

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

Зурочка А. В.^{1,2}, Зурочка В. А.^{1,2}, Добрынина М. А.¹, Зуева Е. Б.¹,
Дукардт В. В.¹, Лаврентьева И. Н.³, Сухобаевская Л. П.³, Гриценко В. А.^{4,5}

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

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, 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 иммунитета (стволовых клеток, лимфоцитов, нейтрофилов, мононуклеаров), но при этом снижает апоптоз клеток в широком диапазоне концентраций, ингибирует рост, размножение, биопленкообразование и цитокинопродукцию большого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и антибиотико-резистентных штаммов, обладает противовирусным действием в отношении ДНК- и РНК-вирусов и активирует репарацию поврежденных тканей макроорганизма при раневом процессе кожи и слизистых. Наличие у данного синтетического пептида обширного набора иммунобиологических эффектов (иммуностимулирующая, антибактериальная, противовирусная и репарационная активности) определяет возможность его использования в качестве основы для создания новых 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 спектра новых лекарственных и косметических препаратов на основе синтетических пептидов, обладающих комбинированной иммунобиологической активностью, является одним из важнейших направлений современной иммунологии и медицины. Наиболее интересными из них являются биологически активные регуляторные молекулы – цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, обладающие выраженными плейотропными свойствами и участвующие в поддержании гомеостаза,

которые являются основой эффективных лекарственных средств, восстанавливающих поврежденные звенья иммунной и других систем организма [1, 2]. К ним, в частности, относится гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), уже нашедший применение в клинической практике [3, 4]. Широкие возможности для производства новых иммуностропных препаратов открывают расшифровка молекулярной структуры и направленный химический синтез активных центров цитокинов, что показано 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 характеристики, повышая их иммунный и терапевтический потенциал.

Целью настоящего исследования явился анализ наличия у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 новых дополнительных иммунобиологических свойств для повышения эффективности разрабатываемых 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 иммуотропной, антимикробной и репарационной активности. Иммуотропную активность синтетического пептида ZP2 определяли *in vitro* по его влиянию хемотаксис и хемокинез нейтрофилов и моноцитов, 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 в жидкой питательной среде, их способность к биопленкообразованию, по влиянию на цитокиноподобную активность бактерий различных видов. Противовирусную активность оценивали по снижению цитопатогенного действия на клетки перевиваемых культур зараженных ДНК- и РНК-вирусами. О репарационной активности синтетического пептида ZP2 судили по скорости заживления ран в эксперименте на животных, а также у больных после электроэксцизионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии.

Результаты. Проведенные ранее исследования выявили, что данный пептид обладает способностью усиливать пролиферацию

лимфоцитов в РБТЛ и ряда других иммуностимулирующих эффектов, как это было показано ранее [7]. При этом выявлено, что синтетический пептид ZP2 (в концентрации 10–100 мкг/мл) вызывал снижение апоптоза моноцитов, что позволяет предположить наличие дополнительного механизма усиления пролиферативной активности иммуноцитов, показанного нами ранее. Кроме того, он стимулировал хемотаксис и хемокинез гранулоцитов и моноцитов человека, при этом блокировал хемотаксическую деактивацию клеток на бактериальные хемоаттрактанты, а также активировал секрецию нейтрофилами периферической крови человека цитокинов G-CSF, GM-CSF, IL-12p70, INF- γ , IL-17A, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, TNF- α , IL-8 и MIP-1 β . 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.

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 супрессорный эффект синтетического пептида ZP2 на кинетику развития бульонных культур музейных и клинических штаммов микрококков, коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков, энтерококков и пептококков, синегнойной палочки, бактерий вида ацинетробактер, кишечной палочки и клебсиел. Экспериментально обнаружена межвидовая переменность эффектов указанного пептида ZP2 в низких концентрациях на способность данных бактерий формировать биопленки, причем на антибиотико-резистентные штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий 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.

Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 обладал противовирусной активностью, подавляя цитопатическое действие ДНК- и РНК-вирусов (аденовирусы, вирусы парагриппа) при заражении ими клеток перевиваемых культур (HEp2).

Пептид 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 электроэксцизионной процедуры иссечения шейки матки при цервикальной интраэпителиальной дисплазии. На основе результатов гистологических исследований установлено, что под действием данного синтетического пептида не только ускорялось заживление ран, но и восстанавливалась нормальная структура ткани без образования рубцов.

Представленные результаты были учтены при создании косметических средств для наружного применения с торговыми названиями: АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ и АЦЕГРАМ-СПРЕЙ, с получением Регистрационного номера сертификата соответствия № РОСС RU.АВ66.Н00840 (№ 1467581). Использование 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 оболочки ротовой полости и урогенитального тракта.

Таким образом, полученные данные 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 [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. Иммуностропные 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. – T. 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⁺45^{dim} 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 genomez. // 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., Aminin D. L., Zurochka A. V., Zurochka V. A., Ivanov Yu. B. Some biological effects of immunomodulator of a natural and synthetic origin of *in vitro* 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>).

RESEARCH OF THE SPECTRUM OF IMMUNOLOGICAL ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDE THE ACTIVE CENTRE OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF) AS A BASIS FOR THE EMPOWERMENT OF CREATING COSMETICS WITH A NEW GENERATION OF COMBINED EFFECTS

Zurochka A. V.^{1,2}, Zurochka V. A.^{1,2}, Zueva E. B.¹, Dobrynina M. A.¹, Dukardt V. V.¹, Lavrentyeva I. N.³, Sukhobayevskaya L. P.³, Gritsenko V. A.^{4,5}

¹*Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg;* ²*South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk;* ³*Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg;* ⁴*Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg;* ⁵*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 cells (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 the repair of damaged tissues of the organism at the wound process. 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 were implemented in the creation of cosmetics 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