, несмотря на это, нет никаких текущих клинических испытаний, которые сосредотачиваются на эффекте GM-CSF как помощника для лечения против агрессивных грибковых болезней. Есть также отчеты о GM-CSF антибактериальном действии его у иммунодефицитных пациентов. Введение GM-CSF усиливает *in vivo* у нейтрофилов антибактериальную активность против *S. aureus* у детей с ВИЧ-инфекцией [148]. Использование GM-CSF с

гематопоезическими стволовыми клетками при пересадке пациентам, уменьшает заболеваемость бактериальными инфекциями и уменьшает связанные с инфекцией время госпитализации [182]. Введение GM-CSF защищают мышей от летальной пневмококковой пневмонии и хламидии трахоматис [127, 164, 165]. В пробирке исследования продемонстрировали, что человеческие M0 стимулированные с GM-CSF увеличивают антимикробный ответ против туберкулеза M [100]. Мыши КО (дефектные по GM-CSF) высоко чувствительны к микобактериальным инфекциям, которые вызывают интрабронхиальные и внутриальвеолярные повреждения без формирования гранулем, которые обычно выявляются у контрольных мышей дикого типа [187]. GM-CSF защищает альвеолярную структуру и регулирует раннюю рекутацию M0 и DC, которые помогают управлять ростом микобактерий посредством формирования гранулем [133]. У мышей активация GM-CSF генотерапией выявило усиление защиты для манифестации скрытого туберкулеза и они избегают заражения высокотоксичным штаммом *M. tuberculosis* [147].

Введение GM-CSF инфицированным пациентам не приводило к благоприятным результатам. GM-CSF мягко увеличивает число циркулирующих нейтрофилов у младенцев маленького возраста, но не улучшает выживание новорожденных при сепсисе [75]. Кроме того, продукция GM-CSF отрицательно коррелирует с выживанием при септическом шоке [175]. Чрезвычайно большие дозы GM-CSF могут оказать негативное влияние у больных с обширными повреждениями и увеличенным уровнем цитокинов и других провоспалительных посредников, которые не сконцентрированы в местах инфекции, могут приводить к гибели Т клеток и M0, снижению накопления M0, слепоте и серьезным повреждениям различных тканей [104, 206].

1.12 – Профилактические вакцины при инфекционных заболеваниях, основанные на дополнительном использовании ГМ-КСФ

Вспомогательная роль GM-CSF в профилактических вакцинах против инфекционных заболеваний была оценена в преклинических испытаниях. Вакцины, основанные на рекомбинантных векторах, кодирующих микобактериальные антигены или вакцины, основанные на рекомбинантном BCG, показали эффективность в экспериментальных моделях туберкулеза. Использование GM-CSF как помощника улучшает защиту от распространенной инфекции, увеличивающей число APC, а также производство IL-12, IFN- γ , антител и цитостатического [149, 155, 156, 170, 209]. Введение рекомбинантного вируса бешенства, кодирующего GM-CSF, предотвращает развитие экспериментального бешенства после заражения вирусом дикого типа [154]. Подобный вариант GM-CSF комбинации с ДНК вакцины против *Clostridium botulinum* показала защиту при заражении клостридиями [112]. GM-CSF также является объектом оценки его эффективности как нового инструмента для лечения туберкулеза, аспергиллеза, кандидоза и гриппа [137, 138, 151].

GM-CSF может вызвать смерть клетки опухоли из-за активации циркулирующих моноцитов. Это и его другие иммуномодулирующие свойства в настоящее время применяются посредством его введения как помощника вакцин против рака простаты, и он также является объектом оценки в клинических испытаниях при лечении меланом. Девятьсот шестьдесят восемь исследований были связаны с «sargramostim» или «GM-CSF» на clinicaltrials.gov странице в октябре 2013. Актуальнейшие исследования анализируют полноценность GM-CSF при гематологических расстройствах и раке как вспомогательная терапия. Кроме того, GM-CSF также в настоящее время оценивается как помощник для профилактических вакцин против ВИЧ, сепсиса, периодонтита и болезни Крона. Все эти

исследования показывают потенциальные клинические применения GM-CSF, которые могут мотивировать фармацевтические компании к исследованию иммунорегуляторных и защитных эффектов этого цитокина при множестве болезней [122, 134].

Большинство авторов (и мы вместе с ними) считают, что при терапевтическом применении дозы цитокинов должны быть физиологичными, то есть низкими. Например, IL-2 в дозе 30000Ед вызывает длительную стимуляцию экспрессии генов IL-2, INF- γ и GM-CSF. В высоких дозах IL-1b, GM-CSF и другие – высокотоксичны [15].

На основании вышеизложенного, можно заключить, что GM-CSF является одним из ключевых цитокинов, играющих важную роль в развитии протективного иммунитета при инфицировании организма.

Кроме того, GM-CSF участвует в реализации противоопухолевого иммунитета, инициируя пролиферацию и дифференцировку соответствующих пулов клеток.

1.13 – Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ

В 90 годах коллективом авторов [18, 19, 25, 52, 54, 61] из активного центра GM-CSF были получены синтетические пептиды, обладающие активностью сходной цельной молекулы GM-CSF. Все это позволило создать основу для дальнейшего анализа иммунобиологических свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) относится к так называемым "ранним" цитокинам, эффективно применяемым в настоящее время, большей частью в онкологии и инфектологии. Существенным недостатком природного GM-CSF является сложность технологии выделения и очистки, опасность контаминации нативного сырья вирусами, дороговизна производства. Цельная молекула

гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора не обладает достаточной селективностью действия: помимо специфических рецепторов, отвечающих за пролиферацию клеток, она вовлекает в активацию и другие рецепторы, способные модифицировать ответ полипотентных клеток в сторону снижения или увеличения колониобразования. Получение синтетической низкомолекулярной молекулы белка, являющейся фрагментом GM-CSF, значительно менее дорогостоящее, чем получение нативного GM-CSF из стимулированных фитогемагглютинином лейкоцитов костного мозга. В то же время чистота получаемого целевого продукта неизмеримо выше по сравнению с рекомбинантным GM-CSF, что определяется технологией получения синтетического пептида. Следует отметить, что синтезированные пептиды и нативный GM-CSF оказывают аналогичное действие в сопоставимых концентрациях *in vitro*. Однако весового количества пептидов требуется на порядок меньше – молекулярная масса GM-CSF 15000 дальтон, предлагаемых пептидов ~ 1100-1500 дальтон.

Авторами была определена структура и затем синтезирован пептид, воспроизводящий последовательность природного белка GM-CSF. Точнее была синтезирована группа пептидов, однако лишь препарат с определённой последовательностью оказался активным. В соответствии с патентом РФ № 20 61699 [52] предложено использовать для культивирования предшественников гранулоцитов и макрофагов низкомолекулярные синтетические пептиды с молекулярной массой ~1100-1500 дальтон следующей структуры: LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO или THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO.

Более высокомолекулярные полипептиды отличаются от более коротких тем, что они дополнительно содержат аминокислотные остатки из группы лизин-глицин-пролин-лейцин в последовательности от одного до четырех, вплоть до полипептида по формуле LYS GLY PRO LEY THR NLE

NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO. Причём, полипептидная цепь содержит не менее одиннадцати аминокислотных остатков, начиная с любого из данной последовательности. Синтезированные пептиды воспроизводят фрагменты структуры природного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. Их использование позволяет стимулировать дифференцировку клеток через специфические рецепторы к GM-CSF, не затрагивая другие рецепторы поверхности клеток, что связано с минимальной величиной молекулярной массы пептида. Следовательно, пептиды GM-CSF обладают повышенной избирательностью действия по сравнению с полной молекулой GM-CSF.

Как показали проведённые исследования, пептиды оказывают на культивируемые клетки действие, аналогичное действию цельной молекулы GM-CSF, что и позволило предложить их в качестве средства для культивирования предшественников гранулоцитов и макрофагов [54, 61]. Однако трудно было предположить, что синтетический пептид, по молекулярной массе составляющий лишь 1/10 часть полной молекулы GM-CSF, будет обладать ярко выраженными свойствами, присущими природному GM-CSF. Тем более, что в организме человека синтезированные пептиды не определяются в виде активной биологической субстанции, и расщепление по стандартным точкам действия протеолитических ферментов не выщепляет данную структуру.

Но, в тоже время, действие пептидов на кластеро- и колониобразование клеток крови, исследованное авторами в двух моделях (культивирование в диффузионных камерах *"in vivo"*, культивирование *"in vitro"* в агарозных культурах на планшетах) показало, что данные пептиды практически идентичны по действию как и цельная молекула ГМ-КСФ. Что указало на несомненную перспективу дальнейших исследований данных структур.

В дальнейшем исследования активности синтетического пептида активного центра GM-CSF были продолжены в ИИФ УрО РАН [1, 4, 10, 12,

13, 20, 23, 29, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 57, 59, 60, 63], где были выявлены у пептида в формуле LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO антибактериальные (на грамположительные бактерии), иммуотропные (стимуляция гранулоцитопоза, активности лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов и др.), а также выраженные репарационные свойства.

Таким образом, GM-CSF является мультипотентным ростовым фактором, широко применяющемся в клинике, обладающим выраженным плеiotропным действием в отношении широкой группы клеток как иммунной системы, так клеток других тканей и органов, что, с одной стороны, в некоторых случаях осложняет его применение (о чем говорят данные, о неоднозначных эффектах препарата при исследованиях в клиниках при сепсисе, аутоиммунных заболеваниях, при лечении нейтропений и т.д.), а с другой стороны, наоборот, открывает более широкую перспективу для расширения его применения.

Одновременно полученные данные о синтетическом препарате из активного центра GM-CSF открывают совершенно новое направление исследований, изучение механизмов действия синтетических пептидов (гомологичных основной молекуле цитокинов и их активных центров), которое позволит во многом исключить побочные эффекты цельной молекулы. В настоящее время для синтетического пептида активного центра GM-CSF остаются не исследованными очень многие вопросы, включая такие как: оценка его иммуотропных эффектов на различные группы клеток, влияние на функции фагоцитов, прямое и опосредованное действие на бактерии и, в первую очередь, на грамотрицательные бактерии. В то же время исследования в этом направлении позволят создавать новые лекарственные препараты с плеiotропными свойствами, имеющие гораздо менее выраженные побочные эффекты с понятным механизмом действия на основе синтетических активных центров природных цитокинов, имеющим четкий механизм действия, связанный с активацией рецептора к GM-CSF.

Именно этому направлению исследований и посвящена данная исследовательская работа.

ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей главе нами представлены основные лабораторные и вспомогательные методы исследования для оценки иммуностропных и антибактериальных действий синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2. 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 изолятов *Staphylococcus aureus* и 71 клиническом изоляте грамотрицательных микроорганизмов разных видов (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*). Все исследования выполнялись согласно 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, иммуностропных и анаболических препаратов и наличие информированного согласия на использование биологического материала в научных целях.

2.1 – Синтез пептидов

Нами была применена 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* с использованием N α -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 S_N1/S_N2 механизмам в присутствии скавенджеров. 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 GM-CSF:

- ZP 1- LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO

- ZP 2 -THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO

с м.м. 1794 и 1397 дальтон.

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

2.2 – Методы оценки иммуотропной активности синтетических пептидов ГМ-КСФ

2.2.1 – Оценка пролиферативной активности

Одной из наиболее часто применяющихся сегодня методик оценки пролиферативной активности лейкоцитов, является реакция бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ). РБТЛ оценивали методом проточной цитометрии [38].

Исследовали пролиферативное действие полученных синтетических пептидов: ZP 1- LYS GLY PRO LEY THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO и ZP 2 -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.

В качестве сравниваемого материала также было использовано вещество, полученное из супернатантов клеток CD34⁺CD45^{din} и коммерческие дефенсин LL37 и кателицидин HNP [21].

2.2.2 – Оценка апоптоза моноцитов

Объект исследования

В качестве объектов исследования были выбраны клетки суспензионные культуры ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека). Культивирование клеток линии ТНР-1 осуществляли с использованием среды RPMI-1640 («Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% инактивированной ЭТС («Биолот», Санкт-Петербург), 50 мкг/мл гентамицина («Биолот», Санкт-Петербург) и 2 мМ L-глутамина («Биолот», Санкт-Петербург). Пересев производили каждые 2-3 дня. Для ведения клеток использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Германия). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5 % CO₂. При постановке экспериментов в лунки 96-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) вносили 200 мкл клеточной суспензии (2×10⁶ клеток в мл) в соответствующей полной культуральной среде. Полученную суспензию клеток использовали для постановки экспериментов, описанных ниже.

В качестве индуктора апоптоза использовали йодацетат – препарат, обладающий способностью блокировать гликолиз и применяемый для создания модели цитотоксической гипоксии *in vitro*. Роль йодацетата в запуске апоптоза связана с подавлением метаболизма клеток, нарушением

процессов синтеза белков и формирование свободных кислородных радикалов в цитоплазме клеток [98]. Более того, йодацетат является мощнейшим ингибитором глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, что, в случае запуска апоптоза клеток в условиях *in vitro*, сопровождается нарушением мембранного потенциала митохондрий, активацией каспазы-3 и продукцией активных форм кислорода [174]. В ходе собственных экспериментов были использованы финальные концентрации йодацетата в 10 и 15 μM . Вещество интереса вносили в финальных концентрациях 10, 20, 100 и 200 мкг/мл (в виде 20х раствора для всех разведений). Также инкубацию клеток осуществляли в присутствии обоих стимуляторов. Время инкубации в присутствии стимуляторов составляло 24 часа при 37°C в атмосфере 5 % CO_2 .

Оценка жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей

Принцип метода. Метод основан одновременно применении двух флуоресцентных красителей – йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия (Idziorek T., et al. 1995). Отличительной особенностью этих веществ, помимо небольшой молекулярной массы (629,3 и 668,4 Да, соответственно), является способность стехиометрическим образом связываться с нуклеиновыми кислотами клетки. Подобного рода взаимодействия сопровождается накоплением красителей в цитоплазме (после взаимодействия с РНК) и в ядре (после взаимодействия с ДНК) клетки и, как следствие, изменением флуоресценции после возбуждения источником света с длиной волны 488 нм. Максимум эмиссии YO-PRO-1 приходится на зеленую часть (около 509 нм), а йодистого пропидия – на красную (около 617 нм) части спектра. Однако существенное различие между данными красителями заключается в способности проникать в клетки, билипидный слой мембраны которых для них является не проницаем. Так, за накопление YO-PRO-1 внутри цитоплазмы отвечают P2RX7 лиганд-зависимые ионные каналы, относящиеся к семейству пуринорецепторов [88, 94]. В живых клетках

накопления YO-PRO-1 не происходит, так как эти каналы не активны или обладают не высокой способностью транспортировать краситель через мембрану. Однако их активация происходит при запуске апоптоза и по времени совпадает с нарушением асимметрии липидного состава поверхностной мембраны, что позволяет рассматривать накопление YO-PRO-1 в клетка в качестве события, характерного для «ранних» стадий апоптоза. Поэтому для выявления различных стадий апоптоза, а не только констатации факта его запуска, помимо YO-PRO-1, клетки дополнительно окрашиваются вторым ДНК-связывающим красителем – йодистым пропидием – обладающим несколько иными свойствами. Йодистый пропидий не имеет каких-либо интегрированных в мембрану специфических переносчиков и может проникать в цитоплазму и ядро только через поврежденные/фрагментированные мембраны, что обычно имеет место на финальных стадиях апоптоза при формировании апоптотических телец или при некрозе клеток. Таким образом, живые клетки в образце не будут окрашиваться ни одним из упомянутых выше красителей. Клетки, вступившие в апоптоз, будут только YO-PRO-1-позитивны, тогда как клетки, находящиеся на более поздних стадиях апоптоза, будут эффективно окрашиваться обоими красителями.

Процедура окрашивания клеток. Более подробно методика описана в статьях 20, 21, 34. Окраску клеток проводили в пробирках для проведения цитометрического учета 12x75 мм («Beckman Coulter», США). Для этого к 100 мкл клеточной суспензии ($2-3 \times 10^6$ клеток/мл) добавляли по 5 мкл 20-кратный рабочий раствор YO-PRO-1 («Invitrogen», США), получая конечную концентрацию красителя равную 250 нМ. Рабочий раствор готовили *ex tempore*, добавляя к 10 мкл стокового раствора (стоковый – 100 мкМ ДМСО, аликвотировали по 10 мкл и хранили при -20°C до использования) 190 мкл ЗФР. После чего в образцы вносили по 10 мкл раствора йодистого пропидия («Sigma-Aldrich», США), получая финальную концентрацию PI равную 1 мкг/мл. Окраску проводили при комнатной температуре в течение 15 минут в

защищенном от света месте. По завершении инкубации к образцам добавляли по 200 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию – интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона хи-квадрат. Результаты выражали в виде % позитивных клеток. Сравнение относительного содержания клеток на различных стадиях апоптоза между экспериментами проводили при помощи t-критерия Стьюдента.

2.2.3 – Оценка миграционной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови на синтетические пептиды активного центра ГМ-КСФ

Для оценки хемотаксиса нейтрофилов периферической крови человека используется метод, предложенный в 1975г. [177], основанный на оценке миграционной активности лейкоцитов под агарозным гелем [164].

Приготовление агарозного геля для проведения хемотаксиса и хемокинеза нейтрофилов. Агарозный гель готовится из двух растворов: Раствор 1 состоит из сыворотки крови человека IV0(AB) Rh– (отр), десятикратного концентрата питательной среды 199, раствора натрия

двууглекислого 7,6 % и дистиллированной воды. Раствор 2 представляет собой 1,64 % раствор агарозы в дистиллированной воде. Раствор 1 инкубируется 30 минут при температуре 37°C. Раствор 2 инкубируется на кипящей водяной бане 10 минут (до полного растворения агарозы). Растворы смешивают. Получается 8 % раствор агарозы, который разливают в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм, на дне которых находятся покровные стекла размером 24×24 мм. Для формирования лунок агарозный гель заливают в чашки Петри через отверстие в стандартном штампе, установленном на покровном стекле. Штамп представляет собой латунный диск диаметром 40 мм и высотой 15 мм. На нижней поверхности штампа располагаются 9 полых стержней с наружным диаметром 2,4 мм. Стержни проходят строго перпендикулярно по перекрещивающимся линиям. При этом один стержень находится в точке пересечения линий, а остальные – полярно по этим линиям. Расстояние между стержнями равно 2,4 мм. Высота стержней строго одинакова и составляет 10 мм. После разливки чашки оставляются со штампами при комнатной температуре на 20 минут для застывания агара. После застывания агара штампы осторожно извлекаются так, чтобы не повредить агар. Чашки Петри помещают в эксикатор, воздух в котором обогащен углекислым газом до 5 %, и выдерживают при температуре 4°C до появления оранжевой окраски агарозного геля (около суток). После этого чашки Петри готовы для проведения опыта.

Приготовление градиента плотности фиколл-верографина

Для приготовления градиентов плотности берут 76 % раствор верографина и готовят из него 36,17% раствор на дистиллированной воде (плотность должна составлять 1,200). Для этого к 20 мл 76 % раствора приливают 20,02 мл дистиллированной воды. Фиколл-400 растворяют в теплой дистиллированной воде и готовят 9 % раствор (плотностью 1,025). Для этого берут 9 г фиколла и 91 мл дистиллированной воды. Соединяют растворы фиколла и верографина. Смеси должны иметь плотность 1,077 и

1,093 г/мл. При необходимости получения стерильной смеси ее фильтруют через бактериальный фильтр.

Выделение лейкоцитов крови. Все процедуры осуществляются в силиконированной или пластиковой посуде. Венозная кровь, взятая в вакуумные пробирки для взятия венозной крови с литий-гепарином [58, 211], смешивается с 6% раствором декстрана Т-500 (на изотоническом растворе хлорида натрия) в соотношении 10:1. Далее кровь отстаивается при температуре 37°C в течение 40 минут. Плазма с лейкоцитами осторожно наслаивается на двойной градиент плотности фиколл-верографина. Плотность нижнего градиента 1,093-1,095, верхнего — 1,075-1,077, объем — по 1,5 мл. Недопустимо перемешивание плазмы с градиентами и градиентов между собой. Плазма с градиентами центрифугируется при 1500 оборотах в минуту в течение 40 минут. По окончании центрифугирования на интерфазе между плазмой и верхним градиентом располагается клеточное кольцо, содержащее 15-20% моноцитов, 10-15% гранулоцитов и 65-75% лимфоцитов. Между градиентами располагается клеточное кольцо на 98-100% состоящее из нейтрофилов. Нижнее кольцо осторожно снимается пастеровской пипеткой, шприцом с катетером для внутривенных инфузий или дозатором и переносится в другую пробирку. Клеточная взвесь отмывается от примеси градиентов питательной средой 199. Для этого в пробирку с клетками добавляют 2,0 мл питательной среды 199 и центрифугируют при 1500 оборотах в минуту в течение 10 минут, после чего надосадочную жидкость сливают. Отмывку повторяют трижды. По окончании отмывания подсчитывается концентрация клеток в камере Горяева и доводится питательной средой 199 до 5×10^7 кл/мл нейтрофилов и до 10^8 кл/мл моноклеаров.

Оценка локомоторной функции нейтрофилов

Из лунок агарозного геля удаляется конденсат. В средние лунки агарозного геля вносится по 10 мкл взвеси нейтрофилов в концентрации 5×10^7 /мл в питательной среде 199. В крайние лунки вносятся

хемоаттрактанты (синтетический пептид ZP2 в концентрациях 10, 30, 100, 300 мкг/мл) по 10 мкл. И взвеси бактерий в дозе 10^7 бактерий/мл. В центральную лунку вносится 10 мкл питательной среды 199. Чашки Петри в эксикаторе, воздух в котором обогащен углекислым газом до 5%, помещаются в термостат при температуре 37°C на 2,5 часа. По истечении времени инкубации в чашки заливается 1000 мл 47% формалина на 30 минут для фиксации клеток к стеклу. После фиксации, агароза осторожно удаляется из чашек, стекла промываются в проточной водопроводной воде и подсушиваются на воздухе при комнатной температуре. Миграционная активность нейтрофилов учитывается при световой микроскопии при увеличении 10×7 с использованием окулярного микрометра. Измеряют две зоны миграции клеток: в сторону хемоаттрактанта (А) и в сторону питательной среды 199 (В). Индекс хемотаксиса представляет собой отношение зоны А к зоне В.

Спонтанная миграция оценивается как среднее арифметическое 4-х зон миграции в контрольной лунке. Индекс хемокинеза оценивается по отношению средних арифметических 4-х зон миграции в опытной лунке после добавления к клеткам синтетического пептида в концентрациях указанных выше по отношению к средней арифметическое 4-х зон миграции в контрольной лунке (спонтанной миграции) [177].

2.2.4 – Метод оценки секреции цитокинов нейтрофилами *in vitro*

Нейтрофилы выделенные на двойном градиенте фиколл-верографина (метод выделения описан нами выше), довели после промывки до концентрации 5×10^6 клеток/мл, и инкубировали в среде RPNI-1640 в течение одного часа при 37°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) и бактерии в соотношении 1: 20 к нейтрофилам (в концентрации 10^8 бактерий /мл).

Влияние данного пептида (в дозе 20 мкг/мл) и бактерий 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- γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF- α , 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 [21].

2.2.5 – Методы оценки антибактериальной активности

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. Посев тестовой культуры микроорганизмов производили общепринятым способом. На подсушенную поверхность среды засекали сплошным газоном госпитальный штамм *S. aureus* 155, *E. Coli* 2290 и *Candida albicans* с использованием стерильного ватного тампона, смоченного в 2-х миллиардной взвеси микробной культуры. На поверхность засеянной среды раскладывали диски, пропитанные исследуемыми субстанциями путем погружения дисков в состав до полного пропитывания.

Зоны подавления роста микроорганизмов учитывали через 18 часов, измеряя их диаметр в миллиметрах линейкой [56].

2.2.6 – Оценка кинетики роста микробных культур при воздействии пептидов активного центра ГМ-КСФ

Исследование влияния *in vitro* синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* K12 (ATCC №25922) и *S. aureus* 209P (ATCC № 6538-P),

а также клинических изолятов энтеробактерий (12 штаммов *E. coli* и 12 штаммов *Klebsiella pneumoniae*) осуществлялось путем инкубации бактериальных культур в течение 24 часов в микроячейках стерильной пластиковой планшеты в присутствии ZP-2. Для этого 25 мкл бактериальной взвеси, содержащей 5×10^8 КОЕ/мл, приготовленной из суточной агаровой культуры бактерий, и 25 мкл раствора с определенной концентрацией ZP-2 (в контроле использовали 25 мкл изотонического раствора NaCl) инокулировали в микроячейки, содержащие 200 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ), с последующей инкубацией в термостате при 37°C. Развитие бактерий в МПБ оценивалось по динамике оптической плотности культуры (ОД, усл. ед.), замеряемой в каждой микроячейке при длине волны (λ) 492 нм на Multiscan Accent (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 трех повторностях с вычислением средних значений ОД.

Для определения степени влияния ZP2 на рост бактериальных культур рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ) по формуле [8]:

$$\text{ИИ} = \text{ОД}_к - \text{ОД}_о / \text{ОД}_к * 100\% \quad (1)$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); $\text{ОД}_к$ и $\text{ОД}_о$ – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Индекс ингибирования бактериальных популяций оценивался на 2, 4, 6 и 24 часах. Чувствительными считались штаммы при $\text{ИИ} \geq 5\%$.

Кроме того, рассчитывали удельную скорость роста (μ , ч^{-1}) бактерий в МПБ на разных этапах развития бактериальных культур (0-4 и 4-24 часа) по формулам (Шлегель Г. 1987):

$$\mu_{T1-T2} = (\text{LnOD}_{T2} - \text{LnOD}_{T1}) / (T2 - T1) \quad (2)$$

где μ_{T1-T2} – удельная скорость роста (ч^{-1}) бактерий на временном интервале $T1-T2$ (час); LnOD_{T1} и LnOD_{T2} – натуральные логарифмы оптической плотности (ОД) бульонных культур на соответствующих часах инкубации во временных интервалах: 0-2, 2-4, 4-6 и 6-24 часа.

