

## СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПЕПТИД АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ), СПЕКТР ЕГО ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Зурочка А. В.<sup>1,2</sup>, Зурочка В. А.<sup>1,2</sup>, Добрынина М. А.<sup>1</sup>, Зуева Е. Б.<sup>1</sup>,  
Дукардт В. В.<sup>1</sup>, Лаврентьева И. Н.<sup>3</sup>, Сухобаевская Л. П.<sup>3</sup>, Гриценко В. А.<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург; <sup>2</sup>ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск; <sup>3</sup>ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург; <sup>4</sup>ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург; <sup>5</sup>ФГБУН Оренбургский научный центр УрО РАН, Оренбург, Россия

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлено, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) стимулирует активность клеток иммунной системы (лимфоцитов, стволовых клеток, нейтрофилов, моноцитов), влияет на рост, биомассу, цитокиновую и антицитокиновую активность и биопленкообразование грамположительных и грамотрицательных бактерий, обладает противовирусным действием в отношении ДНК- и РНК-вирусов и активирует репарацию ран. Наличие у данного синтетического пептида такого широкого спектра иммунобиологических эффектов (иммуностимулирующая, антибактериальная, противовирусная и репарационная активности) определяет возможность его практического использования в качестве основы для создания эффективных лекарственных и косметических препаратов с комбинированными свойствами, что было реализовано при создании косметических средств АЦЕГРАМ.

**Ключевые слова:** гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), синтетический пептид активного центра, клетки иммунной системы, бактерии, вирусы, репарация, косметические средства, АЦЕГРАМ

**Введение.** Создание новых лекарств и косметических препаратов на основе синтетических пептидов, обладающих комбинированной иммунобиологической активностью, является одним из важнейших направлений современной иммунологии и медицины. Наиболее интересными в этой связи являются биологически активные регуляторные молекулы – цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками человека, обладающие выраженными плеiotропными свойствами и участвующие в поддержании гомеостаза, которые могут стать основой эффективных лекарственных средств, восстанавливающих поврежденные звенья иммунной и других систем организма [1, 2]. К ним, в частности, относится гранулоцитарно-макрофагальный колони-

стимулирующий фактор (ГМ-КСФ), уже нашедший применение в клинической практике, в том числе при лечении лейкозов [3, 4]. Широкие возможности для производства новых иммуностропных препаратов открывают расшифровка молекулярной структуры и направленный химический синтез активных центров цитокинов, что убедительно продемонстрировано на примере создания синтетических аналогов активного центра ГМ-КСФ, которые обладали иммуностимулирующим действием, идентичным таковому цельной регуляторной молекулы [5, 6]. В то же время такие синтетические аналоги в сравнении с природными цитокинами могут обладать более обширным набором иммунобиологических свойств, проявляя дополнительные полезные характери-

стики и повышая их иммунный и терапевтический потенциал.

**Целью** настоящего исследования явился анализ наличия у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 дополнительных иммунобиологических свойств для практического использования в качестве косметических средств с комбинированными свойствами.

**Материалы и методы.** Изучали влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) с химической формулой – THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO на наличие иммуностимулирующей, антимикробной и репаративной активности. Иммуностимулирующую активность синтетического пептида ZP2 определяли *in vitro* по его влиянию на РБТЛ, хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов, дифференцировку стволовых клеток, апоптоз моноцитов, секрецию цитокинов нейтрофилами периферической крови человека, в том числе при комбинированном воздействии на них пептида, бактерий и их супернатантов, а также оценивали действие данного пептида на способность бактерий продуцировать цитокино-подобные вещества (ЦПВ). Антибактериальное действие пептида ZP2 в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов определяли по его влиянию на кинетику развития бактериальных культур (рост биомассы) в жидкой питательной среде и их способность к биопленкообразованию. Противовирусную активность оценивали по снижению цитопатогенного действия на клетки перевиваемых культур зараженных ДНК- и РНК-вирусами. О репаративной активности синтетического пептида ZP2 судили по скорости и характеру заживления ран в эксперименте на животных, а также у больных после электроэксцизионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии (включая гистологические исследования).

**Результаты.** Проведенные исследования позволили выявить и охарактеризовать комплекс новых иммунных и биологических свойств синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 и расширить возможности их практического применения.

