

ФГБОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

На правах рукописи

Гришина Татьяна Алексеевна

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

14.04.01 - Технология получения лекарств

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Лариса Владимировна Волкова

Научный консультант:
доктор фармацевтических наук, профессор
Екатерина Владимировна Орлова

Пермь 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК		4
СОКРАЩЕНИЙ		
ВВЕДЕНИЕ		5
ГЛАВА 1.	Природные низкомолекулярные пептиды: биологические свойства, технологии выделения (обзор литературы)	12
1.1.	Современные природные полипептиды млекопитающих..	14
1.2.	Технологии получения лейкоцитарных пептидов.....	23
1.3.	Влияние ультразвуковых волн на продуктивную способность животных клеток.....	29
ГЛАВА 2.	Материалы и методы исследования.....	36
2.1.	Материалы исследования.....	36
2.2.	Физико-химические методы.....	36
2.3.	Биологические методы	38
2.4.	Статистический анализ результатов.....	46
ГЛАВА 3.	Разработка алгоритма оптимизации синтеза лейкоцитарных полипептидов.....	47
3.1.	Математическое моделирование условий синтеза полипептидов вирусиндуцированными лейкоцитами.....	48
3.2.	Изучение влияния пластика гемоконтейнеров на синтез лейкоцитарных полипептидов.....	59
3.3.	Изучения влияния способа заготовки лейкоцитарных клеток на синтез лейкоцитарных полипептидов.....	65
3.4.	Изучение влияния лиопротекторов на остаточную влажность и специфическую активность лейкоцитарных полипептидов.....	67

3.5.	Алгоритм получения лейкоцитарных полипептидов с оптимальными биологическими и физико-химическими свойствами.....	70
ГЛАВА 4.	Разработка технологии лейкоцитарных полипептидов с использованием ультразвуковых волн и оценка его физико-химических свойств.....	72
4.1.	Влияние концентрации клеточной суспензии лейкоцитов на эффективность ультразвуковой обработки	72
4.2.	Влияние амплитуды и времени ультразвуковой обработки на степень разрушения лейкоцитарных клеток.....	73
4.3.	Оптимизация условий биотрансформации лейкоцитов под действием ультразвуковых волн.....	76
4.4.	Разработка условий получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.....	81
4.5.	Характеристика физико-химических свойств ЛБПК.....	84
ГЛАВА 5.	Изучение биологических свойств лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.....	94
5.1.	Изучение антибактериальной активности лейкоцитарных полипептидов.....	94
5.2.	Оценка противовирусной активности лейкоцитарных полипептидов.....	97
5.3.	Оценка безвредности лейкоцитарных полипептидов	98
ВЫВОДЫ		103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ		112
ПРИЛОЖЕНИЯ		124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБПК	антибактериальный пептидный комплекс
АМП	антимикробные препараты
ИК	инфракрасный
ИП	индекс пролиферации
ИФН	интерферон
кДа	килодальтон
КОЕ	колониеобразующие единицы
ЛБПК	лейкоцитарный белково-пептидный комплекс
ЛЭМ	лейкоэритромасса
МПК	минимальная подавляющая концентрация
МСО/СО	международный стандартный образец/стандартный образец
ПФЭ	полнофакторный эксперимент
УЗ	ультразвук
ЧЛИ	человеческий лейкоцитарный интерферон

ВВЕДЕНИЕ

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; LiY., Guani-GuerraE. etal., 2010]. Помимо непосредственного антибактериального действия, АМП нередко проявляют целый ряд иммуномодулирующих эффектов [Богомолова Е. Г. и др., 2012; XiangQ. etal., 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; Дурников Д.А. и др., 2016; Щукин 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 экстрагированным 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 *invitro*.
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 «Terumo» 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» (Заявка на патент РФ № 2019114590 от 13.05.2019, 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, оформлена и представлена заявка на патент РФ «Способ фракционирования лейкоцитарных белков» № 2019114590 от 13.05.2019, 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 ФГБОУ ВО «Пермского национального исследовательского политехнического университета» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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.

ГЛАВА 1.

Природные низкомолекулярные пептиды: биологические свойства, технологии выделения (обзор литературы)

На протяжении последних лет во всем мире отмечается значительное увеличение числа устойчивых возбудителей внебольничных и госпитальных инфекций к антимикробным препаратам (АМП). Возникновение бактериальной резистентности является естественным биологическим ответом на применение АМП, которые создают избирательное давление, содействующее отбору, выживанию и размножению устойчивых штаммов микроорганизмов [6, 55].

Устойчивость к антибиотикам имеет большое социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности. Болезни, вызванные резистентными штаммами, отличаются более длительным течением, чаще требуют госпитализации и увеличивают продолжительность пребывания больных в стационарах и ухудшают прогноз для пациентов. При неэффективности препаратов выбора возникает необходимость применять средства второго или третьего ряда, которые, зачастую, отличаются высокой стоимостью, менее безопасны и не всегда доступны. Эти факторы приводят к росту прямых и косвенных экономических затрат, а также повышают риск распространения в мировом сообществе резистентных штаммов [9, 70].

В течение долгих лет поиск новых препаратов, необходимых для борьбы с бактериальными инфекциями, был сосредоточен на получении новых естественных и искусственных антибиотиков – соединений сложного химического строения [8, 66, 78]. На сегодняшний день присутствует немало инфекционно-воспалительных заболеваний бактериальной природы, которые вызывают слабопатогенные бактерии с атипичными биологическими свойствами, обладающие множественной антибиотикорезистентностью [38].

Лекарственные средства являются одним из важнейших регуляторов уровня жизни населения. В связи с чем высокая эффективность и безопасность являются необходимыми критериями качества препарата. Поэтому устоявшиеся подходы к разработке лекарственных средств путем, например, химического синтеза, почти исчерпаны. Согласно последним данным о качестве лекарственных препаратов и их адаптированности к человеческому организму более предпочтительными средствами лечения являются природные составляющие организма с известной биологической активностью [42, 56, 59]. Поэтому разработка методов выделения и использование таких веществ в качестве субстанций перспективных лекарственных средств является весьма привлекательным и обоснованным подходом к созданию новых препаратов [57].

Выделяют два основных типа воздействия антимикробных пептидов на бактерии: ингибирование метаболических процессов или нарушение целостности клеточной мембраны [79, 80, 82]. Большая часть антимикробных пептидов вызывают гибель бактерий по второму механизму. Чтобы достигнуть плазматической мембраны, пептиды предварительно должны преодолеть несколько слоев клеточной стенки. В случае грамотрицательных бактерий она состоит из внешней липополисахаридной мембраны и пептидогликанового слоя. У грамположительных бактерий внешняя мембрана отсутствует, но пептидогликановый слой развит гораздо сильнее. Пептиды обычно беспрепятственно достигают плазматической мембраны, и именно ее разрушение приводит к гибели клетки [67, 84, 89].

Несмотря на то, что для антимикробных пептидов характерны значительные действующие концентрации и низкая избирательность, они обладают рядом преимуществ: способны быстро подавлять клетки-мишени, широкий спектр действия, активность в отношении штаммов, резистентных к другим антибиотикам, а также низкая способность клеток к развитию резистентности [21, 74]. Поскольку некоторые антимикробные пептиды обладают цитотоксическим эффектом, наиболее эффективно они могут быть

использованы при терапии заболеваний наружных покровов, слизистых — без внутривенного введения. В настоящее время такие пептиды широко используются для конструирования новых лекарственных препаратов [20, 28]. Универсальность действия на микроорганизмы, а также способность быстро поражать клетки-мишени и широкий спектр действия позволяют рассматривать антимикробные пептиды в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов, особенно на фоне глобальной проблемы развития антибиотикорезистентности патогенных штаммов бактерий. Однако стоит обратить внимание на то, что многие природные пептиды помимо чужеродных микроорганизмов могут губительно воздействовать на эритроциты крови [29, 31, 34]. Этот фактор ограничивает использование АМП в современной медицине. Механизм действия пептидов по сей день слабо изучен, поэтому направленный синтез молекул, при котором пептиды бы действовали исключительно на возбудителей, не причиняя вреда клеткам человека, пока невозможен. Но, несмотря на недостаточную изученность, в последние годы обрисовались перспективы применения антимикробных пептидов в клинической практике [11, 32].

1.1. Современные природные полипептиды млекопитающих

Начало развитию антимикробных соединений положил И.И. Мечников в 1903 г с представления фагоцитарной системы иммунитета. А уже в 1905 г. А. Петерсон сумел выделить из лейкоцитов гноя человека противомикробные вещества, которые, по заключению автора, являли собой смесь катионных протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб, для которых к тому времени были показаны антибактериальные свойства *in vitro*. В 1922 г. А. Флемингом был открыт бактериолитический фермент лизоцим, который считается первым белковым антимикробным соединением животного происхождения с установленной первичной структурой [7, 33].

Наличие пептидных веществ, обладающих антибактериальной и противогрибковой активностью, вырабатываемых многими прокариотами, было установлено довольно давно, тогда как наличие подобных соединений у

животных и человека, а позднее и в растениях, было выявлено лишь в 1980-х годах с открытием цекропинов насекомых, дефенсинов кролика, морской свинки и человека, и магейнинов из кожи лягушки. Хотя первые научные работы, из которых впоследствии выросли данные открытия, относятся еще к 1960-м годам [50]. С начала первых успехов выделение и изучение свойств АМП из разнообразных источников быстро развивалось: они были выявлены как в клетках миелоидной линии, так и эпителиальной природы млекопитающих, амфибий, рыб, насекомых, птиц, растений и др. [103].

Антимикробные пептиды (АМП) эндогенного происхождения представляют собой часть самой древней защитной системы организмов от инфекционных бактерий [64]. Такие соединения выявлены практически у всех живых организмов [68]. В процессе эволюции организмы развили целую группу АМП, защищающих их от разнообразных патогенов - грамположительных и грамотрицательных бактерий. Одной из отличительных свойств АМП является высокая скорость бактерицидного действия [96, 100], которая объясняется, образованием АМП пор в мембране бактерий [63]. Антимикробные пептиды, в большинстве случаев, обладают низкой избирательностью; они губительны как в отношении бактерий, так и в отношении эукариотических клеток. Понимание механизмов распознавания противомикробными пептидами клеток-мишеней является необходимым условием для создания лекарственных препаратов на их основе. Наиболее важным фактором, определяющим избирательное действие АМП, является различие в составе мембран бактериальных и эукариотических клеток.

В связи с чем, разработка способов получения и применение таких соединений в качестве основы будущих лекарственных средств является весьма привлекательным и обоснованным подходом к созданию новых препаратов [83]. Прогрессивное развитие биотехнологии, которая является молодой, но быстро развивающейся ветвью фармации во всем мире, позволило претворить эти идеи в жизнь и вывести на фармацевтический рынок ряд принципиально новых лекарственных средств. В развитых странах

это наиболее капиталоемкая отрасль фармацевтических исследований. В Японии, занимающей второе место после США по развитию биотехнологии, на долю лекарственных средств, получаемых методами генной инженерии и биотехнологии, приходится около 50% всех разработок, зарегистрированных в этой стране [110].

В список новых лекарственных препаратов входят протеиновые вещества, обладающие противовирусной, иммуномодулирующей, противоопухолевой активностью, влиянием на сердечно-сосудистую и эндокринную системы (эритропоэтин, интерферон-альфа-2а, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, активатор тканевого плазминогена, моноклональные антитела, вакцины против вирусных гепатитов, фактор некроза опухолей и т.д.) [30]. Возможности биотехнологии в сфере создания препаратов нового поколения чрезвычайно высоки, лекарственные средства пользуются большим спросом и востребованы мировым сообществом [1].

В последние несколько лет в зарубежной литературе все чаще встречаются данные о выделенных из живых организмов пептидах, обладающих антибактериальной активностью [62, 75]. Катионные белки нейтрофилов и макрофагов, находящиеся в лизосомах клеток, являются эффекторами кислороднезависимого угнетения бактерий и относятся к факторам неспецифической антибактериальной резистентности макроорганизма [73]. Установлено, что губительное действие катионных белков на бактерии связано с вызванным нарушением структуры, функции клеточной стенки микроорганизмов и их метаболизма. Есть данные что, при взаимодействии *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* с катионными белками последние способствуют проникновению в клетку веществ (актиномицин D, рифампицин), которые в неповрежденные клетки не проникают. Эффективность действия катионных белков при прочих равных условиях зависит от особенностей строения наружной мембраны бактерий и прежде всего их липополисахаридного комплекса. Кроме того, в

исследованиях с липофильными анионами было установлено, что катионные белки вызывают деполяризацию мембраны. Это влечет за собой физиологические изменения, приводящих к гибели клеток. В литературе имеются данные о том, что бактерии после их взаимодействия с катионными белками теряют жизнеспособность значительно раньше, чем способность к поглощению кислорода, осуществлению макромолекулярных синтезов [85, 86].