Следующие опыты *in vitro* были проведены на 24 клинических штаммах грамотрицательных бактерий (все штаммы были полирезистентны к основным группам антибиотиков) видов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Acinetobacter baumannii* (n=8) и *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, из отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, из желчи и аспирата нижних дыхательных путей у больных с хирургической патологией. Выделение чистых культур осуществляли общепринятыми методами, а видовую идентификацию клинических изолятов микроорганизмов проводили с использованием официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (Чехия), а также на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Biomerieux, Франция) [40, 43].

Влияние косметического средства «Ацеграм» (спрей) на репродуктивные показатели грамотрицательных бактерий оценивали по их росту в жидкой питательной среде в ячейках 96-луночного полистиролового планшета после инокуляции 25 мкл взвесей микроорганизмов ($5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур, в 125 мкл мясопептонного бульона (МПБ) с добавлением в него 50 мкл «Ацеграма» путем замера на 0 (исходное значение), 4 и 24 часах инкубации при 37°C оптической плотности (ОД) бактериальных культур с помощью спектрофотометра Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия) при длине волны (λ) 492 нм, то есть в культуральной среде конечная концентрация синтетического пептида ZP2 составляла 5 мкг/мл. Контролем служили культуры бактерий, где вместо «Ацеграма» в МПБ добавляли 50 мкл стерильной дистиллированной воды.

Для определения степени влияния «Ацеграма» на рост бактерий рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ, %) развития бактериальных популяций по формуле [68]:

$$\text{ИИ} = (\text{ОД}_к - \text{ОД}_о) / \text{ОД}_к \cdot 100\% \quad (3)$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); ОД_к и ОД_о – 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%.

Кроме того, рассчитывали удельную скорость роста (μ , ч⁻¹) бактерий в МПБ на разных этапах развития бактериальных культур (0-4 и 4-24 часа) по формулам [68]:

$$\mu_{0-4} = (\text{LnOD}_4 - \text{LnOD}_0)/4 \quad (4)$$

$$\text{и } \mu_{4-24} = (\text{LnOD}_{24} - \text{LnOD}_4)/20 \quad (5)$$

где μ_{0-4} и μ_{4-24} – удельные скорости роста (ч⁻¹) бактерий на временных интервалах 0-4 и 4-24 часа соответственно; LnOD_0 , LnOD_4 и LnOD_{24} – натуральные логарифмы оптической плотности (ОД) бульонных культур на 0, 4 и 24 часах инкубации.

Оценка влияния пептида ГМ-КСФ на биопленкообразование грамотрицательных бактерий

Опыты *in vitro* проведены на 24 клинических штаммах энтеробактерий из коллекции ИКВС УрО РАН, в том числе на 12_изолятах *E.coli* и 12 изолятах *K. pneumoniae*, выделенных из ран у больных с синдромом диабетической стопы и отделяемого из влагалища у женщин с субмукозной миомой матки. Видовая идентификация клинических изолятов стафилококков проведена общепринятыми методами, в том числе по биохимическим признакам с использованием официальных тест-систем «Staphy Test» (Lachema, Чехия).

В экспериментах использован опытный образец синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO в концентрации 10мкг/мл.

Оценка влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование (БПО) клиническими штаммами энтеробактерий осуществлялась с помощью "планшетного метода" с незначительными модификациями путем их выращивания в стерильной 96-луночной полистироловой планшете [80, по протоколу 188]. 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 5×10^8 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 1% раствором кристаллвиолета (15 мин при комнатной температуре), после чего лунки четырехкратно промывали дистиллированной водой (до ее полного просветления); для экстракции красителя из биопленок в лунки вносили по 200 мкл 96% этанола, выдерживали 30 мин, а затем 150 мкл надосадка отсасывали микропипеткой и переносили в чистую планшету для замера оптической плотности (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.

2.2.7 – Статистические методы исследования

Результаты исследований обрабатывались на ПК под управлением операционной системы Windows XP с использованием пакета прикладных программ "Statistica for Windows 6.0" [36, 37, 62].

Статистическая обработка результатов исследований проводилась стандартными методами с определением средней арифметической вариационного ряда (M) и ошибки средней арифметической (m). Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения

представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая, m – стандартная ошибка средней. Объем выборок был недостаточен для применения любого из параметрических способов анализа, поэтому мы воспользовались непараметрическим аналогом. Согласно литературным данным [36, 37, 62] при применении непараметрических критериев при нормальном распределении их чувствительность составляет примерно 95% от чувствительности их параметрических аналогов, и непараметрические критерии дают больше шансов выявить реально существующие различия. Достоверность отличия оценивалась по критерию Стьюдента – t и/или критерию Манна-Уитни – U . Статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$.

Корреляционный анализ был выполнен в рамках программы «STATISTICA for Windows 6.0.» с использованием модуля «Nonparametrics. Correlations Spearman» («Непараметрические. Корреляции Спирмена»). Для выделения значимых коэффициентов корреляции был выбран уровень значимости, принятый для медико-биологических исследований ($p < 0,05$).

Представленные цифровые данные в подавляющем большинстве были округлены до первого или второго десятичного знака.

ГЛАВА 3 – ИММУНОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ

Прежде чем проанализировать антимикробные и другие механизмы действия синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, нами было исследовано влияние их на лимфоциты в реакции бластной трансформации (РБТЛ). РБТЛ относится к стандартным методикам, направленных на выявление иммуностимулирующих свойств химических соединений. Поэтому данная реакция была выбрана нами для оценки иммуностимулирующего влияния исследуемых нами синтетических пептидов.

С этой целью мы провели исследование влияния 2 синтетических пептидов: ZP1 – LYS GLY PRO LEY 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. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние пептидов активного центра ГМ-КСФ и других веществ на РБТЛ

№	Вещество и его концентрация	Содержание бластных клеток, % (n=10)
1	Спонтанный уровень	11,7 ± 1,3
2	ФГА (субоптимальная доза) - 1 мкг/мл	26,2 ± 1,7
3	ФГА (оптимальная доза) - 10 мкг/мл	62,9 ± 2,8 *
4	ИЛ-2 - 10 мкг/мл	72,5 ± 3,2 *
5	Синтетический пептид ZP1 - 10 мкг/мл	46,6 ± 4,1*
6	Синтетический пептид ZP2 - 10 мкг/мл	97,4 ± 5,4 *,**

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к спонтанному уровню РБТЛ;

** $p < 0,05$ по отношению к ИЛ-2 и ФГА.

Оценка полученных данных выявила, что оба пептида вызывали бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. Важно отметить, что синтетический пептид, состоящий из 12 аминокислот, выявил более высокую активностью по сравнению с пептидом, состоящим из 16 аминокислот, а также в сравнении со стандартным митогеном ФГА и ИЛ-2.

В другой серии экспериментов нами проведено сравнительное исследование иммуностропной активности синтетического пептида ZP2 (концентрации 30 и 300 мкг/мл) и других соединений, обладающих фагоцит-стимулирующей и антибактериальной активностями. В качестве сравниваемых веществ нами были взяты дефенсин LL37 и кателецидин HNP.

Как видно из таблицы 2, в отличие от пептида ZP2, дефенсин LL37 и кателецидин HNP практически не влияли на бластную трансформацию лимфоцитов.

Таблица 2 – Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) и дефенсинов на РБТЛ

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

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

Таким образом, синтетические пептиды ZP1 и ZP2 стимулировали бластную трансформацию лимфоцитов. Последнее свидетельствует о выраженной их иммуностропной активности и, в частности, способности

влиять на процессы пролиферации иммунных клеток (лимфоциты). Учитывая более высокую активность синтетического пептида ZP2, в дальнейших экспериментах проводились исследования именно этого пептида.

3.1 – Исследование апоптоза моноцитов при действии синтетического пептида ZP2

Учитывая, что GM-CSF способен пролонгировать срок жизни фагоцитарных клеток, обладая антиапоптотическим действием, а также полученные нами данные о выраженном его влиянии на пролиферацию клеток, целесообразным представлялось оценить в модельных экспериментах наличие у синтетического пептида ZP2 антиапоптотического эффекта. Нами было исследовано влияние синтетического пептида ZP2 (в градиенте конечных концентраций 10-200 мкг/мл) на состояние моноцито-подобных клеток линии THP-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека) в модели цитотоксической гипоксии, вызванной внесением в среду для культивирования йодацетата (конечные концентрации 10 μ M и 15 μ M). Определение жизнеспособности клеток осуществляли путем их одновременного окрашивания с применением двух ДНК-связывающих флуоресцентных красителей: йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия (PI) и анализа на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Такая методика позволяет не только регистрировать факт запуска апоптоза, но выявлять различные его стадии.

Установлено, что при совместном культивировании клеток с йодацетатом и синтетическим аналогом активного центра GM-CSF (на рисунках – GM-CSF) – синтетическим пептидом ZP2 наблюдается увеличение относительного содержания живых клеток, причем эффект носит дозозависимый характер (рисунок 1).

Так, на фоне индукции апоптоза 10 μ M йодацетата ($62,1 \pm 2,0$ % живых клеток) внесение синтетического пептида ZP2 в финальных концентрациях

10, 20, 100 и 200 мкг/мл сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) 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).

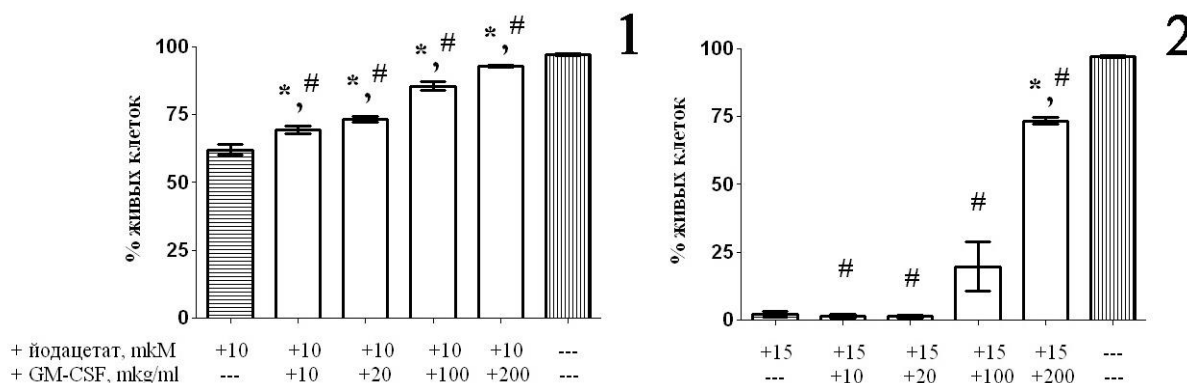


Рисунок 1 - Изменение относительного содержания живых клеток линии ТНР-1 в образцах после 24-часовой инкубации в присутствии 10 и 15 μM йодацетата (гистограммы 1 и 2 соответственно) и различных концентраций синтетического пептида ZP2 (n=10)

Примечание: горизонтальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации с йодацетатом; вертикальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации без внесения веществ (негативный контроль); * – различия достоверны в сравнении с образцами при внесении йодацетата ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с образцами без внесения йодацетата или пептида ZP2 ($p < 0,05$).

В случае, когда для индукции апоптоза применяли йодацетат в финальной концентрации 15 μM (гибель $97,9 \pm 5,3\%$ клеток), добавление пептида ZP2 в концентрациях 10 и 20 мкг/мл достоверно не влияло на увеличение количества жизнеспособных клеток, но при повышении его концентрации в среде до 100 и 200 мкг/мл наблюдался четкий тренд к уменьшению числа погибших клеток и достоверному увеличению относительного содержания жизнеспособных клеток (с $2,1 \pm 1,1\%$ до $19,8 \pm 9,0$ и $73,5 \pm 1,4\%$ соответственно).

Кроме того, добавление в среду культивирования клеток линии ТНР-1 синтетического пептида ZP2 изменяло долю клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, индуцированного йодацетатом (рисунки 2 и 3).

Как видно из представленных диаграмм, инкубация клеток в присутствии 10 μM йодацетата приводила к увеличению доли популяции клеток на ранней стадии апоптоза с $1,3 \pm 0,3$ до $12,7 \pm 2,3\%$, сходные значения получены и для йодацетата в концентрации 15 μM ($12,7 \pm 5,5\%$), тогда как дополнительное внесение в среду синтетического пептида ZP2 (особенно,

при концентрациях 100 и 200 мкг/мл) частично нивелировало этот эффект.

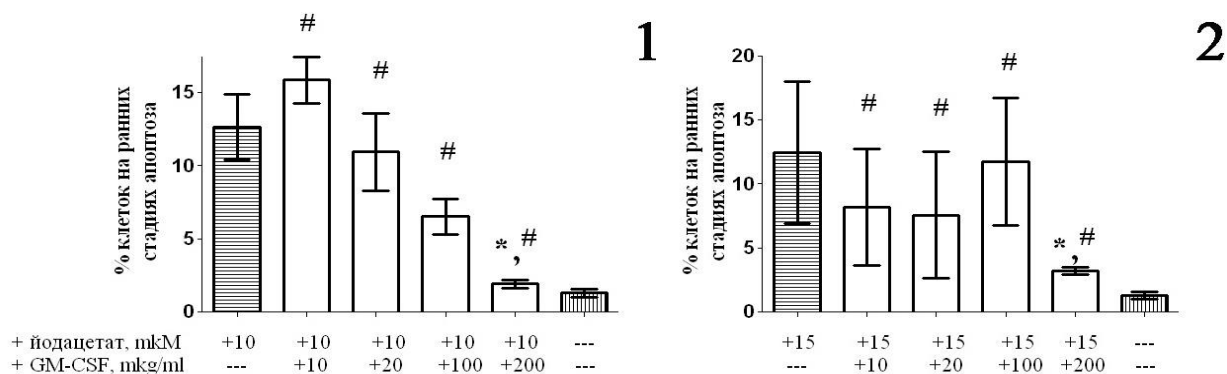


Рисунок 2 – Изменение относительного содержания клеток линии ТНР-1 на ранних стадиях апоптоза после 24-часовой инкубации в присутствии 10 и 15 μ М йодацетата (гистограммы 1 и 2 соответственно) и различных концентраций синтетического пептида ZP2 (n=10)

Примечание: горизонтальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации с йодацетатом; вертикальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации без внесения веществ (негативный контроль); * – различия достоверны в сравнении с образцами при внесении йодацетата ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с образцами без внесения йодацетата или пептида ZP2 ($p < 0,05$).

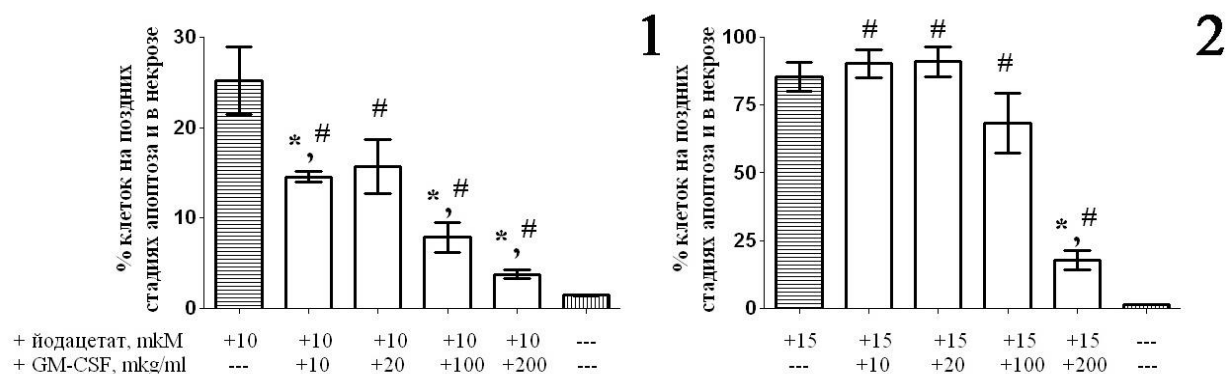


Рисунок 3 – Изменение относительного содержания клеток линии ТНР-1 на терминальных стадиях апоптоза и в некрозе после 24-часовой инкубации в присутствии 10 и 15 μ М йодацетата (гистограммы 1 и 2 соответственно) и различных концентраций пептида ZP2 (n=10)

Примечание: горизонтальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации с йодацетатом; вертикальная штриховка – клетки линии ТНР-1 при инкубации без внесения веществ (негативный контроль); * – различия достоверны в сравнении с образцами при внесении йодацетата ($p < 0,05$); # – различия достоверны в сравнении с образцами без внесения йодацетата или пептида ZP2 ($p < 0,05$).

Аналогичное заключение относится к изменению (в данном случае – уменьшению) относительного содержания клеток на поздних стадиях апоптоза и в некрозе под влиянием синтетического пептида ZP2 на фоне

действия йодацетата (рисунок 3). Причем, достоверный «протективный» (антиапоптотической) эффект данного синтетического пептида ZP2 более четко проявлялся в опытах с инкубацией клеток в присутствии 10 μ M йодацетата, а в экспериментах с 15 μ M йодацетата достоверные отличия опытных образцов (с пептидом) и контролей были отмечены только при использовании высокой концентрации синтетического пептида ZP2 – 200 мкг/мл.

Таким образом, представленные выше данные свидетельствуют о том, что синтетический пептид ZP2, так же, как и цельная молекула GM-CSF, обладает антиапоптотическими эффектами в широком диапазоне доз. А механизмы их такого воздействия могут реализовываться через активацию клеточных рецепторов к GM-CSF. Чтобы выявить наличие рецепторов на нейтрофилах и моноцитах периферической крови и механизмах влияния на них синтетического пептида активного центра GM-CSF нами было исследовано влияние данного вещества на локомоторную функцию нейтрофилов и моноцитов в условиях воздействия на них грамотрицательных бактерий.

3.2 – Исследование локомоторной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови под действием синтетического пептида ZP2

Метод определения хемотаксиса (ХТ) и хемокинеза (ХК) нейтрофилов и моноцитов периферической крови под агарозой позволяет не только оценить двигательную функцию лейкоцитов, но и определить наличие рецепторов к хемоаттрактантам на данных клетках [177]. Поэтому было важно исследовать как хемотаксическую активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови по отношению к синтетическому пептиду ZP2, так и их хемокинетическую активность. Учитывая, что наибольшей иммунотропной активностью в отношении лимфоцитов обладал

синтетический пептид ZP2, мы исследовали его влияние в дозах 10, 30, 100, 300 мкг/мл на ХТ и ХК нейтрофилов и моноцитов периферической крови условно-здоровых доноров.

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

Изучаемые показатели	Статистические показатели	Группы				
		Контрольная (среда 199) Спонтанная миграция	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 10 мкг/мл	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 30 мкг/мл	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 100 мкг/мл	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 300 мкг/мл
		n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
Индекс хемотаксиса нейтрофилов	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	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	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	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

Наши исследования выявили, что синтетический пептид ZP2 в широком диапазоне доз обладал свойствами хемоаттрактанта. При этом он вызывал как целенаправленное движение клеток грануляцитарно-

макрофагального роста кроветворения против градиента концентрации пептида (ХТ), так и усиливая их ХК.

Эти данные свидетельствуют о том, что данный пептид обладает не только способностью вызывать хемотаксис (а значит привлекать, например, фагоциты в очаг воспаления), но и о том, что на клетках этого ряда имеются к нему хемотаксические рецепторы. Возможно, эти данные подтверждают результаты, полученные В.Е.Жемчуговым [18] о том, что указанные пептиды могут взаимодействовать основным рецептором к ГМ-КСФ на гранулоцитах и макрофагах.

Учитывая наличие хемотаксических рецепторов к данному пептиду на фагоцитах было важно оценить механизм действия данного пептида в системе взаимодействия фагоциты – бактерии. Исследованиями [22, 55] было показано, что при инкубации с бактериями нейтрофилов развивается хемотаксическая деактивация (отрицательный хемотаксис) на бактерии того же вида с каким проводили инкубацию нейтрофилов. Поэтому было важно оценить, как меняется хемотаксическая активность на бактерии при воздействии синтетического пептида ZP2 на систему фагоцит-микроорганизм и как изменяется хемотаксическая функция нейтрофилов.

Как видно из таблицы 4 на интактные нейтрофилы, как пептид, так и бактерии сами по себе и в комбинации с пептидом вызывают положительную хемотаксическую реакцию. При оценке хемотаксиса на нейтрофилы культивируемые с *E.coli* развивается хемотаксическая деактивация на те же энтеробактерии, что согласуется с данными литературы [22, 55]. Интересен тот факт, что синтетический пептид ZP2 отменял хемотаксическую деактивацию нейтрофилов как в варианте чистого воздействия как хемоаттрактанта в смеси с бактериями, так и при инкубации с нейтрофилами и бактериями. 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, что характерно для цельной молекулы ГМ-КСФ (см. Обзор литературы)

Таблица 4 – Оценка влияния пептида ГМ-КСФ (ZP2) на хемотаксис нейтрофилов при инкубации их с энтеробактериями *in vitro*

Исследуемые показатели	Статистические показатели	Группы (хемоаттрактанты)			
		Контрольная (среда 199) Спонтанная миграция	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 10 мкг/мл	Опыт E.coli в дозе 10 ⁸ бакт./мл	Опыт синтетический пептид ZP2 В дозе 10 мкг/мл+ E.coli в дозе 10 ⁸ бакт./мл
		n=10	n=10	n=10	n=10
Индекс хемотаксиса нейтрофилов	M±m P	1,01±0,05	1,54±0,12 <0,05	1,38±0,1 1 <0,05	1,58±0,13 <0,05
Индекс Хемотаксиса нейтрофилов инкубированных с энтеробактериями	M±m P	1,01±0,05	1,55±0,11 <0,05	0,66±0,0 8 <0,05	1,48±0,12 <0,05
Индекс Хемотаксиса нейтрофилов инкубированных с энтеробактериями и синтетическим пептидом ZP2	M±m P	1,01±0,03	1,56±0,13 <0,05	1,48±0,1 2 <0,05	1,49±0,12 <0,05

Примечание: * p - достоверность различий между исследуемыми группами и спонтанной миграцией клеток, p < 0,05

3.3 – Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на продукцию цитокинов нейтрофилами при воздействии энтеробактерий *in vitro*

Развитие воспалительного процесса, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности, энтеробактериями, сопровождаются воспалительной реакцией, которая сопровождается секрецией клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих важную регуляторную функцию [26].

Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Эти клетки являются удобной моделью для оценки цитокинопродукции фагоцитами, в том числе при исследовании влияния различных веществ на активацию секреции различных цитокинов нейтрофилами [10]. В то же время, на наш взгляд, эта модель может быть успешно использована для определения особенностей реакции нейтрофилов при их контакте с живыми микроорганизмами, принадлежащими к разным таксонам и обладающими оппозитной патогенностью/вирулентностью.

Учитывая, что *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма [16, 42], важным представлялось оценить влияние кишечных палочек на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* – при взаимодействии фагоцитов с клиническими штаммами этих микроорганизмов. При этом на клетки-фагоциты могут воздействовать как живые микроорганизмы (при фагоцитозе), так и их продукты секреции (метаболиты).

Как мы показали ранее, синтетический пептид ZP2 вызывает значительное повышение секреции широкого спектра цитокинов нейтрофилами периферической крови [10]. Поэтому очень важно было оценить влияние комбинаторного воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях фагоцитоза *E.coli* и

влияния на фагоциты супернатантов бульонных суточных культур эшерихий.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида ZP2, клинических изолятов *E.coli*, супернатантов суточных культур *E.coli* и их комбинаций на секрецию широкого спектра цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Влияние на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (USA). Применяли тест-системы для мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (USA). Определяли 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, INF- γ , TNF- α , MCP-1, MIP-1 β) в супернатантах клеток после 1 часа инкубации нейтрофилов с живыми бактериями в соотношении 1:20, супернатантами бактерий, синтетическим пептидом ZP2; контролями 1 и 2 соответственно служили среда RPMI-1640 и супернатант нейтрофилов, инкубированных в среде RPMI-1640 без бактерий, их продуктов секреции и пептида. Полученные результаты округляли до 0,1 пкг/мл.

Прежде чем оценить влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию нейтрофилами цитокинов, мы исследовали влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на секрецию/продукцию цитокинов этими клетками. Как видно из таблицы 5, нейтрофилы секретируют в среду инкубации следующие 7 цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, GM-CSF, MIP-1 β . При фагоцитозе *E.coli* и добавлении супернатантов суточных культур *E.coli* нейтрофилы увеличивают спектр секретируемых цитокинов и в среде инкубации определяются достоверное увеличение уже 10 цитокинов: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, ITNF- α , MIP-1 β , при этом надо отметить тот факт, что и сами бактерии, и их метаболиты увеличивают секрецию одних и тех же цитокинов по сравнению со средой RPMI 1640. При сравнении со спонтанной продукцией цитокинов нейтрофилами выявлено (контроль 2), что и бактерии, и их супернатанты суточных культур увеличивали секрецию/продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови таких как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF- α , MIP-

1 β , то есть стимулировали провоспалительный потенциал фагоцитов.

