

На правах рукописи

Гришина Татьяна Алексеевна

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ
ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ СУБСТАНЦИИ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО
БЕЛКОВО-ПЕПТИДНОГО КОМПЛЕКСА**

14.04.01 - Технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Волкова Лариса Владимировна**

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук,
профессор **Орлова Екатерина Владимировна**

Официальные оппоненты:

Петров Александр Юрьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармации и химии;

Ситенкова Александра Викторовна - кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доцент Института фармации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «31» марта 2021 года в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел./факс (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, д. 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан

«___» _____ 2021

Ученый секретарь
диссертационного совета,
Кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Согласно Государственной программе «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» Российской Федерации на период до 2020 г. и «Фарма 2030» особое внимание уделяется развитию и внедрению производства инновационных лекарственных средств, в том числе пептидам, обладающим антимикробными свойствами.

В последние годы существует большая потребность практического здравоохранения в природных антибактериальных полипептидах широкого спектра действия. Система глобального эпиднадзора за развитием устойчивости бактерий к противомикробным препаратам (GLASS) Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) выявила широкое распространение антибиотикорезистентности среди населения 22 стран мира.

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что природные антимикробные пептиды (АМП) обладают относительно низкой токсичностью по отношению к клеткам собственного организма, а развитие резистентности к ним бактерий вырабатывается медленнее, чем к традиционным антибиотическим агентам [Кокряков В. Н. и др. 2010; Li Y., Guani-Guerra E. et al., 2010]. Помимо непосредственного антибактериального действия, АМП нередко проявляют целый ряд иммуномодулирующих эффектов [Богомолова Е. Г. и др., 2012; Xiang Q. et al., 2012]. В связи с этим выделение, очистка и структурно-функциональное изучение АМП животных и человека создают предпосылки для разработки и производства гомологов подобных соединений и их внедрения в медицину в качестве альтернативы современным антибиотикам.

С учетом того, что клетки крови в разбавленных суспензиях весьма чувствительны к ультразвуковому воздействию, регулируя параметры ультразвукового воздействия на клеточную суспензию - частоту, мощность, время воздействия, а также температуру, рН и клеточную нагрузку, можно получить конечный продукт с заданными свойствами. В биотехнологии и экспериментальной биологии воздействие ультразвуком используют при самых разных параметрах на среды с неодинаковыми физико-химическими свойствами [Хмелев В.Н. и др., 2009; Котухов А.В. и др., 2015; Дурникин Д.А. и др., 2016; Шукин С.И., 2016].

Таким образом, все вышесказанное обуславливает актуальность и целесообразность проведения исследований по природным антибактериальным пептидам.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время разработаны методы выделения лейкоцитарных пептидов из клеток млекопитающих, включающие в себя такие этапы как экстракцию пептидов из лейкоцитарных клеток при низких значениях рН с последующей экспозицией при пониженных температурах. Полученный экстрагированием материал подвергают ультрафильтрации для выделения низкомолекулярной белковой фракции, с последующей концентрацией и обессоливанием.

Окончательную очистку фракций, проявляющих антимикробный эффект, осуществляют методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Таким образом, на сегодняшний день получены и частично исследованы низкомолекулярные пептиды из лейкоцитов собак, коз, обезьян, лосей, обладающие противомикробным действием [Сипайлова О.Ю., Нестеров Д.В., 2013].

Анализ литературы свидетельствует об использовании лейкоцитов млекопитающих в качестве сырьевого источника получения полипептидов [Шамова О.В., 2013]. Получаемые субстанции обладают антибактериальным и иммуномодулирующим эффектами, что является несомненным преимуществом при разработке терапевтических препаратов.

Цель исследования – разработка технологии, стандартизация и изучение фармакологической активности лиофилизированной субстанции лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.

Основные задачи исследования:

1. Оценить интенсивность процесса биосинтеза лейкоцитарных пептидных соединений при варьировании технологических параметров (концентрация лейкоцитов, продолжительность проведения процесса синтеза, скорость перемешивания клеточной суспензии).

2. Провести эксперименты на модельных системах вирус-индуцированных и чистых лейкоцитов, изучение действия колебаний низкочастотного диапазона в зависимости от частоты, мощности и времени воздействия.

3. Изучить физико-химические свойства полученных пептидных субстанций после воздействия ультразвуковых волн на лейкоциты человека *in vitro*.

4. Охарактеризовать биологическую активность выделенных лейкоцитарных полипептидов и изучить их физико-химические свойства.

5. Разработать технологическую схему получения очищенного препарата лейкоцитарных пептидов, провести его стандартизацию, изучить стабильность и сроки годности разработанной субстанции.

Научная новизна. Разработан алгоритм технологических стадий, позволяющий получать полипептиды с повышенной биологической активностью. Впервые разработан способ получения биологически активной субстанции лейкоцитарных пептидов человека с использованием ультразвуковой обработки. С использованием методов математического планирования и оптимизации параметров проведения эксперимента определены условия, при которых ультразвуковая обработка лейкоцитарных клеток является наиболее эффективной для получения целевого продукта. Впервые проведена оценка биологически активной субстанции, полученной ультразвуковой обработкой лейкоцитов крови, изучены физико-химические свойства и определены антибактериальная и противовирусная активности.

Теоретическое и практическое значение работы. Теоретическая значимость результатов исследований состоит в расширении знаний о

биотехнологии культивирования лейкоцитов крови человека и получении биопродукта с максимальным выходом специфической активности.

Практическое значение работы заключается в демонстрации возможности получения низкомолекулярного лейкоцитарного пептидного комплекса при использовании ультразвукового облучения, а также выявлении высокой антибактериальной и менее выраженной противовирусной активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.

Результаты проведенного исследования являются обоснованием необходимости дальнейшего изучения состава и биологической активности низкомолекулярных лейкоцитарных пептидов, синтезируемых лейкоцитами человека.

В ходе выполнения исследований:

- проведена оптимизация условий для активации синтеза низкомолекулярных лейкоцитарных пептидов;
- разработана технология получения белково-пептидного комплекса из лейкоцитов человека;
- изучены физико-химические свойства и биологическая активность выделенного лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.