Список антибактериальных пептидов, выделенных из человеческого организма, постоянно пополняется. О.В. Бухариным описан тромбоцитарный катионный белок – бета-лизин, проявляющий антибактериальную активность в отношении грамположительных бактерий и обладающий иммунорегулирующей активностью [10]. В 2002 году было установлено, что кератиноциты кандилом способны продуцировать антимикробный пептид LL-37, являющийся и многофункциональным иммуномодулятором. Стоит отметить, что ряд пептидов и белков, обладающих противомикробным действием, проявляют свою активность как внутриклеточно, так и в жидких средах макроорганизмов. К этой группе принадлежат также продуцируемые клетками барьерных эпителиев и секретируемые на поверхность слизистых, антимикробные пептиды. Например, протеин-18, выделенный из семенной жидкости человека в 2002 году [90, 93, 95].

Между тем, современные антибиотические препараты, применяемые для лечения различных заболеваний бактериальной природы, обладают широким спектром побочных эффектов - от эндотоксемии иммуносупрессивной активности, возможности индукции анафилактического шока, кандидозных поражений полости рта и промежности, диареи, кожных аллергических высыпаний, до развития дисбактериоза слизистых и формирования псевдомембранозного колита [52]. Все аминогликозиды обладают выраженной нефро- и ототоксичностью; хлорамфеникол в некоторых случаях вызывает тяжелое осложнение - развитие необратимой апластической анемии, а при его длительном использовании нередко

возникают невриты зрительных и периферических нервов. Тетрациклиновые антибиотики имеют способность поражать центральную нервную систему и печень [55, 99]. Кроме того, выявленная на начальных этапах применения большинства современных антибиотических препаратов высокая эффективность в дальнейшем значительно снижается из-за появления антибиотикоустойчивых форм возбудителей [97]. Поэтому одним из наиболее значимых факторов совершенствования терапии инфекционно – воспалительных заболеваний человека является разработка новых эффективных противомикробных препаратов.

В начале прошлого столетия стало очевидно, что организм млекопитающих обладает способностью к выработке антимикробных соединений. Было получено, что нейтрофильные гранулоциты являются собой важнейшие эффекторными клетками системы врожденного иммунитета и обеспечивают защиту организма от патогенов. Действие нейтрофильных гранулоцитов в деятельности противоопухолевой защиты организма на сегодняшний день остается малоизученной, а накопленные данные с трудом поддаются обобщению. Известно, что в лизосомоподобных гранулах нейтрофилов содержится набор молекул, способных уничтожать как микробные, так и эукариотические клетки. В состав действующих компонентов лизосомоподобных гранул нейтрофилов входят миелопероксидазная система, а также катионные пептиды с молекулярной массой от 2 до 6 кДа, обладающие высокой антимикробной активностью. Затем было показано, что некоторые антимикробные пептиды нейтрофилов обладают рядом биологических свойств, отличных от антибиотических, что дало основание рассматривать эти пептиды как потенциальные регуляторные молекулы, обеспечивающие взаимодействие систем врожденного и приобретенного иммунитета [81, 104].

Для млекопитающих организмов известны две группы антимикробных пептидов: дефенсины и кателицидины. Дефенсины это семейство гомологичных пептидов с молекулярной массой от 3.5 до 4.0 кДа, молекулы

которых стабилизированы тремя дисульфидными мостиками. Кателицидины представлены пептидами с разнообразными структурами, общим для которых является происхождение из молекул-предшественниц, которые состоят из двух частей: одна гомологична белку кателину (ингибитору катепсина L), а другая представляет собой сам антимикробный пептид, который приобретает активность после протеолитического отщепления кателиновой части молекулы-предшественницы. Для некоторых антимикробных пептидов, в частности дефенсинов человека, известна способность угнетать различные опухолевые (а также в некоторых случаях и нормальные) клетки организма. Однако до настоящего времени исследований в этом направлении проведено незначительно [92, 94].

Изначально дефенсины были выделены из лизосомного аппарата нейтрофильных гранулоцитов кролика, морской свинки, крысы, человека. В дальнейших исследованиях они были обнаружены и в макрофагах, и в специализированных клетках эпителия ротовой полости, трахеи и тонкой кишки млекопитающих. К числу дефенсинов можно отнести такие пептидные соединения с антимикробной активностью, как протегрины, лизоцим, бактерицидный белок увеличивающий проницаемость, действующий преимущественно на грамотрицательные микроорганизмы, а также бактенецины, цекропины, майгенины [51].

Аминокислотная последовательность и структура противомикробных пептидов сильно отличаются, однако существует ряд общих свойств. Все они синтезируются в виде предшественников с сигнальными последовательностями, которые в последствии изменяются либо в результате отщепления части последовательности, либо в результате гликозилирования или галогенирования [108, 109]. Все антимикробные пептиды являются амфипатическими молекулами, с гидрофобные участками, которые взаимодействуют с липидами, и гидрофильные участки, контактирующие с водой или отрицательно заряженными ионами. Молекулы антимикробных

пептидов, обычно имеют положительный заряд, что помогает им взаимодействовать с негативно заряженными мембранами бактерий [65].

Кроме того, ряд пептидов и белков, обладающих антибактериальным действием, проявляют свою активность не только внутриклеточно, освобождаясь из лизосомальных гранул нейтрофилов, но и в жидких средах макроорганизма. К ним относится лизоцим, лактоферрин и лактопероксидаза человека, являющиеся по своей природе катионными белками, проявляющими антимикробную активность посредством разнообразных механизмов, включая и повреждение клеточной стенки бактерий, и продуцируемые клетками барьер эпителиев желудочно-кишечного, респираторного и мочеполового трактов и секретируемые на поверхность слизистых млекопитающих [74]. Показано, что такие пептиды, как цекропины, реализуют свои антибактериальные свойства и во внутренней неклеточной среде организма насекомых (гемолимфе) [105].

Анализ научной литературы свидетельствует о том, что низкомолекулярные катионные пептиды не обладают негативными свойствами классических антибактериальных препаратов: для них не описаны анафилактоидные реакции, поскольку они неантигенны [106], к ним практически не вырабатывается устойчивость со стороны микроорганизмов [107]. Большинство катионных пептидов обладает эндотоксиннейтрализующими и иммунорегулирующими свойствами [98], будучи факторами проницаемости, они усиливают действие традиционно используемых антибиотиков [102]. Эти факторы являются предпосылкой для создания новых антимикробных препаратов на основе катионных пептидов, продуцируемых в организме человека и животных.

Наряду с фундаментальными исследованиями структурно-функциональных свойств антимикробных препаратов (АМП) важное прикладное значение имеют работы по созданию эффективных лекарственных средств на их основе. Природные пептиды могут стать прототипами новых антибиотиков широкого спектра действия, способных

решить проблему резистентности к существующим антимикробным средствам [67]. Подавляющее большинство АМП относятся к мембранотропным антибиотикам, поэтому развитие резистентности патогенов к ним менее вероятно из-за низкоизбирательного механизма их действия и возможно только при существенных изменениях структуры и свойств клеточной мембраны. Кроме того, многие АМП усиливают действие традиционных антибиотиков [88]. Известно, что продолжительная антибиотикотерапия в ряде случаев вызывает состояние иммунодефицита и эндотоксемию. Все это создаёт предпосылки для создания новых эффективных антибиотических лекарственных средств на основе природных пептидных антибиотиков, лишенных перечисленных выше недостатков. Учитывая наличие выраженной антибиотической и иммуномодулирующей активности у природных АМП, многие зарубежные фармацевтические компании уже приступили к созданию нового класса антибиотиков на их основе, а первые из них уже проходят клинические испытания [76, 91]. Структурно-функциональные исследования природных пептидных антибиотиков могут внести существенный вклад в развитие этого перспективного направления медико-биологической науки, а поиск методов их получения с целью создания на их основе лекарственных препаратов нового поколения является одной из актуальных задач современной биотехнологии [72, 77].

В настоящее время антибактериальные пептиды, синтезируемые вирусиндуцированными лейкоцитами в процессе синтеза интерферона, привлекают большое внимание. Их получение является заманчивым в том плане, что не требует дополнительного оборудования и разработки сложных технологических схем получения. Многие микроорганизмы чувствительны к их воздействию [13]. В связи с этим катионные пептиды из лейкоцитов человека, несомненно, являются перспективным объектом для создания на их основе новых лечебных препаратов.

Изучение клинической эффективности модификаторов биологического ответа и, в частности, интерферонов – один из самых развивающихся разделов современной иммунологии. Интерфероны являются важной частью естественной защитной системы человека и обладают противоопухолевой, противовирусной и иммунорегуляторной активностью [12].

Система интерферона представлена практически в каждой клетке организма и направлена на распознавание и элиминацию чужеродной генетической информации. За прошедшие со времени открытия интерферонов 40 лет накоплена обширная информация о физико-химических и биологических свойствах, выявлены основные компоненты системы интерферона, детально изучена локализация интерфероновых и регуляторных генов, определена нуклеотидная и белковая последовательность всех основных типов и субтипов интерферонов. Именно интерфероны оказались первыми полноценными белками эукариотов, синтезированными прокариотами в результате генно-инженерных манипуляций и применяемыми в клинической практике биопрепаратов нового поколения [43].

В начале 80-х годов прошлого столетия в отечественной литературе появились сообщения о наличии у человеческого лейкоцитарного интерферона антибиотических свойств в отношении, в основном, грамположительных микроорганизмов [15]. Показано, что в препаратах человеческого лейкоцитарного интерферона нативного типа обнаруживается в достаточно высоких титрах антистафилококковая активность, не связанная с интерфероном непосредственно. Как было доказано в опытах, активность эта не нейтрализовалась антиинтерфероновым гаммаглобулином и не возрастала, а напротив, полностью утрачивалась в процессе очистки интерферона и повышения его противовирусной активности [12]. Опыты продемонстрировали, что интерферон оказывал бактерицидное и бактериостатическое действие на стафилококки [13]. В отношении граммнегативной флоры был обнаружен бактериостатический эффект только

при применении больших доз препарата [23]. В 1988 г. группа авторов (Л.И. Малеева, В.В. Сергеев, С.А. Печеркина) высказала предположение, что антибактериальное действие препаратов интерферона не связано с молекулой интерферона, а обусловлено специфическим фактором, являющимся термостабильным пептидом с молекулярной массой, близкой к 5 кДа [12].

В настоящее время антибактериальные пептиды, продуцируемые лейкоцитами в среду при биосинтезе интерферона, привлекают все большее внимание исследователей.

Их получение является весьма привлекательным в том плане, что не требует дополнительного оборудования и специальных условий, поскольку низкомолекулярные катионные пептиды с антибиотической активностью являются «побочным продуктом» биосинтеза интерферона. Они не обладают таким разнообразным спектром побочных действий, как традиционно применяемые антибиотические препараты [6, 16], к их действию чувствительны многие микроорганизмы [6]. Поэтому катионные пептиды из лейкоцитов человека, несомненно, являются перспективным объектом для дальнейших исследований с целью создания на их основе новых лечебных препаратов.

1.2 Технологии выделения лейкоцитарных пептидов

В последние годы наблюдается значительное повышение интереса к структуре и функциям встречающихся в свободном состоянии в живых организмах низкомолекулярных пептидов, выполняющих ряд специфических биологических функций. Короткие пептиды, содержащие до 10 аминокислот, принято называть олигопептидами; в то же время полипептиды и белки считаются взаимозаменяемыми, хотя термином «полипептиды» чаще обозначают продукты с молекулярной массой менее 10000. В некоторых биоактивных пептидах имеются необычные аминокислоты, не встречающиеся в природных белках, или производные обычных аминокислот. Мнение о том, что пептиды могут играть роль промежуточных

продуктов на пути синтеза белка, не подтвердилось, так как этот процесс во всех живых организмах осуществляется *de novo* матричным путем [101].

Человеческий лейкоцитарный интерферон является природным полипептидом, синтезируемым донорскими лейкоцитами в ответ на воздействие интерфероногена [12].