Таблица 5 – Влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови (M $\pm$ m) n=10

Цитокины	Среда RPMI-1640 (контроль 1)	Супернатант нейтрофилов (контроль 2)	Супернатант нейтрофилов + <i>E.coli</i> (опыт 1)	Супернатант нейтрофилов + супернатант <i>E.coli</i> (опыт 2)
G-CSF пкг/мл	16,1 $\pm$ 1,5	19,1 $\pm$ 1,6	22,0 $\pm$ 1,5 $p_1 < 0,05$	21,0 $\pm$ 0,6 $p_1 < 0,05$
GM-CSF пкг/мл	210,3 $\pm$ 6,2	250,2 $\pm$ 5,6 $p_1 < 0,05$	251,3 $\pm$ 6,6 $p_1 < 0,05$	250,3 $\pm$ 4,5 $p_1 < 0,05$
IL-10 пкг/мл	32,1 $\pm$ 2,6	35,3 $\pm$ 3,4	37,3 $\pm$ 0,9	36,3 $\pm$ 1,3
IL-12p70 пкг/мл	13,2 $\pm$ 1,7	23,4 $\pm$ 1,6 $p_1 < 0,05$	34,0 $\pm$ 1,2 $p_1 < 0,05$	32,2 $\pm$ 0,4 $p_1 < 0,05$
INF- γ пкг/мл	13,3 $\pm$ 1,3	13,6 $\pm$ 1,5	15,3 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 0,3
IL-13 пкг/мл	10,2 $\pm$ 1,1	11,3 $\pm$ 1,3	12,0 $\pm$ 0,6	12,0 $\pm$ 0,3
IL-17A пкг/мл	29,4 $\pm$ 2,6	62,4 $\pm$ 5,6 $p_1 < 0,05$	145,7 $\pm$ 14,7 p_1 и $p_2 < 0,05$	113,0 $\pm$ 8,0 p_1 и $p_2 < 0,05$
IL-1 β пкг/мл	13,3 $\pm$ 1,5	42,4 $\pm$ 3,4 $p_1 < 0,05$	147,0 $\pm$ 10,5 p_1 и $p_2 < 0,05$	157,3 $\pm$ 26,7 p_1 и $p_2 < 0,05$
IL-2 пкг/мл	35,4 $\pm$ 3,5	38,5 $\pm$ 4,5	40,7 $\pm$ 1,5	39,0 $\pm$ 1,0
IL-4 пкг/мл	17,2 $\pm$ 1,8	23,4 $\pm$ 2,4	35,2 $\pm$ 2,0 p_1 и $p_2 < 0,05$	31,3 $\pm$ 0,9 p_1 и $p_2 < 0,05$
IL-5 пкг/мл	9,2 $\pm$ 1,1	9,4 $\pm$ 1,3	10,0 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,4
IL-6 пкг/мл	17,7 $\pm$ 1,8	122,4 $\pm$ 9,7 $p_1 < 0,05$	658,0 $\pm$ 185,0 p_1 и $p_2 < 0,05$	950,3 $\pm$ 137,4 p_1 и $p_2 < 0,05$
IL-7 пкг/мл	10,2 $\pm$ 1,2	12,6 $\pm$ 1,6	14,7 $\pm$ 0,7	13,7 $\pm$ 0,3
TNF- α пкг/мл	15,4 $\pm$ 1,8	16,1 $\pm$ 1,9	37,7 $\pm$ 1,2 p_1 и $p_2 < 0,05$	22,5 $\pm$ 1,0 p_1 и $p_2 < 0,05$
IL-8 пкг/мл	13,3 $\pm$ 2,3	320,8 $\pm$ 14,5 $p_1 < 0,01$	1244,8 $\pm$ 229,4 p_1 и $p_2 < 0,001$	1873,2 $\pm$ 325,7 p_1 и $p_2 < 0,001$
MCP-1 пкг/мл	12,6 $\pm$ 1,8	12,5 $\pm$ 1,9	13,7 $\pm$ 0,7	14,0 $\pm$ 0,3
MIP-1 β пкг/мл	40,8 $\pm$ 4,8	1492,7 $\pm$ 72,7 $p_1 < 0,01$	5466,5 $\pm$ 384,5 p_1 и $p_2 < 0,001$	4370,2 $\pm$ 292,9 p_1 и $p_2 < 0,001$

Примечание: p_1 - достоверность различий по отношению к среде RPMI-1640 (контроль 1);
 p_2 - достоверность различий по отношению к супернатантам нейтрофилов (контроль 2).

Учитывая полученные результаты, важно было выявить, как влияют на

секрецию цитокинов нейтрофилов комбинации синтетического пептида ZP2, бактерий и супернатантов суточных культур бактерий.

Таблица 6 – Сравнительная характеристика содержания цитокинов в контрольных и опытных пробах, в том числе при добавлении к нейтрофилам синтетического пептида ZP2, *E.coli*, супернатантов суточных культур *E.coli*. (M±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±1,5	19,1±1,6	34,6±2,7 p ₁ , p ₂ <0,05	23,0±1,0 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	24,7±0,9 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
GM-CSF пкг/мл	210,3±6,2	250,2±5,6 p ₁ <0,05	277,6±7,3 p ₁ , p ₂ <0,05	263,0±4,6 p ₁ , p ₂ <0,05	259,2±5,4 p ₁ и p ₃ <0,05
IL-10 пкг/мл	32,1±2,6	35,3±3,4	42,3±4,3 p ₁ , p ₂ <0,05	41,7,0±0,9 p ₁ <0,05	38,2±1,0 p ₁ <0,05
IL-12p70 пкг/мл	13,2±1,7	23,4±1,6 p ₁ <0,05	60,5±4,2 p ₁ и p ₂ <0,05	33,8±0,2 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	41,3±2,4 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
INF-γ пкг/мл	13,3±1,3	13,6±1,5	23,6±2,7 p ₁ и p ₂ <0,05	16,3±0,7 p ₃ <0,05	18,0±1,2 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
IL-13 пкг/мл	10,2±1,1	11,3±1,3	18,6±3,8 p ₁ и p ₂ <0,05	12,3±0,3 p ₃ <0,05	13,0±0,6 p ₃ <0,05
IL-17A пкг/мл	29,4±2,6	62,4±5,6 p ₁ <0,05	337,8±11,8 p ₁ <0,001, p ₂ <0,01	139,7±1,7 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	172,8±12,6 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
IL-1β пкг/мл	13,3±1,5	42,4±3,4 p ₁ <0,05	287,5±16,8 p ₁ и p ₂ <0,01	211,7±51,5 p ₁ , p ₂ <0,05	240,8±42,5 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-2 пкг/мл	35,4±3,5	38,5±4,5	49,2±6,8	39,7±1,5	42,2±1,6
IL-4 пкг/мл	17,2±1,8	23,4±2,4	53,5±5,9 p ₁ и p ₂ <0,05	33,7±0,3 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	37,8±2,5 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
IL-5 пкг/мл	9,2±1,1	9,4±1,3	12,7±2,3	10,3±0,3	10,7±0,3
IL-6 пкг/мл	17,7±1,8	122,4±9,7 p ₁ <0,05	1574,6±76,8 p ₁ и p ₂ <0,001	709,2±106,8 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	1265,7±196,4 p ₁ и p ₂ <0,05
IL-7 пкг/мл	10,2±1,2	12,6±1,6	18,6±2,2 p ₁ и p ₂ <0,05	14,3±0,3 p ₁ и p ₃ <0,05	16,3±0,7 p ₁ и p ₂ <0,05
TNF-α пкг/мл	15,4±1,8	16,1±1,9	67,7±6,7 p ₁ и p ₂ <0,05	40,5±1,5 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	35,3±4,8 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
IL-8 пкг/мл	13,3±2,3	320,8±14,5 p ₁ <0,01	3541,7±211,4 p ₁ и p ₂ <0,001	1160,3±113,7 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	1789,2±363,9 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05
MCP-1 пкг/мл	12,6±1,8	12,5±1,9	19,4±3,7	14,7±0,3	14,7±0,9
MIP-1β пкг/мл	40,8±4,8	1492,7±72,7 p ₁ <0,01	12538,2±768,9 p ₁ и p ₂ <0,001	5929,7,1±282,1 p ₁ , p ₂ и p ₃ <0,05	6988,8±292,4 p ₁ , p ₂ и 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 оценке действия метаболитов суточных культур бактерий в комбинации с синтетическим пептидом ZP2 наблюдалась очень похожая картина, так по сравнению с контролем 1 - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β за исключением 1 цитокина IL-13 (13 из 17 исследованных), а по сравнению с контролем 2 - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β за исключением 3 цитокинов - GM-CSF, IL-10, IL-13 (11 из 17 исследованных). При этом обращает на себя внимание, что основной пул цитокинов остается повышенным при данных комбинациях синтетического пептида ZP2 с бактериями и их метаболитами. При сравнении влияния самого пептида (опыт 3) с комбинаций пептида с бактериями и их метаболитами (опыт 4 и 5), выявляется несколько иная картина. Во-первых, все варианты комбинаций либо снижали, либо вообще отменяли действие пептида на цитокиновую продукцию нейтрофилов периферической крови. Так бактерии снижали цитокиновую активированных синтетическим пептидом ZP2 нейтрофилов на следующие цитокины: IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, TNF- α , INF- γ , MIP-1 β , а их метаболиты на IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (на 11 цитокинов в том и другом случае, отличия были только в 2 цитокинах IL-6 и GM-CSF для бактерий и их метаболитах соответственно).

Для оценки степени выраженности воздействия комбинаций синтетического пептида ZP2 и бактерий и их метаболитов мы оценили кратность воздействия их на цитокинопродукцию нейтрофилов в сравнении с действием пептида без бактериальных компонентов.

Как показали исследования (таблица 7), степень подавления была более выражена при комбинаторном влиянии бактерий и пептида ZP2 и колебалась в диапазоне от 0,33 до 0,76, в то время как воздействие супернатантов суточных бульонных культур и пептида было несколько менее выраженным от 0,51 до 0,93, при этом такое различие отмечалось для всех достоверно сниженных цитокинов.

Таблица 7 – Кратность изменений продукции цитокинов нейтрофилами при комбинации воздействия пептида ZP2 с бактериями *E.coli* и их метаболитами

Цитокины	Супернатант нейтрофилов + ZP2 (опыт 3)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Кратность изменения активности цитокинов в Супернатанте нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 4)	Супернатант нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 5)	Кратность изменения активности цитокинов Супернатанте нейтрофилов + ZP2+ <i>E.coli</i> (опыт 5)
G-CSF пкг/мл	34,6±2,7	23,0±1,0 $p_1 < 0,05$	0,67	24,7±0,9 $p_1 < 0,05$	0,71
GM-CSF пкг/мл	277,6±7,3	263,0±4,6 $p_1 > 0,05$	-	259,2±5,4 $p_1 < 0,05$	0,93
IL-12p70 пкг/мл	60,5±4,2	33,8±0,2 $p_1 < 0,05$	0,55	41,3±2,4 $p_1 < 0,05$	0,68
INF- γ пкг/мл	23,6±2,7	16,3±0,7 $p_1 < 0,05$	0,69	18,0±1,2 $p_1 < 0,05$	0,76
IL-13 пкг/мл	18,6±3,8	12,3±0,3 $p_1 < 0,05$	0,66	13,0±0,6 $p_1 < 0,05$	0,70
IL-17A пкг/мл	337,8±11,8	139,7±1,7 $p_1 < 0,05$	0,41	172,8±12,6 $p_1 < 0,05$	0,51
IL-4 пкг/мл	53,5±5,9	33,7±0,3 $p_1 < 0,05$	0,62	37,8±2,5 $p_1 < 0,05$	0,71
IL-6 пкг/мл	1574,6±76,8	709,2±106,8 $p_1 < 0,05$	0,45	1265,7±196,4	-
IL-7 пкг/мл	18,6±2,2	14,3±0,3 $p_3 < 0,05$	0,76	16,3±0,7	-
TNF- α пкг/мл	67,7±6,7	40,5±1,5 $p_1 < 0,05$	0,60	35,3±4,8 $p_1 < 0,05$	0,52
IL-8 пкг/мл	3541,7±211,4	1160,3±113,7 $p_1 < 0,05$	0,33	1789,2±363,9 $p_1 < 0,05$	0,51
MIP-1 β пкг/мл	12538,2±768,9	5929,7,1±282,1 $p_1 < 0,05$	0,48	6988,8±292,4 $p_1 < 0,05$	0,56

Примечание: p_1 – достоверность по отношению к супернатантам нейтрофилов активированных ZP2

Таким образом, бактерии вида *E.coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11,12 из 17 исследованных цитокинов). Синтетический пептид ZP2 также стимулирует продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом

спектр и степень активации их выше, чем у бактерий и их метаболитов (14 цитокинов из 17 исследованных). При исследовании комбинаторного воздействия бактерий, их метаболитов и синтетического пептида ZP2, выявлено, что комбинаторные воздействия в целом приводит к снижению активности пептида практически по всем провоспалительным цитокинам (11 из 17 исследованных).

Разработанная нами модель оценки систем цитокиновой регуляции клеток при различных вариантах воздействия позволяет получить новые данные о механизмах регуляции воспалительного процесса где нейтрофилы, цитокины, бактерии и их метаболиты играют важную роль. Поэтому, полученные нами результаты о блокировании/снижении регуляторного потенциала активированных иммуностимулятором клеток, должны учитываться для правильного понимания патогенеза формирования процессов в системе взаимодействия паразит-хозяин в условиях инфекционного воспаления, вызванного, в том числе, условно-патогенными микроорганизмами. Возможно такой механизм подавления цитокиновой активности активированных клеток, способствует выживанию (персистенции) данных микроорганизмов в организме человека при развитии инфекционного процесса вызванного *E.coli*.

Поэтому, на наш взгляд, необходимо было выявить наличие других биологических свойств у данного пептида. Одним из таких направлений является поиск эндогенных пептидов, обладающих антибактериальными свойствами как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Именно этим исследованиям и посвящена следующая глава нашей диссертации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 3 ГЛАВЕ

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК и индексируемых в электронной международной базе данных Scopus:

1. 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. Суховей, В.А. Гриценко // Гигиена и санитария. 2012. № 3. С. 71-72 (Scopus – N/A, РИНЦ – 0,739).

2. Характеристика антибактериальных, иммуотропных 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).

3. 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. Суховей, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2013. Т.7 (16), № 2-3(1). С. 50-52 (РИНЦ – 0,332).

4. 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. Суховей, В.А. Гриценко // Российский иммунологический журнал. 2013. Т.7 (16), № 2-3. С. 141-141 (РИНЦ – 0,332).

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. 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).

7. 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).

8. 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).

9. Дозазависимое влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ – ZP2) на индуцированный апоптоз 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.265-279 (РИНЦ – 0,389, PubMed).

Патент РФ

10. 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.Опубл. 27.10. 2012.

Публикации в других изданиях

11. 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. Дукарт, В.А. Гриценко, Я.В. Тяпаева, В.А. Черешнев // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН: [электр. изд.]. 2016. № 2. С. 1-30. (РИНЦ – 0,330).

ГЛАВА 4 – АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГМ-КСФ

4.1 – Оценка бактерицидной активности пептидов активного центра ГМ-КСФ на плотной питательной среде *in vitro*

При оценке бактерицидной активности синтетических пептидов нами были исследованы влияние различных доз этих препаратов на бактерицидную активность по отношению к госпитальным штаммам *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 и *Candida albicans* (таблица 8). Одновременно были проведен сравнительный анализ активности других бактерицидных соединений (супернатантов клеток моноклеарного ряда, тромбоденсина, интерцида, коммерческих дефенсина LL 37 и кателецидина HNP, как в фосфатно-солевом буфере, так и в физиологическом растворе).

Полученные результаты показали, что бактерицидная активность выявлялась у следующих веществ: 1пик МНК, интерцид, пептид ZP1, пептид ZP2, дефенсин LL 37, кателецидин HNP.

Выявлено, что бактерицидной активностью в отношении *S. aureus* 155 обладают коммерческие дефенсин LL 37 и кателецидин HNP растворенные в буферном растворе в дозе 10 мкг/мл ($20,1 \pm 1,9$ и $22,2 \pm 2,15$ мм диаметр зоны подавления роста бактерий соответственно). У них же в той же дозе проявляется самая высокая бактерицидная активность и в отношении *E. Coli* 2290 ($23,2 \pm 1,7$ и $24,7 \pm 2,15$ мм диаметр зоны подавления роста бактерий соответственно). Идентичной активностью обладал полученный нами синтетический пептид ZP2. У него бактерицидная 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 бактерий. Отличие было лишь в том, что подобная бактерицидная активность пептида проявилась не только в

буферном растворе, но и в физиологическом растворе в отличие от коммерческих БЭП, которые в физиологическом растворе теряли свою антимикробную активность.

В отношении *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 бактерицидная активность проявилась также у интерцида (диаметр зоны подавления роста микроорганизмов составила $15,1 \pm 0,9$ в дозе 10 мг/мл и $10,3 \pm 0,6$ в дозе 30 мг/мл соответственно). Но степень его активности была значительно ниже в отношении *St. aureus* 155 в 1,3-1,5 раза, в отношении *E. coli* 2290 в 2,2-2,4 раза по сравнению с анализируемыми коммерческими биологически активными пептидами и синтетическим пептидом ZP2.

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

Так у 1 пика МНК диаметр зоны подавления роста микроорганизма соответственно в дозах 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 ZP 1 соответственно в дозах 10 и 30 мг/мл – $11,5 \pm 1,9$ и $9,6 \pm 0,8$ мм. Однако их активность была ниже в 1,7-1,9 раза анализируемых коммерческих БЭП и ZP2.

При оценки влияния веществ на *Candida albicans* ни один из исследуемых препаратов не выявил антигрибковой активности.

Таким образом, исследования показали, что наибольшая активность выявлена у синтетического пептида ZP2, при этом его активность проявлялась не только в фосфатно-солевом буфере, но и в физиологическом растворе в отношении как Грам⁺, так и Грам⁻ бактерий. Наличие противогрибковой активности не было установлено ни у одного из исследуемых образцов.

Таблица 8 – Характеристика антимикробной активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ и коммерческих дефенсина и кателецидина

№	Исследуемые средства	Концентрация мкг/мл	n	Диаметр зоны подавления роста, мм		
				<i>S. aureus</i> 155	<i>E. coli</i> 2290	<i>Candida albicans</i>
1	Пептид ZP 1 (физиологический раствор)	3	10	0	0	0
		10	10	10,5 ± 1,24	0	0
		30	10	10,6 ± 0,6	0	0
2	Пептид ZP2 (физиологический раствор)	3	10	0	0	0
		10	10	12,2 ± 1,1	7,9 ± 0,46	0
		30	10	22,6 ± 2,23	20,1 ± 1,8	0
3	Пептид ZP1 (буфер)	3	10	0	0	0
		10	10	11,5 ± 1,09	0	0
		30	10	9,6 ± 0,8	0	0
4	Пептид ZP2 (буфер)	3	10	0	0	0
		10	10	11,7 ± 1,2	7,3 ± 0,5	0
		30	10	22,3 ± 2,16	19,6 ± 1,6	0
5	LL37 (физиологический раствор)	3	10	0	0	0
		10	10	0	0	0
		30	10	0	0	0
6	HNP (физиологический раствор)	3	10	0	0	0
		10	10	0	0	0
		30	10	0	0	0
7	LL 37 (буфер)	3	10	0	0	0
		10	10	20,1 ± 1,9	23,2 ± 1,7	0
		30	10	19,4 ± 2,16	19,4 ± 1,7	0
8	HNP (буфер)	3	10	17,3 ± 1,2	13,3 ± 1,1	0
		10	10	22,2 ± 2,15	24,7 ± 2,15	0
		30	10	20,4 ± 1,8	20,4 ± 1,8	0

Поскольку стафилококки и энтеробактерии вызывают многие инфекционно-воспалительные заболевания, при этом нередко проявляя устойчивость к используемым в клинике антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам, разработка новых эффективных

лекарственных средств для борьбы с антибиотикорезистентными бактериями остается актуальной задачей. С этой точки зрения синтетический пептид ZP2 является очень перспективным кандидатом, так как обладает не только антимикробной активностью в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, но и показывает широкий спектр иных «полезных» биоэффектов [42].

В структуре возбудителей многих бактериальных инфекций, в том числе и эндогенной природы (апостематозный нефрит, послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения, раневые дефекты при синдроме диабетической стопы и др.), большую долю занимает грамотрицательная флора и, прежде всего, кишечные палочки [16]. Данные бактерии при инфицировании внутренних органов на фоне их иммунобиологической скомпрометированности способны вызывать в макроорганизме инфекционно-воспалительный процесс, проявляющийся различной патологией [16]. В развитие воспаления вовлекаются клетки иммунной системы, синтезирующие различные цитокины, выполняющие регуляторную функцию и одним из ключевых цитокинов является гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [26].

Вместе с тем, антибактериальное действие синтетического пептида ZP2 в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий пока не охарактеризовано, хотя в опытах *in vitro* на музейных штаммах стафилококков и клинических изолятов грамположительных бактерий показаны закономерности его дозозависимого влияния на рост бактерий в жидкой питательной среде с учетом их видовой принадлежности и фазы развития культур [23].

Поэтому прежде чем начать анализ влияния синтетического пептида ZP2 в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий, мы провели сравнительную оценку влияния данного различных концентраций данного пептида на музейные штаммы *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P).

4.2 – Исследование доза-зависимых эффектов синтетического пептида ZP2 на рост бактериальных культур в жидкой питательной среде *in vitro*

Энтеробактерии, в том числе эшерихии и клебсиеллы, принадлежат к потенциально патогенным микроорганизмам, входящим в состав кишечного микробиоценоза (как его ассоциативный компонент), и, одновременно, являются доминирующими этиологическими агентами эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний разной локализации, включая нозокомиальные инфекции, в том числе послеоперационные инфекционные осложнения [16, 28, 65, 200]. По данным многочисленных исследований и заключению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), указанные микроорганизмы часто обладают резистентностью к широкому спектру антибиотиков, что затрудняет эмпирический выбор адекватных лекарственных препаратов для стартовой терапии патологии, ассоциированной с этими возбудителями, и критически снижает ее эффективность [41, 82, 210].

Такая ситуация побуждает создавать новые антибиотики и химиотерапевтические средства антибактериальной направленности. Одним из перспективных путей решения данной задачи является использование пептидов естественного или искусственного происхождения, которые проявляют антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [34, 86, 118, 208]. При этом некоторые антимикробные пептиды, помимо противобактериальной активности, могут обладать иммуномодулирующими эффектами [5, 35, 81].

Последнее в полной мере относится к синтетическому пептиду ZP2, учитывая, что данный пептид проявляет плеiotропные эффекты, обладая не только иммуностимулирующими и репаративными свойствами, но и антимикробной активностью, в том числе в отношении грамположительной кокковой флоры

(микро- и стафилококки) [1, 13, 23, 44, 46, 47, 49, 50, 57, 63]. О влиянии указанного синтетического пептида ZP2 на рост энтеробактерий известно гораздо меньше, хотя в ряде экспериментальных работ показан его ингибирующий эффект на развитие тест-культур *E. coli* в жидкой питательной среде [23]. Кроме оценки ингибирующего воздействия указанного синтетического пептида на рост энтеробактерий, не менее интересным представляется исследование его влияния на способность данных микроорганизмов формировать биопленки, поскольку данное свойство относится к факторам персистенции и адаптации бактерий [7, 180], а его модификация может оказать влияние на течение инфекционно-воспалительного процесса.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование клинических штаммов энтеробактерий *in vitro*.

4.3 – Влияние синтетического пептида ZP2 на рост музейных штаммов *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P)

Прежде чем анализировать влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на клинические штаммы энтеробактерий, мы исследовали его влияние на рост биомассы музейных штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий.

В работе использованы тест-штаммы *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), а также 24 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n=12) и *Klebsiella pneumoniae* (n=12), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, желчи у больных с холециститом и холангитом (из коллекции культур микроорганизмов ИКВС УрО РАН). Выделение чистых культур микроорганизмов осуществляли

общепринятыми методами, а их видовую идентификацию проводили с использованием официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (Чехия) [43, 56].

В экспериментах использован опытный образец синтетического пептида ZP2, синтезированного стандартным методом [27].

Анализ влияния *in vitro* синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* и *S. aureus*, а также клинических изолятов энтеробактерий осуществлялся путем инкубации бактериальных культур в течение 24 часов в микроячейках стерильной пластиковой планшеты в присутствии синтетического пептида ZP-2 (см. Главу Материалы и методы).

Анализ влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование (БПО) клиническими штаммами энтеробактерий осуществлялось с помощью "планшетного метода" с незначительными модификациями путем их выращивания в стерильной 96-луночной полистироловой планшете [80, 188].

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). О достоверности межвидовых отличий судили по критерию Стьюдента - t и/или критерию Манна-Уитни – U [36. 62].

Полученные в сравнительных экспериментах *in vitro* данные свидетельствовали, что внесенный в жидкую питательную среду синтетический пептид ZP2 ингибировал рост исследованных тест-штаммов бактерий – *E. coli* K12 (ATCC №25922) и *S. aureus* 209P (ATCC №6538-P), дозозависимо снижая биомассу опытных культур в процессе развития бактериальных популяций (рисунок 4).

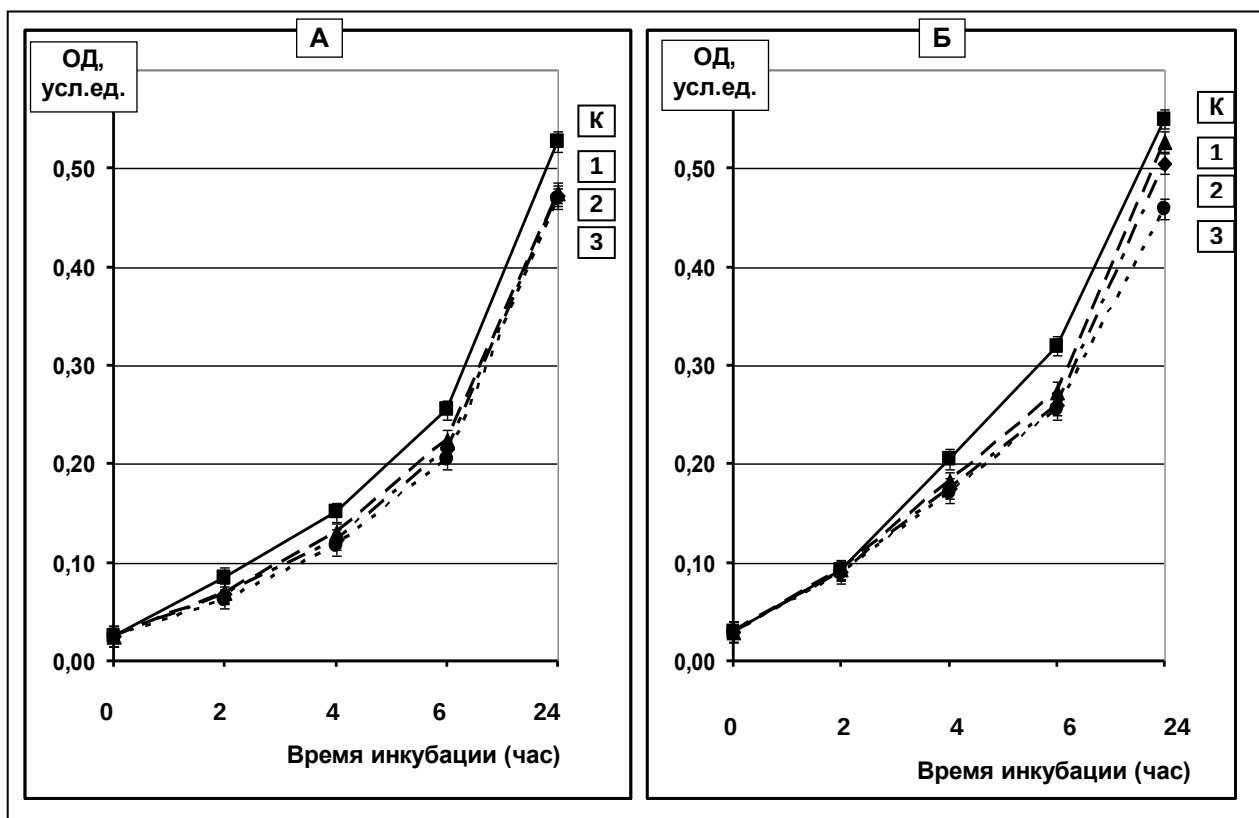


Рисунок 4 – Рост тест-штаммов

Примечание: *E. coli* K12 (А) и *S. aureus* 209P (Б) в МПБ (ОД, усл. ед.) при разной концентрации ZP2: 1 – 10 мкг/мл; 2 – 30 мкг/мл; 3 – 100 мкг/мл; К – контроль

При этом характер ингибирующего действия синтетического пептида ZP2 на рост исследованных тест-штаммов бактерий зависел от вида микроорганизмов (таблица 1). 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 %).