Технологическая апробация результатов диссертационного исследования подтверждена актом внедрения в производство филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» от 06.09.2017.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Повышение специфической активности целевого продукта зависит от использования метода цитафереза при заготовке донорской крови в гемоконтейнеры типа «Тегито» с последующим суспензионным культивированием лейкоцитов в концентрации 8 млрд./л и скорости перемешивания суспензии 32 об./мин, а также лиофилизацией конечного продукта с лиопротектором мальтозой в концентрации 2,5 %.

2. Разработанный способ выделения, очистки и концентрирования обеспечивает получение из лейкоцитов человека при воздействии низкочастотных колебаний препарата пептидной природы, обладающего антибактериальной активностью.

3. Низкомолекулярный белково-пептидный комплекс, выделенный из лейкоцитов человека в поле действия низкочастотного диапазона можно отнести к пептидам, проявляющим антибактериальную активность в отношении штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*.

Апробация работы. Основные положения теоретического и экспериментального исследования представлены и доложены на Международной научно-практической конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Уфа 2015); XVIII региональной научно-практической конференции студентов и молодых

ученых «Химия. Экология. Биотехнология - 2016» (Пермь, 2016); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов, студентов и школьников (с международным участием) «Химия. Экология. Урбанистика» (Пермь, 2017); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2017); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов, студентов и школьников (с международным участием) «Химия. Экология. Урбанистика» (Пермь, 2018); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, аспирантов, студентов и школьников (с международным участием) «Химия. Экология. Урбанистика» (Пермь, 2019); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, пунктам 3, 4 паспорта специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств.

Внедрение результатов исследования. Полученные результаты исследований использованы для составления методических рекомендаций по выполнению практических заданий по учебной дисциплине «Биотехнология лекарственных препаратов и GMP» и используются в учебном процессе на кафедре химии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет».

Результаты исследований легли в основу изобретения: «Способ фракционирования лейкоцитарных белков» (Патент на изобретение №2737730).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из которых 4 статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК при Минобрнауки России, из них 2 по специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств, получен патент на изобретение №2737730.

Личный вклад автора. Автором проведены обзор и систематизация литературных данных, разработана технология получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса с оценкой физико-химических и биологических свойств благодаря непосредственному участию в проведении экспериментов, обсуждению, результатов и выводов по теме диссертации, написанию научных статей и подготовке патентной заявки. Экспериментальная работа осуществлялась автором лично, на кафедре химии и биотехнологии федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «Пермский национальный исследовательский политехнический университет».

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав экспериментальных исследований, выводов и заключения, Библиографический указатель включает в себя 110 источников литературы, из них 49 иностранных авторов.

Диссертация изложена на 126 страницах печатного текста, содержит 29 таблиц, 16 рисунков, 2 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель работы и задачи исследования.

Первая глава посвящена анализу данных литературы, включающая современные представления о полипептидах млекопитающих, их биологического потенциала и особенностей технологий получения с учетом биотехнологических подходов. Приведены сравнительные данные о получении лейкоцитарных пептидов при использовании различных технологий, а также сведения, о необходимости поиска новых путей синтеза природных антибактериальных полипептидов, в частности, возможности применения ультразвукового воздействия для выявления новых природных полипептидов из побочных продуктов синтеза вирусиндуцированных лейкоцитов.

Вторая глава включает описание объектов и методов, использованных при проведении экспериментальных исследований; режимы работы оборудования, методики по изучению физико-химических и биологических свойств лейкоцитарных полипептидов, статистические методы обработки полученных результатов. В качестве объектов исследования были использованы донорские лейкоциты человека, которые контролировали на отсутствие HBS-антигена к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ 1, 2, сифилиса.

Размер частиц лейкоцитарного белково-пептидного комплекса определяли с помощью комплекса «Zetasizer Nano ZS» фирмы «Malvern» (Германия). Данный прибор предназначен для определения устойчивости коллоидных растворов (дзета потенциала), среднего размера частиц в диапазоне от 0,3 до 5000 нм, изоэлектрической точки, температурных и рН трендов и динамической вязкости.

Определение молекулярных параметров лейкоцитарного белково-пептидного комплекса проводили с использованием метода ВЭЖХ при длине волны 280 нм с использованием хроматографических колонок фирмы «Knauer» с сорбентом Диасфер-110-Диол.

Для определения антибактериальной активности использовали метод серийных разведений исследуемых субстанций АБПК в бульоне микротестированием на базе лаборатории ИЭГМ УрО РАН (Пермь, зав. лаб.

– к.м.н., доц. Коробов В.П.). Скрининг противомикробной активности проведен в отношении культур *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* №НХ 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 под руководством к.ф.н., доц. Новиковой В.В. на кафедре микробиологии Пермской государственной фармацевтической академии. Изучение цитотоксичности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса на культуре клеток НСТ 116 и культуре клеток меланомы человека MS проводили в ИТХ УрО РАН под руководством к.б.н. Гришко В.В.

Исследование острой токсичности проводили на белых нелинейных мышах обоего пола на базе кафедры физиологии Пермской государственной фармацевтической академии (зав. кафедрой – к.м.н., Рудакова И.П.).

Третья глава посвящена разработке алгоритма получения полипептидов лейкоцитами человека с высоким выходом специфической активности конечного продукта. На первом этапе исследования проведено математическое моделирование процесса синтеза альфа-интерферона клетками крови (лейкоцитами) с получением экспериментальных зависимостей количества синтезируемого интерферона от количества вируса-индуктора и живых лейкоцитов в зависимости от времени проведения процесса биосинтеза. Для точного определения указанных параметров процесс синтеза проводили в одностадийном режиме. Для осуществления данного режима лейкоциты после проведения стадии «прайминг» подвергали индукции и, не отделяя вирусосодержащей жидкости, взвесь индуцированных лейкоцитов вносили в среду для биосинтеза и инкубировали при температуре 37 °С в течение 19 час.