Лейкоциты крови человека – основные продуценты природного интерферона-альфа, количество которых для производственных целей лимитируется донорским сырьем. В связи с этим весьма важным и актуальным для производственного процесса является решение вопросов оптимизации методов культивирования лейкоцитов в целях повышения выхода целевого продукта и разработки унифицированного эффективного метода получения природного ИФН.

Лимит сырья – донорских лейкоцитов, обуславливает необходимость оптимизации технологии получения ИФН, повышение его качества за счет очистки препарата и, как следствие, снижение негативных реакций при использовании ИФН. Анализ существующих технологий получения ЧЛИ и данных литературы показал необходимость и возможность совершенствования различных стадий технологического процесса, и прежде всего, стадии индукции интерфероногенеза [16, 49].

В настоящее время существует единая технология получения человеческого лейкоцитарного интерферона, которая состоит из основных стадий: получение чистых лейкоцитов, индукция вирусом интерфероногеном, биосинтез. Выделенные лейкоциты из донорской крови, лейкоцитарной или эритроцитарной массы суспендируют в питательной среде (среда 199), содержащей инсулин, 5-10% плазмы крови человека или 1,5-2% альбумина человека и антибиотики. Затем в суспензию добавляют вирус-индуктор болезни Ньюкасла или парагриппа Сендай и инкубируют вирусиндуцированные лейкоциты при температуре $36,9 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 час. Культивирование проводят одним из известных способов, стационарным, роллерным или суспензионным. Лейкоциты удаляют

центрифугированием, а надосадочную жидкость содержащую интерферон, подкисляют соляной кислотой до pH 2,2-2,4. Выдерживают подкисленный полуфабрикат интерферона в течение от 5 до 10 дней для инактивации вируса-индуктора. Препарат является нативным интерфероном. Для получения концентрированного, нативный интерферон дополнительно очищают методом хроматографического разделения [49].

С целью увеличения продуктивности лейкоцитов на стадии биосинтеза при производстве человеческого лейкоцитарного интерферона дополнительно вводят стадию прайминга – обработку суспензии лейкоцитов нативным интерфероном. Введение стадии прайминга значительно повышает продукцию интерферона лейкоцитами, а противовирусная активность интерферона возрастает в несколько раз. Параметры этой стадии варьируют в следующих пределах: температура проведения процесса от 37 до 38 °С, время проведения процесса от 2 до 10 часов. После проведения стадии прайминга следует индукция лейкоцитов вирусом и культивирование [36, 49].

Путем манипуляций, включающих как прайминг, так и использование ингибиторов метаболизма (супериндукция), определена возможность оптимизации технологии производства интерферона. Повышению выработки интерферона способствуют присутствие сыворотки или плазматической белковой фракции, замещающей сыворотку; пониженная температура инкубации, особенно в период индукции; использование роллерных культур; добавление соответствующего количества праймера, в качестве которого обычно используют интерферон. Комбинация прайминга с метаболическими ингибиторами может давать несколько более высокий выход интерферона, чем использование только ингибиторов. [12, 61].

Важным является вопрос о факторах, от которых зависят количество вырабатываемого интерферона в различных системах интерфероногены – клетки, о характере и сущности этой зависимости.

Представляют большой интерес агенты и условия, являющиеся причиной подавления и особенно усиления интерфероногенеза.

Достаточно хорошо известно об увеличении продукции интерферона, индуцированной вирусами, в условиях более высокой температуры, низкого уровня рН среды, наличия в среде сыворотки крови [49]. Среди описания многочисленных факторов, влияющих на продукцию и действие интерферона, немаловажное место занимает температурный режим. При описании многочисленных генетических признаков вирусов приводятся данные о различной способности патогенных и аттенуированных штаммов индуцировать образование интерферона в инфицированных ими клетках культур тканей [36].

Таким образом, оптимальной температурой для проведения синтеза интерферона животными клетками можно считать 37°C. Повышение или понижение температуры проведения биосинтеза более чем на 3°C ведет к резкому снижению количества синтезируемого интерферона в культуральной среде [49].

Так же выделен антибактериальный фактор, синтезируемый донорскими лейкоцитами в процессе интерфероногенеза под действием вируса-индуктора. Данный пептидный комплекс был изучен, дана оценка его физико-химических и некоторых биологических свойств. Исследование специфической активности комплекса подтвердило его антимикробное действие на ряд грамположительных и грамотрицательных бактерий [12, 13].

Одним из источников получения полипептидов природного происхождения может служить лейкоцитарная масса, образуемая в процессе производства препаратов крови. Известна технология получения препарата «Аффинолейкин» путем разрушения лейкоцитарных клеток замораживанием-оттаиванием, выделения низкомолекулярных компонентов мембранным разделением и лиофилизацией. В качестве исходного сырья используют осадок лейкоцитарной массы не утилизируемый отход,

образуемый в процессе получения человеческого лейкоцитарного интерферона.

Отход, состоящий из лейкоцитарной массы, суспендируют в 0,85% растворе хлористого натрия, содержащего 0,1% этилендиаминотетраацетата натрия, и отмывают этим же раствором путем центрифугирования. Объединяют в одну загрузку сырья лейкоцитарную массу из культур, содержащих исходно в сумме $13 \cdot 10^{11}$ лейкоцитов (т.е. $13 \cdot 10^{11}$ клеточных эквивалентов). Отмытые клетки смешивают с дистиллированной водой и проводят 5 циклов замораживания при минус 20° С и оттаивания при плюс 37°С. Клеточный детрит гомогенизируют в размельчителе тканей. Доводят рН лейкоцитарного лизата до 2,2 добавлением 20% раствора соляной кислоты и оставляют на 5-10 сут при 4° С, затем нейтрализуют, добавляя 20% раствор гидроокиси натрия до рН 7,2. Субклеточные частицы удаляют из лейкоцитарного экстракта центрифугированием с последующей микрофильтрацией через мембрану с размером пор 0,2 мкм. Осветленный экстракт подвергают диафильтрации пятью объемами растворителя в половолоконном ультрафильтрационном модуле на мембране с ретенцией 15 кДа. Надмембранную фракцию собирают, добавляют 0,44% глицина, стерилизуют мембранной микрофильтрацией, прогревают при 60° С в течение 10 ч, вновь стерилизуют мембранной микрофильтрацией [13].

Получаемый препарат является трансфер-фактором и обладает высокой иммуноспецифической активностью в переносе иммунореактивности к антигенам убиквитарных инфекционных возбудителей, например к туберкулину и герпесвирусным антигенам, но при этом не проявляет ни противовоспалительного, ни миелостимулирующего, ни пирогенного действия [12].

В настоящее время разработаны методы выделения лейкоцитарных пептидов их клеток млекопитающих. Рассмотрим несколько технологий.

Для получения α -дефенсинов из лейкоцитов крови обезьяны *Pario hamadryas* к осадку лейкоцитарной массы добавляли 10%-ную уксусную

кислоту и разрушали клетки гомогенизацией на холоду. Клеточный гомогенат центрифугировали. Полученный супернатант подвергали ультрафильтрации и концентрированию. Дальнейшее разделение фракций, содержащих низкомолекулярные пептиды, осуществлялось методом препаративного электрофореза. Окончательную очистку фракций, демонстрирующих АМА, осуществляли методом обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Очищенные пептиды высушивались на вакуумной установке перерастворялись в 0,01% уксусной кислоте и хранились при минус 20°C [60]. Аналогично получали катионные белки и пептиды из лейкоцитов собаки. Однако, полученные экстракты не относились к дефензинам, поскольку в исследуемых молекулах не обнаружены дисульфидные связи. Высказано предположение, что полученные пептиды собаки могут быть представителями третьей группы антимикробных пептидов, которые являются продуктами ограниченного протеолиза различных белков [27].

Для получения пептидов из лейкоцитов лося клетки ресуспендировали в воде и добавляли четыре объема 0,02М Na-ацетатного буфера с 0,3%-ным цетилтриметиламмонийбромидом (ЦТАБ). Далее проводили гомогенизирование клеток и дальнейшую экстракцию на холоде. Экстракцию проводили четырехкратно, после чего супернатанты объединяли и подвергали ультрафильтрации и концентрированию. Сконцентрированную низкомолекулярную белковую фракцию, содержащую пептиды с молекулярными массами от 0,5 до 10 кДа, подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии. Проводили несколько циклов хроматографии, элюируя пептиды в различных условиях: меняя величины градиентов концентрации ацетонитрила и противоионы (0,1%-ная трифторуксусная кислота или 0,13%-ная гептафтормасляная кислота). В данной технологии отсутствует этап, предполагающий использование препаративного электрофореза, традиционно применяемого при выделении

антимикробных пептидов, что позволило снизить потери целевого продукта [60].

Для экстракции пептидов из лейкоцитов козы (*C. hircus*) использовали 0.3% раствор бромистого цетилтриметиламмония в 0,02 М натрий-ацетатном буфере при pH 4,5. Полученный после экстракции материал подвергали ультрафильтрации для отделения низкомолекулярной белковой фракции, далее концентрировали и обессоливали. Материал, содержащий кислоторастворимые полипептиды с молекулярной массой менее 10-15000 Да, разделяли методом препаративного электрофореза. Фракции, в которых была выявлена антимикробная активность, отбирали и разделяли содержащиеся в них пептиды с помощью нескольких последовательных циклов обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Чистоту полученных после ОФ ВЭЖХ фракций оценивали с помощью аналитического электрофореза, масс-спектрометрии, а также аналитической ОФ ВЭЖХ. Таким образом выделены два пептида (средние молекулярные массы 2895,5 и 2739,3 Да), обладающие высокой антимикробной активностью и представляющие собой N-концевые фрагменты пролин-богатого пептида бактенецина 7.5 козы, структура гена которого представлена в базах данных, но соответствующий белковый продукт до настоящего времени не был выделен [60].

Таким образом, использование лейкоцитов млекопитающих в качестве сырьевого источника получения полипептидов весьма актуальное направление в настоящее время. Получаемый при этом супернатант обладает антибактериальным эффектом и иммуномодулирующим действием, что является несомненным преимуществом при разработке комбинированных терапевтических препаратов.

1.3 Влияние ультразвуковых волн на продуктивную способность животных клеток

Перспективным методом получения полипептидов их биологических объектов может служить ультразвуковая обработка. В биотехнологии и

экспериментальной биологии применяется воздействие ультразвуком различных параметров на среды с неодинаковыми физико-химическими свойствами. При увеличении интенсивности ультразвука до значений, когда в среде возникают механические усилия, сравнимые с прочностью клеточных мембран, начинается процесс разрушения клеток. При повышенных частотах ультразвукового воздействия на суспензию клеток механизмы разрушения также имеют механическую природу. Пороговая интенсивность ультразвука, вызывающего гибель клеток, зависит как от частоты ультразвука, так и от типа клеток [4].

Реакции на ультразвук отдельных, не связанных друг с другом клеток и совокупности клеток неодинаковы, так как различны условия взаимодействия клеток и клеточных систем, например с микропотоками, а также потому, что на тканевом уровне функционирование отдельных клеток находится под контролем межклеточных регуляторных систем. Роль этих систем обнаруживается при сравнении действия ультразвука на клетки в суспензиях и тканях [3].

Так, в стоячей ультразвуковой волне с клеток HeLa в суспензии смыываются поверхностные слои, отделяются нитевидные образования, в мембранах возникают дыры. Эти же клетки в монослое практически не испытывают изменений даже при вдесятеро большей интенсивности ультразвука.

Некоторые виды клеток в обычных условиях существуют в суспендированном состоянии. Это эритроциты, лейкоциты и другие клетки крови, сперматозоиды, бактерии, одноклеточные водоросли и пр. Другие клетки можно получить в виде суспензии, только применяя специальные методы. Чувствительность разных типов клеток к ультразвуковому воздействию весьма различна. Некоторые из них, например клетки амёбы, выдерживают значительное интенсивное облучение [17, 18].

Механическая устойчивость одноклеточных заметно меняется в зависимости от их величины, формы, особенностей строения, периода и

жизненном цикле и т. д. Однако в среднем она достаточно высока, и многие одноклеточные остаются в суспензии целыми и жизнеспособными даже после облучения ультразвуком высокой интенсивности. Стоит отметить, что еще никому не удавалось только с помощью ультразвука полностью избавиться от микроорганизмов в жидких средах, т.е. стерилизовать их [8].