Таблица 9 – Индекс ингибирования (ИИ, %) роста в МПБ *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P на разных этапах развития культур в зависимости от концентрации ZP2

Концентрация пептида ZP2 (мкг/мл)	Индекс ингибирования (ИИ, %) пептидом ZP2 роста <i>E. coli</i> K12 и <i>S. aureus</i> 209P в МПБ на разных этапах развития культур							
	<i>E. coli</i> K12				<i>S. aureus</i> 209P			
	2 час	4 час	6 час	24 час	2 час	4 час	6 час	24 час
3 мкг/мл	12,2±0,6*	10,4±0,3	9,2±0,7	6,9±0,3*	2,3±0,6	8,3±1,2	11,4±0,9	3,2±0,8
10 мкг/мл	19,5±1,4*	14,1±1,1	12,0±0,8	10,4±0,3*	3,8±0,9	10,1±1,4	14,2±0,8	4,6±0,3
30 мкг/мл	22,7±1,6*	18,9±0,9*	15,7±1,0	11,0±0,6*	5,4±1,5	13,0±0,9	17,4±0,8	7,8±0,6
100 мкг/мл	26,2±0,8*	22,9±0,5*	19,3±0,7	12,4±1,1*	9,3±0,4	15,0±1,2	20,4±0,9	16,0±0,3
300 мкг/мл	34,0±1,4*	32,8±0,5*	28,8±0,4*	12,6±1,0*	12,0±0,6	22,5±1,1	25,7±0,5	17,8±0,3

Примечание: * - достоверные отличия между *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P ($p < 0,05$).

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 синтетического пептида ZP2 3-100 мкг/мл, хотя в опытах с более высокой его концентрацией (300 мкг/мл) уровень ингибирования роста кишечной палочки был несколько выше, чем подавление золотистого стафилококка (28,8±0,4 против 25,7±0,5%, $p < 0,05$).

Кроме того, необходимо подчеркнуть, что для оценки влияния синтетического пептида ZP2 на рост микроорганизмов (как эшерихий, так и стафилококков) более предпочтительным временным интервалом является период развития культур с 2 до 6 часов, так как к этому времени нивелируются естественные «погрешности» в количестве инокулируемых бактерий, которые неминуемо сказываются на параметрах бактериального роста на начальных

этапах культивирования.

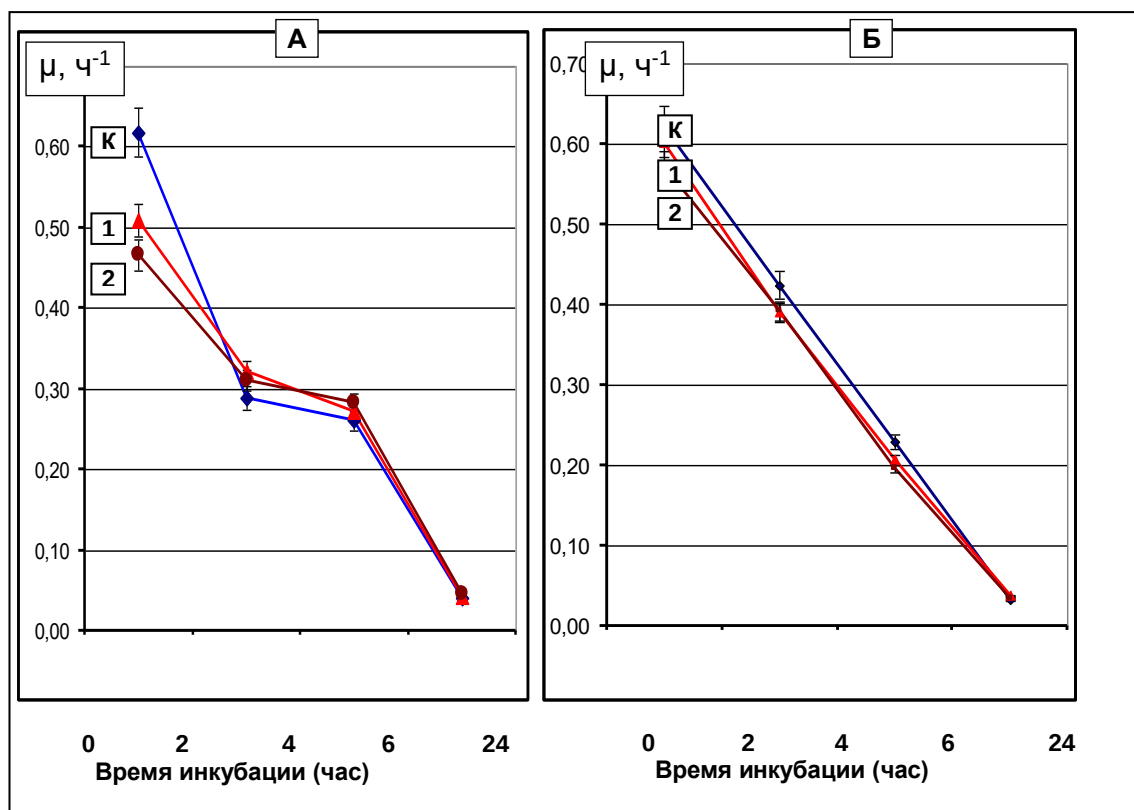


Рисунок 5 – Удельная скорость роста (μ , ч⁻¹) *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P в МПБ на разных этапах развития культур в зависимости от концентрации пептида ZP2:

Примечание: К (синяя линия) – контроль; 1 (красная линия) – 10 мкг/мл; 2 (коричневая линия) – 100 мкг/мл.

Биомасса бактерий (ОД) и ее динамика в периодической культуре являются производными от такой интегральной характеристики, как удельная скорость роста микроорганизмов (μ , ч⁻¹), которая изменяется на разных этапах развития бактериальных популяций в периодических культурах. Как видно из демонстрационных графиков, представленных на рисунке 5, изменение удельной скорости роста в контрольных (без пептида ZP2) и опытных (с синтетическим пептидом ZP2 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл) культурах исследованных тест-штаммов бактерий (*E. coli* K12 и *S. aureus* 209P) имело определенные видоспецифические особенности.

Так, на начальном этапе культивирования (0-2 час) удельная скорость

роста (μ_{0-2}) *E. coli* K12 в контроле была в 1,12-1,51 раза выше, чем в опытах с градиентом концентраций синтетического пептида ZP2 3-300 мкг/мл ($0,62 \pm 0,04$ против $0,55-0,41$ ч⁻¹, $p < 0,05$), однако уже на следующих временных интервалах развития культур (2-4 и 4-6 час) удельные скорости роста эшерихий в экспериментальных культурах не только выравнивались с показателями контрольных проб, но даже несколько их превышали ($0,30-0,32$ и $0,27-0,29$ ч⁻¹ против $0,29 \pm 0,01$ и $0,26 \pm 0,01$ ч⁻¹ соответственно, $p > 0,05$). В то же время в экспериментах с *S. aureus* 209Р удельная скорость роста золотистого стафилококка в опытных культурах была снижена на всех начальных этапах развития (0-6 часов) в сравнении с контролем, и особенно заметно – во временных интервалах 2-4 и 4-6 часов (соответственно на 7,5-14,9 и 7,3-14,4%).

Характер выявленных особенностей влияния синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209Р, помимо прочего, указывал на то, что клетки кишечной палочки, взятые из «стационарной» (суточной) агаровой культуры проявляли более выраженную чувствительность к антибактериальному действию данного пептида, чем клетки золотистого стафилококка.

Учитывая известные данные об ингибирующем действии синтетического пептида ZP2 на способность клинических изолятов стафилококков образовывать биопленки [118], важным представлялось оценить его влияние на биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12.

В серии специальных экспериментов *in vitro* было установлено, что синтетический пептид ZP2 в диапазоне проанализированных концентраций (3-300 мкг/мл) дозозависимо снижал способность эшерихий формировать биопленки (рисунок 6). Как видно из представленной на рисунке диаграммы, в опыте достоверное снижение биопленкообразования 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.

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.

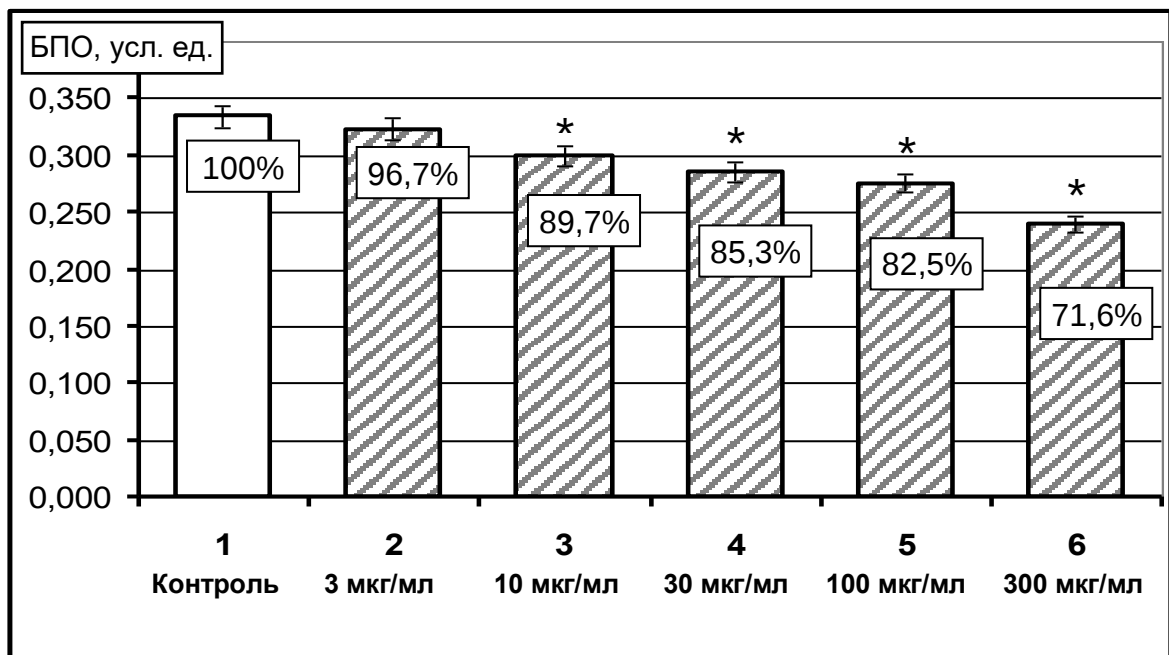


Рисунок 6 – Биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12 в зависимости от концентрации пептида ZP2

Примечание: * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$) ($n=12$).

На следующем этапе исследования было решено исследовать влияние синтетического пептида ZP2 в концентрации 10 мкг/мл на рост и БПО клинических штаммов энтеробактерий (эшерихии и клебсиеллы). Выбор этой концентрации синтетического пептида ZP2 был 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 синтетического пептида ZP2 на рост клинических

штаммов стафилококков и их биопленкообразование [1, 11, 44]; в-третьих, имеющейся информацией о ее репарационном действии и эффективной иммуотропной активности в отношении разных иммунокомпетентных клеток [12,13, 23, 29, 45, 46, 47, 49, 50, 57, 63].

Эксперименты *in vitro* показали, что синтетический пептид ZP2 в концентрации 10 мкг/мл существенно подавлял рост к 4 и 6 часам инкубации примерно у половины (58,3 и 50,0% соответственно) клинических штаммов *E. coli* и у трети (33,3%) клинических изолятов *K. pneumoniae* (таблица 10). При этом Индексы ингибирования роста клинических штаммов энтеробактерий вне зависимости от исследованных видов колебались в широком диапазоне (от -11,0 до +20,8%), что определяло низкие средние значения в исследованных выборках изолятов эшерихий и клебсиелл (3,0-3,5 и 1,8-2,4% соответственно) и, кроме того, свидетельствовало о внутривидовом (межштаммовом) разнообразии энтеробактерий по уровню их чувствительности к синтетическому пептиду ZP2.

Анализ особенностей подавления синтетическим пептидом ZP2 роста 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 (таблица 10).

Наличие отрицательных значений Индекса ингибирования роста на 4 и 6 часах, зафиксированные у небольшого числа исследованных клинических штаммов эшерихий и клебсиелл (у $8,3 \pm 8,3\%$), указывало на то, что в использованной концентрации (10 мкг/мл) синтетический пептид ZP2 способен оказывать не только ингибирующее, но и стимулирующее действие на отдельные клинические изоляты энтеробактерий.

Таблица 10 – Показатели чувствительности клинических штаммов энтеробактерий к синтетическому пептиду ZP2 в концентрации 10 мкг/мл

Анализируемые показатели	Показатели чувствительности энтеробактерий к пептиду ZP2 на разных этапах развития культур			
	<i>Escherichia coli</i> (n=12)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=12)	
	4 час	6 час	4 час	6 час
Диапазон ИИ (%)*; min – max	-11,0 – 12,3	-12,4 – 20,8	-7,1 – 11,7	-6,5 – 11,8
Среднее значение ИИ (%) в выборке штаммов	3,5±1,8	3,0±2,4	1,8±1,6	2,4±1,5
Доля чувствительных штаммов, %	58,3±14,9	50,0±15,1	33,3±14,2	33,3±14,2
Диапазон ИИ (%) в группе чувствительных штаммов; min – max	5,0 – 12,3	5,0 – 20,8	5,1 – 11,7	5,1 – 11,8
Среднее значение ИИ (%) в группе чувствительных штаммов	7,2±1,0	9,1±2,6	8,1±1,6	8,5±1,5

Примечание: * - ИИ – индекс ингибирования роста бактерий (%).

Аналогичный (стимулирующий) эффект синтетического пептида ZP2 ранее был описан при исследовании его влияния на рост в жидкой питательной среде микрококка [10]. 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 [8].

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.

При оценке влияния синтетического пептида ZP2 (в концентрации 10 мкг/мл) на способность клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* формировать биопленки было установлено, что в исследованных выборках бактериальных изолятов имеется 3 группы: 1 группа – штаммы, у которых наблюдалось снижение БПО больше, чем на 5% от контрольных значений; 2 – «индифферентные» штаммы, то есть без существенного изменения у них этого показателя (отклонение от контроля менее 5%); 3 – штаммы, у которых БПО увеличивалось на 5% и более относительно контроля (рисунок 7).

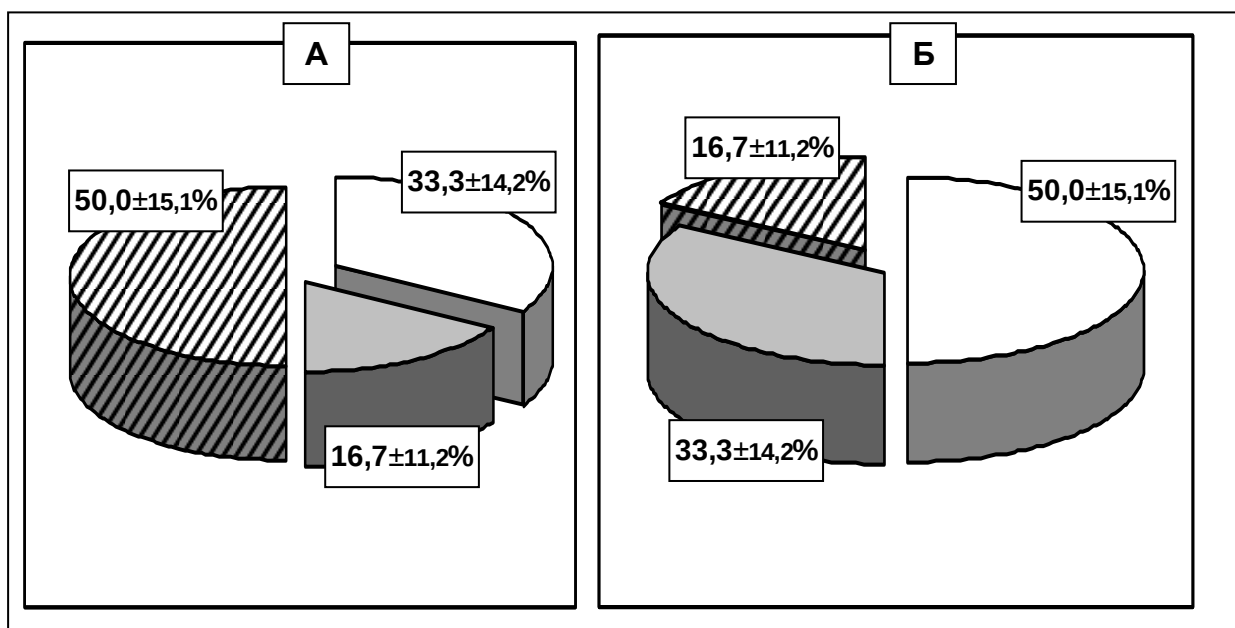


Рисунок 7 – Структура штаммов *E. coli* (А) и *K. pneumoniae* (Б) по эффектам пептида ZP2 на их БПО

Примечание: белый сектор – ингибирование; серый сектор – индифферентность; заштрихованный сектор – стимулирование (n=12).

Как видно из представленных на рисунке диаграмм, в выборках исследованных клинических штаммов энтеробактерий размеры соответствующих групп изолятов и их соотношение между собой зависели от видовой принадлежности микроорганизмов. Так, среди эшерихий группа штаммов, у которых синтетический пептид ZP2 подавлял образование биопленок, включала 33,3±14,2% изолятов, в то время как в выборке клебсиелл доля таких изолятов была в 1,5 раза больше и составила 50,0±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 (в данном случае в виде изменения у них способности формировать биопленки) на действие синтетического пептида ZP2, причины и механизмы которых предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Возможно, это каким-то образом 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 синтетического 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 $r = -0,74$).

Полученные результаты интересны в нескольких аспектах.

Анализируя представленные сравнительные данные о влиянии синтетического пептида ZP2 (в диапазоне концентраций 3-300 мкг/мл) на развитие бактериальных популяций тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209Р, необходимо подчеркнуть, что при общем дозозависимом антибактериальном действии данного пептида на указанные микроорганизмы имеются его видоспецифические особенности, которые отчетливо выявляются при оценке динамики таких интегральных показателей, как Индекс ингибирования (%) и удельная скорость роста ($ч^{-1}$) кишечной палочки и золотистого стафилококка в периодических культурах. Очевидно, вышеописанные видовые/родовые отличия динамики указанных показателей,

на которые раньше мы уже обращали внимание при оценке действия синтетического пептида ZP2 на музейные штаммы грамположительных кокков разной видовой принадлежности (*Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) [10], обусловлены, с одной стороны, особенностями строения клеточных стенок кишечной палочки и золотистого стафилококка как грамотрицательного и грамположительного микроорганизмов, а с другой стороны, теми изменениями поверхностных структур (химический состав, степень гидрофильности/гидрофобности, архитектура макромолекул и др.) бактерий, которые они претерпевают в процессе периодического культивирования на разных этапах развития бактериальных популяций – от лаг-фазы до стационарной фазы [17, 32, 212].

Иначе говоря, имеется определенная видоспецифичность ингибирующего действия синтетического пептида ZP2 на микроорганизмы, которая не является его исключительной прерогативой, поскольку известно, что интерлейкин 26 способен подавлять рост *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), некоторых штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, но не *Enterococcus faecalis* [198], причем эффективная его концентрация в отношении *E. coli* была в 2,5 раза выше, чем в опытах с *S. aureus*. Кроме того в недавней работе с использованием IFN- β , спирали 4 как части молекулы IFN- β и ее синтетического аналога было показано их антимикробное действие на *S. aureus*, но не на грамотрицательные бактерии (в частности *E. coli*) [103].

Наши результаты и имеющиеся немногочисленные литературные данные указывают на то, что некоторые цитокины и их активные центры в макроорганизме выполняют не только иммунорегуляторную сигнальную функцию (хотя, очевидно, она является ведущей), но и способны непосредственно участвовать в киллинге бактерий, формируя совместно с рядом хемокинов семейство киноцидинов, обладающих противомикробными свойствами [103].

Полученные данные по межвидовому и штаммовому

разнонаправленному влиянию синтетического пептида на эшерихии и клебсиеллы ставят перед нами несколько важных вопросов. Во-первых, а как данный пептид влияет на рост и размножение других видов грамотрицательных бактерий, в том числе и антибиотикорезистентных (генетически) их видов. И во-вторых, учитывая, что данный пептид является основой для косметических средств АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель, как данное косметическое средство влияет на рост грамотрицательных микроорганизмов, в том числе и антибиотикорезистентных клинических штаммов.

4.4 – Исследование влияния косметического средства АЦЕГРАМ-спрей на рост и размножение грамотрицательных бактерий

Грамотрицательные бактерии разной таксономической принадлежности, в частности энтеробактерии, псевдомонады и ацинетобактеры, относятся к потенциально патогенной микрофлоре и являются частыми возбудителями инфекционно-воспалительной патологии, в том числе эндогенных и нозокомиальных инфекций [16, 200]. Причем данные возбудители часто обладают полиантибиотикорезистентностью, что осложняет выбор этиотропных лекарственных средств для эмпирической (стартовой) терапии вызванных ими заболеваний и делает ее мало эффективной [14, 41, 82]. Это обстоятельство побудило Всемирную Организацию Здравоохранения (ВОЗ) впервые составить и опубликовать 27.02.2017 г. Лист приоритетных возбудителей инфекций, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, включив в него указанные микроорганизмы, прежде всего *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, в качестве «критических» патогенов, которые чаще всего проявляют множественную устойчивость к антибиотикам (даже к резервным карбапенемам), и против которых требуется срочная разработка новых действенных антибактериальных

препаратов [210].

Потенциальными претендентами на роль таких препаратов являются природные, полусинтетические и синтетические пептиды, нередко обладающие антимикробной активностью, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [81, 86, 118, 208].

В этом плане определенный интерес вызывает вопрос о чувствительности грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2, поскольку в недавнем цикле работ показано, что указанный пептид помимо иммуотропных и репаративного эффектов обладает антибактериальной активностью в отношении эшерихий и грамположительной кокковой флоры (микро- и стафилококки) [1, 23, 44]. 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 [13, 23, 46, 47, 49, 50, 57, 63]. Однако его влияние на клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* не тестировалось.

Целью настоящего исследования была оценка антибактериальной активности косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности.

Опыты *in vitro* проведены на 24 клинических штаммах грамотрицательных бактерий видов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Acinetobacter baumannii* (n=8) и *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, из отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, из желчи и аспирата нижних дыхательных путей у больных с хирургической патологией. Выделение чистых культур осуществляли общепринятыми методами, а видовую идентификацию клинических изолятов микроорганизмов проводили с использованием

официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (Чехия), а также на микробиологическом анализаторе VITEK 2 Compact (Biomérieux, Франция) [40, 43].

Влияние косметического средства «Ацеграм» (спрей) на репродуктивные показатели грамотрицательных бактерий оценивали по их росту в жидкой питательной среде в ячейках 96-луночного полистиролового планшета после инокуляции 25 мкл взвесей микроорганизмов ($5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур, в 125 мкл мясопептонного бульона (МПБ) с добавлением в него 50 мкл «Ацеграма» путем замера на 0 (исходное значение), 4 и 24 часах инкубации при 37°C оптической плотности (ОД) бактериальных культур с помощью спектрофотометра Multiscan Ascent (Thermo Labsystems, Финляндия) при длине волны (λ) 492 нм, то есть в культуральной среде конечная концентрация синтетического пептида ZP2 составляла 5 мкг/мл. Контролем служили культуры бактерий, где вместо «Ацеграма» в МПБ добавляли 50 мкл стерильной дистиллированной воды.

Для определения степени влияния «Ацеграма» на рост бактерий рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ, %) развития бактериальных популяций по формуле [8]:

$$\text{ИИ} = (\text{ОД}_к - \text{ОД}_о) / \text{ОД}_к \cdot 100\% \quad (8)$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); ОД_к и ОД_о – 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%.

Кроме того, мы рассчитывали удельную скорость роста (μ , ч⁻¹) бактерий в МПБ на разных этапах развития бактериальных культур (0-4 и 4-24 часа) по формулам [68]:

$$\mu_{0-4} = (\text{LnOD}_4 - \text{LnOD}_0) / 4 \quad \% \quad (9)$$

$$\text{и } \mu_{4-24} = (\text{LnOD}_{24} - \text{LnOD}_4) / 20\% \quad (10)$$

где μ_{0-4} и μ_{4-24} – удельные скорости роста (ч⁻¹) бактерий на временных интервалах 0-4 и 4-24 часа соответственно; LnOD₀, LnOD₄ и LnOD₂₄ –

натуральные логарифмы оптической плотности (ОД) бульонных культур на 0, 4 и 24 часах инкубации.

Данные были обработаны методами вариационной статистики [36, 62].