В частности, экспериментально установлено, что данный пептид обладает способностью в широком диапазоне концентраций усиливать бластную трансформацию лимфо-

цитов, по степени сопоставимую при контакте со стандартным стимулятором ФГА и действием ряда иммуномодуляторов (дефенсина L37 и HNP, IL-2, и др.), как это было показано ранее [7]. Установлено, что синтетический пептид ZP2 (в концентрации 10 мкг/мл) вызывал дифференцировку стволовых клеток человека с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> (по протоколу ISHAGE) в сторону гранулоцитопоза. Кроме того, он стимулировал хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов человека, а также активировал секрецию нейтрофилами периферической крови человека цитокинов G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$ , IL-8 и MIP-1 $\beta$ . В то же время обнаружено переменное по характеру модулирующее действие синтетического пептида ZP2 на секрецию ряда цитокинов нейтрофилами после контакта фагоцитов с живыми грамположительными и грамотрицательными бактериями разной таксономической принадлежности и супернатантами их бульонных культур, но в целом пептид снижал антицитокиновую активность бактерий различных видов.

В опытах *in vitro* установлено, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра грампозитивных и грамотрицательных бактерий разных видов. Выявлен дозозависимый эффект и определены особенности влияния синтетического пептида ZP2 на кинетику развития бульонных культур (их биомассу и скорость роста) музейных и клинических штаммов микрококка, коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков, синегнойной палочки и энтеробактерий. Экспериментально обнаружена межвидовая переменность эффектов указанного пептида ZP2 в низких концентрациях на способность данных бактерий формировать биопленки, причем на клинические изоляты *Staphylococcus aureus* синтетический пептид ZP2 оказывал преимущественно ингибирующее действие.

Выявлена переменность действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на способность ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий (стафилококки, энтерококки, энтеробактерии, псевдомонады) продуцировать цитокино-подобные вещества (ЦПВ). У большинства штаммов бактерий изученных видов синтетический

пептид ZP2 в концентрации 10 мкг/мл снижал уровень ЦПВ в супернатантах бульонных культур. В тоже время у части штаммов (в основном среди изолятов *S. aureus*) синтетический пептид ZP2, наоборот, стимулировал продукцию ЦПВ.

Пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 обладал противовирусной активностью как в «профилактической», так и в «лечебной» схеме применения, подавляя цитопатическое действие ДНК- и РНК-вирусов (аденовирусы, вирусы парагриппа) при заражении ими клеток перевиваемых культур (HEp2).

Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 влиял на течение репаративно-пластических процессов в ране, вызывая практически двукратное ускорение её заживления как в опытах на животных, так и в клинических наблюдениях – у больных после электроэксизионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии. При этом установлено, что под действием данного синтетического пептида не только ускорялось заживление ран, но и восстанавливалась нормальная структура ткани без образования рубцов, о чем свидетельствовали результаты гистологических исследований.

Полученные данные позволили создать косметические средства для наружного применения торговыми названиями: АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ и АЦЕГРАМ-СПРЕЙ, с получением Регистрационного номера сертификата соответствия № РОСС RU.АВ66.Н00840 (№ 1467581). Практическое применение указанных средств выявило их высокую эффективность для восстановления поврежденных кожных покровов и слизистых оболочек, а также при воспалительных и гнойных поражениях кожи, вирусных поражениях слизистой оболочек ротовой полости и урогенитального тракта.

Таким образом, результаты исследований отражают наличие у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 широкого спектра иммунобиологических эффектов (плейотропное действие), что может служить фундаментом для создания на его основе лекарственных и косметических препаратов нового поколения, обладающих комбинированной (в том числе иммуномодулирующей, антибактериальной, противовирусной и репаративной) активностью и внедрения их в широкую клиническую практику [8].

(Работа выполнена по проектам ИИФ УрО РАН № 15-3-4-33 и ИКВС УрО РАН № 15-3-4-34 в рамках Комплексной программы фундаментальных исследований УрО РАН)