Разрушению структуры клеток предшествуют заметные изменения их физиологического состояния, и если механическая устойчивость клеток меняется в широком диапазоне ($0,1 - 10 \text{ Вт/см}^2$; $0,5 - 2 \text{ МГц}$; $1 - 10^4 \text{ с}$) в зависимости от типа клеток, то пороговые физиологические изменения происходят в более узкой области ($0,1 - 0,5 \text{ В т/см}$ $0,5 - 2 \text{ МГц}$; $10 - 100 \text{ с}$).

Отличия в чувствительности различных клеток к ультразвуковому воздействию связаны с их морфологическими особенностями и функциональным состоянием [25, 35].

В первую очередь, устойчивость клеток к ультразвуковому воздействию определяется структурой их мембраны, в наибольшей степени подверженной влиянию факторов, действующих в ультразвуковом поле [4]. В непосредственной близости от клеточных мембран как внутри, так и вне клетки, наблюдаются периодические механические воздействия и энергичные акустические микропотоки. Напряжения сдвига под влиянием этих микропотоков могут достигать весьма больших величин ($10^2 - 10^3 \text{ Н/м}^2$), однако уже 10 Н/м^2 (5 - 60 мин воздействия) оказывается достаточно, чтобы уменьшить время жизни эритроцитов и повысить их чувствительность к осмотическому лизису, увеличить проницаемость цитоплазматических мембран и изменить их поверхностную энзиматическую активность, понизить поверхностный заряд и увеличить скорость оседания эритроцитов в поле гравитационных сил. Переменные напряжения в акустическом поле, расшатывающие структуру клеточной мембраны, и микропотоки, «смывающие» макромолекулы с поверхности клеток, приводят к повышению межфазного натяжения на границе мембрана - среда. Стремление энергии Гиббса системы к минимуму обуславливает дополнительные напряжения в

мембране, приводящие к уменьшению поверхности клетки и снижению ее поверхностной энергии. Это повышение напряжения приводит, например, к изменению формы клеток HeLa при кратковременном ультразвуковом воздействии (1 Вт/см^2 ; $0,8 \text{ МГц}$; 1 мин), незначительной деформации эритроцитов в сходных условиях и т.д. Оно сохраняется, пока поверхностная энергия не уменьшится до исходных значений в результате адсорбции белка и других поверхностно-активных веществ из окружающей среды [3].

Десорбция с поверхности клеток под действием ультразвука некавитационных интенсивностей ($0,05 - 0,3 \text{ Вт/см}^2$; 1 МГц ; $5 - 60 \text{ мин}$) молекул белков, гликопротеинов и, возможно, других биополимеров подтверждается изменениями энзиматической активности поверхности эритроцитов, потерей эритроцитами, лимфоцитами и соматическими клетками человека антигенов, связанных с их мембранами, повышением адгезивных свойств клеток, появлением в супернатанте заметных количеств гликопротеидов.

В результате ультразвукового облучения ($0,05 \text{ Вт/см}^2$; $0,88 \text{ МГц}$) суспензии эритроцитов (17000 кл./мм^3) в физиологическом растворе в первую же минуту с поверхности каждой клетки десорбируется примерно $10-14 \text{ г}$ вещества белковой природы. Дальнейшее облучение не приводит к повышению в среде концентрации десорбированного вещества, по-видимому, благодаря достижению равновесия десорбция - резорбция. После прекращения ультразвукового облучения «смытые» макромолекулы быстро сорбируются на поверхности клеток, и через несколько минут идентифицировать белок в среде спектрофотометрически не удастся. Поверхность клетки покрыта слоем фибриллярного белка, к которому, как правило, прикрепляются белковые глобулы, мукополисахариды и другие биомacroмолекулы. Благодаря белковому покрытию межфазное натяжение между клеточной мембраной и окружающей средой составляет всего $(0,1 - 2) \cdot 10^3 \text{ Дж/м}^2$. Белковые молекулы, способные взаимодействовать и с липидами

мембран, и с окружающей средой, ведут себя как поверхностно-активные вещества [4].

Межфазное натяжение на границе липид-вода составляет около $30 \cdot 10^3$ Дж/м², и молекулы белка, обладая поверхностной активностью, стремятся адсорбироваться на этой поверхности, снизить межфазное натяжение, а следовательно, и свободную энергию поверхности. Если клеточные мембраны после ультразвукового воздействия сохранили свою структурную целостность, то их функциональные характеристики восстанавливаются в течение 10 - 60 мин. Это восстановление, по-видимому, обеспечивается как функционированием специфических репаративных механизмов, так и процессами резорбции на поверхности мембраны белковых молекул, «смытых» микропотоками. Для заметного снижения межфазного натяжения на поверхности раздела между слоем липидов и белковым раствором должно адсорбироваться довольно много белка, поскольку его поверхностная активность невелика [25].

Наиболее характерная реакция клеток на ультразвуковое воздействие – возникновение вызванного потенциала действия. Его проявление носит пороговый характер, зависит от интенсивности и длительности ультразвукового облучения. Потенциал действия не возникает, если первичная деполяризация не достигает некоторой критической величины. Исходя из этого, можно объяснить существование порогов ультразвуковых воздействий.

Увеличение интенсивности ультразвука до 1 Вт/см^2 (3 -5 мин) вызывает структурные нарушения – разрывы и контрактуру цитоплазмы, появление пузырьков, перемешивание клеточного содержимого. Однако, ни при этих, ни при более высоких интенсивностях ультразвука не отмечалось разрушения клеток. Закономерное увеличение проницаемости под действием ультразвука, связанное с деполяризацией клеточных мембран, хорошо проявляется в суспензиях клеток – эритроцитах, лейкоцитах.

Для разрушения клеток эффективен низкочастотный ультразвук. Регулируя условия ультразвукового воздействия – меняя частоту, мощность и время, можно получить конечный продукт с заданными свойствами [4].

Клетки крови в разбавленных суспензиях весьма чувствительны к ультразвуковому воздействию и начинают разрушаться при интенсивности $0,3 \text{ Вт/см}^2$, совпадающей с порогом кавитации в воде. Повышение клеток в суспензии заметно снижает скорость разрушения клеток.

Проведен ряд исследований по влиянию ультразвуковой обработки на биосинтез интерферона лейкоцитами. Воздействие ультразвуком с частотой 880 кГц и интенсивностью от $0,05$ до $0,6 \text{ Вт/см}^2$ в течение 130 - 300 секунд на суспензию лейкоцитов до прайминга или после него, во до вирусной индукции, не приводит к заметному изменению количества синтезированного интерферона. Ультразвук с интенсивностью, превышающей $0,6 \text{ Вт/см}^2$, подавляет процесс биосинтеза. Воздействие ультразвуком с интенсивностью от $0,01$ до $0,05 \text{ Вт/см}^2$ на лейкоциты после вирусной индукции практически не влияет ни на скорость биосинтеза интерферона, ни на жизнеспособность клеток, оцениваемых по их окрашиваемости красителем трипановым синим. Дальнейшее увеличение интенсивности ультразвука приводит к экспоненциальному росту числа нежизнеспособных (прокрашиваемых) клеток, а после обработки ультразвуком интенсивностью $0,7 \text{ Вт/см}^2$ в суспензии остается 65 % жизнеспособных лейкоцитов [3].

Существенное увеличение скорости гибели клеток при интенсивностях ультразвука, превышающих $0,7 \text{ Вт/см}^2$, обусловлено кавитацией, порог возникновения которой зависит от объемной концентрации клеток в среде, в разбавленных суспензиях совпадает с порогом кавитации в воде и становится весьма значительным, если объем частиц в суспензии превышает 2% [4].

Исходя из вышеизложенного следует, что использование донорских лейкоцитов в качестве источника получения пептидов, обладающих биологической активностью, в том числе и антибактериальной, является

весьма перспективным направлением для создания инновационных лекарственных средств. При этом применение обработки лейкоцитарных клеток ультразвуковыми волнами может служить способом выделения полипептидных комплексов.

ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

В качестве объектов исследования использовали донорские лейкоциты человека, которые подвергались вирусологическому контролю на отсутствие: HBS-антигена к вирусу гепатита В, антител к вирусу гепатита С и ВИЧ 1, 2, сифилиса.

2.2 Физико-химические методы

Определение содержания белка

Количественное определение содержания белка осуществляли по методу Лоури. Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяли по оптической плотности при длине волны 750 нм.

Определение количества живых лейкоцитов

Из флакона пипеткой вместимостью 1,0 мл отбирали 0,5 мл хорошо перемешанной суспензии лейкоцитов и переносили в чистый флакон. Чистой пипеткой добавляли 0,5 мл 1 % раствора натрия эозина, хорошо перемешивали и оставляли на 30 сек для окрашивания погибших лейкоцитов. Затем в этот флакон пипеткой вместимостью на 10 мл отмеряли 9 мл 0,9% раствора натрия хлорида, получая, таким образом, разведение 1:20. Суспензию лейкоцитов в количестве 1,0 мл в разведении 1:20 пипеткой переносили в другой флакон с 9 мл 0,9% раствора натрия хлорида (разведение 1:200). Тщательно перемешивали и заправляли камеру Горяева для подсчета форменных элементов крови. Подсчет лейкоцитов проводили во всей камере с помощью биологического микроскопа (Option ID 03, Германия).

Количество лейкоцитов рассчитывали по формуле:

$X = A \times 1110 \times 200 \times 1000$, где

X – количество лейкоцитов в 1 л суспензии;

A – количество лейкоцитов во всей камере;

1110 и 200 - коэффициенты пересчета на 1 мл с учетом разведения;

1000 – объем суспензии лейкоцитов, мл.

Определение аминного азота формальным титрованием по упрощенному методу Зеренсена-Гаврилова

Метод основан на блокировании формальдегидом при pH=7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

По количеству миллилитров 0,1 N NaOH, пошедшему на титрование, определяли аминный азот в миллиграмм-процентах.

Определение хлоридов в присутствии белка

Содержание хлоридов определяли согласно МУК 4.2.2316-08 [41].

Белки окисляли марганцевокислым калием в кислом растворе. Хлорид натрия взаимодействовал с азотнокислым серебром, избыток которого оттитровывали роданидом аммония.

Определение содержания остаточной влажности

Остаточную влажность лейкоцитарных полипептидов проводили согласно ГОСТ 24061-2012 [19].

Присутствие белков и высокомолекулярных соединений пептидной природы контролировали в реакции с трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотой. Отсутствие осадка означало полную депротеинизацию раствора низкомолекулярных пептидов.

Молекулярную массу пептидов

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

Аминокислотный состав определяли путем хроматографического анализа на колонке Microsorb 100-5C18 (250 мм x 4.6 мм) при следующих условиях: подвижная фаза: 0.1 М ацетатный буфер, растворённый в вода-метанол (60:40), pH = 6.8; температура 25 °C; скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; концентрация пробы: 1.9 г/л; объём пробы: 5 мкл; длина волны детектора: 220 нм.

Определение размеров частиц лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Размер частиц ЛБПК 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 pH трендов и динамической вязкости.

В зависимости от образца проводили от 20 до 100 измерений. Результат представляли на основании суммы всех приемлемых зарегистрированных данных.

Определение ИК-спектра гемопластика

Анализ состава и контроль качества полимеров, входящих в состав гемоконтейнеров определяли методом ИК-спектроскопии с помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet 380 (США).

2.3 Биологические методы

Определение антибактериальной активности (микротитрование)

Для определения антибактериальной активности использовали метод серийных разведений в бульоне. Тестирование проводили в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах в формате 8x12 лунок. Методом серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона определяли индивидуальные значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) для каждого из исследуемых образцов в отношении тестируемого штамма микроорганизма.

Для проведения исследования в подготовленные планшеты осуществляли инокуляцию приготовленной суспензией тестируемых микроорганизмов.

Оценка антибактериальной активности исследуемого лейкоцитарного белково-пептидного комплекса проведена под руководством к.м.н., зав. лабораторией биохимии развития микроорганизмов, доцента Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук В.П. Коробова. Для изучения антибактериальных свойств полученного пептидного комплекса использовали штаммы *Staphylococcus cohnii* 3165 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Для оценки антибактериальной активности в подготовленные 96-луночные планшеты для иммунологических исследований проводили инокуляцию приготовленной суспензией исследуемого микроорганизма. Далее планшеты инкубировали при температуре 37 °С. Учет результатов проводили визуально, сравнивая рост микроорганизма в присутствии лейкоцитарного супернатанта, полученного при различных условиях с ростом культуры и без него. За минимальную подавляющую концентрацию принимали минимальную концентрацию, обеспечивающую полное подавление видимого роста исследуемого штамма. При постановке методов серийных разведений в бульоне проводили контроль роста культуры в среде без АМП. Контролировали чистоту суспензии микроорганизма, использованной для инокуляции, путем высева на неселективные среды. Каждая партия тестируемых штаммов сопровождалась внутренним контролем качества исследования с использованием соответствующих контрольных (референтных) штаммов [40].