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что косметическое средство «Ацеграм», основу которого составляет синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2, в целом, оказывало ингибирующее воздействие на рост грамотрицательных микроорганизмов исследованных таксонов, однако уровень и характер его антибактериальной активности зависели как от видовой принадлежности бактерий, так и их штаммовых особенностей.

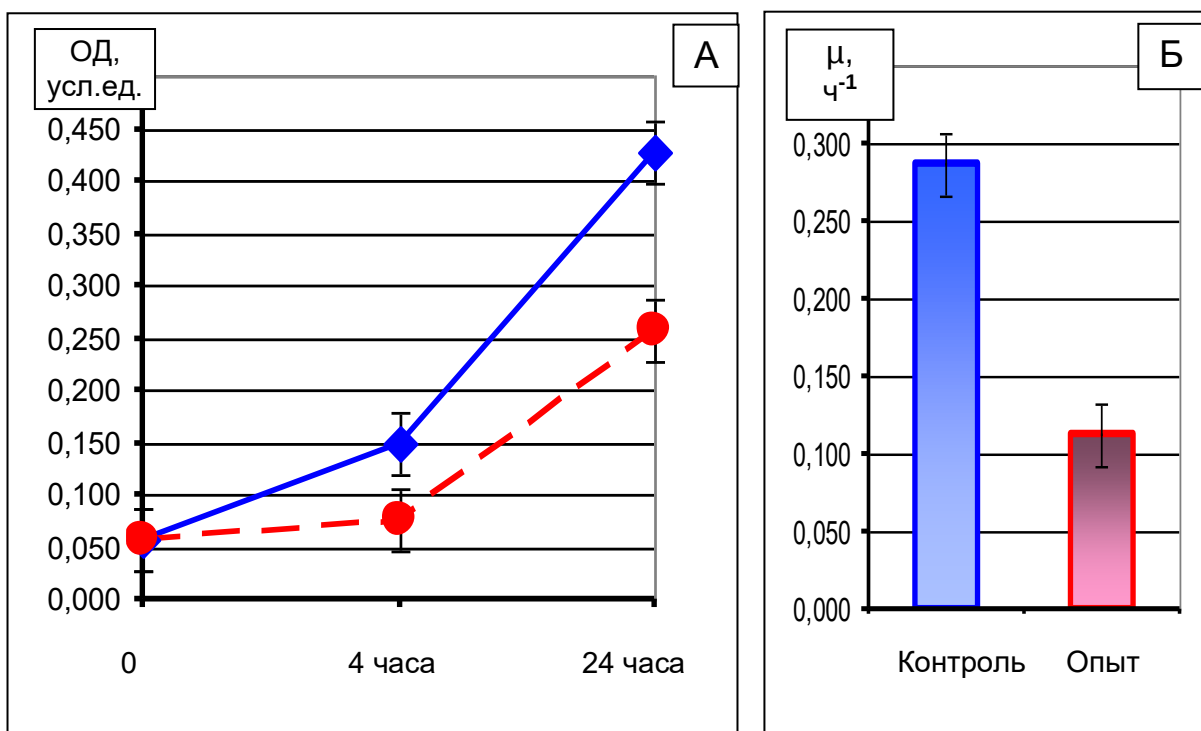


Рисунок 8 – Влияние «Ацеграм» на динамику ОД (А) и удельную скорость роста – μ_{0-4} (Б) клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae* в МПБ

Примечание: для рисунка А: по оси ординат – оптическая плотность (ОД, усл.ед.); по оси абсцисс – время (часы); синяя сплошная линия – контроль; красный пунктир – опыт; для рисунка Б: по оси ординат – удельная скорость роста в течение 4 часов (μ , ч⁻¹); синий столбик – контроль; красный столбик – опыт.

Так, клинические штаммы *K. pneumoniae* существенно медленнее развивались в МПБ при добавлении в жидкую питательную среду

косметического средства «Ацеграм» (опыт), чем в контроле, на что указывали не только разный характер динамики ОД опытных и контрольных бульонных культур микроорганизмов (рисунок 8А), но и 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 (рисунок 8Б, таблица 11).

При этом на более позднем этапе развития культур (4-24 часа) удельные скорости роста исследованных 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 (таблица 11), что, очевидно, указывало на способность клебсиелл адаптироваться к ингибирующему действию синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2.

Таблица 11 – Удельная скорость роста штаммов *Klebsiella pneumoniae* в МПБ с учетом наличия в среде «Ацеграма» (на разных этапах)

Вид бактерий (количество штаммов)	Образцы	Удельная скорость роста (μ , ч ⁻¹) бактерий в разные временные интервалы	
		0-4 часа	4-24 часа
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=8)	Контроль (К)	$0,287 \pm 0,021$	$0,053 \pm 0,003$
	Опыт (Оп)	$0,113 \pm 0,023^*$	$0,053 \pm 0,012$
	К/Оп	2,55	1,00

Примечание: * – достоверность отличий значений в опыте и контроле ($p < 0,05$):

К/Оп – отношение средних значений в контроле и опыте.

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 (таблица 12).

Еще более выраженный ингибирующий эффект косметическое средство «Ацеграм» оказывало на рост в МПБ клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*.

Таблица 12 – Индексы ингибирования (ИИ, %) роста граммотрицательных бактерий в МПБ «Ацеграмом» (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*.

С одной стороны, на это указывала депрессивная динамика ОД бульонных культур данных микроорганизмов в опыте при сравнении с контролем (рисунок 9А); с другой стороны, об этом же свидетельствовало выраженное относительно контроля уменьшение удельной скорости роста (μ) бактерий в опытных культурах как на начальных, так и на поздних этапах развития бактериальных популяций – в 7,85 и 5,29 раза соответственно (рисунок 9Б, таблица 13). Конечным итогом антибактериального действия «Ацеграма» в отношении клинических штаммов *A. baumannii* явилось то, что средние значения Индекса ингибирования их роста в МПБ были максимальными (при сравнении с этим показателем для бактерий других исследованных видов) и достоверно увеличивались с 47,6±4,0% на 4 часах, до 77,1±7,7% на 24 часах (таблица 13).

Здесь же попутно отметим разницу в характере роста клинических изолятов *K. pneumoniae* и *A. baumannii* в МПБ (в контроле), которая проявлялась в том, что клебсиеллы в сравнении с ацинетобактерами более активно росли на начальных этапах (0-4 часа) и медленнее в позднюю стадию (4-24 часа), о чем свидетельствовали соответствующие значения удельной скорости их роста (μ_{0-4} и μ_{4-24}): 0,287±0,021 против 0,196±0,039 ч⁻¹ (в 1,46 раза) и 0,053±0,003 против 0,069±0,004 ч⁻¹ (в 1,30 раза).

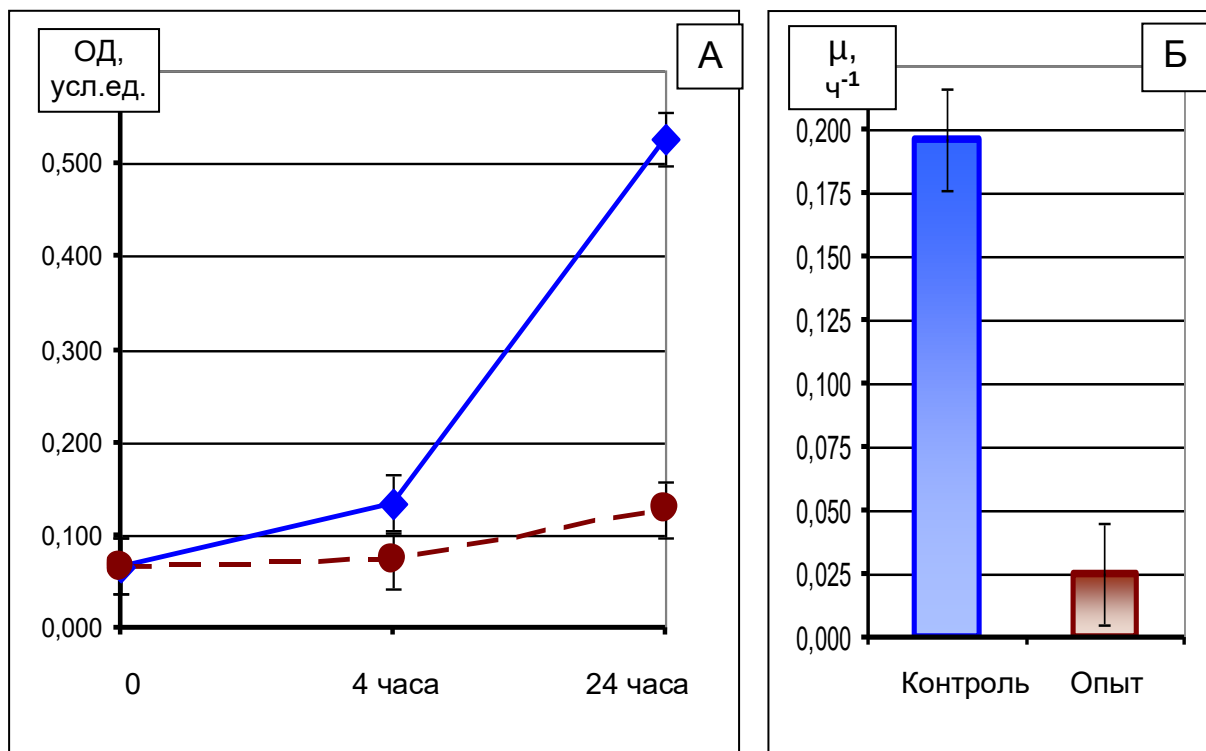


Рисунок 9 – Влияние «Ацеграма» на динамику ОД (А) и удельную скорость роста – μ_{0-4} (Б) клинических штаммов *Acinetobacter baumannii* в МПБ

Примечание: для рисунка А: по оси ординат – оптическая плотность (ОД, усл.ед.); по оси абсцисс – время (часы); синяя сплошная линия – контроль; коричневый пунктир – опыт; для рисунка Б: по оси ординат – удельная скорость роста в течение 4 часов (μ , ч⁻¹); синий столбик – контроль; коричневый столбик – опыт.

Таблица 13 - Удельная скорость роста штаммов *Acinetobacter baumannii* в МПБ с учетом наличия в среде «Ацеграма» (на разных этапах)

Вид бактерий (количество штаммов)	Образцы	Удельная скорость роста (μ , ч ⁻¹) бактерий в разные временные интервалы	
		0-4 часа	4-24 часа
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=8)	Контроль (К)	0,196±0,039	0,069±0,004
	Опыт (Оп)	0,025±0,036*	0,013±0,011*
	К/Оп	7,85	5,29

Примечание: * – достоверность отличий значений в опыте и контроле ($p < 0,05$);

К/Оп – отношение средних значений в контроле и опыте.

Клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa* проявляли к антибактериальному действию косметического средства «Ацеграм» большую устойчивость, чем исследованные изоляты *K. pneumoniae* и *A. baumannii*.

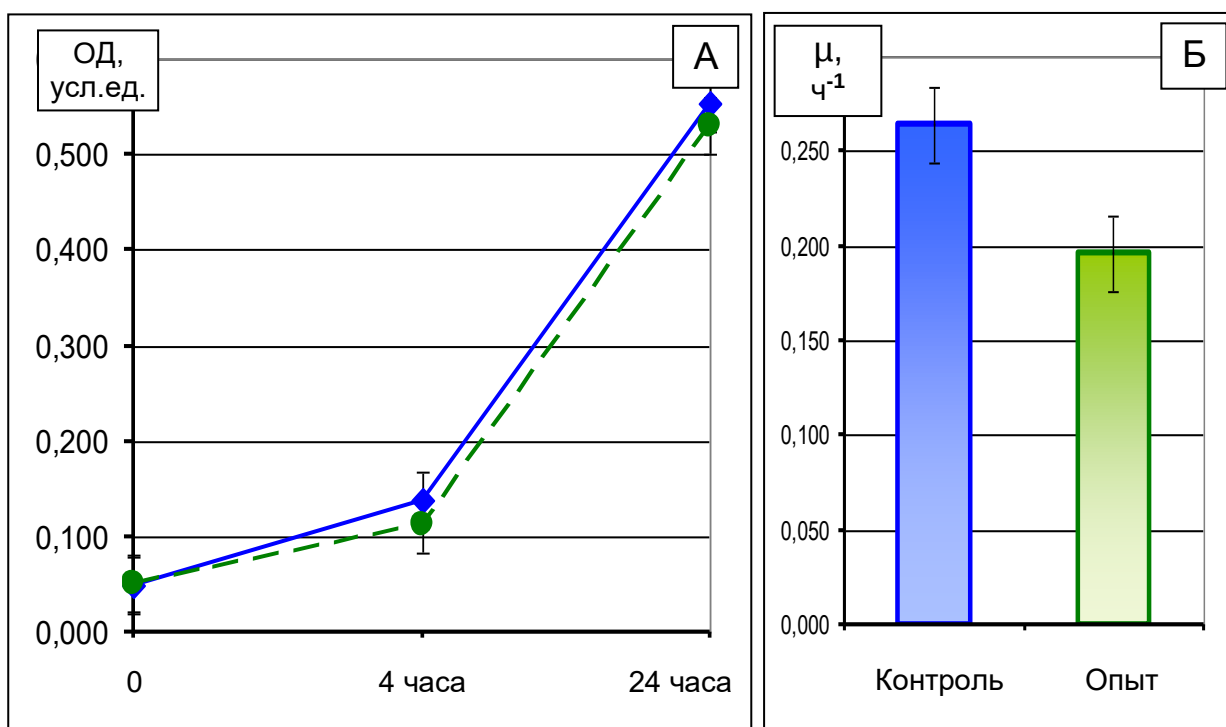


Рисунок 10 – Влияние «Ацеграма» на динамику ОД (А) и удельную скорость роста – μ_{0-4} (Б) клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в МПБ

Примечание: для рисунка А: по оси ординат – оптическая плотность (ОД, усл.ед.); по оси абсцисс – время (часы); синяя сплошная линия – контроль; зеленый пунктир – опыт; для рисунка Б: по оси ординат – удельная скорость роста в течение 4 часов (μ , ч⁻¹); синий столбик – контроль; зеленый столбик – опыт.

Как видно из рисунка 10А, 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 (рисунок 10Б, таблица 14). Это обеспечивало среднее значение Индекса ингибирования роста *P. aeruginosa* на 4 часах инкубации всего на уровне $18,2 \pm 3,1\%$ (таблица 12), который был в 2,71 и 2,62 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 соответственно (таблица 14), 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 $2,2 \pm 4,7\%$ (таблица 12), которое можно было расценивать как способность псевдомонад «ускользнуть» от антибактериального действия синтетического пептида ZP2, входящего в состав косметического средства «Ацеграм».

Таблица 14 – Удельная скорость роста штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в МПБ с учетом наличия в среде «Ацеграма» (на разных этапах)

Вид бактерий (количество штаммов)	Образцы	Удельная скорость роста (μ , ч ⁻¹) бактерий в разные временные интервалы	
		0-4 часа	4-24 часа
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=8)	Контроль (К)	$0,264 \pm 0,019$	$0,068 \pm 0,004$
	Опыт (Оп)	$0,196 \pm 0,005^*$	$0,077 \pm 0,006$
	К/Оп	1,35	0,89

Примечание: * – достоверность отличий значений в опыте и контроле ($p < 0,05$); К/Оп – отношение средних значений в контроле и опыте.

В этом плане клинические изоляты *P. aeruginosa* вели себя аналогично исследованным штаммам *K. pneumoniae*, однако их адаптация к синтетическому пептиду ZP2 была еще более выражена, чем у клебсиелл.

Совокупность полученных данных позволяет ранжировать микроорганизмы исследованных видов с учетом показателей их чувствительности к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2 (угнетение удельной скорости роста и Индекс ингибирования) в следующий ряд: *A. baumannii* $\geq$ *K. pneumoniae* $>$ *P. aeruginosa*.

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекционно-воспалительной патологии становится острее год от года. Это связано, с

одной стороны, с бесконтрольным не всегда оправданным использованием антимикробных препаратов при лечении (или самолечении) заболеваний, следствием чего является «селекция» устойчивых к ним клональных линий бактерий, с другой стороны, с изменением структуры патогенов, среди которых увеличивается доля возбудителей, обладающих природной и/или приобретенной полирезистентностью к широко используемым в клинике антибиотикам. Особенно тревожная ситуация складывается при терапии эндогенных и нозокомиальных инфекций, где приоритетными этиологическими факторами выступают грамотрицательные микроорганизмы видов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся высокой устойчивостью ко многим антимикробным препаратам с разными механизмами действия.

Именно с этой точки зрения интересны представленные результаты настоящей экспериментальной работы, в которой дана оценка чувствительности клинических штаммов указанных микроорганизмов к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, входящего в состав нового косметического средства «Ацеграм» (спрей).

Как следует из полученных данных, косметическое средство «Ацеграм» в условиях *in vitro* оказывало ингибирующее действие на рост клинических штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, однако выраженность и характер такого воздействия существенно зависели от видовой принадлежности исследованных микроорганизмов. Наиболее чувствительными к синтетическому пептиду ZP2 оказались клинические изоляты *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, тогда как штаммы *P. aeruginosa* демонстрировали к нему большую устойчивость.

В то же время было обращено внимание на способность клинических штаммов *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* «адаптироваться» к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, поскольку данные микроорганизмы на более поздних этапах развития бульонных культур (4-24 часа) восстанавливали свою удельную скорость роста в жидкой

среде, содержащей указанный пептид. Это обстоятельство заставляет задуматься о механизмах такой адаптации, а также продолжить анализ ее последствий и ответить, по крайней мере, на вопросы: насколько увеличивается устойчивость бактерий к синтетическому пептиду ZP2 после контакта с ним и как долго она сохраняется у «адаптированных» к нему микроорганизмов.

Кроме того, следует отметить наличие внутривидовой вариабельности чувствительности клинических изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* к синтетическому пептиду ZP2, о чем свидетельствовал относительно широкий диапазон варьирования анализируемых показателей, отражающих влияние данного пептида на рост исследованных штаммов бактерий.

Тем не менее, полученные экспериментальные данные уже сейчас позволяют рекомендовать косметическое средство «Ацеграм» (спрей) для местного лечения раневых дефектов, вызванных указанными патогенами (например, гнойных осложнений при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных раневых инфекций в хирургии и гинекологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 4 ГЛАВЕ

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК и индексируемых в электронной международной базе данных Scopus:

1. 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).

2. 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).

3. 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).

4. 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).

5. 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).

6. 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).

7. 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).

8. 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).

9. 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).

10. 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).

11. Дозазависимое влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ – ZP2) на индуцированный апоптоз 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.265-279 (РИНЦ – 0,389, PubMed).

Патент 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.Опубл. 27.04.2012.

Публикации в других изданиях

13. 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. изд.]. 2015. № 2. С.1-10 (РИНЦ – 0,258).

14. 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).

15. 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. 1-17с. (DOI: 10.24411/2304-9081-2018-14011) (РИНЦ – 0,364).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск препаратов, обладающих плеiotропными полезными свойствами является одной из приоритетных задач современной науки. Как мы показали ранее в обзоре литературы, одними из таких средств могут быть биологически активные синтетические пептидные центры ГМ-КСФ [1, 4, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 27, 29, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 54, 57, 59, 60, 61, 63]. Полученный пептид обладает одновременно антибактериальной, противовирусной, иммуностимулирующей и репарационной активностью. Но в тоже время многие аспекты действия данного синтетического вещества остаются во многом не исследованными. Так, например, не известно, влияет ли данный пептид на процессы пролиферации и апоптоза клеток иммунной системы, на механизмы взаимодействия фагоциты-бактерии, на продукцию цитокинов в этих условиях и каков механизма его действия на грамотрицательные бактерии, и вообще влияет ли он на рост и размножение антибиотикорезистентных видов и штаммов грамотрицательных бактерий.

Прежде чем проанализировать антимикробные и другие механизмы действия синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ, нами было исследовано влияние их на лимфоциты в реакции бластной трансформации (РБТЛ). РБТЛ относится к стандартным методикам, направленных на выявление иммуностимулирующих свойств химических соединений. Поэтому данная реакция была выбрана нами для оценки иммуностимулирующего влияния исследуемых нами синтетических пептидов.

С этой целью мы провели исследование влияния 2 синтетических пептидов: ZP1 – LYS GLY PRO LEY 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.

Оценка полученных данных выявила, что оба пептида вызывали бластную трансформацию лимфоцитов *in vitro*. Важно отметить, что синтетический пептид, состоящий из 12 аминокислот, выявил более высокую активность по сравнению с пептидом, состоящим из 16 аминокислот, а также в сравнении со стандартным митогеном ФГА и ИЛ-2.

В другой серии экспериментов нами проведено сравнительное исследование иммуностропной активности синтетического пептида ZP2 (концентрации 30 и 300 мкг/мл) и других соединений, обладающих фагоцит-стимулирующей и антибактериальной активностями. В качестве сравниваемых веществ нами были взяты дефенсин LL37 и кателицидин HNP.

В отличие от пептида ZP2, дефенсин LL37 и кателицидин HNP практически не влияли на бластную трансформацию лимфоцитов.

Следующим этапом наших исследований было сравнение иммуностропной активности полученного пептида с другими соединениями обладающими иммуностропной и антибактериальной активностями. В качестве сравниваемых веществ нами были взяты дефенсин LL37 и кателицидин HNP.

Таким образом, синтетические пептиды ZP1 и ZP2 стимулировали бластную трансформацию лимфоцитов. Последнее свидетельствует о выраженной их иммуностропной активности и, в частности, способности влиять на процессы пролиферации иммунных клеток (лимфоциты). Учитывая более высокую активность синтетического пептида ZP2, в дальнейших экспериментах проводились исследования именно этого пептида.

Учитывая, что ГМ-КСФ способен пролонгировать срок жизни фагоцитарных клеток, обладая антиапоптоическим действием, а также полученные нами данные о выраженном его влиянии на пролиферацию клеток, целесообразным представлялось оценить в модельных экспериментах наличие у синтетического пептида ZP2 антиапоптоического эффекта. Нами было оценено влияние синтетического пептида ZP2 (в градиенте конечных концентраций 10-200 мкг/мл) на состояние моноцито-подобных клеток

линии ТНР-1 (клетки моноцитарной лейкемии человека) в модели цитотоксической гипоксии, вызванной внесением в среду для культивирования йодацетата (конечные концентрации 10 μM и 15 μM). Определение жизнеспособности клеток осуществляли путем их одновременного окрашивания с применением двух ДНК-связывающих флуоресцентных красителей: йодида YO-PRO-1 и йодистого пропидия (PI) и анализа на проточном цитофлуориметре Navios™ («Beckman Coulter», США). Такая 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 10 μM йодацетата ($62,1 \pm 2,0\%$ живых клеток) внесение синтетического пептида ZP2 в финальных концентрациях 10, 20, 100 и 200 мкг/мл сопровождалось достоверным ($p < 0,05$) 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).

В случае, когда для индукции апоптоза применяли йодацетат в финальной концентрации 15 μM (гибель $97,9 \pm 5,3\%$ клеток), добавление пептида ZP2 в концентрациях 10 и 20 мкг/мл достоверно не влияло на увеличение количества жизнеспособных клеток, но при повышении его концентрации в среде до 100 и 200 мкг/мл наблюдался четкий тренд к уменьшению числа погибших клеток и достоверному увеличению относительного содержания жизнеспособных клеток (с $2,1 \pm 1,1\%$ до $19,8 \pm 9,0$ и $73,5 \pm 1,4\%$ соответственно).

Кроме того, добавление в среду культивирования клеток линии ТНР-1 синтетического пептида ZP2 изменяло долю клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, индуцированного йодацетатом.

Инкубация клеток в присутствии 10 μM йодацетата приводила к

увеличению доли популяции клеток на ранней стадии апоптоза с $1,3 \pm 0,3$ до $12,7 \pm 2,3\%$, сходные значения получены и для йодацетата в концентрации $15 \mu\text{M}$ ($12,7 \pm 5,5\%$), тогда как дополнительное внесение в среду синтетического пептида ZP2 (особенно, при концентрациях 100 и 200 мкг/мл) частично нивелировало этот эффект.

Аналогичное заключение относится к изменению (в данном случае – уменьшению) относительного содержания клеток на поздних стадиях апоптоза и в некрозе под влиянием синтетического пептида ZP2 на фоне действия йодацетата. Причем, достоверный «протективный» (антиапоптотический) эффект данного пептида ZP2 более четко проявлялся в опытах с инкубацией клеток в присутствии $10 \mu\text{M}$ йодацетата, а в экспериментах с $15 \mu\text{M}$ йодацетата достоверные отличия опытных образцов (с пептидом) и контролей были отмечены только при использовании высокой концентрации синтетического пептида ZP2 – 200 мкг/мл.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что синтетический пептид ZP2, так же как и цельная молекула ГМ-КСФ обладает антиапоптотическими эффектами в широком диапазоне доз. А механизмы их такого воздействия могут реализовываться через активацию клеточных рецепторов к ГМ-КСФ. Чтобы выявить наличие рецепторов на нейтрофилах и моноцитах периферической крови и механизмах влияния на них синтетического пептида ZP2 нами было оценено влияние данного вещества на локомоторную функцию нейтрофилов и моноцитов в условиях воздействия на них грамотрицательных бактерий.

Метод определения хемотаксиса (ХТ) и хемокинеза (ХК) нейтрофилов и моноцитов периферической крови под агарозой позволяет не только оценить двигательную функцию лейкоцитов, но и определить наличие рецепторов к хемоаттрактантам на данных клетках [177]. Поэтому было важно исследовать как хемотаксическую активность нейтрофилов и моноцитов периферической крови по отношению к синтетическому пептиду

ZP2, так и их хемокинетическую активность. Учитывая, что наибольшей иммуотропной активностью в отношении лимфоцитов обладал синтетический пептид ZP2, мы исследовали его влияние в дозах 10, 30, 100, 300 мкг/мл на ХТ и ХК нейтрофилов и моноцитов периферической крови условно-здоровых доноров.

Как показали наши исследования, синтетический пептид ZP2 обладал в широком диапазоне доз свойствами хемоаттрактанта, вызывая как целенаправленное движение клеток гранулацитарно-макрофагального ростка кроветворения против градиента концентрации пептида, так и усиливая хемотаксис клеток.