Полученные зависимости представлены на рисунках 1, 2.

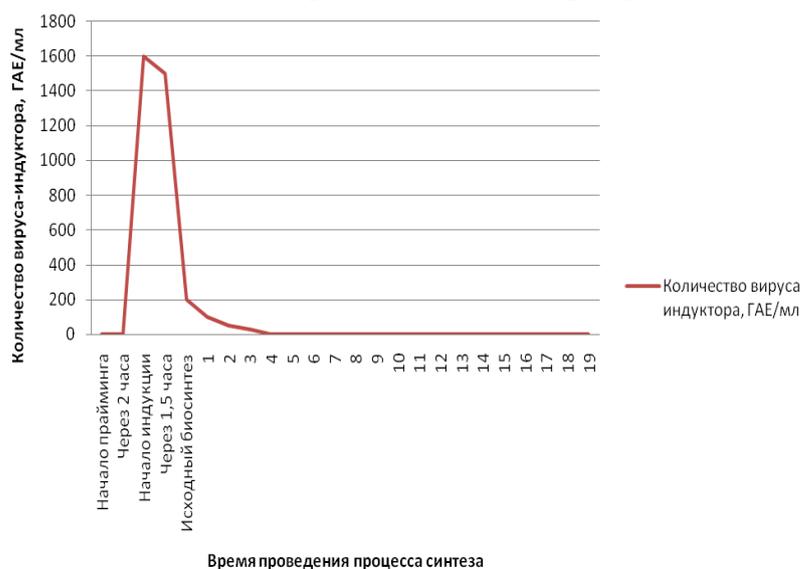


Рисунок 1. Зависимость количества вируса-индуктора от времени проведения процесса синтеза

Как видно из данных рис. 1, максимальная концентрация вируса в культуральной среде на стадии индукции составляла 1600 ГАЕ/мл. В первые

часы проведения стадии биосинтеза (1 – 4 час.) лейкоциты адсорбировали на своей поверхности вирусные частицы, в результате чего, концентрация вируса снижалась от 200 ГАЕ/мл до 0 ГАЕ/мл.

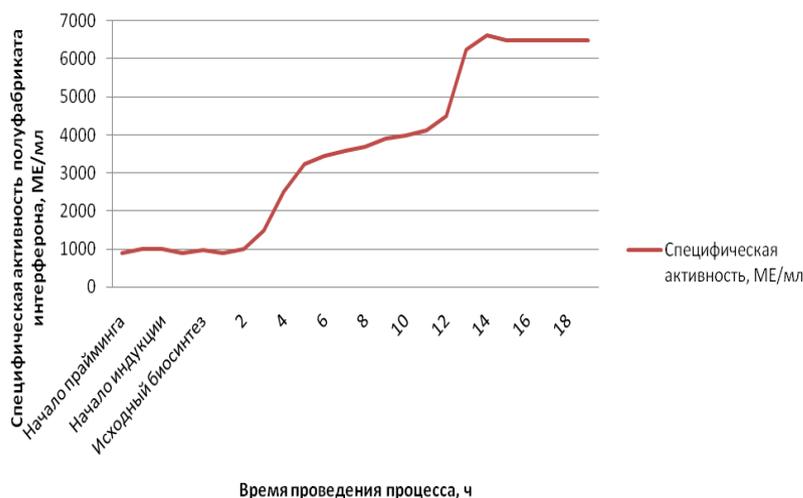


Рисунок 2. Зависимость количества синтезируемого альфа-интерферона от времени проведения процесса синтеза

Из графика, представленного на рис. 2 следует, что накопление полипептидов интенсивнее происходило в промежутках времени от 4 час. до 6 час. и от 12 час. до 14 час. В промежутке времени от 14 час. до 18 час. уровень специфической активности полипептидов не изменялся. Поэтому для проведения процесса синтеза альфа-интерферона экономически целесообразно принять время, равное от 14 час. до 16 час.

В ходе проведения планирования экспериментов проведена оценка влияния внешних факторов – скорости перемешивания среды и концентрации вирусиндуцированных лейкоцитов на интенсивность процесса синтеза альфа-интерферона. При этом температура и рН среды не изменялись. В результате полного факторного эксперимента было получено адекватное уравнение регрессии:

$$y = 3312,5 + 187,5 x_1 + 437,5 x_2 .$$

где y - уровень специфической активности полипептидов МЕ/мл; x_1 - безразмерная скорость перемешивания; x_2 - безразмерная концентрация лейкоцитов.

Рассчитанное уравнение регрессии выражало влияние на выход полуфабриката альфа-интерферона двух факторов: скорости перемешивания среды и концентрации лейкоцитов. Выявлено, что наиболее значимым фактором на стадии биосинтеза является начальная концентрация лейкоцитов.

С использованием полученного уравнения была проведена оптимизация условий проведения стадии «биосинтез». По итогам проведенных расчетов выявлено, что оптимальной на стадии биосинтеза является начальная концентрация лейкоцитов - 8 млрд./л и скорость перемешивания культуральной среды 32 об./мин.

Следующим этапом явилось изучение влияния ряда условий на продуктивную способность лейкоцитов. Для оценки влияния гемопластика на лейкоцитарные клетки было проведено сравнительное изучение двух видов гемоконтейнеров («Гемасин» и «Terumo»), используемых для транспортирования лейкоэритроцитомассы. Оценка эффективности обоих видов гемопластика проводили по индексу пролиферации (ИП) и уровню специфической активности синтезируемых полипептидов.

Анализ полученных результатов показал, что ИП на пластике из гемоконтейнеров «Terumo» в 2,6 раз выше, чем при культивировании с пластиком «Гемасин». Аналогичный результат отмечался и при оценке морфологии клеток, которые не имели измененных форм. Уровень специфической активности полипептидов, синтезированных лейкоцитами, собранных в гемоконтейнеры производителя «Terumo» был в 3,4 раза выше, чем в контейнерах «Гемасин».

Показана эффективность метода цитафереза, позволяющего получить в 4 раза больше лейкоцитарных клеток с повышенной продуктивной способностью, чем при использовании классического метода забора донорской крови (19,5 млрд./мл и 5,1 млрд./мл соответственно).