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. – СПб.: Фолиант, 2008. – 552 с. [Ketlinsky S. A., Simbircev A. S. Cytokins. – SPb.: Volume, 2008. – 552 p.]
2. Козлов В. А., Борисов А. Г., Смирнова С. В., Савченко А. А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений: Руководство для врачей. – Новосибирск: Наука, 2009. – 274 с. [Kozlov V. A., Borisov A. G., Smirnova S. V., Savchenko A. A. Practical aspects of diagnostics and treatment of immune violations: The management for doctors. – Novosibirsk: Science, 2009. – 274 p.]
3. Cruz A. F., Santelises M. A., Espinosa O. R., Espinosa D. M., Castillo B. M., Payan J. B., Pando R. H. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. // *Med. Oncol.* – 2014. – № 31. – P. 774-788.
4. Van Nieuwenhuijze A., Koenders M., Roeleveld D., Sleeman M. A., Van den Berg W., Wicks I. P. GM-CSF as a therapeutic target in inflammatory diseases. // *Molecular Immunology.* – 2013. – № 56. – P. 675-682
5. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Суховой Ю. Г., Добрынина М. А., Костоломова Е. Г., Гриценко В. А., Студеникина Ю. Н. Иммунотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. // *Вестник уральской медицинской академической науки.* – 2011. – № 2/2 (35). – С. 23-24. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Suchovei Yu. G., Dobrynin M. A., Kostolomova E. G., Gritsenko V. A., Studenikina Yu. N. Immunotropic and biological effects of synthetic peptides of the GM-CSF active center. // *Messenger of the Ural medical academic science.* – 2011. – No. 2/2 (35). – P. 23-24.]
6. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Гольцова И. А., Гриценко В. А. Новые подходы к изучению спектра биологической активности синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. // *Российский иммунологический журнал.* – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 690-693. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Goltsova I. A., Gritsenko V. A. New approaches to studying of a range of biological activity of synthetic peptides of the GM-KSF active center. // *Russian journal of immunology.* – 2014. – Т. 8 (17), No. 3. – P. 690-693.]
7. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Костоломова Е. Г. и др. Сравнительная характеристика антибактериальных свойств синтетических пептидов активного центра GM-CSF и веществ, полученных из супернатантов CD34<sup>+</sup>45<sup>dim</sup> клеток-предшественников гемопоэза. // *Цитокины и воспаление.* – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 96-99.

- [Zurochka A. V. Zurochka V. A., Kostolomova E. G., et al.. The comparative characteristic of antibacterial properties of synthetic peptides of the active center GM-CSF and the substances received from supernatant of CD34+45dim of cages predecessors of a gemoroez. // Cytokines and inflammation. – 2012. – Т. 11, No. 2. – P. 96-99.
8. Гриценко В. А., Аминин Д. Л., Зурочка А. В., Зурочка В. А., Иванов Ю. Б. Некоторые биологические эффекты иммуномодуляторов естественного и синтетического происхождения *in vitro* как основа создания новых лекарственных средств для борьбы с эндогенными инфекциями. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2012. – № 3. – 17 с. [Электронный ресурс]. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>). [Gritsenko V. A., Aminind.L., Zurochka A. V., Zurochka V. A., Ivanov Yu. B. Some biological effects of immunomodulator of a natural and synthetic origin of invitro as basis of creation of new medicines for fight against endogenous infections. // Bulletin of Orenburg scientific center UrB RAS. 2012. 3: 17 p. [An electronic resource]. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3/Articles/15GricenkoVA-ADL-ZAV.pdf>).

## SYNTHETIC PEPTID THE ACTIVE CENTRE OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF) RANGE OF ITS IMMUNOBIOLOGY ACTIVITY AND PRACTICAL APPLICATION

**Zurochka A. V.<sup>1,2</sup>, Zurochka V. A.<sup>1,2</sup>, Zueva E. B.<sup>1</sup>, Dobrynina M. A.<sup>1</sup>,  
Dukardt V. V.<sup>1</sup>, Lavrentyeva I. N.<sup>3</sup>, Sukhobayevskaya L. P.<sup>3</sup>, Gritsenko V. A.<sup>4,5</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg;* <sup>2</sup>*South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk;* <sup>3</sup>*Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg;*

<sup>4</sup>*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg;* <sup>5</sup>*Orenburg scientific center UrB RAS, Orenburg, Russia*

In experiments *in vitro* and *in vivo* it was shown that a synthetic peptide of the active site of GM-CSF – ZP2 (chemical formula: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO) stimulates the activity of immune system (lymphocytes, stem cells, neutrophils, monocytes), inhibits the growth, reproduction and biofilm formation of gram-positive and gram-negative bacteria and has antiviral activity against DNA and RNA viruses and activates a reparation of wounds. The presence at this synthetic peptide of such a wide range of immunological effects (immunostimulatory, antibacterial, antiviral, and repair activity) determines the possibility of its use as the basis for creation of new effective medicinal and cosmetic preparations with combined properties that was realized at creation of ACEGRAM.

*Key words:* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), synthetic peptide of the active center, cage of immune system, bacteria, viruses, reparation, cosmetics, ACEGRAM