Оценка антибактериальной и противогрибковой активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Оценка антибактериальной и противогрибковой активности проведена под руководством заведующего кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России, к.ф.н. Новиковой В.В. Антибактериальную и

противогрибковую активность лейкоцитарного белково-пептидного комплекса определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой среде. Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на плотной питательной среде Сабуру, для определения антибактериальной активности использовали типовые суточные культуры, выращенные на питательном агаре. Концентрация микробных клеток в опыте составила $2-5 \times 10^5$ КОЕ/мл. Культивирование посевов бактерий в эксперименте осуществляли на питательном бульоне, дрожжей – на бульоне Сабуру. В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Оценку роста бактерий проводили визуально через 20–24 часа инкубирования, антимикотическую активность – через 24–48 час инкубирования. В качестве значения МПК (минимальной подавляющей концентрации) принимали концентрацию соединения в последней прозрачной пробирке серии разведения. Антибактериальный эффект лейкоцитарного белково-пептидного комплекса сравнивали с действием диоксидина (1% раствор), фунгистатический эффект - с действием флуконазола (табл. 1).

Таблица 1

Соединение	МПК, мкг/мл						
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> №НХ 19/222	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>C. albicans</i> NCTC 885-653
Диоксидин (1% раствор)	31,2	7,8	500	62,5	500	500	-
Флуконазол	-	-	-	-	-	-	2 – >64

Скрининг противомикробной активности осуществляли 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* №HX 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Определение противовирусной активности

Противовирусную активность определяли путем сравнения протективного действия лейкоцитарного белково-пептидного комплекса с аналогичным действием международного стандартного образца (МСО) или соответствующего СО, откалиброванного в Международных единицах (МЕ) по соответствующему международному стандарту.

Готовили серию десятикратных и двукратных разведений исследуемого препарата в поддерживающей среде (на 4 разведения выше и ниже предполагаемого титра активности). Параллельно готовят соответствующие разведения СО.

Из лунок планшетов с клеточным монослоем удаляли ростовую среду и вносили приготовленные разведения испытуемого образца и соответствующего СО (по 100 мкл), используя на каждое разведение не менее 4 лунок с культурой клеток. Для контроля дозы индикаторного вируса оставляли 16 лунок с культурой клеток, а для контроля состояния монослоя клеток – 4 лунки. В эти 20 лунок вносили по 100 мкл поддерживающей среды, используемой для приготовления разведений испытуемых препаратов. Инокулированные и контрольные культуры клеток инкубировали в течение 24 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$. Из лунок культурального планшета удаляли ростовую среду, затем в каждую лунку с испытуемым материалом и соответствующим СО вносили по 100 мкл вирусной суспензии, содержащей рассчитанную заранее дозу индикаторного вируса – 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. В лунки контроля клеток вносили такой же объем (100 мкл) поддерживающей среды.

Определение дозы индикаторного вируса начинали с установления его активности. Для определения активности вируса-индикатора готовили десятикратные разведения вируса в поддерживающей среде в лунках

планшета. Из лунок культурального планшета удаляли ростовую среду и вносили по 100 мкл приготовленных разведений вируса (не менее чем по 4 лунки на каждое разведение). Инокулированные и контрольные интактные культуры клеток инкубировали в течение 24-48 ч при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$. За титр (активность) вируса принимали величину, обратную разведению препарата, при котором в 50% лунок с клеточной культурой обнаруживали цитопатическое действие вируса. Титр вируса выражали в тканевых цитопатических дозах – ТЦД₅₀/мл.

Активность вируса вычисляют методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\lg ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \times \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

где: $D_{\max}$ – lg разведения, ниже которого произошла 100% гибель клеток (+);

d – lg интервала между разведениями (1,0);

n – число лунок на каждую дозу (4);

p – число лунок, давших гибель (+) в разведении, ниже которого и в последующих разведениях произошла 100% гибель клеток.

После установления активности вируса производили подсчёт дозы для последующего внесения в лунки с испытуемым препаратом (100 ТЦД₅₀/0,1 мл).

Одновременно с внесением вируса-индикатора осуществляли контроль взятой дозы вируса на 16 лунках с культурой клеток, предназначенных для этих целей (по 4 лунки на каждое разведение вируса). Вносили вирус по 100 мкл, начиная с разведения, соответствующего 100 ТЦД₅₀/0,1 мл, и до разведения, соответствующего 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл с коэффициентом разведения равным 10. Лунки с культурой клеток для оценки состояния монослоя клеток оставляли интактными.

После внесения индикаторного вируса культуру клеток инкубировали при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в атмосфере с $(5,0 \pm 0,5) \% \text{CO}_2$ до появления

первых признаков цитопатических изменений в клетках с индикаторным вирусом в дозе 1 ТЦД₅₀/0,1 мл. Монослой в лунках с 0,1 ТЦД₅₀/0,1 мл индикаторного вируса должен соответствовать состоянию клеток в контрольных лунках.

Учёт активности пептида осуществляли через 24-48ч при условии, что доза внесённого вируса соответствовала 100 ТЦД₅₀/0,1 мл; в лунках с клетками, зараженными индикаторным вирусом, наблюдали практически полный цитопатический эффект (80–100%), а в контрольной культуре клеток отсутствовали признаки дегенерации.

За титр принимали величину, обратную разведению препарата, при котором клеточная культура в 50% лунок полностью защищена от цитопатического действия вируса.

Титр пептида вычисляли методом Спирмена-Кербера по формуле:

$$\log_2 ED_{50} = D_{\max} + \frac{d}{n} \times \left(p - \frac{n}{2} \right),$$

где: $D_{\max}$ – $\log_2$ разведения, ниже которого произошла 100% защита (–);

d – $\log_2$ интервала между разведениями (1,0);

n – число лунок на каждую дозу (4);

p – число лунок, давших защиту (–) в разведении, ниже которого и последующих разведениях произошла 100 % защита.

Противовирусную активность лейкоцитарного белково-пептидного комплекса (A_x) в исследуемом образце в МЕ/мл вычисляли по формуле:

$$A_x = \frac{A_{co}}{a_{co}} \times a_x,$$

где: A_{co} – противовирусная активность СО пептида в МЕ/мл;

a_x – титр исследуемого образца;

a_{co} – титр СО в данном опыте.

Определение цитотоксичности

Оценка цитотоксичности проведена под руководством заведующего лабораторией БАС ИТХ УрО РАН, к.х.н. Гришко В.В.

Для определения цитотоксичности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса использовали культуру клеток НСТ 116. Культивирование клеток проводили в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамина и 1% гентамицина в качестве антибиотика во влажной атмосфере. Клетки вносили в лунки 96-луночного планшета и инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 24 ч к монослою клеток добавляли исследуемые соединения в диапазоне концентраций от 0,9 до 30 мкг/мл. В качестве контроля использовали лунки с добавлением питательной среды. Выживаемость клеток оценивали через 72 ч инкубации с исследуемыми соединениями путем добавления раствора МТТ и последующего определения оптической плотности образовавшегося формазана при 544 нм на спектрофотометре FLUOstar OPTIMA BMG Labtech (Германия). В качестве количественного показателя цитотоксичности по кривой «доза – эффект» рассчитывали концентрацию тестируемого соединения, которая вызывает гибель 50% клеток (IC₅₀).

Определение аномальной токсичности

Аномальную токсичность оценивали с использованием клеточной линии SPEV (лаборатория клеточных культур Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций). Культивирование клеточной линии SPEV проводили с использованием питательной среды 199 (Институт имени Чумакова, г. Москва) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали в чашках Петри в концентрации 1x10⁶ кл./мл во влажной атмосфере с 5% CO₂ до образования конфлюэнтного монослоя. Пересев осуществляли 1 раз в 3 - 4 дня по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 5 - 15 минутной экспозицией с раствором Версена (ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург). Кинетику роста клеток эпителиальной

ткани почки эмбриона свиньи (SPEV) исследовали на микроскопе (Option ID 03, Германия) при 4 –х и 40 кратном увеличении.

Определение индекса пролиферации

Влияние гемопластика и ЛБПК на функциональные свойства эпителиальной ткани SPEV изучали по индексу пролиферации (ИП) – разрастание клеточной ткани путем размножения клеток делением.

Для культивирования клеточной линии SPEV готовили смесь растворов Версена и трипсина в соотношении 3:1. Брали матрац с клетками и сливали среду роста в емкость для слива. В матрац наливали 10 мл среды 199 круговыми движениями ополаскивали монослой клеток, затем сливали среду в емкость для слива. Для отслаивания клеток от стекла вносили в матрац с клетками 60 мл смеси Версена и трипсина, располагали горизонтально и оставляли в таком положении на 3-5 минут, процесс набухания контролировали визуально. Для приготовления среды роста в стерильный флакон на 0,45 л с помощью пипетки добавляли 20 мл сыворотки КРС, наливали до 200 мл среды 199, перемешивали круговыми движениями. После набухания осторожно сливали раствор Версена и трипсина по стороне матраца, противоположной набухшему слою клеток в емкость для слива. С помощью пипетки вблизи пламени спиртовки вносили в матрац с отслоившимися клетками 10 мл питательной среды, смывали клеточную взвесь со стенок и с помощью этой же пипетки ресуспензировали взвесь путём пипетирования 40-50 раз.

Оценивали по количеству клеток на 3-4 сутки культивирования в присутствии пластика исследуемых гемаконтейнеров и жизнеспособность клеток культуры изучали по суправитальному окрашиванию клеток трипановым блау.

Оценку внешних особенностей гемопластика до культивирования и влияние клеточной линии SPEV на пластик различных производителей проводили, используя микроскоп Option ID 03.

Определение стерильности

Стерильность субстанции лейкоцитарных полипептидов проводили согласно ОФС. 1.2.4.0003.15 [46].

2.4 Статистический анализ результатов

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили с использованием метода описательной статистики: вычисляли среднее значение, рассчитывали стандартное отклонение. Для получения достоверных результатов каждый опыт с использованием культур клеток повторяли 5 раз.

Обработку цифрового материала осуществляли с помощью компьютерных программ «Excel» и «Биостатистика», последняя из которых предназначена для статистической обработки результатов медицинских и биологических исследований методами, описанными в книге С. Гланца "Медико-биологическая статистика" (Primer of Biostatistics, 4th Edition, S.A.Glantz, McGraw-Hill).

ГЛАВА 3. Разработка алгоритма эффективности синтеза лейкоцитарных полипептидов

В настоящее время одним из наиболее известных лейкоцитарных полипептидов является природный альфа-интерферон. Процесс биосинтеза человеческого лейкоцитарного интерферона (ЧЛИ) осуществляется в суспензионной культуре с использованием роллерных установок или биореакторов.

Культивирование вирусиндуцированных лейкоцитов является основной стадией технологического процесса и во многом определяет количественные и качественные характеристики готового продукта. Накопление полупродукта интерферона при этом находится в тесной зависимости от состава питательной среды, конструкции биореактора и условий культивирования. Однако, большинство технологических процессов, в том числе и культивирование в условиях крупномасштабного производства, базируется на эмпирических данных и требует научного обоснования. Некоторые колебания характеристик полупродукта интерферона, получаемого на роллерных установках, наблюдаемые в практике производства препаратов крови, вызывают необходимость усовершенствования состава питательных сред и конструкции биореакторов, оптимизации режимов культивирования клеток крови человека (лейкоцитов).

Важным методологическим вопросом математического моделирования является выбор уровня организации биологической системы, моделирование взаимодействия компонентов культуральной среды, которые наиболее полно и адекватно соответствуют поставленной практической задаче. Конечной целью математического моделирования является управляемое культивирование клеток крови человека.

В связи с вышеизложенным, весьма актуальным в решении данной проблемы является разработка алгоритма по оптимизации синтеза лейкоцитарных полипептидов с использованием современных методов

математического моделирования применительно к свойствам и особенностям используемых вирусиндуцированных лейкоцитов крови человека.