Оценка влияния лиопротекторов на остаточную влажность и специфическую активность препаратов лейкоцитарных полипептидов показала, что оптимальным защитным агентом при лиофильном высушивании является мальтоза в концентрации 2,5 %, позволяющая снизить остаточную влажность препарата до уровня 0,3%, что является несомненным преимуществом при лиофилизации биологических препаратов, при этом уровень специфической активности полипептидов не снижался.

По результатам проведенных экспериментов разработан алгоритм оптимизации метода получения лейкоцитарных полипептидов (рис. 3).

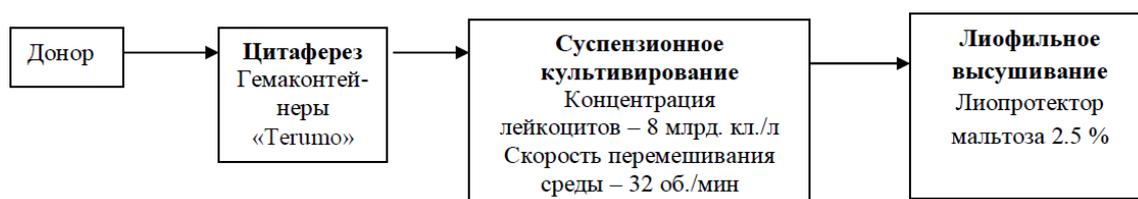


Рисунок 3. Алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных полипептидов

Алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных пептидов заключается в использовании метода цитафереза, на этапе заготовки сырья в гемоконтейнеры типа «Terumo», культивировании лейкоцитов при оптимальных параметрах (концентрация лейкоцитов – 8 млрд./л и скорость перемешивания культуральной среды 32 об./мин.), а также в проведении лиофилизации готовой субстанции в присутствии стабилизатора мальтозы в концентрации 2,5%.

В четвертой главе представлены результаты разработки технологии комплекса лейкоцитарных полипептидов с использованием ультразвуковых волн и оценка его физико-химических свойств. Ультразвуковую обработку

проводили при следующих условиях: мощность 50 Вт, частота 30 кГц, амплитуда варьировала в пределах от 20 % до 100 %. Продолжительность обработки клеток ультразвуком составляла от 30 до 90 сек.

Проведением серии экспериментов по исследованию ультразвукового воздействия на лейкоцитарные суспензии с различной концентрацией клеток и амплитудой ультразвука показано, что для разрушения лейкоцитарных клеток и высвобождения содержащихся в них пептидных соединений наиболее эффективным является использование ультразвука при амплитуде 80-100 % при концентрации клеток 6,7 млн./мл.

Математические расчеты по оптимизации условий ультразвукового воздействия на лейкоцитарные клетки позволили получить уравнение, выражавшее влияние на этот процесс двух факторов – амплитуды воздействия ультразвука и времени воздействия на уровень биологической активности полученных лейкоцитарных пептидов. Проведение расчетов привело к уравнению регрессии следующего вида:

$$y = 116,875 + 20,625 x_1 - 20,625 x_2 .$$

где y - уровень специфической активности пептидов мкг/мл; x_1 - безразмерная амплитуда воздействия; x_2 - безразмерное время воздействия.

Результаты проведения оптимизации позволяют сделать вывод о том, что при амплитуде воздействия ультразвука 60% и времени воздействия 90 сек. достигается максимальный уровень специфической активности получаемого в результате биотрансформации лейкоцитов белково-пептидного комплекса. При дальнейшем увеличении амплитуды воздействия ультразвука происходит снижение уровня специфической активности выделенных лейкоцитарных полипептидов. Таким образом, увеличение времени воздействия не является целесообразным, поскольку длительное воздействие ультразвука на клетки млекопитающих и биологически активные молекулы может вызвать их необратимые разрушения.

Разработана технология получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (рис. 4), которая начинается со вспомогательных работ по подготовке очищенной воды, стерильной посуды, санитарной подготовки помещений, приготовления рабочих растворов. Выделение пептидного комплекса проводили из лейкоцитов, освобожденных от примеси эритроцитов.

Для проведения ультразвуковой обработки лейкоцитарные клетки ресуспендировали в растворе 0,9 % хлорида натрия. На ультразвуковой установке UP50H (Helischer Ultrasonics, Германия) выставляли необходимые параметры амплитуды и интенсивности ультразвука. Ультразвуковой зонд помещали в емкость с клетками и подвергали воздействию в течение необходимого времени. Полученную суспензию обработанных лейкоцитов центрифугировали для удаления клеточной стромы. Центрифугат фильтровали через мелкопористые фильтры (Millipore). Для отделения белковых примесей полученный фильтрат подвергали ультрафильтрации на ультрафильтрах Амикон Ультра-15с последующей стерилизующей

фильтрацией. Полученный концентрат подвергли лиофильному высушиванию в вакуумсушильном аппарате типа ТГ-50. Продукт хранили в сухом, защищенном от света месте при температуре от 4 до 8 °С.