Эти данные свидетельствуют о том, что данный пептид обладает не только 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 к нему хемотаксические рецепторы, они подтверждают результаты, полученные В.Е.Жемчуговым [18] о том, что исследуемые пептиды взаимодействуют с основным рецептором к ГМ-КСФ на гранулоцитах и макрофагах.

Учитывая наличие хемотаксических рецепторов к данному пептиду на фагоцитах, было важно оценить механизм действия данного пептида в системе взаимодействия фагоциты – бактерии. Исследованиями [22, 55] было показано, что при инкубации с бактериями нейтрофилов развивается хемотаксическая деактивация (отрицательный хемотаксис) на бактерии того же вида, с каким проводили инкубацию нейтрофилов. Поэтому было важно оценить, как меняется хемотаксическая активность на бактерии при воздействии синтетического пептида ZP2 на систему фагоцит-микроорганизм и как изменяется хемотаксическая функция нейтрофилов.

Исследования показали, что на интактные нейтрофилы как пептид, так и бактерии сами по себе и в комбинации с пептидом вызывают положительную хемотаксическую реакцию. При оценке хемотаксиса на нейтрофилы культивируемые с *E.coli* развивается хемотаксическая

деактивация на те же энтеробактерии, что согласуется с данными литературы. Интересен тот факт, что синтетический пептид ZP2 отменял хемотаксическую деактивацию нейтрофилов как в варианте чистого воздействия, как хемоаттрактанта в смеси с бактериями, так и при инкубации с нейтрофилами и бактериями. 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, что характерно для цельной молекулы ГМ-КСФ (см. Обзор литературы).

Развитие воспалительного процесса, в том числе вызванные инфекционными агентами, в частности энтеробактериями, сопровождаются воспалительной реакцией с выработкой клетками иммунной системы различных цитокинов, выполняющих регуляторную функцию [26].

Одними из первых в инфекционно-воспалительный процесс вовлекаются фагоцитарные клетки и, прежде всего, нейтрофилы. Эти клетки являются удобной моделью для оценки цитокинопродукции фагоцитами, в том числе при оценке влияния различных веществ на активацию секреции различных цитокинов нейтрофилами [10]. В то же время, на наш взгляд, эта модель может быть успешно использована для определения особенностей реакции нейтрофилов при их контакте с живыми микроорганизмами, принадлежащими к разным таксонам и обладающими оппозитной патогенностью/вирулентностью.

Учитывая, что *E.coli* принадлежат к индигенной (комменсальной, потенциально патогенной) микрофлоре макроорганизма [16, 42], важным представлялось оценить влияние кишечных палочек на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях *in vitro* – при взаимодействии фагоцитов с клиническими штаммами этих микроорганизмов. При этом на клетки-фагоциты могут воздействовать как живые микроорганизмы (при фагоцитозе), так и их продукты секреции (метаболиты).

Как мы показали ранее, синтетический пептид ZP2 вызывает значительное повышение секреции широкого спектра цитокинов нейтрофилами периферической крови [10]. Поэтому очень важно было оценить влияние комбинаторного воздействия синтетического пептида ZP2 на продукцию цитокинов нейтрофилами в условиях фагоцитоза *E.coli* и влияния на фагоциты супернатантов бульонных суточных культур эшерихий.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида ZP2, клинических изолятов *E.coli* и супернатанты суточных культур *E.coli* и их комбинаций на секрецию широкого спектра цитокинов нейтрофилами человека *in vitro*.

Влияние на секрецию цитокинов нейтрофилами определяли на приборе MAGPIX-100 (USA). Использовали тест-системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (USA) для определения 17 цитокинов (см. главу материалы и метода).

Прежде чем анализировать влияние синтетического пептида ZP2 на секрецию нейтрофилами цитокинов, мы исследовали влияние *E.coli* и супернатантов суточных культур *E.coli* на секрецию/продукцию цитокинов этими клетками. Полученные данные свидетельствуют о том, что нейтрофилы секретируют в среду инкубации следующие 7 цитокинов: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, GM-CSF, MIP-1 β . При фагоцитозе *E.coli* и добавлении супернатантов суточных культур *E.coli* нейтрофилы увеличивают спектр секретируемых цитокинов и в среде инкубации определяются достоверное увеличение уже 10 цитокинов: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IL-17A, TNF- α , GM-CSF, MIP-1 β , при этом надо отметить тот факт, что и сами бактерии, и их метаболиты увеличивают секрецию одних и тех же цитокинов по сравнению со средой RPMI 1640. При сравнении со спонтанной продукцией цитокинов нейтрофилами выявлено (контроль 2), что и бактерии и их супернатанты суточных культур увеличивали секрецию/продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови таких как IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-17A, IL-8, TNF- α , MIP-

1 β , то есть стимулировали провоспалительный потенциал фагоцитов.

Учитывая полученные результаты, важно было выявить, как влияют на секрецию цитокинов нейтрофилов комбинации синтетического пептида ZP2, бактерий и супернатантов суточных культур бактерий.

Как показали наши исследования, синтетический пептид ZP2 значительно усиливал продукцию/секрецию практически всех исследованных цитокинов – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, INF- γ , IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β (14 из исследованных 17) как по сравнению с контролем 1 (среда RPMI 1640), так и по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов). При инкубации нейтрофилов в комбинациях синтетического пептида ZP2 с живыми бактериями и ZP2 с их метаболитами, были получены немного иные данные, так по сравнению с контролем 1 (среда инкубации) при комбинаторном воздействии бактерий и синтетического пептида ZP2 так же увеличивалась секреция/продукция практически тех же цитокинов, что и на ZP2 без бактерий IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , за исключением INF- γ , IL-13 (12 из 17 исследованных), а по сравнению с контролем 2 (супернатант нейтрофилов без добавления бактерий и пептида) – IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , MIP-1 β , за исключением IL-10, INF- γ , IL-13 (11 из 17 исследованных). При оценке действия метаболитов суточных культур бактерий в комбинации с синтетическим пептидом ZP2 наблюдалась очень похожая картина, так по сравнению с контролем 1 - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β за исключением 1 цитокина IL-13 (13 из 17 исследованных), а по сравнению с контролем 2 - IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β за исключением 3 цитокинов - GM-CSF, IL-10, IL-13 (11 из 17 исследованных). При этом обращает на себя внимание, что основной пул цитокинов остается повышенным при данных комбинациях синтетического пептида ZP2 с бактериями и их метаболитами. При сравнении влияния самого пептида

(опыт 3) с комбинаций пептида с бактериями и их метаболитами (опыт 4 и 5), выявляется несколько иная картина. Во-первых, все варианты комбинаций либо снижали, либо вообще отменяли действие пептида на цитокиновую продукцию нейтрофилов периферической крови. Так бактерии снижали цитокиновую активированных синтетическим пептидом ZP2 нейтрофилов на следующие цитокины: IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β , а их метаболиты на IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-12p70, IL-13, IL-17A, G-CSF, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , MIP-1 β (на 11 цитокинов в том и другом случае, отличия были только в 2 цитокинах IL-6 и GM-CSF для бактерий и их метаболитах соответственно).

Для оценки степени выраженности воздействия комбинаций синтетического пептида ZP2, бактерий и их метаболитов мы проанализировали кратность воздействия их на цитокинопродукцию нейтрофилов в сравнении с действием пептида без бактериальных компонентов.

Как показали исследования, степень подавления была более выражена при комбинаторном влиянии бактерий и синтетического пептида ZP2 и колебалась в диапазоне от 0,33 до 0,76, в то время как воздействие супернатантов суточных бульонных культур и пептида было несколько менее выраженным от 0,51 до 0,93, при этом такое различие отмечалось для всех достоверно сниженных цитокинов.

Таким образом, бактерии вида *E.coli* и их метаболиты способны усиливать секрецию нейтрофилами широкого спектра провоспалительных цитокинов (11,12 из 17 исследованных цитокинов). Синтетический пептид ZP2 также стимулирует продукцию цитокинов нейтрофилами, при этом спектр и степень активации их выше, чем у бактерий и их метаболитов (14 цитокинов из 17 исследованных). При оценке комбинаторного воздействия бактерий, их метаболитов и синтетического пептида ZP 2, выявлено, что комбинаторные воздействия в целом приводит к снижению активности пептида практически по всем провоспалительным цитокинам (11 из 17

исследованных).

Разработанная нами модель оценки систем цитокиновой регуляции клеток при различных вариантах воздействия позволяет получить новые данные о механизмах регуляции воспалительного процесса, где нейтрофилы, цитокины, бактерии и их метаболиты играют важную роль. Поэтому, полученные нами результаты о блокировании/снижении регуляторного потенциала активированных иммуностимулятором клеток, должны учитываться для правильного понимания патогенеза формирования процессов в системе взаимодействия паразит-хозяин в условиях инфекционного воспаления, вызванного, в том числе, условно-патогенными микроорганизмами. Возможно такой механизм подавления цитокиновой активности активированных клеток, способствует выживанию (персистенции) данных микроорганизмов в организме человека при развитии инфекционного процесса вызванного *E.coli*.

Поэтому, на наш взгляд, необходимо было выявить наличие других биологических свойств у данного пептида. Одним из таких направлений является поиск эндогенных пептидов, обладающих антимикробными свойствами, как против грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Именно этим исследованиям и посвящены следующие наши исследования.

При оценке бактерицидной активности синтетических пептидов нами были исследованы влияние различных доз этих препаратов на бактерицидную активность по отношению к госпитальным штаммам *S. aureus* 155, *E. coli* 2290 и *Candida albicans*. Одновременно были проведен сравнительный анализ активности других бактерицидных соединений (супернатантов клеток мононуклеарного ряда, тромбоденсина, интерцида, коммерческих дефенсина LL 37 и кателицидина HNP, как в фосфатно-солевом буфере, так и в физиологическом растворе).

Полученные результаты показали, что бактерицидная активность выявлялась у следующих веществ: 1пик МНК, интерцид, пептид ZP1, пептид ZP2, дефенсин LL 37, кателецидин HNP.

Выявлено, что бактерицидной активностью в отношении *S. aureus* 155 обладают коммерческие дефенсин LL 37 и кателецидин HNP растворенные в буферном растворе в дозе 10 мкг/мл. У них же в той же дозе проявляется самая высокая бактерицидная активность и в отношении *E. Coli*. Идентичной активностью обладал полученный нами синтетический пептид ZP2. У него бактерицидная активность в отношении *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 достоверно не отличалась от известных коммерческих БЭП. Отличие было лишь в том, что подобная бактерицидная активность пептида проявилась не только в буферном растворе, но и в физиологическом растворе в отличие от коммерческих БЭП, которые в физиологическом растворе теряли свою антимикробную активность.

В отношении *S. aureus* 155 и *E. coli* 2290 бактерицидная активность проявилась также у интерцида. Но степень его активности была значительно ниже в отношении *St. aureus* 155 в 1,3-1,5 раза, в отношении *E. coli* 2290 в 2,2-2,4 раза по сравнению с анализируемыми коммерческими биологически активными пептидами и синтетическим пептидом ZP2.

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

Так у 1 пика МНК диаметр зоны подавления роста микроорганизма соответственно в дозах 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 ZP 1 соответственно в дозах 10 и 30 мг/мл – $11,5 \pm 1,9$ и $9,6 \pm 0,8$ мм. Однако их активность была ниже в 1,7-1,9 раза анализируемых коммерческих БЭП и ZP2.

При оценке влияния веществ на *Candida albicans* ни один из исследуемых препаратов не выявил антигрибковой активности.

Таким образом, исследования показали, что наибольшая активность выявлена у синтетического пептида ZP2, при этом его активность проявлялась не только в фосфатно-солевом буфере, но и в физиологическом растворе в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Наличие противогрибковой активности не было установлено ни у одного из исследуемых образцов.

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 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 [42].

В структуре возбудителей многих эндогенных бактериальных инфекций (апостематозный нефрит, послеоперационные инфекционно-воспалительные осложнения, раневые дефекты при синдроме диабетической стопы и др.) большую долю занимает грамотрицательная флора и, прежде всего, кишечные палочки [16]. Данные бактерии при инфицировании внутренних органов на фоне их иммунобиологической компрометированности способны вызывать в макроорганизме инфекционно-воспалительный процесс, проявляющийся соответствующей патологией [16, 42]. В развитие воспалительной реакции неминуемо вовлекаются клетки иммунной системы, синтезирующие различные цитокины, выполняющие регуляторную функцию и одним из ключевых цитокинов является

гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [26].

Вместе с тем антибактериальное действие синтетического пептида ZP2 в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий пока не охарактеризовано, хотя в опытах *in vitro* на музейных штаммах стафилококков и клинических изолятов грамположительных бактерий показаны закономерности его дозозависимого влияния на рост бактерий в жидкой питательной среде с учетом их видовой принадлежности и фазы развития культур [23].

Поэтому, прежде чем начать анализ влияния синтетического пептида ZP2 в отношении клинических изолятов грамотрицательных бактерий, мы провели сравнительное исследование влияния данного различных концентраций данного пептида на музейные штаммы *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P).

Энтеробактерии, в том числе эшерихии и клебсиеллы, принадлежат к потенциально патогенным микроорганизмам, входящим в состав кишечного микробиоценоза (как его ассоциативный компонент), и, одновременно, являются доминирующими этиологическими агентами эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний разной локализации, включая нозокомиальные инфекции, в том числе послеоперационные инфекционные осложнения [16, 28, 65, 200]. По данным многочисленных исследований и заключению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), указанные микроорганизмы часто обладают резистентностью к широкому спектру антибиотиков, что затрудняет эмпирический выбор адекватных лекарственных препаратов для стартовой терапии патологии, ассоциированной с этими возбудителями, и критически снижает ее эффективность [41, 82, 210].

Такая ситуация побуждает создавать новые антибиотики и химиотерапевтические средства антибактериальной направленности. Одним из перспективных путей решения данной задачи является использование пептидов естественного или искусственного происхождения, которые

проявляют антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [34, 86, 118, 208]. При этом некоторые антимикробные пептиды, помимо противобактериальной активности, могут обладать иммуномодулирующими эффектами [5, 35, 81].

Последнее в полной мере относится к синтетическому пептиду ZP2, учитывая, что данный пептид проявляет плеiotропные эффекты, обладая не только иммуностропными и репаративными свойствами, но и антимикробной активностью, в том числе в отношении грамположительной кокковой флоры (микро- и стафилококки) [1, 13, 23, 44, 46, 47, 49, 50, 57, 63]. О влиянии указанного синтетического пептида ZP2 на рост энтеробактерий известно гораздо меньше, хотя в ряде экспериментальных работ показан его ингибирующий эффект на развитие тест-культур *E. coli* в жидкой питательной среде [23]. Кроме оценки ингибирующего воздействия указанного синтетического пептида на рост энтеробактерий, не менее интересным представляется анализ его влияния на способность данных микроорганизмов формировать биопленки, поскольку данное свойство относится к факторам персистенции и адаптации бактерий [7, 180], а его модификация может оказать влияние на течение инфекционно-воспалительного процесса.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование клинических штаммов энтеробактерий *in vitro*.

Прежде чем анализировать влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на клинические штаммы энтеробактерий, мы исследовали его влияние на рост биомассы музейных штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий.

В работе использованы тест-штаммы *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), а также 24 клинических изолята

энтеробактерий, включая *E. coli* (n=12) и *Klebsiella pneumoniae* (n=12), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, желчи у больных с холециститом и холангитом (из коллекции культур микроорганизмов ИКВС УрО РАН) (методы выделения и оценки характера роста бактерий были описаны нами ранее в главе «Материалы и методы»).

Полученные в сравнительных экспериментах *in vitro* данные свидетельствовали, что внесенный в жидкую питательную среду синтетический пептид ZP2 ингибировал рост исследованных тест-штаммов бактерий – *E. coli* K12 (ATCC №25922) и *S. aureus* 209P (ATCC №6538-P), дозозависимо снижая биомассу опытных культур в процессе развития бактериальных популяций.

При этом характер ингибирующего действия синтетического пептида ZP2 на рост исследованных 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 ZP2 3-100 мкг/мл, хотя в опытах с более высокой его концентрацией (300 мкг/мл) уровень ингибирования роста кишечной палочки был несколько выше, чем подавление золотистого стафилококка ($28,8 \pm 0,4$ против $25,7 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$).

Кроме того, необходимо подчеркнуть, что для оценки влияния синтетического пептида ZP2 на рост микроорганизмов (как эшерихий, так и стафилококков) более предпочтительным временным интервалом является период развития культур с 2 до 6 часов, так как к этому времени нивелируются естественные «погрешности» в количестве инокулируемых бактерий, которые неминуемо сказываются на параметрах бактериального роста на начальных этапах культивирования.

Биомасса бактерий (ОД) и ее динамика в периодической культуре являются производными от такой интегральной характеристики, как удельная скорость роста микроорганизмов (μ , $ч^{-1}$), которая изменяется на разных этапах развития бактериальных популяций в периодических культурах. Как видно из демонстрационных графиков, изменение удельной скорости роста в контрольных (без синтетического пептида ZP2) и опытных (с пептидом ZP2) в концентрациях 10 и 100 мкг/мл культурах исследованных тест-штаммов бактерий (*E. coli* K12 и *S. aureus* 209P) имело определенные видоспецифические особенности.

В то же время в экспериментах с *S. aureus* 209P удельная скорость роста золотистого стафилококка в опытных культурах была снижена на всех начальных этапах развития (0-6 часов) в сравнении с контролем, и особенно заметно – во временных интервалах 2-4 и 4-6 часов (соответственно на 7,5-14,9 и 7,3-14,4%).

Характер выявленных особенностей влияния синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P, помимо прочего, указывал на то, что клетки кишечной палочки, взятые из «стационарной» (суточной) агаровой культуры проявляли более выраженную чувствительность к антибактериальному действию данного пептида, чем

клетки золотистого стафилококка.

Учитывая известные данные об ингибирующем действии синтетического пептида ZP2 на способность клинических изолятов стафилококков образовывать биопленки [118], важным представлялось оценить его влияние на биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12.

В серии специальных экспериментов *in vitro* было установлено, что синтетический пептид ZP2 в диапазоне концентраций (3-300 мкг/мл) дозозависимо снижал способность эшерихий формировать биопленки. В опыте достоверное снижение биопленкообразования 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.

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.

На следующем этапе исследования было решено оценить влияние синтетического пептида ZP2 в концентрации 10 мкг/мл на рост и БПО клинических штаммов энтеробактерий (эшерихии и клебсиеллы). Выбор этой концентрации синтетического пептида ZP2 был 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 ZP2 на рост клинических штаммов стафилококков и их биопленкообразование [1, 11, 44]; в-третьих, имеющейся информацией о ее репарационном действии и эффективной иммунотропной активности в отношении разных иммунокомпетентных клеток [12, 13, 23, 29, 45, 46, 47, 49,

50, 57, 63].

Эксперименты *in vitro* показали, что синтетический пептид ZP2 в концентрации 10 мкг/мл существенно подавлял рост к 4 и 6 часам инкубации примерно у половины (58,3 и 50,0% соответственно) клинических штаммов *E. coli* и у трети (33,3%) клинических изолятов *K. pneumoniae* (табл. 3). При этом Индексы ингибирования роста клинических штаммов энтеробактерий вне зависимости от проанализированных видов колебались в широком диапазоне (от -11,0 до +20,8%), что определяло низкие средние значения в проанализированных выборках изолятов эшерихий и клебсиелл (3,0-3,5 и 1,8-2,4% соответственно) и, кроме того, свидетельствовало о внутривидовом (межштаммовом) разнообразии энтеробактерий по уровню их чувствительности к синтетическому пептиду ZP2.

Анализ особенностей подавления синтетическим пептидом ZP2 роста 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 оцененных клинических штаммов эшерихий и клебсиелл (у $8,3 \pm 8,3\%$), указывало на то, что в использованной концентрации (10 мкг/мл) синтетический пептид ZP2 способен оказывать не только ингибирующее, но и стимулирующее действие на отдельные клинические изоляты энтеробактерий. Аналогичный (стимулирующий) эффект синтетического пептида ZP2 ранее был описан при оценке его влияния на рост в жидкой питательной среде микрококка [1, 44]. 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 [6].

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.

При оценке влияния синтетического пептида ZP2 (в концентрации 10 мкг/мл) на способность клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* формировать биопленки было установлено, что в проанализированных выборках бактериальных изолятов имеется 3 группы: 1 группа – штаммы, у которых наблюдалось снижение БПО больше, чем на 5% от контрольных значений; 2 – «индифферентные» штаммы, то есть без существенного изменения у них этого показателя (отклонение от контроля менее 5%); 3 – штаммы, у которых БПО увеличивалось на 5% и более относительно контроля.

Как видно из представленных на рисунке диаграмм, в выборках проанализированных клинических штаммов энтеробактерий размеры соответствующих групп изолятов и их соотношение между собой зависели от видовой принадлежности микроорганизмов. 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 (в данном случае в виде изменения у них способности формировать биопленки) на

действие синтетического пептида ZP2, причины и механизмы которых предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Возможно, это каким-то образом 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 синтетического 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 $r=-0,74$).

Полученные результаты интересны в нескольких аспектах.

Анализируя представленные сравнительные данные о влиянии синтетического пептида ZP2 (в диапазоне концентраций 3-300 мкг/мл) на развитие бактериальных популяций тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P, необходимо подчеркнуть, что при общем дозозависимом антибактериальном действии данного пептида на указанные микроорганизмы имеются его видоспецифические особенности, которые отчетливо выявляются при оценке динамики таких интегральных показателей, как Индекс ингибирования (%) и удельная скорость роста ($ч^{-1}$) кишечной палочки и золотистого стафилококка в периодических культурах. Очевидно, вышеописанные видовые/родовые отличия динамики указанных показателей, на которые раньше мы уже обращали внимание при оценке действия синтетического пептида ZP2 на музейные штаммы грамположительных кокков разной видовой принадлежности (*Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) [1, 44], обусловлены, с одной стороны, особенностями строения клеточных стенок кишечной палочки и золотистого стафилококка как грамотрицательного и грамположительного микроорганизмов, а с другой стороны, теми

изменениями поверхностных структур (химический состав, степень гидрофильности/гидрофобности, архитектура макромолекул и др.) бактерий, которые они претерпевают в процессе периодического культивирования на разных этапах развития бактериальных популяций – от лаг-фазы до стационарной фазы [17, 32, 212].

Иначе говоря, имеется определенная видоспецифичность ингибирующего действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на микроорганизмы, которая не является его исключительной прерогативой, поскольку известно, что интерлейкин 26 способен подавлять рост *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), некоторых штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, но не *Enterococcus faecalis* [198], причем, эффективная его концентрация в отношении *E. coli* была в 2,5 раза выше, чем в опытах с *S. aureus*. Кроме того, в недавней работе с использованием IFN- β , спирали 4 как части молекулы IFN- β и ее синтетического аналога было показано их антимикробное действие на *S. aureus*, но не на грамотрицательные бактерии (в частности *E. coli*) [103].

Наши результаты и имеющиеся немногочисленные литературные данные указывают на то, что некоторые цитокины и их активные центры в макроорганизме выполняют не только иммунорегуляторную сигнальную функцию (хотя, очевидно, она является ведущей), но и способны непосредственно участвовать в киллинге бактерий, формируя совместно с рядом хемокинов семейство киноцидинов, обладающих противомикробными свойствами [103]. Полученные данные по межвидовому и штаммовому разнонаправленному влиянию синтетического пептида на эшерихии и клебсиеллы ставят перед нами несколько важных вопросов. Во-первых, а как данный пептид влияет на рост и размножение других видов грамотрицательных бактерий, в том числе и антибиотикорезистентных (генетически) их видов. И, во-вторых, учитывая, что данный пептид является основой для косметических средств АЦЕГРАМ-спрей и АЦЕГРАМ-гель, как данное косметическое средство влияет на рост грамотрицательных

микроорганизмов, в том числе и антибиотикорезистентных клинических штаммов.

Грамотрицательные бактерии разной таксономической принадлежности, в частности энтеробактерии, псевдомонады и ацинетобактеры, относятся к потенциально патогенной микрофлоре и являются частыми возбудителями инфекционно-воспалительной патологии, в том числе эндогенных и нозокомиальных инфекций [16, 200]. Причем данные возбудители часто обладают полиантибиотикорезистентностью, что осложняет выбор этиотропных лекарственных средств для эмпирической (стартовой) терапии вызванных ими заболеваний и делает ее мало эффективной [14, 41, 82]. Это обстоятельство побудило Всемирную Организацию Здравоохранения (ВОЗ) впервые составить и опубликовать 27.02.2017 г. Лист приоритетных возбудителей инфекций, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, включив в него указанные микроорганизмы, прежде всего *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, в качестве «критических» патогенов, которые чаще всего проявляют множественную устойчивость к антибиотикам (даже к резервным карбапенемам), и против которых требуется срочная разработка новых действенных антибактериальных препаратов [210].

Потенциальными претендентами на роль таких препаратов являются природные, полусинтетические и синтетические пептиды, нередко обладающие антимикробной активностью, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [81, 86, 118, 208].

В этом плане определенный интерес вызывает вопрос о чувствительности грамотрицательных бактерий разной таксономической принадлежности к синтетическому пептиду ZP2, поскольку в недавнем цикле работ показано, что указанный пептид помимо иммуностропных и репаративного эффектов обладает антибактериальной активностью в отношении эшерихий и грамположительной кокковой флоры (микро- и

стафилококки) [1, 23, 44]. 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 [13, 23, 46, 47, 49, 50, 57, 63]. Однако его влияние на клинические штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* не тестировалось.

Исходя из полученных нами данных, была проведена оценка антибактериальной активности косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий разной видовой принадлежности.

Опыты *in vitro* проведены на 24 клинических штаммах грамотрицательных бактерий видов *Klebsiella pneumoniae* (n=8), *Acinetobacter baumannii* (n=8) и *Pseudomonas aeruginosa* (n=8), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, из отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, из желчи и аспирата нижних дыхательных путей у больных с хирургической патологией (методы выделения и оценки роста и размножения бактерий см. главу материалы и методы).