В данной главе представлены материалы исследований, направленные на совершенствование методов получения лейкоцитарных полипептидов, в частности ЧЛИ, с целью повышения выхода и сохранения специфической активности.

3.1 Математическое моделирование условий синтеза полипептидов вирусиндуцированными лейкоцитами

Для получения математической зависимости описания процесса синтеза альфа-интерферона клетками крови (лейкоцитами) необходимо получить данные зависимости количества синтезируемого интерферона от количества вируса-индуктора и живых лейкоцитов в зависимости от времени проведения процесса синтеза альфа-интерферона.

Для более точного определения указанных параметров процесс синтеза проводили в одностадийном режиме. Для осуществления данного режима в культуральную среду вводили вируссодержащую жидкость вируса Сендай и проводили стадию индукции в течение 90 мин. при температуре 37 °С, не отделяя вируссодержащую жидкость, во взвесь вирусиндуцированных лейкоцитов вносили питательную среду для биосинтеза (среда 199 + 5% донорской плазмы + антибиотик канамицин) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 час. методом суспензионного культивирования.

Полученные результаты представлены в графиках зависимостей (рис. 1, 2, 3).

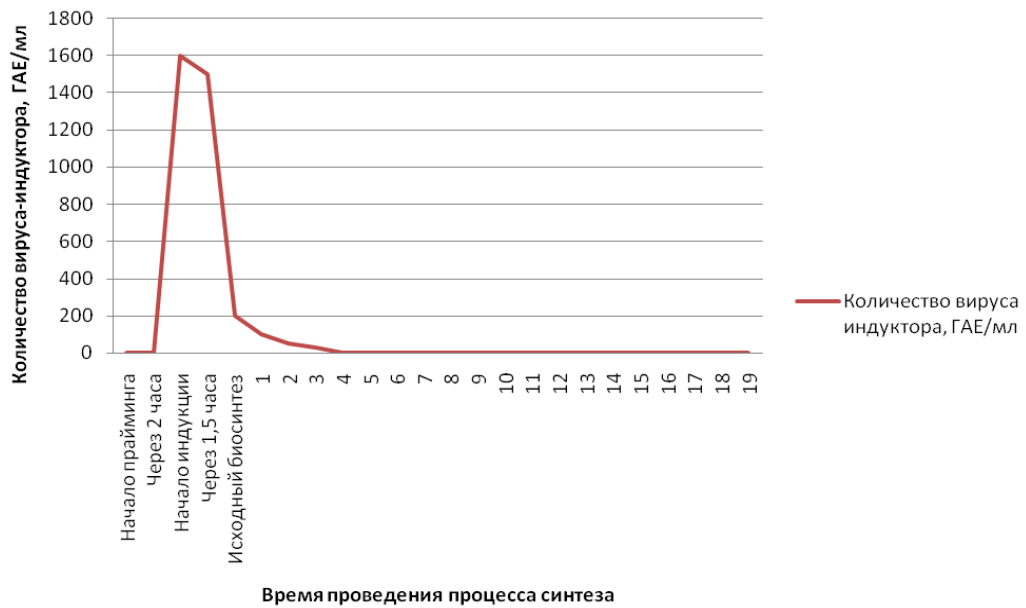


Рисунок 1. Зависимость количества вируса-индуктора от времени проведения процесса синтеза альфа-интерферона

Как видно из данных рис. 1, максимальная концентрация вируса в культуральной среде на стадии индукции составляет 1600 ГАЕ/мл. В первые часы стадии биосинтеза (1 – 4 час.) лейкоциты взаимодействовали с вирусными частицами, в результате чего концентрация вируса снизилась от 200 ГАЕ/мл до 0 ГАЕ/мл. В последующие часы биосинтеза вирус-индуктор не выявляли.

Следующим этапом проведена оценка накопления специфической активности в процессе биосинтеза интерферона.

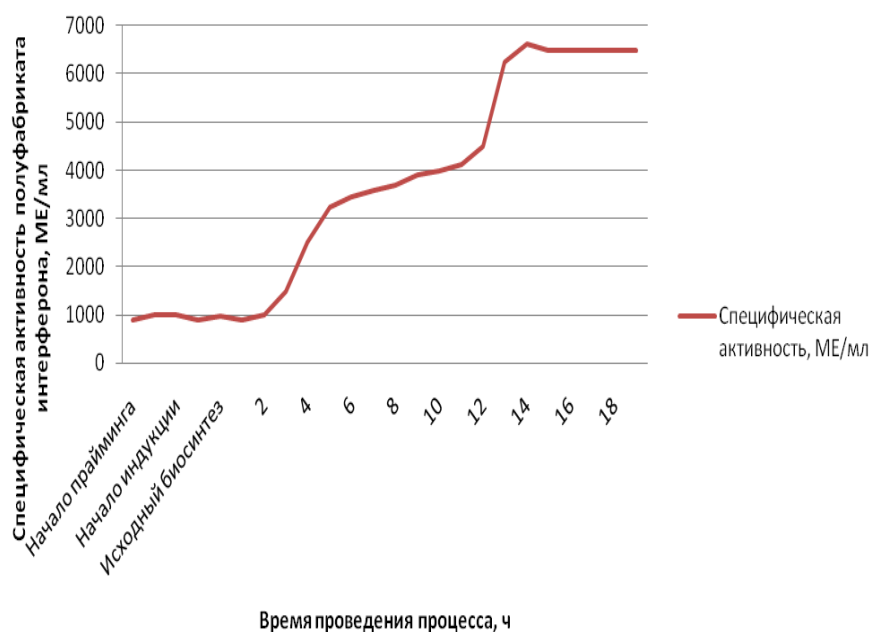


Рисунок 2. Зависимость количества синтезируемого альфа-интерферона от времени проведения процесса синтеза

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

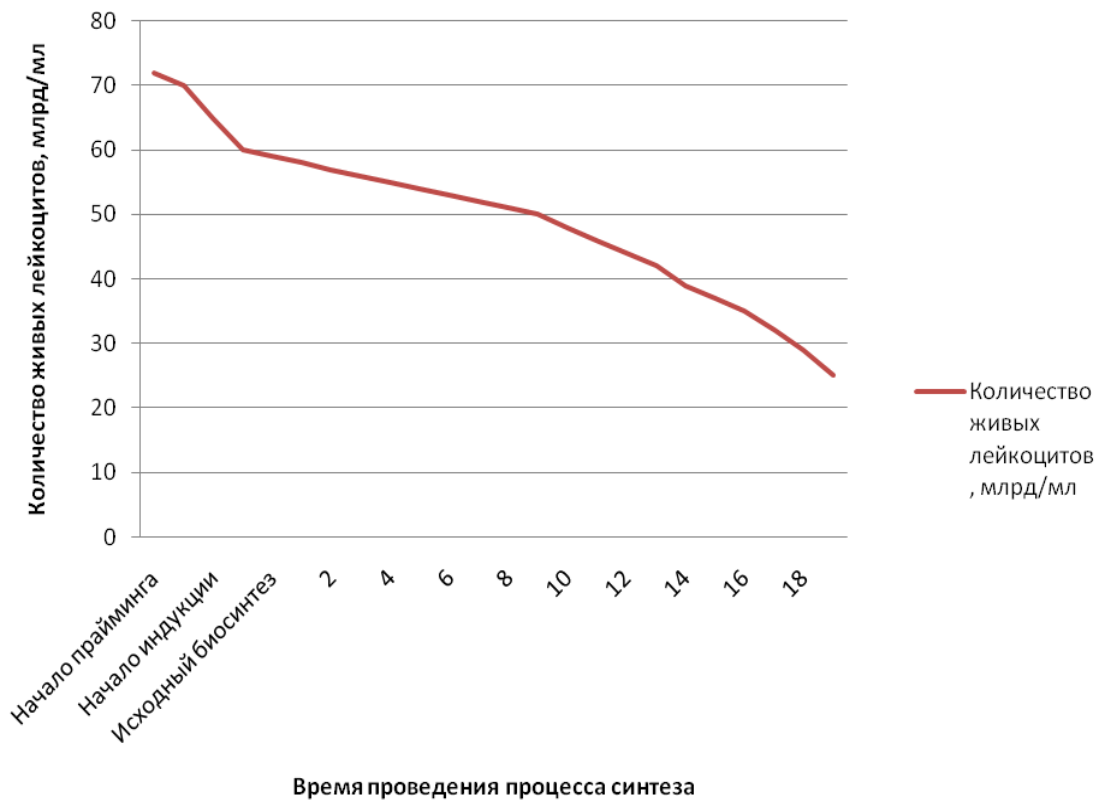


Рисунок 3. Зависимость количества живых лейкоцитов от времени проведения процесса синтеза альфа-интерферона

Изучение зависимости количества жизнеспособных лейкоцитов от продолжительности процесса синтеза (рис. 3) показало, что количество живых лейкоцитов снижалось в процессе продуцирования во внеклеточное пространство полипептидов. В конце процесса биосинтеза количество живых лейкоцитов уменьшилось на 2/3 от исходной концентрации, с 72 млрд/мл до 25 млрд/мл. При этом в культуральной среде накапливается ИФН.

Для изучения влияния способа культивирования на специфическую активность полуфабриката ИФН- α были использованы праймированные и вирусиндуцированные лейкоциты. Культивирование лейкоцитов осуществляли роллерным и суспензионным методами в течение 16 час. Результаты, полученные при определении специфической активности изучаемых образцов полуфабриката интерферона, приведены в табл. 2. Результаты обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента и

представлены в виде средней арифметической и ее ошибки ($X \pm \Delta x$) при уровне достоверности $P=0,95$.

Таблица 2

Результаты определения специфической активности ИФН в зависимости от способа культивирования клеток крови ($n=3$)

№ образца	Способ культивирования	Продолжительность синтеза, ч	Уровень специфической активности, МЕ/мл, $X \pm \Delta x$
1	Роллерный	16	4125 $\pm$ 250
2	Суспензионный	16	5500 $\pm$ 490

По данным, представленным в табл. 2 можно сделать вывод, что уровень специфической активности препарата ИФН- α синтезированного в суспензионной культуре в 1,3 раза выше чем препарата, полученного методом роллерного культивирования. Это явление можно объяснить тем, что при суспензионном культивировании компоненты клеточной взвеси, находились в более равномерных условиях.

Для проведения оптимизации стадии синтеза ИФН- α возникает необходимость изучения факторов, влияющих на специфическую активность конечного продукта [39]. В качестве факторов оптимизации выбраны скорость перемешивания культуральной среды и концентрация лейкоцитов на стадии «биосинтез», параметром оптимизации служит специфическая активность полуфабриката ИФН. Температура в процессе культивирования клеток составляла 37 °C.

Необходимо получить уравнение, выражающее влияние на выход продукта биосинтеза двух факторов: z_1 – скорость перемешивания, в диапазоне 12 – 60 об/мин; z_2 – концентрация лейкоцитов, в диапазоне 4 – 8 млрд/мл (табл. 3). В центре плана поставлено три параллельных опыта $m = 3$

и получены следующие значения параметра оптимизации y_u^0 : $y_1^0 = 2650$; $y_2^0 = 2750$; $y_3^0 = 2750$.

Табличное значение критерия Стьюдента для уровня значимости $p = 0,05$ и числа степеней свободы $f = 2$ равно $t_p(f) = 4,3$.

Критическое значение критерия Фишера для $p = 0,05$; $f_{ад} = 4$ и $f_{вос} = 2$ равно $F_{кр} = 19,3$.

Таблица 3

Факторы их уровни и интервалы варьирования

Факторы	Нижний уровень	Верхний уровень	Основной уровень, z_0	Интервал варьирования, Δz
z_1	12	60	36	24
z_2	4	8	6	2

Основной уровень и интервал варьирования определяли по формулам

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\max} + z_j^{\min}}{2}; \quad \Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2}.$$

Для математической обработки результатов удобнее перейти к безразмерной системе координат $x_1, x_2, \dots, x_n$ путем следующего преобразования

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j}.$$

После преобразования получены следующие данные (табл. 4)

Таблица 4

План полного факторного эксперимента

Факторы	Нижний уровень	Верхний уровень
x_1	-1	1
x_2	-1	1

Количество факторов $k = 2$. Число возможных комбинаций равно $N = 2^k = 2^2 = 4$. План ПФЭ в безразмерном виде с результатами эксперимента приведены в табл. 5.