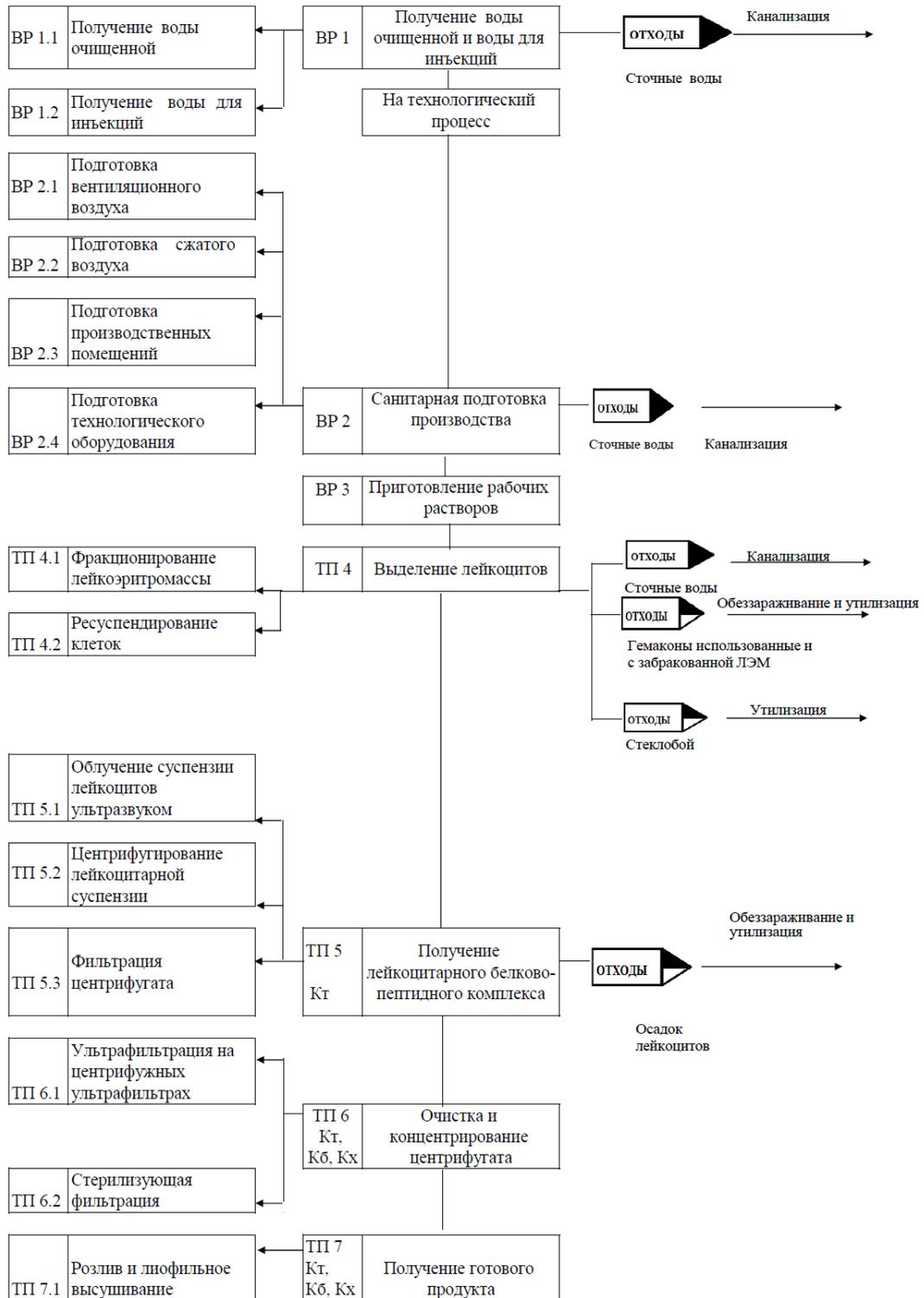


Рисунок 4. Технологическая схема получения лейкоцитарного пептидного комплекса. Кт, Кб, Кх – контроль технологический, биологический и химический соответственно

Для определения молекулярного состава лейкоцитарного пептидного комплекса, полученного обработкой ультразвуком, использована высокоэффективная жидкостная хроматография. Содержание пептидных соединений контролировали в растворе комплекса с концентрацией 1 мг/мл по сухому веществу. Идентификацию молекулярных масс пептидов проводили на хроматографе фирмы «Knauer» с использованием колонки Superdex 10, результаты представлены на рис. 5. и в табл. 1.

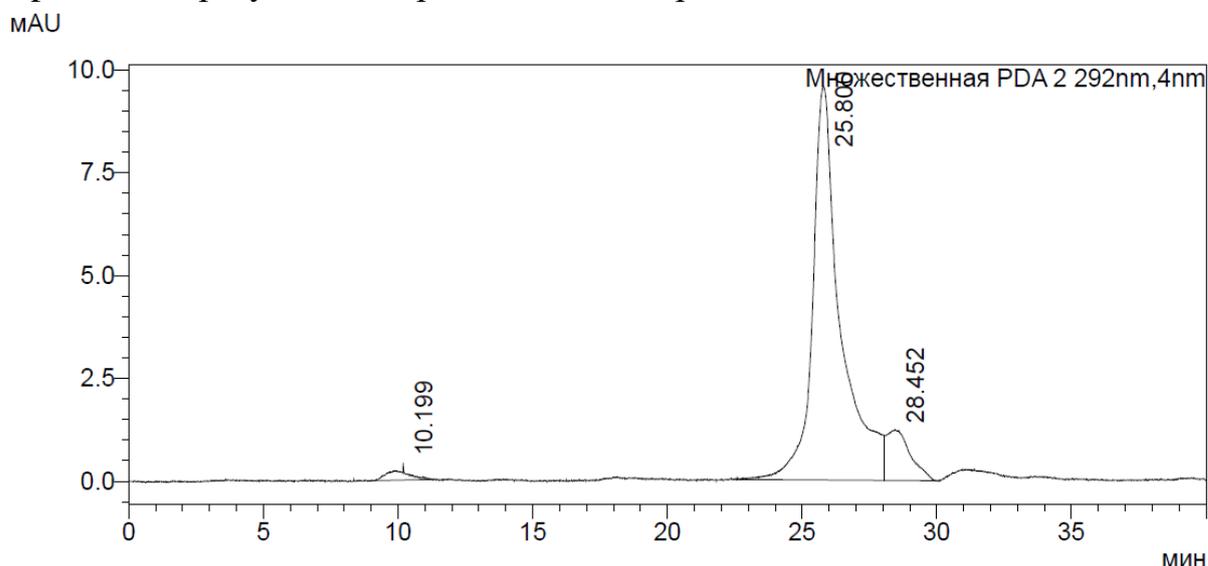


Рисунок 5. Результаты ВЭЖХ лейкоцитарного белково-пептидного комплекса после проведения очистки

Таблица 1 - Молекулярный состав лейкоцитарного белково-пептидного комплекса после проведения очистки по результатам ВЭЖХ

Номер пика	Процентное содержание	Молекулярная масса, кДа
1	0,85	От 158 до 75
2	94,24	Менее 6,5
3	4,91	Менее 6,5

Согласно данным, представленным на рис. 5 можно сделать вывод об эффективности применения стадии ультрафильтрации в качестве очистки и концентрирования ЛБПК, так как степень концентрации целевого компонента (низкомолекулярных пептидов) возрастает в 5,9 раза (от 16,81% до 99,15% соответственно).