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали, что косметическое средство «Ацеграм», основу которого составляет синтетический пептид ZP2, в целом оказывало ингибирующее воздействие на рост грамотрицательных микроорганизмов исследованных таксонов, однако уровень и характер его антибактериальной активности зависели как от видовой принадлежности бактерий, так и их штаммовых особенностей.

Так, клинические штаммы *K. pneumoniae* существенно медленнее развивались в МПБ при добавлении в жидкую питательную среду косметического средства «Ацеграм» (опыт), чем в контроле, на что указывали не только разный характер динамики ОД опытных и контрольных бульонных культур микроорганизмов, но и 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.

При этом на более позднем этапе развития культур (4-24 часа) удельные

скорости роста исследованных 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» оказывало на рост в МПБ клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*. С одной стороны, на это указывала депрессивная динамика ОД бульонных культур данных микроорганизмов в опыте при сравнении с контролем; с другой стороны, об этом же свидетельствовало выраженное относительно контроля уменьшение удельной скорости роста (μ) бактерий в опытных культурах как на начальных, так и на поздних этапах развития бактериальных популяций – в 7,85 и 5,29 раза соответственно. Конечным итогом антибактериального действия «Ацеграма» в отношении клинических штаммов *A. baumannii* явилось то, что средние значения Индекса ингибирования их роста в МПБ были максимальными (при сравнении с этим показателем для бактерий других исследованных видов) и достоверно увеличивались с $47,6 \pm 4,0\%$ на 4 часах, до $77,1 \pm 7,7\%$ на 24 часах.

Здесь же попутно отметим разницу в характере роста клинических изолятов *K. pneumoniae* и *A. baumannii* в МПБ (в контроле), которая проявлялась в том, что клебсиеллы в сравнении с ацинетобактерами более активно росли на начальных этапах (0-4 часа) и медленнее в позднюю стадию (4-24 часа), о чем свидетельствовали соответствующие значения удельной скорости их роста (μ_{0-4} и μ_{4-24}): $0,287 \pm 0,021$ против $0,196 \pm 0,039$ ч⁻¹ (в 1,46 раза) и $0,053 \pm 0,003$ против $0,069 \pm 0,004$ ч⁻¹ (в 1,30 раза).

Клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa* проявляли к

антибактериальному действию косметического средства «Ацеграм» большую устойчивость, чем проанализированные изоляты *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 2,71 и 2,62 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 соответственно, 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 $2,2 \pm 4,7\%$, которое можно было расценивать как способность псевдомонад «ускользнуть» от антибактериального действия синтетического пептида ZP2, входящего в состав косметического средства «Ацеграм».

В этом плане клинические изоляты *P. aeruginosa* вели себя аналогично исследованным штаммам *K. pneumoniae*, однако их адаптация к синтетическому пептиду ZP2 была еще более выражена, чем у клебсиелл.

Совокупность полученных данных позволяет ранжировать микроорганизмы исследованных видов с учетом показателей их чувствительности к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2 (угнетение удельной скорости роста и Индекс ингибирования) в следующий ряд: *A. baumannii* $\geq$ *K. pneumoniae* $>$ *P. aeruginosa*.

Проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекционно-воспалительной патологии становится острее год от года. Это связано, с

одной стороны, с бесконтрольным не всегда оправданным использованием антимикробных препаратов при лечении (или самолечении) заболеваний, следствием чего является «селекция» устойчивых к ним клональных линий бактерий, с другой стороны, с изменением структуры патогенов, среди которых увеличивается доля возбудителей, обладающих природной и/или приобретенной полирезистентностью к широко используемым в клинике антибиотикам. Особенно тревожная ситуация складывается при терапии эндогенных и нозокомиальных инфекций, где приоритетными этиологическими факторами выступают грамотрицательные микроорганизмы видов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, характеризующиеся высокой устойчивостью ко многим антимикробным препаратам с разными механизмами действия.

Именно с этой точки зрения интересны представленные результаты настоящей экспериментальной работы, в которой дана оценка чувствительности клинических штаммов указанных микроорганизмов к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, входящего в состав нового косметического средства «Ацеграм» (спрей).

Как следует из полученных данных, косметическое средство «Ацеграм» в условиях *in vitro* оказывало ингибирующее действие на рост клинических штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, однако выраженность и характер такого воздействия существенно зависели от видовой принадлежности исследованных микроорганизмов. Наиболее чувствительными к синтетическому пептиду ZP2 оказались клинические изоляты *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, тогда как штаммы *P. aeruginosa* демонстрировали к нему большую устойчивость.

В то же время было обращено внимание на способность клинических штаммов *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* «адаптироваться» к антибактериальному действию синтетического пептида ZP2, поскольку данные микроорганизмы на более поздних этапах развития бульонных культур (4-24 часа) восстанавливали свою удельную скорость роста в жидкой

среде, содержащей указанный пептид. Это обстоятельство заставляет задуматься о механизмах такой адаптации, а также продолжить оценку ее последствий и ответить, по крайней мере, на вопросы: насколько увеличивается устойчивость бактерий к синтетическому пептиду ZP2 после контакта с ним и как долго она сохраняется у «адаптированных» к нему микроорганизмов.

Кроме того, следует отметить наличие внутривидовой вариабельности чувствительности клинических изолятов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* к синтетическому пептиду ZP2, о чем свидетельствовал относительно широкий диапазон варьирования анализируемых показателей, отражающих влияние данного пептида на рост исследованных штаммов бактерий.

Тем не менее, полученные экспериментальные данные уже сейчас позволяют рекомендовать косметическое средство «Ацеграм» (спрей) для местного лечения раневых дефектов, вызванных указанными патогенами в инфектологии (например, гнойных осложнений при синдроме диабетической стопы), а также для профилактики послеоперационных раневых инфекций в хирургии и гинекологии.

Резюмируя полученные данные, можно отметить следующее, что выявленными нами синтетический пептид с химической формулой THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO обладает выраженными иммуностимулирующими, антимикробными свойствами позволяющими его рекомендовать как основу для создания лекарственных препаратов нового направления, 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 активирует 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 СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
АТ	антитело
АФП	альфа фетопроtein
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ 1- п	интерлейкины 1-п
ИФА	иммуноферментный анализ
МКБ	Международная классификация болезней
мРНК	матричная рибонуклеиновая кислота
С3а, С5а	фрагменты комплемента С3а, С5а
СА	раковый антиген
ФСБ	фосфатно-солевой буферный раствор
ФЧН	фагоцитарное число нейтрофилов
ЦТЛ	цитотоксические лимфоциты
AML	острый миелоидный лейкоз
AM0	альвеолярный макрофаг
BM	костный мозг
CD	кластер дифференцировки
CISH	цитокин, индуцируемый SH2-домена
DC	дендритные клетки
FITC	Флуоресцеинаизотиационат
G-CSF	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
Ig A, M, G, E	иммуноглобулины A, M, G, E
IκB	ядерного фактора каппа-света-полипептид ген усилитель В-клеток
ИКК	ИКБкиназы HLA, MHC – главный комплекс гистосовместимости
IL 1- п	интерлейкины 1-п
INFγ	интерферон γ
iNKT	Инвариантный естественный убийца T LTK4, D4, E2 - лейкотриеныK4, D4, E2
M0	Макрофаг
МАРКм	митоген-активируемой киназо-подобный белоNK – натуральные киллеры

NFKB	ядерного фактора каппа-легкой цепи усилитель активированных В-клеток
PE	Фикоэритрин
PI3K	фосфатидилинозит3-киназа Th1 - Т-хелперы 1 типа
PC5	фикоэритрин C5
PKC	протеинкиназа C
STAT	сигнальные датчики и активаторы транскрипции
SLAP	SRC-подобный белок адаптер
Th2	Т-хелперы 2 типа
TLR	Толл-подобные рецепторы
TNF	фактор некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. и др. // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 3 (1). С. 82-85.
2. Антибактериальная активность пептидного комплекса, выделенного из препаратов лейкоцитарного интерферона / Л.В. Волкова, П.В. Косарева, В.Ф. Попов, и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2005. № 5. С.54-57.
3. Антимикробные пептиды в реализации различных защитных функций организма / О.В. Шамова, Д.С. Орлов, В.Н. Кокряков и др. // Медицинский академический журнал. 2013. Т. 13. № 3. С. 42-52.
4. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ / А.В. Зурочка, В.В. Дукардт, В.А. Зурочка и др. // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 3. С.374-376.
5. Бибикова, М.В. Природные пептиды с антимикробным и иммуномодулирующим действием / М.В. Бибикова, А.М. Егоров, А.В. Катлинский // Антибиотики и химиотерапия. 2005. № 50 (8-9). С.57-66.
6. Бухарин, О.В. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка “Интерцид” на *Escherichia coli* / О.В. Бухарин, В.А. Гриценко // Антибиот. и химиотер. 2000. Т. 45 (1). С. 16-20.
7. Бухарин, О.В. Инфекционная симбиология / О.В. Бухарин // Журн. микробиол. 2015. № 4. С.4-9.
8. Бухарин, О.В. Экологическая детерминированность внутривидового разнообразия патогенных бактерий / О.В. Бухарин, В.А. Гриценко // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000. № 1. С.103-106.

9. Влияние дефенсина и лактоферрина на функциональную активность эндотелиальных клеток *in vitro* / А.В. Крылов, Е.П. Киселева, Г.М. Алешина, и др. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2007. Т. 144, № 9. С.306-309.

10. 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, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. № 4. С.1-9: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/ZAV-2015-4.pdf>).

11. 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, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. № 4. С.1-11: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>).

12. Влияние синтетического пептида активного центра GM-CSF на продукцию бактериями цитокиноподобных веществ в бульонных культурах / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, В.В. Дукардт, и др. // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, спец. вып. С. 33-34.

13. Влияние стафилококков на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 1. С.73-80.

14. Горбич, Ю.Л. Значение адекватной эмпирической терапии при нозокомиальных инфекциях, вызванных *Acinetobacter baumannii* / Ю.Л. Горбич, И.А. Карпов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. № 14 (1). С.67-73.

15. Грачёва Л.А. Цитокины в онкогематологии / Л.А. Грачёва. Москва: Алтус, 1996. 168с.
16. Гриценко, В.А. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных инфекций / В.А. Гриценко, Ю.Б. Иванов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 4. С.66-71.
17. Дерябин Д.Г. Функциональная морфология клетки / Д.Г. Дерябин. Москва : КДУ, 2005. 320 с.
18. Жемчугов В.Е. Как мы делали химические вакцины / Записки о современных охотниках за микробами / В.Е. Жемчугов. Москва : Наука, 2004. 349 с.
19. Жемчугов В.Е. Обоснование принципов создания комплексных препаратов для профилактики и лечения бактериальных и вирусных заболеваний: дис. ...д-ра мед. наук. / В.Е. Жемчугов. Москва, 2005. 304 с.
20. Зурочка А.В. Проточная цитометрия в медицине и биологии / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, В.А. Черешнев. Екатеринбург. РИО УРО РАН, 2014. 576 с.
21. Зурочка А.В. Проточная цитометрия в биомедицинских исследованиях / А.В. Зурочка, С.В. Хайдуков, И.В. Кудрявцев, В.А. Черешнев. 2-е изд., доп. и испр. Екатеринбург. РИО УРО РАН, 2018. 720 с.
22. Зурочка, А.В. Специфические реакции нейтрофилов на бактериальные хемоаттрактанты / А.В. Зурочка, И.И. Долгушин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1988. № 3. С.69-71
23. Зурочка В.А. Иммунобиологические свойства синтетических пептидов активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ): дис. ... д-ра мед. наук / В.А. Зурочка. Екатеринбург, 2016. 206 с.
24. Индукция апоптоза и некроза клеток эндотелия пупочной вены человека пероксидом водорода / А.Д. Надеев, И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, и др. // Цитология. 2015. Т. 57, № 12. С.909-916.

25. Использование пептидного фрагмента наружной цепи ГМ-КСФ в качестве колониестимулирующей активности при клонировании КОЕ-ГМ *in vitro* / А.В. Зурочка, В.Е. Жемчугов, Б.Г. Яровинский, и др. // Факторы клеточного и гуморального иммунитета при различных физиологических и патологических состояниях: тез. докл. XII Рос. науч. конф.. Челябинск, 1995. С.47-48.
26. Иммунология: структура и функции иммунной системы / под ред. Р.М. Хаитова. Москва, 2013. 280 с.
27. Иммуотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Ю.Г. Суховой, и др. // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. № 2/2 (35). С.23-24.
28. Информативность маркеров персистенции *Escherichia coli* при бактериологической диагностике хронического пиелонефрита у детей / В.А. Гриценко, И.Э. Ляшенко, Л.М. Гордиенко, и др. // Журн. микробиол. 1996. № 3. С.80-83.
29. Исследование спектра иммунобиологической активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для расширения возможностей создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, и др. // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 3. С.377-380.
30. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность / В.Н. Кокряков, Л.В. Ковальчук, Г.М. Алешина, и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. № 2. С.98-105.
31. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. Санкт-Петербург : Изд-во «Фолиант», 2008. 552 с.
32. Кислухина О.В. Ферментативный лизис микроорганизмов / О.В. Кислухина, К.А. Калунянц, Д.Ж. Аленова. Алма-Ата: Рауан, 1990. 200 с.

33. Козлов В.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: руководство для врачей / В.А. Козлов, А.Г. Борисов, С.В. Смирнова, А.А. Савченко. Новосибирск : Наука, 2009. 274 с.
34. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения / В.Н. Кокряков. Санкт-Петербург : Наука, 1999. 162 с.
35. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете / В.Н. Кокряков. Санкт-Петербург : Наука, 2006. 261 с.
36. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. Москва : Высш. шк., 1990. 352 с.
37. Медик В.А. Статистика в медицине и биологии / В.А. Медик // Теоретическая статистика. - Москва: Медицина, 2000. Т. 1. 454 с.
38. Медицинские лабораторные технологии: справочник. Санкт-Петербург: Интермедика, 1999. Т. 2. 303 с.
39. Морфологические и гематологические критерии эффективности лечения экспериментального пиелонефрита комплексом природных цитокинов и антибактериальных пептидов / В.А. Черешнев, П.В. Косарева, Е.И. Самоделкин, и др. // Перм. мед.журн. 2008. Т. 25. № 2. С.5-13.
40. МР 02.032-08. Идентификация микроорганизмов и определение их чувствительности к антибиотикам с применением автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact: метод. рек. Москва, 2008.
41. Мругова, Т.М. Особенности таксономической структуры и резистентности к антибиотикам микрофлоры, изолированной от больных в многопрофильном хирургическом стационаре / Т.М. Мругова, И.В. Качалова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. № 2. С.1-12: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>).
42. Некоторые биологические эффекты иммономодуляторов естественного и синтетического происхождения *invitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями /

В.А. Гриценко, Д.Л. Аминин, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. № 3. С.1-17 (URL: <http://elmag.uran.ru/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>).

43. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ МЗ СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. Москва, 1989. 126 с.

44. Особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на рост грамположительных кокков *in vitro* / В.А. Зурочка, М.А. Добрынина, А.В. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. № 1. С.1-10: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-1/Articles/VAZ-2015-1.pdf>).

45. Оценка уровней цитокиноподобных веществ супернатантах культур бактерий / В.А. Зурочка, А.В. Зурочка, Е.Б. Зуева и др. // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. С. 32-33.

46. Продукция цитокинов нейтрофилами периферической крови человека при воздействии синтетического пептида активного центра / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т.10 (19), № 1. С.73-80.

47. 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, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 2(1). С.429-432.

48. Роль TOLL – подобных рецепторов и дефенсинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин / О.А. Ганковская, Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 1. С.46-50.

49. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами - Ацеграм-гель и Ацеграм-спрей / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 3. С.269-272.

50. 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, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 2(1). С.433-435.

51. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), спектр его иммунобиологической активности и практическое применение / А.В. Зурочка, В.В. Дукардт, В.А. Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 2. С.137-140.

52. Синтетический полипептид, способ получения и средство для культивирования на его основе / В.Е. Жемчугов, В.А. Майоров, А.В. Зурочка, и др. // Патент 2061699 РФ, приоритет от 16.11.1994; Опубликовано 10.06.1996. Бюл. № 16. 12 с.

53. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета. / В.Н. Кокряков, Г.М. Алешина, О.В. Шамова, и др. // Медицинский академический журнал. 2010. Т. 10, № 4. С.149-160.

54. Способ диагностики депрессии кроветворения / В.Е. Жемчугов, А.В. Зурочка, А.Г. Румянцев, и др. // Патент 2136307 РФ. Приоритет от 16.11.1999; Опубликовано 10.09.99. Бюл. № 25. 4 с.

55. Способ определения вида бактериальной инфекции / Л.Я. Эберт, А.В. Зурочка, А.В. Чукичев, и др. // А.с. № 1156644 (СССР). 1985. С.4.

56. Справочник по микробиологии и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. 3-е изд. Москва, 1982. С. 172-179.

57. Сравнительная оценка влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (Zp2) и супернатантов суточных культур грамотрицательных и грамположительных бактерий на продукцию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека / А.В. Зурочка, В.А. Зурочка, Е.Б. Зуева, и др. // Российский иммунологический журнал. 2016. Т. 10 (19), № 4. С.430-433.

58. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» / С.В. Хайдуков, Л.А. Байдун, А.В. Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 4. С.974-992.

59. *Staphylococcus aureus*: спонтанная продукция цитокиноподобных веществ и её регуляция синтетическим аналогом активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) / А.В. Зурочка, В.В. Дукардт, В.А. Зурочка, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. № 1. С. 1-15: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-1/Articles/ZAV-2017-1.pdf>). DOI 10.24411/2304-9081-2017-00016.

60. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ / А.В. Зурочка, В.В. Дукардт, В.А. Зурочка, и др. // Российский иммунологический журнал. 2017. Т. 11 (20), № 2. С.134-136.

61. Стимулятор роста костно-мозговых клеток человека / В.Е. Жемчугов, А.Г. Румянцев, Е.Б. Владимирская, и др. // Патент 2136308 РФ. Приоритет от 16.11.1994; Опубликовано 10.09.99. Бюл. № 25. 10 с.

62. Трухачева Н.В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н.В. Трухачева. Москва: ГОЭТАР-Медиа, 2012. 384 с.

63. 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, и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. № 2. С. 1-30: [электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).

64. Хаитов Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы.: руководство для врачей / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин. Москва, 2009. 352 с.

65. Характеристика энтеробактерий, выделенных от больных с урогенитальной патологией / В.А. Гриценко, Ю.А. Брудастов, М.Г. Шухман, и др. // Журн. микробиол. 2001. № 4. С.107-111.

66. Черешнев, В.А. Иммунная система и кроветворение / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков // Наука в России. 2005. № 1. С.20-26.

67. Черешнев, В.А. Иммунология воспаления: Роль цитокинов / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3, № 3. С. 361-368.

68. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. Москва : Мир, 1987. 567 с.

69. Ярилин А.А. Иммунология / А.А. Ярилин. Москва, 2010. 752 с.

70. A functional isoform of the human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor has an unusual cytoplasmic domain / K.E. Crosier, G.G. Wong, B. Mathey-Prevot, et al. // Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 1991. № 88. P.7744–7748.

71. A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma: a phase II trial of safety, efficacy, and immune activation / E. Lutz, C.J. Yeo, K.D. Lillemoe, et al. // Ann. Surg. 2011. № 253. P.328–335.

72. A linguistic model for the rational design of antimicrobial peptides / C. Loose, K. Jensen, I. Regoutous, et al. // *Nature*. 2006. Vol. 443. P. 867-869.
73. A novel combination treatment of armed oncolytic adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF with radiotherapy in murine hepatocarcinoma / W. Kim, J. Seong, H.J. Oh, et al. // *J. Radiat. Res.* 2011. № 52. P.646–654.
74. A Phase I safety study of plasmid DNA immunization targeting carcinoembryonic antigen in colorectal cancer patients / C. Staff, F. Mozaffari, B.K Haller, et al. // *Vaccine*. 2011. № 29. P.6817–6822.
75. A randomised trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neonatal sepsis: outcomes at 2 years / N. Marlow, T. Morris, P. Brocklehurst, et al. // *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 2013. № 98 (1). P.46–53.
76. A recombinant human G-CSF/GM-CSF fusion protein from *E. coli* showing colony stimulating activity on human bone marrow cells / A.Y. Lee, H.K. Chung, E.K. Bae, et al. // *Biotechnol Lett.* 2003. V. 25(3). P.205-211.
77. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases / H. Kutsuna, K. Suzuki, N. Kamata, et al. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. V. 286 (1). P. 55-64.
78. Activation of human T cells by major histocompatibility complex class II expressing neutrophils: proliferation in the presence of superantigen, but not tetanus toxoid / N.A. Fanger, C. Liu, P.M. Guyre, et al. // *Blood*. 1997. № 89. P.4128–4135.
79. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity / L. Wang, X Qi., Y. Sun, et al. // *Cancer Gene Ther.* 2002. № 9. P.819–824.
80. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / G.D. Christensen, W.A. Simpson, J.J. Younger, et al. // *J Clin Microbio.* 1985. № 22. P.996-1006.

81. Antimicrobial activity of the indolicidin-derived novel synthetic peptide In-58 / A.S. Vasilchenko, A.V. Vasilchenko, T.M. Pashkova, et al. // J. Pept. Sci. 2017. 23: 855-863 (DOI: 10.1002/psc.3049).
82. Antimicrobial Drug Resistance Among Clinically Relevant Bacterial Isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review / S. J. Leopold, F. van Leth, H. Tarekegn, et al. // The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014. 69 (9). P.2337-2353.
83. Armitage, J.O. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / J.O. Armitage // Blood. 1998. № 92. P.4491–4508.
84. Bradbury, P.A. Immunotherapy for lung cancer / P.A. Bradbury, F.A. Shepherd // J. Thorac. Oncol. 2008. № 3. P.164–170.
85. Bradley, T.R. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro* / T.R. Bradley, D. Metcalf // Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1966. № 44. P.287–29.
86. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // Nat. Rev. Microbiol. 2005. 3. P.238-250 (DOI:10.1038/nrmicro1098).
87. Burgess, A.W. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium / A.W. Burgess, J. Camakaris, D. Metcalf // Journal of Biological Chemistry. 1977. № 252. P.1998–2003.
88. Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X(7) receptors, AZ11645373 / L. Stokes, L.H. Jiang, L. Alcaraz, et al. // Br. J. Pharmacol. 2006. Vol. 149 (7). P.880-887.
89. Castagnola, E. Role of G-CSF and GM-CSF in the management of infections in preterm newborns: an update / E. Castagnola, C. Dufour // Early Human Development 2014. v. 90. № 2. P.15–17.
90. Chen, J. The alpha subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor interacts with c-Kit and inhibits c-Kit signalling / J. Chen, J.M. Cárcamo, D.W. Golde // J. Biol. Chem. 2006. № 281. P.22421–22426.

91. CISH is induced during DC development and regulates DC-mediated CTL activation / M.A. Miah, C.H. Yoon, J. Kim, et al. // Eur. J.Immunol. 2012. 42. P.58–68.

92. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells / C.L. Slingluff, G.R. Petroni, G.V. Yamshchikov et al. // J. Clin. Oncol. 2003. V. 21 (21). P. 4016-4026.

93. Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination / X. Sun, L.M. Hodge, H.P. Jones, et al. //Vaccine. 2002. № 20. P.1466–1474.

94. Comparison of apoptosis and mortality measurements in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using multiple methods / S. Glisic-Milosavljevic, J. Waukau, S. Jana, et al. // Cell Prolif. 2005. Vol. 38 (5). P.301-311.

95. Conti, L. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances / L. Conti, S. Gessani // Immunobiology. 2008. № 213. P.859–870.

96. Correction of granulocytopenia in Felty's syndrome by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Simultaneous induction of interleukin-6 release and flare-up of the arthritis / B.P. Hazenberg, M.A. Van Leeuwen, M.H. Van Rijswijk, et al. // Blood. 1989. № 74. P.2769–2770.

97. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the ternary human GM-CSF receptor complex / G. Hansen, T.R. Hercus, Y. Xu, et al. // Acta.Crystallogr. Sect. F Struct.Biol.Cryst.Comm. 2008. № 64. P. 711–714.

98. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia *in vitro* / A. Uto, E. Dux, M. Kusumoto, et al. // J Neurochem. 1995. May. 64 (5). P.2185-2192.

99. Dendritic cells generated in the presence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-alpha are potent inducers of HIV-specific CD8

T- cells / C. Carbonneil, A. Aouba, M. Burgard, et al. // AIDS. 2003. V. 17(12). P.1731-1740.

100. Denis, M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor restricts growth of tubercle bacilli in human macrophages / M. Denis, E. Ghadirian // Immunol. Lett. 1990. № 24. P.203–206.

101. Department Human macrophage polarization *in vitro*: Maturation and activation methods compared / D. Vogela, J. E. Glina, A. Stavenhagen, et al. // J. Immunobiology 2014. № 219. P. 695–703.

102. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages / D.S. O'Mahony, U. Pham, R. Iyer, et al. // Int. J. Med.Sci. 2008. № 5. P.1–8.

103. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β / A. Kaplan, M.W. Lee, A.J. Wolf, et al. // J. Immunol. 2017. № 198. P.4036-4045. doi: 10.4049/jimmunol.1601226.

104. Disruption of granulocyte macrophage-colony stimulating factor production in the lungs severely affects the ability of mice to control mycobacterium tuberculosis infection / M. Gonzalez-Juarrero, J.M. Hattler, A. Izzo, et al. // J. Leukoc. Biol. 2005. № 77. P. 914–922.

105. Distinct domains of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit mediate activation of Jak/Stat signalling and differentiation / M.B. Lilly, M. Zemskova, A.E. Frankel, et al. // Blood. 2001. № 97. P.1662–1670.

106. Divergent effects of GM-CSF and TGF-beta-1 on bone marrow-derived macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis / M.M. Jost, E. Ninci, B. Meder, et al. // FASEB J. 2003. V. 15. P.2281-2283.

107. Domen, J. Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signalling the other / J. Domen, I.L. Weissman // J. Exp. Med. 2000. № 192. P.1707–1718.

108. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes / G.W. Takahashi, D.F. Andrews 3rd, M.B. Lilly, et al. // *Blood*. 1993. № 81. P.357–364.