Таблица 5

Матрица планирования ПФЭ типа 2^2 с учетом коэффициентов взаимодействия

№ опыта	Названия факторов				Параметр оптимизации, МЕ/мл	
	x_0	x_1	x_2	x_{12}	y^3	y_p
1	+1	-1	-1	+1	2750	2687,5
2	+1	+1	-1	-1	3000	3062,5
3	+1	-1	+1	-1	3500	3562,5
4	+1	+1	+1	+1	4000	3937,5

В табл. 6 представлены результаты влияния скорости перемешивания и концентрации вирусиндуцированных лейкоцитов на уровень противовирусной активности полуфабриката альфа-интерферона. Сравнение проводили согласно ОФС.1.7.2.0002.15.

Таблица 6

Результаты влияния факторов оптимизации на параметр оптимизации

№ опыта	Скорость перемешивания, об/мин	Концентрация лейкоцитов, млрд./л	Уровень специфической активности полуфабриката α -ИФН, МЕ/мл, $X \pm \Delta x$
1	12	8	3500 $\pm$ 200
2	60	4	3000 $\pm$ 170
3	60	8	4000 $\pm$ 250
4	12	4	2750 $\pm$ 150

По результатам табл. 6 можно предположить, что увеличение скорости перемешивания до 60 об./мин. (опыт № 2) способствовало незначительному увеличению уровня специфической активности полуфабриката ИФН-α (в 1,1 раз). При увеличении концентрации лейкоцитов на стадии «биосинтез» до 8 млрд./л (опыт № 1) уровень специфической активности полуфабриката α-ИФН увеличился в 1,3 раза. При одновременном увеличении скорости перемешивания до 60 об./мин. и концентрации лейкоцитов до 8 млрд./л (опыт № 3) уровень специфической активности повысился в 1,5 раза.

Далее были определены коэффициенты уравнения регрессии:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2,$$

Коэффициенты уравнения регрессии b_j определяли произведением столбца Y на соответствующий столбец X , деленным на число опытов в матрице планирования N .

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i.$$

Пользуясь планом, представленным в табл. 5, определили коэффициенты линейного уравнения регрессии.

Например, для определения коэффициента b_1 при x_1 необходимо получить сумму произведений:

x_{1i}	y_i	$x_{1i}y_i$
-1	2750	-2750
1	3000	3000
-1	3500	-3500
1	4000	4000

$$\sum_{i=1}^N x_{1i} y_i = 750$$

$$b_1 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{1i} y_i = \frac{750}{4} = 187,5.$$

Аналогично получили $b_0 = 3312,5$; $b_2 = 437,5$ и $b_{12} = 62,5$.

Для оценки значимости коэффициентов рассчитали для опытов в центре плана следующие величины:

$$\bar{y}^0 = \frac{\sum_{u=1}^3 y_u^0}{m} = 2717 \quad S_{\text{ср}}^2 = \frac{\sum_{u=1}^3 (y_u^0 - \bar{y}^0)^2}{m-1} = 2244,5 \quad S_{\text{ср}} = 47,4 \quad s_{bj} = \frac{S_{\text{ср}}}{\sqrt{N}} = 23,7$$

Оценили значимость коэффициентов по критерию Стьюдента:

$$t_0 = |b_0|/s_{b0} = |3312,5| / 23,7 = 139,8.$$

Аналогично для остальных:

$$t_1 = 7,9; \quad t_2 = 18,5; \quad t_{12} = 2,6.$$

Сравнивая полученные значения критериев Стьюдента с табличным значением пришли к выводу, что коэффициент b_{12} незначим и его следует исключить из уравнения. После его исключения уравнение регрессии приняло вид

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

Проверили адекватность полученного уравнения по критерию Фишера:

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - L} = \frac{15625}{4 - 3} = 15625; \quad F = S_{\text{ад}}^2 / S_{\text{ср}}^2$$

где L – число значимых факторов в уравнении регрессии, равное 3.

Тогда $F = 15625/2244,5 = 6,96$.

Так как $F < F_{\text{кр}}$ – уравнение регрессии адекватно.

В ходе проведения планирования эксперимента по влиянию внешних факторов, таких как скорость перемешивания среды и концентрация вирусиндуцированных лейкоцитов, на интенсивность процесса синтеза ИФН- α получили, что наиболее значимым фактором является концентрация лейкоцитов на стадии биосинтеза.

В результате полного факторного эксперимента получили адекватное уравнение регрессии

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

где y_1 - уровень специфической активности МЕ/мл; x_1 - безразмерная скорость перемешивания; x_2 - безразмерная концентрация лейкоцитов.

Следующим этапом было проведение оптимизации выхода целевого продукта методом крутого восхождения. В качестве базового фактора принята концентрация вирусиндуцированных лейкоцитов. Считая, что в ходе эксперимента интервал варьирования $\Delta z_2 = 2$, примем шаг движения на крутом восхождении $\Delta z_2^* = 1$, тогда

$$\gamma = \Delta z_j^* / (b_2 \Delta z_2) = 1 / (437,5 \cdot 2) = 0,0011$$

Шаг изменения концентрации на крутом восхождении равен:

$$\Delta z_1^* = \gamma b_1 \Delta z_1 = 0,0011 \cdot 187,5 \cdot 24 \approx 5 \text{ \%}.$$

Здесь $\Delta z_1 = 24$ принято по условиям полного факторного эксперимента.

Результаты опытов, выполненные по методу крутого восхождения, приведены в табл. 7.

Таблица 7

Результаты опытов по методу крутого восхождения

Характеристика	z_1	z_2	x_1	x_2	y_1	y_1^y
Центр плана	12	4	0	0	3312,5	2750
Интервал варьирования	24	2	1	1	-	-
Шаг движения	5	1	0,2	0,5	-	-
Номер опыта	Крутое восхождение					
1	17	5	0,2	0,5	3568,75	3000
2	22	6	0,4	1,0	3825	3125
3	27	7	0,6	1,5	4081,25	3500
4	32	8	0,8	2,0	4337,5	4125
5	37	9	1,0	2,5	4593,75	3125
6	42	10	1,2	3,0	4850	2500

Где y_1 и y_1^y - расчетные и экспериментальные значения выхода целевого продукта биохимической реакции, соответственно.

Расчетные значения критерия оптимальности непрерывно возрастают на крутом восхождении. В отличие от этого экспериментальные значения сначала возрастают, а затем, пройдя через максимум, начинают убывать. Такое расхождение между расчетными и экспериментальными значениями объясняется тем, что в процессе крутого восхождения мы выходили за пределы области адекватности уравнения регрессии.

В четвертом опыте получен максимальный выход продуктов реакции. Ограничения на величины z_1 и z_2 в ходе оптимизации не были нарушены.

По данным табл. 7 можно сделать вывод, что при концентрации лейкоцитов 8 млрд./л и скорости перемешивания 32 об./мин. (образец № 4) достигался максимальный уровень специфической активности синтезируемого полуфабриката ИФН- α . Дальнейшее увеличение концентрации лейкоцитов приводило к снижению уровня специфической активности препарата ИФН- α , что может быть вызвано недостатком питания и доступа кислорода для лейкоцитов. Увеличение скорости перемешивания до 60 об./мин. не является целесообразным, поскольку при скорости 32 об./мин. достигается необходимый уровень специфической активности, и дальнейшее увеличение скорости перемешивания может вызвать экономические потери.

Рассчитанное уравнение регрессии выражало влияние на выход альфа-интерферона двух факторов: скорости перемешивания и концентрации лейкоцитов. С учетом полученного уравнения проведена оптимизация условий проведения стадии «биосинтез». По итогам проведенных расчетов выявлено, что оптимальной на стадии биосинтеза является концентрацией лейкоцитов - 8 млрд./л и скорость перемешивания культуральной среды 32 об./мин.

3.2 Изучение влияния пластика гемоконтейнеров на синтез лейкоцитарных полипептидов

На продуктивную способность лейкоцитов оказывает влияние ряд факторов, в частности условия получения и хранения клеток. За последние годы уровень биологической активности полипептидов, синтезируемых лейкоцитами, собранных в гемоконтейнеры различных производителей отличается. Исследований по использованию гемоконтейнеров для заготовки лейкоэритромаксы, лейкотромбомаксы с последующим выделением «чистых» лейкоцитов для синтеза полипептидов не проводилось.

Для оценки качества пластика гемоконтейнеров проводили исследование ИК-спектра образцов различных производителей гемомешков на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 380 (глава 2).

При оценке ИК-спектрограмм пластика используемого для производства гемоконтейнеров, нами был получен ряд полос поглощения (рис. 4). Необходимо отметить то, что ИК-спектрограмма пластика от гемоконтейнера «Terumo» аналогичны пластику от гемоконтейнера «Гемасин» - оба имеют три ярко выраженных пика. Однако, при суммарном наложении данных ИК-спектрограмм, обнаружены некоторые отличия в волновых числах, что говорит о дополнительных примесях в составе гемопластика.

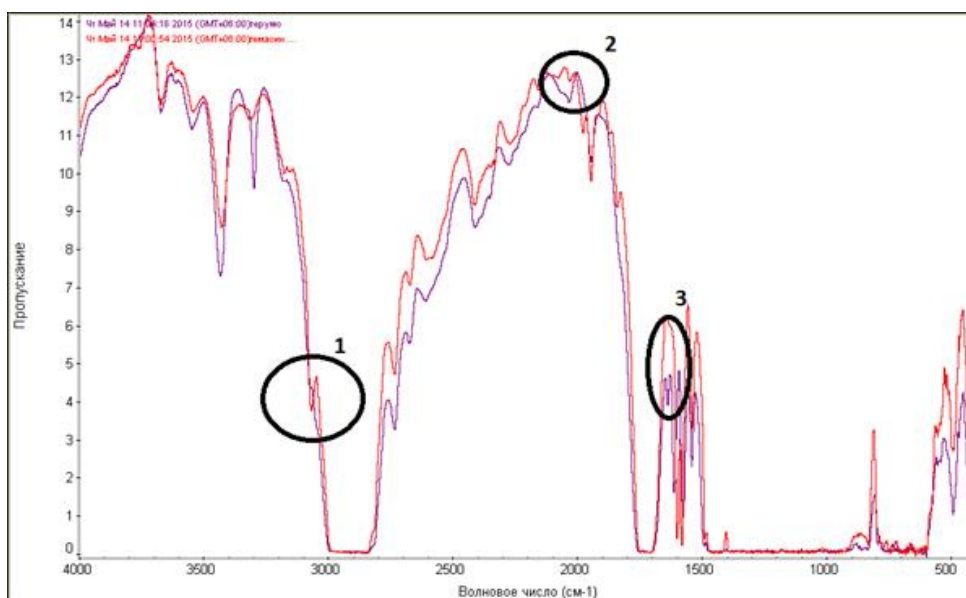


Рисунок 4. Динамика суммарного наложения ИК-спектрограммобразцов пластика от гемоконтейнеров: красный «Гемасин», фиолетовый - «Тегимо»

Область 1: пик 3069 см-1 (гемоконтейнер «Гемасин») примеси бензила;
 Область 2: пик 2034 см-1 (гемоконтейнер «Тегимо») предположительные примеси CH_2O ; BCl_2N ; C_{12}H -; C_4Cl^+ ; трикарбоны;
 Область 3: пик 1637 см-1 (гемоконтейнер «Тегимо») предположительные примеси: C_6F_4 ; $\text{C}_2\text{H}_8\text{Ti}$; $\text{Cl}_2\text{D}_2\text{Si}$ (дихлорсилан); CuN_2O_2 .

Наличие полос в области 3600-3100 см-1 может свидетельствовать о присутствии NH или OH, или обеих групп в молекуле. Первый отличительный пик -3069 см-1 характерен для гемоконтейнера «Гемасин» и по справочным таблицам соответствует примеси бензила (1,2-дифенилэтандион).

Полосы поглощения в области 2850-1850 см-1 могут быть отнесены к колебаниям S-H, C=C связи, карбоновой кислоте, гидрохинону, α -амино- или аминокислоте. Полученный пик 2034 см⁻¹ соответствует данной области, но уже относится к пластику от гемоконтейнера «Тегимо». Предположительно примесями могут служить CH_2O ; BCl_2N ; C_{12}H -; C_4Cl^+ ; трикарбоны.

В области 1850-1400 см-1 могут присутствовать частоты колебания связи C=C, деформационного колебания CH, карбонильных, карбоксилатных, ангидридных, нитро-, нитрозонитритных групп, бензольного кольца и др.