Полученный препарат ЛБПК был исследован на определение размеров частиц прибором Zetasizer Nano ZS. Анализ результатов показал, что в исследуемом препарате присутствовали частицы размером 16,51 нм в количестве 88,5% от общего объема, о чем свидетельствует пик 2 на рис. 6. Частицы подобного размера обычно относят к полипептидам, поэтому можно предположить, что большую часть лейкоцитарного белково-пептидного комплекса составили полипептиды.

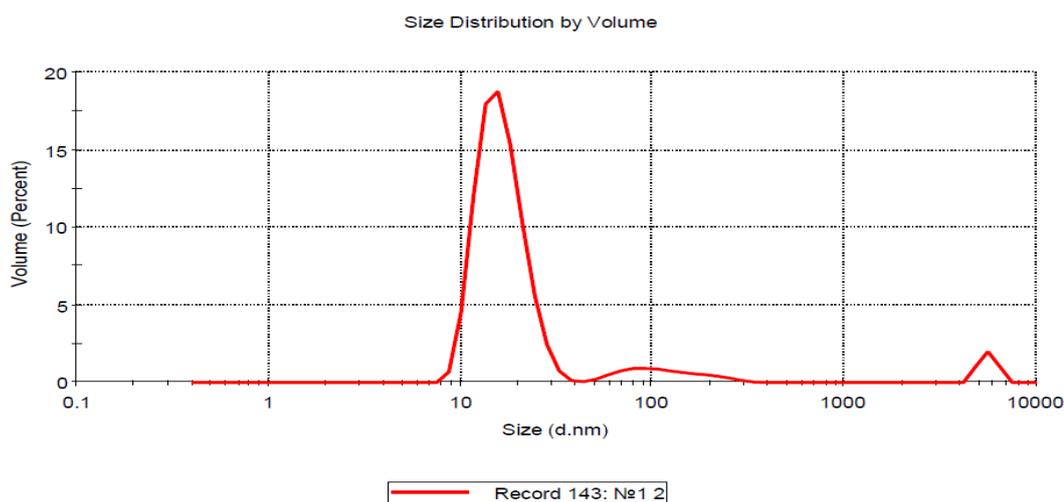


Рисунок 6. Распределение находящихся в суспензии частиц по размерам

Таблица 2 - Результаты измерений частиц в суспензии прибором Zetasizer Nano ZS

№ Пика	Размер частиц (нм)	Объем, %
Пик 1	122,9	7,5
Пик 2	16,5	88,5
Пик 3	5581,0	4,0

Важной характеристикой лейкоцитарного белково-пептидного комплекса явилась его устойчивость к температурным воздействиям. Оценку влияния температур проводили на серии препарата № 1. Результаты оценки влияния различных температур на лейкоцитарный белково-пептидный комплекс представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Влияние температурной обработки на антибактериальную активность лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Температура, °С	Антибактериальная активность, мг/мл
10	0,03
25	0,03
40	0,03
55	0,015
70	0

По результатам, представленным в табл. 3 можно сделать вывод, что лейкоцитарный белково-пептидный комплекс сохранял антибактериальную активность при температуре не выше 40 °С в течение 60 мин. При повышении температуры активность субстанции снижалась, что можно объяснить денатурацией компонентов, обладающих биологической активностью.

Следующим этапом наших исследований явилось изучение влияния pH на уровень антибактериальной активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса препарата серии № 1. Раствор исследуемого препарата подвергали воздействию 1 М раствора кислоты соляной в диапазоне pH от

6,9 до рН 2,0 и 1 М раствора натрия гидроксида в диапазоне рН от 7,0 до 12,0. Полученные результаты представлены на рис. 7.

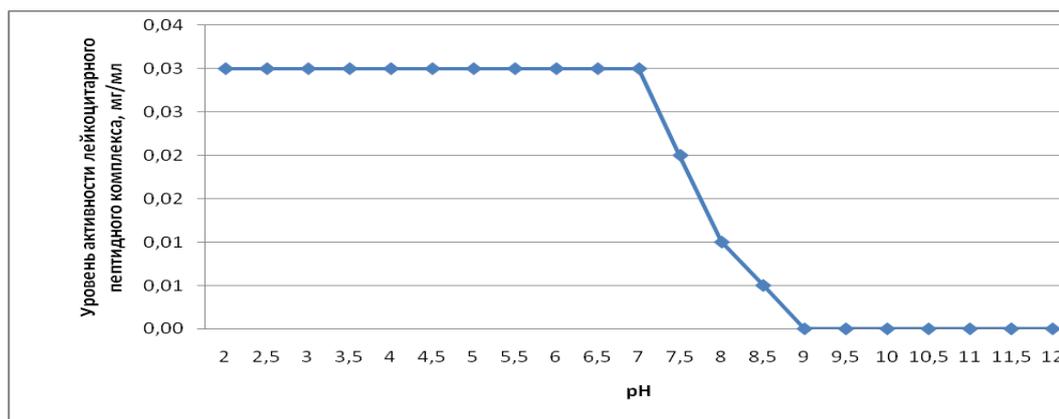


Рисунок 7. Зависимость антибактериальной активности ЛБПК от значения рН

Как следует из представленных данных на рис. 7, препарат сохранял исходную биологическую активность в диапазоне рН от 2,0 до 7,0 в течение двух часов в условиях комнатной температуры, в то время как при повышении рН до значений 9,0 отмечали резкое падение активности до нуля.