109. Effects of macrophage-colony stimulating factor on human monocytes: induction of expression of urokinase-type plasminogen activator, but not of secreted prostaglandin E2, interleukin-6, interleukin-1, or tumour necrosis factor- α / J.A. Hamilton, G.A. Whitty, H. Stanton, et al. // *J. Leukoc. Biol.* 1993. № 53. P.707–714.

110. Efficacy and safety of mavrimumab in subjects with rheumatoid arthritis / G.R. Burmester, M.E. Weinblatt, I.B. McInnes, et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 2013. № 72. P.1445–1452.

111. Egea, L. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert. Rev.* / L. Egea, Y. Hirata, M.F. Kagnoff // *Gastroenterol. Hepatol.* 2010. № 4. P.723–731.

112. Enhancement of the immunogenicity of DNA replicon vaccine of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A by GM-CSF gene adjuvant / N. Li, Y.Z. Yu, W.Y. Yu, et al. // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2011. № 33. P.211–219.

113. Essential roles of tumor-derived helper T-cell epitopes for an effective peptide-based tumor vaccine / L. Wang, Y. Miyahara, T. Kato, et al. // *Cancer Immun.* 2003 V. 21. P. 3-16.

114. Exacerbation of acute inflammatory arthritis by the colony-stimulating factors CSF-1 and granulocyte macrophage (GM)-CSF: evidence of macrophage infiltration and local proliferation / R.J. Bischof, D. Zafiropoulos, J.A. Hamilton, et al. // *Clin Exp Immunol.* 2000. № 119. P.361–367.

115. Expression of cytokine receptors in cultured neuronal and glial cells / M. Sawada, Y. Itoh, A. Suzumura, et al. // *Neurosci. Lett.* 1993. № 160. P.131–134.

116. Expression of HLADR (major histocompatibility complex class II) on neutrophils from patients treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor for mobilization of stem cells / S.P. Mudzinski, T.P. Christian, T.L. Guo, et al. // *Blood*.1995. № 86. P.2452–2453.

117. Factor beta induces granulocyte macrophage colony stimulating factor independent differentiation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells into dendritic cells with features of Langerhans cells / Z.U. Mollah, S. Aiba, S. Nakagawa, et al. // *J. Invest Dermatol*. 2003. V. 121(6). P.401-1397.

118. Finlay, B.B. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? / B.B. Finlay, Hancock R.E.W. // *Nat. Rev. Microbiol*. 2004. № 2. P. 497-504 (DOI: 10.1038/nrmicro908).

119. Flare-up of rheumatoid arthritis during GM-CSF treatment after chemotherapy / E.G. De Vries, P.H. Willemse, B. Biesma, et al. // *Lancet*. 1991. № 338. P.517–518.

120. Gene therapy of beta(c)-deficient pulmonary alveolar proteinosis (beta(c)-PAP): studies in a murine *in vivo* model / V. Kleff, U.R. Sorg, C. Bury, et al. // *Mol. Ther*. 2008. № 16. P.757–764.

121. Gene transfer for cytokinefunctional studies in the lung: the multifunctional role of GM-CSFin pulmonary inflammation / Z. Xing, T. Braciak, Y. Ohkawara, et al. // *J. Leukoc. Biol*. 1996. № 59. P.481–488.

122. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases / A. Van Nieuwenhuijze, M. Koenders, D. Roeleveld, et al. // *Molecular Immunology*. 2013. № 56. P. 675– 682.

123. GM-CSF Exhibits Anti-Inflammatory Activity on Endothelial Cells Derived from Chronic Venous Disease Patients / V. Tisato, P. Secchiero, E. Rimondi, et al. // *Mediators of Inflammation*. 2013. V. 2013. P.1-9.

124. GM-CSF-facilitated dendritic cell recruitment and survival govern the intestinal mucosal response to a mouse enteric bacterial pathogen / Y. Hirata, L. Egea, S.M. Dann, et al. // *Cell Host.Microbe*. 2010. № 7. P.151–163.

125. GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice / L.M. Moldenhauer, S.N. Keenihan, J.D. Hayball, et al. // *J. Immunol*. 2010. № 185. P.7085–7096.

126. GM-CSF production by CD4⁺ T cells in MS patients: Regulation by regulatory T cells and vitamin D / E. Peelen, A.H. Muris, J. Damoiseaux, et al. // *Journal of euroimmunology*. 2015. № 280. P. 36–42.

127. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis / L. Bo, F. Wang, J. Zhu et al. // *Crit. Care*. 2011. № 15. R.58.

128. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interferon-gamma prevent dexamethasone-induced immunosuppression of antifungal monocyte activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae / E. Roilides, C. Blake, A. Holmes, et al. // *J. Med. Vet. Mycol.* 1996. № 34. P.63–69.

129. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor augments neutrophil killing of *Torulopsis glabrata* and stimulates neutrophil respiratory burst and degranulation / I.C. Kowanko, A. Ferrante, D.P. Harvey, et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 1991. № 83. P.225-230.

130. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-based melanoma cell vaccines immunize syngeneic and allogeneic recipients via host dendritic cells / A. Schneeberger, P. Luhrs, R. Kutil, et al. // *J. Immunol.* 2003. V. 171 (10). P. 5180-5187.

131. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor exacerbates collagen induced arthritis in mice / I.K. Campbell, A. Bendele, D.A. Smith, et al. // *Ann. Rheum. Dis.* 1997. № 56. P.364–368.

132. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is a chemoattractant cytokine for human neutrophils: involvement of the ribosomal p70 S6 kinase signaling pathway / J. Gomez-Cambronero, J. Horn, C.C. Paul, et al. // *J. Immunol.* 2003. V. 171 (12). P.846-855.

133. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor-mediated innate responses in tuberculosis / J. Szeliga, D.S. Daniel, C.H. Yang, et al. // *Tuberculosis*. 2008. № 88. P.7–20.

134. Granulocyte–macrophage colony stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor / A.F. Cruz, M.A. Santelises, O.R. Espinosa, et al. // *Med. Oncol.* 2014. № 31. P.774-788.
135. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor shows anti-apoptotic activity in neural progenitor cells via Jak /STAT5-Bcl-2 pathway / J.K. Choi, K.H. Kim, H. Park, et al. // *Apoptosis.* 2011. № 16. P.127–134.
136. Groot, R.P. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family / R.P. Groot, P.J. Coffey, L. Koenderman // *Cell Signal.* 1998. № 10. P.528–619.
137. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity / J.A. Hamilton // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. № 8. P.533–544.
138. Hamilton, J.A. GM-CSF biology / J.A. Hamilton, G.P. Anderson // *Growth Factors.* 2004. № 22. P.225–231.
139. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation / T.A. Lane, P. Law, M. Maruyama, et al. // *Blood.* 1995. № 85. P.275–282
140. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation / T.A. Lane, P. Law, M. Maruyama, et al. // *Blood.* 1995. № 85. P.275–282
141. Hege, K.M. Lung cancer vaccines and gene therapy / K.M. Hege, D.P. Carbone // *Lung Cancer.* 2003. V. 41. Suppl. 1. P. 103-13.
142. Herold, S. Acute lung injury. How macrophages orchestrate resolution of inflammation and tissue repair / S. Herold, K. Mayer, J. Lohmeyer // *Front. Immunol.* 2001. № 2. P.6.
143. Holt, G.E. Immune modulation as a therapeutic strategy for non-small-cell lung cancer / G.E. Holt, M.L. Disis // *Clin. Lung. Cancer.* 2009. № 9. P.13–19.

144. Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor / M.A. Raines, L. Liu, S.G. Quan, et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. № 88. P.8203–8207.
145. Identification of GM-CSF in Paneth cells using single-cell RT-PCR. / H. Fukuzawa, M. Sawada, T. Kayahara, et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. № 312. P.897–902
146. Immunomodulation of peritoneal macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in humans / R. Selgas, M. Fernández de Castro, C. Jiménez, et al. // Kidney Int. 1996. № 50. P.2070–2078.
147. Immunotherapeutic effects of recombinant adenovirus encoding granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental pulmonary tuberculosis / A. Francisco-Cruz, D. Mata-Espinosa, S. Estrada-Parra, et al. // Clin. Exp. Immunol. 2013. № 171. P.283–297.
148. Impairment of neutrophil chemotactic and bactericidal function in children infected with human immunodeficiency virus type 1 and partial reversal after *in vitro* exposure to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / E. Roilides, S. Mertins, J. Eddy, et al. // J. Pediatr. 1990. № 117. P.531–540.
149. Improved protection against disseminated tuberculosis by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin secreting murine GM-CSF is associated with expansion and activation of APCs / A.A. Ryan, T.M. Wozniak, E. Shklovskaya, et al. // J. Immunol. 2007. № 179. P.18–24.
150. Induction of inhibitory central nervous system-derived and stimulatory blood-derived dendritic cells suggests a dual role for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in central nervous system inflammation / L. Hesske, C. Vincenzetti, M. Heikenwalder, et al. // Brain. 2010. V. 133 (Pt 6). P.1637–1654.
151. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / K.H. Grabstein, D.L. Urdal, R.J. Tushinski, et al. // Science. 1986. № 232. P.506–508.

152. Inhaled granulocyte/macrophage-colony stimulating factor as therapy for pulmonary alveolar proteinosis / R. Tazawa, B.C. Trapnell, Y. Inoue, et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. № 181. P.1345–1354.

153. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer / C.S. Higano, P.F. Schellhammer, E.J. Small, et al. // *Cancer*. 2009. № 115. P.3670–3679.

154. Intracerebral administration of recombinant rabies virus expressing GM-CSF prevents the development of rabies after infection with street virus / H. Wang, G. Zhang, Y. Wen, et al. // *PLoS One*. 2011. № 6. P.254-314.

155. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene / X. Zhang, M. Divangahi, P. Ngai, et al. // *Vaccine*. 2007. № 25. P.1342–1352.

156. Investigation of immunogenic effect of the BCG priming and Ag85A-GM-CSF boosting in Balb/c mice model / J. Dou, Q. Tang, F. Yu, et al. // *Immunobiology*. 2010. № 215. P.133–142.

157. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis / G. Dranoff, J. Dou, Q. Tang, et al. // *Science*. 1994. № 264. P.713–716.

158. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses / T. Krausgruber, J.R. Korzenik, B.K. Dieckgraefe, J.F. Valentine, et al. // *Nat. Immunol.* 2011. № 12. P.231–238.

159. Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells / F. Lee, T. Yokota, T. Otsuka, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985. № 82. P.4360–4364.

160. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes / A.E. Garcia, G. Osapay, P.A. Tran, et al. // *Infect. Immun.* 2008. Vol. 76, № 12. P.5883-5891.

161. Jiang, D. Regulation of granulocyte and macrophage populations of murine bone marrow cells by G-CSF and CD137 protein / D. Jiang, H. Schwarz // PLoS One. 2010. № 5. P. 515-565.

162. Kobayashi, N. Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce cell cycle progression through the synthesis of c-Myc protein by internal ribosome entry site-mediated translation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway in human factor-dependent leukemic cells / N. Kobayashi, K. Saeki, A. Yuo // Blood. 2003. V. 102 (9). P.3186-3195.

163. Leukine. Prescribing information. Available at <http://products.sanofi.us/Leukine/Leukine.html> Accessed on September. 2013.

164. Local delivery of GM-CSF protects mice from lethal pneumococcal pneumonia / K. Steinwede, O. Tempelhof, K. Bolte, et al. // J. Immunol. 2011. № 187. P.5346–5356

165. Lu, H. GM-CSF transgene-based adjuvant allows the establishment of protective mucosal immunity following vaccination with inactivated Chlamydia trachomatis / H. Lu, Z. Xing, R.C. Brunham // J. Immunol. 2002. № 169. P.6324–6331.

166. Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte- macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair / L. Cakarova, L.M. Marsh, J. Wilhelm, et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2009. № 180. P.521–532.

167. Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections / S. McCormick, M. Santosuosso, X.Z. Zhang, et al. // Biochem. Soc. Trans. 2006. № 34. P.283–286.

168. Metcalf, D. Hematopoietic cytokines / D. Metcalf // Blood. 2008. № 111. P. 485–491.

169. Methods in laboratory investigation. Normal human urothelial cells *in vitro*: proliferation and induction of stratification / J. Southgate, K.A.R. Hutton, F.M. Thomas, et al. // Lab. Invest. 1994. № 71. P.583.

170. Modulation of pulmonary DC function by vaccine-encoded GM-CSF enhances protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection / J.K. Nambiar, A.A. Ryan, C.U. Kong, et al. // *Eur. J. Immunol.* 2010. № 40. P.153–161
171. Molecular assembly of the ternary granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor complex / B.J. McClure, T.R. Hercus, B.A. Cambareri, et al. // *Blood.* 2003. № 101. P.1308–1315.
172. Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor / N.M. Gough, J. Gough, D. Metcalf, et al. // *Nature.* 1984. № 309. P.763–767.
173. Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signalling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells / A. Tanimoto, Y. Murata, K.Y. Wang, et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. № 283. P. 4643–4651.
174. Monosodium iodoacetate induces apoptosis via the mitochondrial pathway involving ROS production and caspase activation in rat chondrocytes *in vitro* / L. Jiang, L. Li, C. Geng, et al. // *J Orthop Res.* 2013. № 31 (3). P.364-369.
175. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis / S. Mera, D. Tatulescu, C. Cismaru, et al. // *APMIS.* 2011. № 119. P.155–163.
176. Myeloid growth factors / J. Crawford, J. Armitage, L. Balducciet, et al. // *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 2009. № 7. P. 64–83.
177. Nelson, R.D. Chemotaxis under agarose: a new and simpl method for measuring chemotaxis and spontanequs migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes / R.D. Nelson, et al. // *J. Immunol.* 1975. № 115. P. 1650-1656.
178. Newman, S.L. Colony-stimulating factors activate human macrophages to inhibit intracellular growth of *Histoplasma capsulatum* yeasts / S.L. Newman, L. Gootee // *Infect. Immun.* 1992. № 60. P.4593–4597.

179. O'Gara, J. Pica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* / J. O'Gara // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. № 270 (2). P.179-188.
180. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* 2000. № 54. P.49-79.
181. Optimizing autologous Stem Cell Mobilization Strategies to Improve Patient Outcomes: Consensus Guidelines and Recommendations / S. Giral, L. Costa, J. Schriber, et al. // *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* 2014. № 20. P.295-308.
182. Page, A.V. Colony-stimulating factors in the prevention and management of infectious diseases / A.V. Page, W.C. Liles // *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2011. № 25. P.803–817.
183. Phase I trial of TGF-(beta)2 antisense GM-CSF gene-modified autologous tumor cell (TAG) vaccine / J. Olivares, P. Kumar, Y. Yu, et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. № 17. P.183–192.
184. Phase I/II trial of subcutaneous interleukin-2, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon- α in patients with metastatic renal cell carcinoma / J.A. Garcia, T. Mekhail, P. Elson, et al. // *BJU Int.* 2012. № 109. P.63–69.
185. Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with *Mycobacterium avium*-M. intracellulare: activation of bactericidal activity by GM-CSF / D.K. Blanchard, M.B. Michelini-Norris, C.A. Pearson Hamilton, et al. // *Infect Immun.* 1991, July. № 59 (7). P.2396-2402.
186. Pulmonary alveolar proteinosis caused by deletion of the GMCSFR(α) gene in the X chromosome pseudoautosomal region 1 / M. Martinez-Moczygemba, M.L. Doan, O. Elidemir, et al. // *J. Exp. Med.* 2008. № 205. P.2711–2716.

187. Pulmonary surfactant and tuberculosis / Z.C. Chroneos, K. Midde, Z. Sever-Chroneos, et al. // Tuberculosis. 2009. № 89. P.10–14.
188. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanovic, D. Vukovic, V. Hola, et al. // APMIS. 2007. № 115. P. 891-899.
189. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / T.M. Hornell, G.W. Beresford, A. Bushey, et al. // J. Immunol. 2003. V. 171 (5). P.2374-2383.
190. Sargramostim for active Crohn's disease / J.R. Korzenik, B.K. Dieckgraefe, J.F. Valentine, et al. // N Engl J Med. 2005. № 352. P. 2193–2201.
191. Schadendorf, D. Melanoma vaccines / D. Schadendorf // Drug News Perspect. 2000. V. 13(2). P. 85-90.
192. Schiffman, K. HER-2/neu peptide-based vaccines, with GM-CSF as an adjuvant, in patients with advanced-stage HER2/neu-expressing cancers / K. Schiffman, M.L. Disis // Clin. Lung. Cancer. 2000. V. 2 (1). P.74-77.
193. Sheridan, J.W. A low molecular weight factor in lung conditioned medium stimulating granulocyte and monocyte colony formation *in vitro* / J.W. Sheridan, D Metcalf // J. Cell Physiol. 1973. № 81. P.11–23.
194. Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. Aureus* lineage / S. Croes, R.H. Deurenberg, M.-L. Boumans, et al. // BMC Microbiology. 2009. V. 9. № 229 (doi:10.1186/1471-2180-9-229).
195. Steroid-sparing properties of sargramostim in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study / J.F. Valentine, R.N. Fedorak, B. Feagan, et al. // Gut. 2009. № 58. P. 1354–1362.
196. Structure of the complete extracellular domain of the common subunit of the human GM-CSF, IL-3, and IL-5 receptors reveals a novel dimer

configuration / P.D. Carr, S.E. Gustin, A.P. Church, et al. // *Cell*. 2001. № 104. P.291–300.

197. Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity / P.H. Hart, G.A. Whitty, D.S. Piccoli, et al. // *J. Immunol*. 1988. № 141. P.1516–1521.

198. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26 τ / S. Meller, J.D. Domizio, K.S. Voo, et al. // *Nature Immunology*. 2015. № 16 (9). P.970-979. doi:10.1038/ni.3211.

199. The cytoplasmic domain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor subunit is essential for both GM-CSF-mediated growth and differentiation / T. Matsuguchi, Y. Zhao, M. Lilly, et al. // *J. Biol. Chem*. 1997. № 272. P.17450–17459.

200. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America / B. Spellberg, R. Guidos, D. Gilbert, et al. // *Clinical Infectious Diseases*. 2008. 46. P.155-164.

201. The new normal: immuno-modulatory agents against sepsis immune suppression / N.A. Hutchins, J. Unsinger, R.S. Hotchkiss, et al. // *Trends Mol. Med*. 2014, April. № 20 (4). P.224–233.

202. The Src-like adaptor protein regulates GM-CSFR signalling and monocytic dendritic cell maturation / L.M. Liontos, D. Dissanayake, P.S. Ohashi et al. // *J. Immunol*. 2011. № 186. P.1923–1933.

203. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation / G. Hansen, T.R. Hercus, B.J. McClure, et al. // *Cell*. 2008. № 134. P.496–507.

204. TNF-alpha induces phosphorylation of p47 (phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor / C. Dewas, P.M. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, et al. // J. Immunol. 2003. V. 171 (8). P. 4392-4398.

205. Toll-like receptor-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion is impaired in Crohn's disease by nucleotide oligomerization domain 2-dependent and -independent pathways / A. Brosbol-Ravnborg, C.L. Hvas, J. Agnholt, et al. // Clin. Exp. Immunol. 2009. № 155. P.487–495.

206. Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage / R.A. Lang, D. Metcalf, R.A. Cuthbertson, et al. // Cell. 1987. №51. P.675–686.

207. Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury / R. Paine 3rd, S.E. Wilcoxon, S.B. Morris, et al. // Am J. Pathol. 2003. V. 163 (6). P.2397-2406.

208. Walsh, C. Where will new antibiotics come from? / C. Walsh // Nat. Rev. Microbiol. 2003. 1 (1). 65-70 (DOI: 10.1038/nrmicro727).

209. Wang, J. Enhanced immunogenicity of BCG vaccine by using a viral-based GM-CSF transgene adjuvant formulation / J. Wang, A. Zganiacz, Z. Xing // Vaccine. 2002. № 20. P.2887–2898.

210. WHO: First ever list of antibiotic-resistant "priority pathogens". GENEVA, 2017 (URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>).

211. Wong, L. The identification of Fc and C₃ receptors on human neutrophils / L. Wong, R.D. Wilson // J. Immunol. Meth. 1975. Vol. 7. P. 69-76.

212. Yeaman, M.R. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance / M.R. Yeaman, N.Y. Yount // Pharmacol. Rev. 2003. № 55. P. 27-55.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность за помощь оказанную в работе сотрудникам Тюменского филиала Института клинической иммунологии Сибирского отделения РАМН в лице директора, д.м.н., профессора Суховея Ю.Г. и к.б.н. Костоломовой Е.Г.

Коллективу сотрудников НИИ ОЧБ в лице научного руководителя института, член-корреспондента РАН, д.м.н., профессора Симбирцева А.С. и д.б.н. Колобова А.А.

Коллективу сотрудников ФГБУН Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН в лице директора института, член-корреспондента РАН, д.м.н Черкасова С. В. и моего научного руководителя д.м.н., профессора Гриценко В.А.

Моему научному руководителю, академику РАН, д.м.н., профессору Черешневу В.А., г.н.с. ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН.

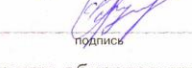
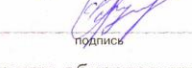
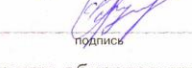
Патент 1



Патент 2



Сертификат соответствия 1

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ				
	СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ			
№ РОСС RU.АБ72.Н00566 Срок действия с 30.10.2017 по 29.10.2020 № 0203563				
ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ рег.№ RA.RU.11АБ72, Орган по сертификации Общества с ограниченной ответственностью «ТЕХНОЛАБ», 115230, Россия, город Москва, проезд Электролитный, дом 3, строение 12, офис 8, Тел: +79661713392, E-mail: texnoolab@gmail.com				
ПРОДУКЦИЯ Средства косметические для ухода за кожей: спрей для тела и лица, марка "Ацеграм-Спрей". Серийный выпуск.	КОД ОК Код ОК 034-2014 (КПЕС 2008) 20.42.15			
СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ ТУ 20.42.15.-001-68681750-2017 "Гель косметический "Ацеграм-гель" и спрей косметический "Ацеграм -спрей". Технические условия".				
ИЗГОТОВИТЕЛЬ Общество с ограниченной ответственностью "Академический инновационный научный центр", 454091, Россия, Челябинская область, город Челябинск, улица Телевизионная, дом 6, квартира 36. ИНН 7451317317.				
СЕРТИФИКАТ ВЫДАН Общество с ограниченной ответственностью "Академический инновационный научный центр", 454091, Россия, Челябинская область, город Челябинск, улица Телевизионная, дом 6, квартира 36. Телефон: +79193077598. E-mail: av_zigochka@mail.ru.				
НА ОСНОВАНИИ протокола испытаний № 621-02/10-ЭУ от 27.10.2017 года Испытательной лаборатории Общества с ограниченной ответственностью «ЭНЕРГОУЧЕТ», аттестат аккредитации РОСС RU.31403.04ИВВ0.001, срок действия с 22.12.2016 по 21.12.2019.				
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ Схема сертификации: 3. Декларация о соответствии ЕАЭС № RU Д- RU.АБ72.В.13762 от 24.10.2017 года, выдана Органом по сертификации Общества с ограниченной ответственностью "ТЕХНОЛАБ", аттестат аккредитации RA.RU.11АБ72				
	<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Руководитель органа Эксперт </td> <td style="width: 50%; text-align: center; vertical-align: top;">  подпись  подпись </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> Гречишников Кирилл Андреевич инициалы, фамилия Кудинов Сергей Владимирович инициалы, фамилия </td> </tr> </table>	Руководитель органа Эксперт	 подпись  подпись	Гречишников Кирилл Андреевич инициалы, фамилия Кудинов Сергей Владимирович инициалы, фамилия
Руководитель органа Эксперт	 подпись  подпись	Гречишников Кирилл Андреевич инициалы, фамилия Кудинов Сергей Владимирович инициалы, фамилия		
Сертификат не применяется при обязательной сертификации				

Сетификат соответствия 2

СИСТЕМА СЕРТИФИКАЦИИ ГОСТ Р ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ	
	СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ
№ РОСС RU.АБ72.Н00565	
Срок действия с 30.10.2017 по 29.10.2020	
№ 0203562	
ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ пер.№ RA.RU.11АБ72, Орган по сертификации Общества с ограниченной ответственностью «ТЕХНОЛАБ», 115230, Россия, город Москва, проезд Электролитный, дом 3, строение 12, офис 8, Тел: +79661713392, E-mail: texnoolab@gmail.com	
ПРОДУКЦИЯ Средства косметические для ухода за кожей: гель для лица и тела, марка "Ацеграм-Гель". Серийный выпуск.	код ОК Код ОК 034-2014 (КПЕС 2008) 20.42.15
СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ ТУ 20.42.15.-001-68681750-2017 "Гель косметический "Ацеграм-гель" и спрей косметический "Ацеграм-спрей". Технические условия".	
код ТН ВЭД 3304 99 000 0	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ Общество с ограниченной ответственностью "Академический инновационный научный центр", 454091, Россия, Челябинская область, город Челябинск, улица Телевизионная, дом 6, квартира 36. ИНН 7451317317.	
СЕРТИФИКАТ ВЫДАН Общество с ограниченной ответственностью "Академический инновационный научный центр", 454091, Россия, Челябинская область, город Челябинск, улица Телевизионная, дом 6, квартира 36. Телефон: +79193077598. E-mail: av_zurochka@mail.ru.	
НА ОСНОВАНИИ протокола испытаний № 620-02/10-ЭУ от 27.10.2017 года Испытательной лаборатории Общества с ограниченной ответственностью «ЭНЕРГОУЧЕТ», аттестат аккредитации РОСС RU.31403.04ИВВ0.001, срок действия с 22.12.2016 по 21.12.2019.	
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ Схема сертификации: 3. Декларация о соответствии ЕАЭС № RU Д- RU.АБ72.В.13760 от 24.10.2017 года, выдана Органом по сертификации Общества с ограниченной ответственностью "ТЕХНОЛАБ", аттестат аккредитации RA.RU.11АБ72.	
	Руководитель органа Эксперт
Сертификат не применяется при обязательной сертификации	
Гречишников Кирилл Андреевич инициалы, фамилия Кудинов Сергей Владимирович инициалы, фамилия	

Косметические средства

