

СПЕКТР ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ПОТЕНЦИАЛ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА (ГМ-КСФ)

© 2018 г. А. В. Зурочка^{1,2*}, В. А. Зурочка^{1,2}, М. А. Добрынина¹,
В. В. Дукардт¹, О. И. Забков¹, Е. Б. Зуева³, Л. О. Фомина¹,
А. И. Файзуллина¹, В. А. Гриценко^{4,5}

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

²ФГАОУ ВО Южно-Уральский государственный университет (национальный
исследовательский университет), Челябинск, Россия

³ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

⁴ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

⁵ФГБУН 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: THRNLNLEALASERHISTYRLYSGLNHISCYSPRO) стимулирует активность основных пулов иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов, стволовых клеток, нейтрофилов, моноцитов), блокирует рост, размножение, цитокиновую и антицитокиновую активность и биопленкообразование грамположительных и грамотрицательных бактерий, снижает репликацию ДНК- и РНК-содержащих вирусов и активирует репарацию ран. Наличие у данного синтетического пептида такого широкого спектра иммунобиологических свойств (иммуностимулирующая, антибактериальная, противовирусная и репарационная активности) определяет возможность его практического применения 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

DOI: 10.31857/S102872210002632-0

Адрес: 620049, Екатеринбург, ул. Первомайская 106, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598, E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Авторы:

Зурочка А. В., д. м. н., профессор, профессор кафедры пищевых и биотехнологий, в. н. с. лаборатории молекулярной иммунологии Южно-Уральского государственного университета (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; в. н. с. лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Зурочка В. А., доцент кафедры пищевых и биотехнологий, с. н. с. лаборатории молекулярной иммунологии Южно-Уральского государственного университета (Национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; с. н. с. лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Добрынина М. А., м. н. с. лаборатории иммунологии воспаления Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Дукардт В. В., аспирант Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Забков О. И., аспирант Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Зуева Е. Б., к. б. н., с. н. с. лаборатории экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского института Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Фомина Л. О., аспирант Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Файзуллина А. И., аспирант Института иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

Гриценко В. А., д. м. н., профессор, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза РАН, ученый секретарь Президиума Оренбургского научного центра РАН, Оренбург, Россия.

Введение. Создание новых лекарственных и косметических препаратов на основе синтетических пептидов, обладающих выраженной иммунобиологической, антимикробной и репара-

ционно-регенерационной активностью, является одним из важнейших направлений современной медицины. Наиболее интересными в этой связи являются биологически активные регуляторные молекулы – цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками человека, обладающие выраженными плеiotропными свойствами и участвующие в регуляции различных систем организма, которые могут стать основой эффективных лекарственных средств, восстанавливающих поврежденные звенья иммунной и других систем ответственных за поддержание гомеостаза [1, 2]. К ним, в частности, относится гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), уже нашедший применение в клинической практике, в том числе при лечении лейкозов и лейкопений [3, 4]. Широкие возможности для производства новых иммуностимулирующих 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 и другими свойствами, 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 свойства и повышая их иммунный и терапевтический потенциал.

Целью настоящего исследования явился поиск наличия у синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 дополнительных иммунобиологических эффектов для практического применения при различных заболеваниях в качестве косметических препаратов с комбинированными свойствами.

Материалы и методы. Изучали влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ (ZP2) с химической формулой – THRNL ENLEALASERHISTYRLYSGLNHISCSYPRO на наличие иммуностимулирующей, антимикробной и репаративной активности. Иммуностимулирующую активность синтетического пептида ZP2 определяли *in vitro* по его влиянию на РБТЛ, хемотаксис и хемотаксис 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, цитокиновую и антицитокиновую активность бактерий. Противовирусную активность *in vitro* оценивали по снижению цитопатогенного действия на клетки перевиваемых культур зараженных ДНК- и РНК-вирусами, в клинике – при применении в условиях комбинированной терапии при герпетических инфекциях по наличию в слюне, крови, урогенитальном тракте генетического материала вирусов методом ПЦР-анализа. 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 лимфоцитов, 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⁺CD45^{dim} (по протоколу ISHAGE) в сторону гранулоцитопоза. Кроме того, он стимулировал хемотаксис и хемотаксис гранулоцитов и моноцитов человека, 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 ней-

трофилами 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, включая и антибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов. 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 вариабельность эффектов указанного пептида ZP2 в низких концентрациях на способность данных бактерий формировать биопленки, причем на клинические изоляты *Staphylococcus aureus* и ряд грамотрицательных бактерий синтетический пептид ZP2 оказывал преимущественно ингибирующее действие.