Пятая глава посвящена изучению биологических свойств лейкоцитарного белково-пептидного комплекса. Для исследования антибактериальных свойств полученного пептидного комплекса использовали бактериальные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* № НХ 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 методом микротитрования в 96-луночных планшетах. За минимальную подавляющую концентрацию принимали концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма.

Результаты определения антибактериальной активности представлены в табл. 4.

Таблица 4 - Чувствительность микроорганизмов к исследуемому лейкоцитарному пептидному комплексу

Исследованные бактерии	Штамм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл	Контроль	
			Диоксидин (1% раствор)	Флуконазол
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538-P	2,0	62,5	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	1,0	500	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0,25	31,2	-

Продолжение таблицы 4

<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	62,5	500	-
<i>Proteus vulgaris</i>	№НХ 19/222	2,0	7,8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	125	500	-
<i>Candida albicans</i>	NCTC 885-653	2000	-	64

По результатам, представленным в табл. 4 можно сделать вывод о том, что очищенный лейкоцитарный пептидный комплекс (ЛПК) обладал высокой антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris*, и средне выраженной активностью в отношении штаммов *E. faecalis* и *P. aeruginosa*. Исследуемый ЛПК не обладал фунгицидным действием.

Изучение противовирусной активности полученного препарата проводили с использованием культур клеток путем сравнения протективного действия пептидного комплекса с аналогичным действием соответствующего стандартного образца, откалиброванного в Международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандарту. Оценка уровня противовирусной активности лейкоцитарных полипептидов при обработке лейкоцитарной суспензии ультразвуком представлена в табл. 5.

Таблица 5 - Определение антибактериальной активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса ($n=3$)*

Номер образца	Время воздействия, сек	Амплитуда воздействия, %	Уровень противовирусной активности, МЕ/мл
1	30	60	110±10
2	60	60	110±10
3	90	60	165±25
4	30	80	82,5±7,5
5	60	80	110±10

Примечание:* достоверно при $P=0,95$.

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что полученный пептидный комплекс обладал умеренной противовирусной активностью.

Для оценки острой токсичности полученного лейкоцитарного пептидного комплекса использовали метод Прозоровского В.Б. [Прозоровский В.Б., 2007]. Исследуемое соединение вводили внутрибрюшинно в четырех дозах. Каждой паре животных вводили одну дозу в порядке возрастания. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6 - Оценка острой токсичности лейкоцитарных пептидов

Показатель ЛД ₅₀ , мг/кг	Степень токсичности по К.К. Сидорову	Степень токсичности по ГОСТ 12.1.007-76
3500	6 класс, относительно безвредно	4 класс, малотоксично

Исследования острой токсичности показали, что исследуемые лейкоцитарные пептиды относятся к 6 классу токсичности по классификации К.К. Сидорова и к 4 классу токсичности по ГОСТ 12.1.007-76 (т.е. являются малотоксичными).

Цитотоксичность соединений изучали *in vitro* на опухолевой линии клеток человека НСТ 116 (колоректальная карцинома) и на культуре клеток человека MS (меланоме) с помощью МТТ-теста. Результаты эксперимента представлены в табл. 7.

Таблица 7 - Оценка уровня цитотоксичности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Исследуемая культура клеток	Концентрация IC ₅₀ (мкг/мл)	
	ЛБПК	Доксорубицин (контроль)
Клеточная линия НСТ 116 (колоректальная карцинома)	77,56±10,84	0,29±0,05
Клеточная линия MS (меланоме)	3155±645	0,7±0,09

Проведенные эксперименты показали, что исследуемый лейкоцитарный белково-пептидный комплекс не проявлял цитотоксического действия в отношении клеток колоректальной карциномы (НСТ 116) и меланомы (MS), так как рассчитанные для них концентрации IC₅₀ во всех случаях превышали IC₅₀ для препарата сравнения (доксорубицина).

Определение аномальной токсичности проводили на монослое линии эпителиоподобных клеток почки эмбриона свиньи (SPEV). В качестве основного показателя оценки аномальной токсичности лейкоцитарного пептида взят индекс пролиферации клеток (ИП), который определяли после каждого пассажа на клеточной линии SPEV (таблица 8).

Таблица 8 - Сравнительный анализ значений ИП клеточной линии *SPEV* при культивировании её на питательных средах различного состава

Условия культивирования	Номер пассажа				Степень увеличения ИП*
	1	2	3	4	
Клеточная линия <i>SPEV</i> на стандартной питательной среде (контроль)	8,8	8,9	8,9	9,1	1,03
Клеточная линия <i>SPEV</i> на питательной среде с 30%-м содержанием лейкоцитарных пептидов	8,5	8,9	9,1	9,3	1,09

Примечание: * достоверно при $P=0,95$.

Анализ полученных результатов показал, что добавление экспериментального образца ЛБПК в ростовую среду для культивирования клеточной линии *SPEV* благоприятно сказывалось на росте клеток. Индекс пролиферации увеличивался от первого до четвертого пассажа в 1,09 раза, в то время как, в контрольном образце увеличение ИП произошло в 1,03 раза.

Выводы

1. Разработан алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных пептидов: использовать метод цитафереза при заготовке сырья и гемоконтейнеров «Terumo», соблюдать при культивировании лейкоцитов оптимальные параметры (концентрация лейкоцитов - 8 млрд./л и скорость перемешивания культуральной среды 32 об./мин), лиофилизацию готовой субстанции проводить с применением лиопротектора мальтозы в концентрации 2,5 %.
2. Разработана методика ультразвукового воздействия на лейкоцитарные клетки, позволяющая получить белково-пептидный комплекс. Для максимального выделения биологической активности из лейкоцитов наиболее эффективна их ультразвуковая обработка при амплитуде 80-100 % вне зависимости от времени обработки. Оптимальная концентрация лейкоцитов в клеточной суспензии для проведения клеточной деструкции путем УЗ-обработки составляет 6,7 млн./мл.
3. Разработана технологическая схема получения лейкоцитарных пептидов, с применением ультразвукового лизиса клеток и очистки с помощью ультрафильтрационных пластин с порогом отсечения 15кДа. Проведенный анализ ВЭЖХ подтвердил наличие в ЛБПК низкомолекулярных пептидов, с количественным содержанием до 99 %.