Выявлена вариабельность 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). Получен выраженный эффект в отношении герпетических вирусов (вирус Эпштейна-Барр, цитомегаловируса, герпеса 1–2 типа) при хронических герпетических инфекциях. При комбинированном применении АЦЕГРАМ-спрея (при поражении слизи-

стых) и АЦЕГРАМ-геля (про поражение кожи) в комбинации с противовирусными средствами (ванцикловир) и иммуномодуляторами общего действия (глюкозаминилмурамилдипептид – Ликопид) получен выраженный противовирусный эффект при полном клиническом выздоровлении, восстановлении иммунной системы, а именно, отсутствие выявления методом ПЦР-анализа вирусов слюне, крови и урогенитальном тракте (которые до этого там определялись, что и служило одним из критериев назначения лекарственных препаратов, другими критериями так же являлись наличие клинических проявлений вирусной инфекции и нарушений иммунного статуса).

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 электроэксцизионной 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 с торговыми названиями: АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ и АЦЕГРАМ-СПРЕЙ, с получением Регистрационного номера сертификатов соответствия РОСС RU.AB66.H00566 (№ 0203563) и РОСС RU.AB66.H00565 (№ 0203562).

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 репарацион-

ной) активностью и внедрения их в широкую клиническую практику [8].

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФУрОРАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

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., Суховей 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., Suchovoi Yu. G., Dobrynina 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⁺CD45^{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⁺CD45^{dim} of cages predecessors of a hemopoiesis. // *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>).

**SPECTRUM OF IMMUNOBIOLOGICAL ACTIVITY AND POTENTIAL
OF PRACTICAL APPLICATION OF SYNTHETIC PEPTID
THE ACTIVE CENTRE OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE
COLONY-STIMULATING FACTOR (GM-CSF)**

© 2018 A. V. Zurochka^{1,2*}, V. A. Zurochka^{1,2}, M. A. Dobrynina¹,
V. V. Dukart¹, O. I. Zabkov¹, E. B. Zueva³, L. O. Fomina¹,
A. I. Faizullina¹, V. A. Gritsenko^{4,5}

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

³Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia;

⁴Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia;

⁵Orenburg scientific center UrB RAS, Orenburg, Russia

In vitro and *in vivo* experiments, it was found that the synthetic peptide of the GM-CSF – ZP2 active site (the chemical formula: THRNLENLEALASERHISTYRLYSGLNHISCYSPRO) stimulates the activity of the main pools of immunocompetent cells (lymphocytes, stem cells, neutrophils, monocytes), blocks growth, reproduction, cytokine and anticytokine activity and biofilm formation of Gram-positive and Gram-negative bacteria, reduces the replication of DNA and RNA-containing viruses and activates wound repair. The presence in this synthetic peptide of such a wide range of immunobiological properties (immunostimulating, antibacterial, antiviral and repair activity) determines the possibility of its practical application for the creation of effective medicinal and cosmetic preparations with combined properties that was realized with the creation of cosmetics by 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

Authors:

Zurochka A. V., ✉ MD, Professor, professor of the Department of food and biotechnology, leading researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leading researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia; E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Zurochka V. A., MD, assistant professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Dobrynina M. A., Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Dukardt V. V., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Zabkov O. I., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Zueva E. B., candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of experimental virology of the Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia;

Fomina L. O., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Fayzullina A. I., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Gritsenko V. A., MD, Professor, head of the laboratory of the Institute of cellular and intracellular symbiosis of the RAS, scientific Secretary of the Presidium of the Orenburg scientific center of the RAS, Orenburg, Russia.