4. Установлено, что ЛБПК обладает высокой антибактериальной активностью в отношении штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* и средне выраженной активностью в отношении изученных штаммов *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. Так же показано, что лейкоцитарный белково-пептидный комплекс обладает умеренной противовирусной активностью и относится к 4 классу токсичности по ГОСТ 12.1.007-76 (является малотоксичным).

Список публикаций по теме диссертации

1. Волкова Л.В. Оценка биологических свойств пептидов, синтезируемых в процессе интерфероногенеза / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина**, А.Г. Волков // Тезисы докладов XVII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых Химия, экология, биотехнология - 2015. ПНИПУ.– Пермь. 2015. С. 134 – 136.
2. Волков А.Г. Антибактериальное действие лейкоцитарного пептидного комплекса на культуры микроорганизмов, выделенных от больных абдоминальной хирургической инфекцией / А.Г. Волков, **Т.А. Гришина** // Международная научно-практическая конференция «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» - Уфа, 2015. С. 139 – 141.
3. Волкова Л.В. Низкомолекулярные катионные пептиды лейкоцитов, индуцированные различными антигенами / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина**, А.Г. Волков // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология № 4. 2015. С. 35 – 48.
4. Волкова Л.В. Новый антибактериальный пептидный комплекс / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина**, Л.Д. Аснин // Тезисы докладов XVIII региональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых Химия, экология, биотехнология-2016. ПНИПУ.– Пермь, 2016. С.108 – 111.
5. Волкова Л.В. Оценка возможности использования ультразвука в технологии получения белоксодержащих соединений / Л.В. Волкова, Я.И. Кузнецова, **Т.А. Гришина** // Химия. Экология. Урбанистика, 2017. С. 350 – 353.
6. Волкова Л.В. Опыт получения микроконтейнеров направленного действия для антибактериального пептидного комплекса / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых: Биология. Наука XXI века, 2017. С. 217 – 218.
7. Волкова Л.В. Математическое прогнозирование оптимальных условий синтеза вирусиндуцированными лейкоцитами полипептидов / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Danish Scientific Journal. - №3. 2017. С. 49 – 53.
8. Волкова Л.В. Оценка возможности получения пептидных соединений из клеток крови человека посредством влияния физических факторов / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Химия. Экология. Урбанистика. 2018. С. 574 – 577.
9. Волкова Л.В. Лейкоцитарные пептиды, полученные под воздействием физических факторов / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Международная

Пушинская школа-конференция молодых ученых: Биология. Наука XXI века, 2018. С. 214.

10. Волкова Л.В. Фракционный состав лейкоцитарного лизата и его биологические свойства / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина**, А.Г. Волков // **Современные проблемы науки и образования**. – 2019. - № 1; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=28527>.

11. Волкова Л.В. Влияние гемопластика различных производителей на продуктивную способность клеток млекопитающих / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // **Биофармацевтический журнал**. - Т. 11. № 2. 2019. С. 11 – 15.

12. Antibacterial effect leukocyte peptide complexes on the culture of microorganisms isolated from patients with abdominal surgical infection / L.V. Volkova, **Т.А. Grishina**, A.G. Volkov // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). - №1 (58). 2019. С. 4 – 5.

13. Волкова Л.В. Опыт использования лейкоцитов млекопитающих для получения новых антимикробных препаратов / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: Биология. Наука XXI века. 2019. С. 88.

14. Волкова Л.В. Разработка технологических режимов получения природных пептидов из лейкоцитов млекопитающих / Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина** // Химия. Экология. Урбанистика. 2019. С. 282 – 286.

15. **Гришина Т.А.**, Волкова Л.В., Волков А.Г. «Способ фракционирования лейкоцитарных белков» (патент РФ на изобретение №2737730).

16. Волкова Л.В. Разработка алгоритма оптимизации синтеза лейкоцитарных полипептидов/ Л.В. Волкова, **Т.А. Гришина**, Е.В. Орлова// **Бутлеровские сообщения**. – 2019.- Т.59,№ 7.- С.128- 133.

17. **Гришина Т.А.** Цитотоксичность и токсикологическая характеристика нового лейкоцитарного полипептида/ **Т.А. Гришина**, А.Г. Волков, Л.В. Волкова// **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2020. – Т. 23, № 5. – С. 3–8.

Список сокращений

АБПК	антибактериальный пептидный комплекс
АМП	антимикробные препараты
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	высокоэффективная жидкостная хроматография
ИК	инфракрасный
ИП	индекс пролиферации
ИФН	интерферон
кДа	килодальтон
КОЕ	колониеобразующие единицы
ЛБПК	лейкоцитарный белково-пептидный комплекс
ЛПК	лейкоцитарный пептидный комплекс
ЛЭМ	лейкоэритромасса
МПК	минимальная подавляющая концентрация
МСО/СО	международный стандартный образец/стандартный образец
УЗ	ультразвук

Гришина Татьяна Алексеевна (Россия)

Разработка технологии и стандартизация лиофилизированной субстанции лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Разработан алгоритм технологических стадий, позволяющий получать полипептиды с повышенной биологической активностью. Впервые разработан способ получения биологически активной субстанции лейкоцитарных пептидов человека с использованием ультразвуковой обработки. Впервые проведена оценка биологически активной субстанции, полученной ультразвуковой обработкой лейкоцитов крови, изучены физико-химические свойства и определены антибактериальная и противовирусная активности.

Grishina Tatiana Alekseevna (Russia)

Development of technology and standardization of lyophilized substance of the leukocyte protein-peptide complex

An algorithm of technological stages has been developed, which makes it possible to obtain polypeptides with increased biological activity. For the first time, a method has been developed for obtaining a biologically active substance of human leukocyte peptides using ultrasonic treatment. For the first time, the assessment of a biologically active substance obtained by ultrasonic treatment of blood leukocytes was carried out, the physicochemical properties were studied, and the antibacterial and antiviral activities were determined.