Пик 1637 см⁻¹, характерный так же для пластика от гемоконтейнера «Terumo», соответствует данной области, что предполагает следующие примеси в составе: C₆F₄; C₂H₈Ti; Cl₂D₂Si (дихлорсилан); CuN₂O₂.

Таким образом, результаты полученного анализа позволили предположить, что состав пластика гемоконтейнеров исследуемых производителей отличался по добавкам, используемым в их производстве.

Оценка качества пластика гемоконтейнеров необходима для доказательства отсутствия токсикологического влияния на компоненты крови. Во избежание этого к продуктам из пластика предъявляются требования по химической, биологической и санитарно-химической безопасности. Согласно ГОСТу Р 50855-96 токсикологические испытания изделий для хранения крови проводят на соответствие требованиям, включающим оценку острой токсичности на белых мышах и определение раздражающего действия на кожу белых крыс, слизистую глаза кролика, которые представлены в паспорте изделия.

Проведена оценка морфологии клеток клеточной линии SPEV в присутствии различных пластиков от гемоконтейнеров исследуемых производителей на 4-е сутки культивирования. В норме клетки SPEV имеют четкую округлую форму без признаков деформации и деструкции. Выявлены следующие отличия, что в присутствии образца пластика от контейнера «Terumo» клетки SPEV имели правильную округлую форму и размеры без признаков деформации, при этом в присутствии пластика от гемоконтейнера «Гемасин» клетки изменились, стали более округлые и имели неправильную вытянутую форму.

Учитывая, что клеточные линии более чувствительны к токсическому воздействию окружающей среды, нами был апробирован тест определения аномальной токсичности на клеточной линии SPEV в присутствии пластика от гемоконтейнеров различных производителей. Проведена оценка индекса пролиферации (ИП).

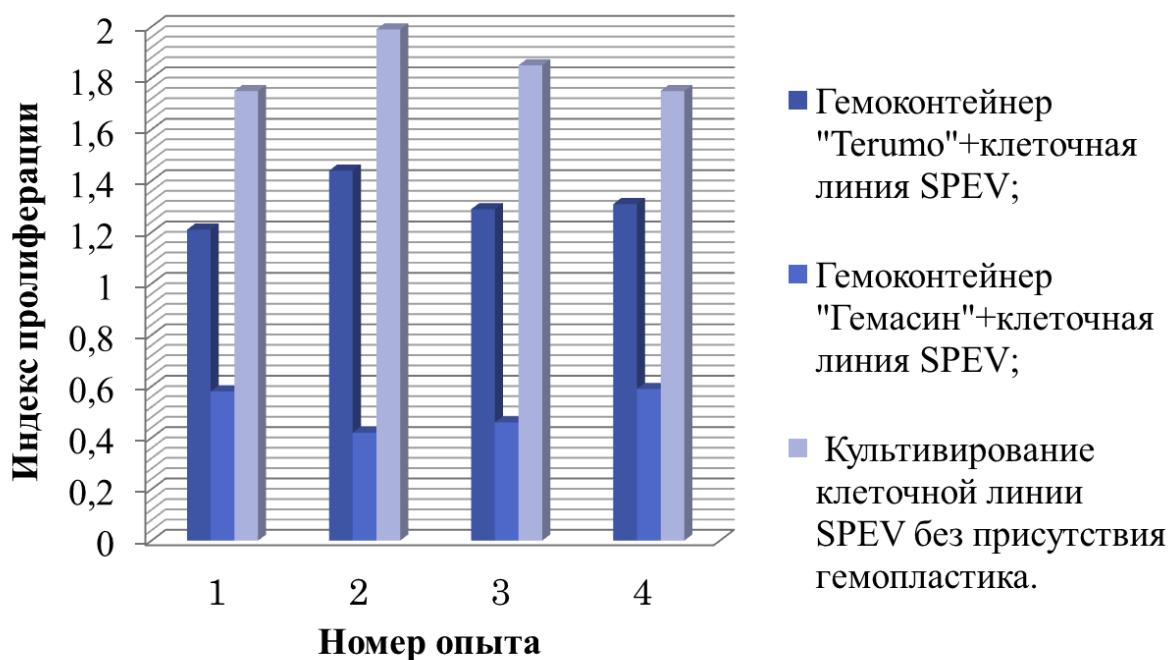


Рисунок 5. Зависимость индекса пролиферации от качества пластика гемоконтейнеров на клеточную линию SPEV

Как следует из полученных результатов (рис. 5) среднее значение ИП образца клеток, культивируемых в присутствии пластика от гемоконтейнера «Гемасин», равно $0,512 \pm 0,04$; от контейнера «Terumo» - $1,315 \pm 0,04$, что в 2 раза меньше показателя ИП контрольных образцов – $1,835 \pm 0,05$. Значения ИП образца, культивируемого в присутствии пластика от гемоконтейнера «Terumo», отличался от контрольного образца в 1,3 раза по сравнению с образцом, культивируемого в присутствии пластика от гемоконтейнера «Гемасин»-3,5 раз.

Одновременно с оценкой ростовых свойств культуры была произведена визуальная оценка пластика до и после культивирования перевиваемой клеточной линией SPEV.

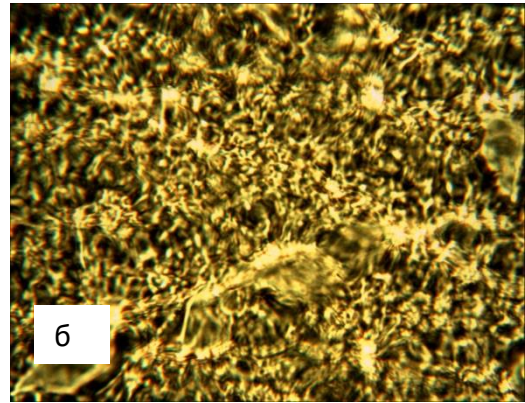
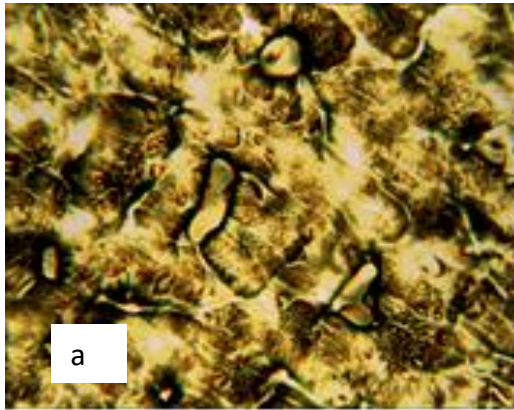


Рисунок 6. Структура гемопластика до культивирования клеточной линии SPEV: а) пластик от гемоконтейнера «Гемасин»; б) пластик от гемоконтейнера «Terumo».

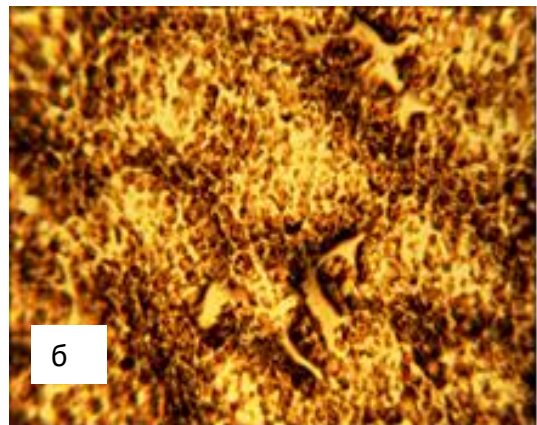
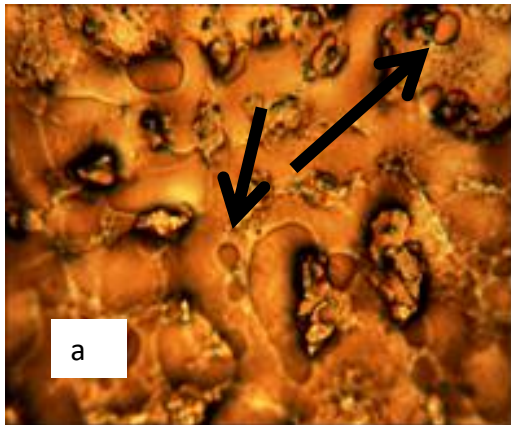


Рисунок 7. Влияние клеточной линии SPEV на пластик производителей: а) «Гемасин»; б) «Terumo».

Необходимо отметить, что на рис. 6 четко видна неоднородность пластика гемоконтейнеров, так у производителя гемоконтейнеров «Гемасин» рытвины более крупные, чем у производителя «Terumo». И, как следствие, после культивирования клеточной линии SPEV в присутствии данных гемопластиков, а именно у образца «а» (гемоконтейнер «Гемасин») видны клетки, которые «прикрепились» к поверхности гемопластика, предположительно, тем самым ухудшая ИП клеточной линии SPEV и показатели специфической активности синтезируемых полипептидов.

Образец «б» (гемоконтейнер «Terumo») имел наименьшую выраженность неровностей (меньший размер рытвин), в связи с чем можно

предположить, что процесс фиксации клеток в неровностях становится более сложным, что понижает вероятность уменьшения ИП клеточной линии SPEV и потере ЛЭМ в процессе сбора и хранения в данных гемоконтейнерах.

Проведена оценка уровня специфической активности интерферона, синтезированного лейкоцитами, собранными в гемоконтейнеры. Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8

Противовирусная активность интерферона полученного с использованием лейкоцитов, хранившихся в гемоконтейнерах производителей «Гемасин» и «Terumo» в течение 24-48 час.(n=3)

Производитель гемоконтейнера	Уровень специфической активности МЕ/мл
«Гемасин»	1056±71
«Terumo»	3574±262

Из полученных данных следует, что лейкоциты, собранные и хранившиеся в гемоконтейнерах «Terumo», достоверно больше синтезируют интерферона, чем лейкоциты, собранные в гемоконтейнеры «Гемасин». Возможно, это связано с тем, что в процессе хранения лейкоцитоцитарной массы в гемомешках лейкоциты возможно частично прикрепляются к стенкам гемоконтейнера.

В результате проведенных исследований получено, что оба вида гемоконтейнеров («Гемасин» и «Terumo») являются пригодными для транспортирования лейкоэритроцитомассы, используемой для синтеза полипептидов, в том числе природного интерферона. Однако следует отметить следующее положительные особенности пластика компании «Terumo»: ИП в 2,64 раза выше, чем при культивировании с пластиком «Гемасин», аналогичное отмечается и при оценке морфологии клеток, которые не имеют видоизмененные формы. Оценка уровня специфической активности полипептидов, синтезированных лейкоцитами, собранных и

хранившихся в гемоконтейнерах разных производителей так же показала, что наиболее благоприятно на лейкоцитарные клетки и соответственно уровень специфической активности полипептидов влияют гемоконтейнеры производителя «Terumo» [14].

3.3 Изучения влияния способа заготовки лейкоцитарных клеток на синтез лейкоцитарных полипептидов

Лейкоциты крови человека – основные продуценты природных полипептидов, количество которых лимитировано донорским сырьем. В настоящее время наиболее часто используется забор крови в гемоконтейнер с последующим разделением методом центрифугирования. Для изучения влияния способа заготовки лейкоэритроцитомассы (ЛЭМ) на продуктивную способность лейкоцитов проведен сравнительный анализ использования цитафереза и классического метода заготовки сырья. Проведенный анализ показал, что количество циклов напрямую зависит от исходного количества лейкоцитов у донора, чем выше количество лейкоцитов, тем меньшее число циклов, тем быстрее идет процедура забора форменных элементов.

Оценка уровня специфической активности полипептидов, полученных из ЛЭМ, заготовленной с использованием метода цитафереза, свидетельствует о повышении её в 2,4 раза по сравнению с полипептидами полученными из сырья, заготовленного по классической технологии (табл. 9).

Зависимость специфической активности полипептидов от способа
заготовки донорских лейкоцитов

Номер образца	Специфическая активность лейкоцитарных полипептидов, МЕ/мл	
	Метод цитафереза	Классический метод
1	2000	1500
2	3000	3000
3	2000	1000
4	2000	1000
5	1500	1000
6	2000	500
7	4000	1000
8	4000	1000
9	6000	2000
10	4000	3000
11	8000	2000
12	6000	2000
13	6000	2000
14	4000	2000
M±m*	3893±550	1643±214

Примечание: * Число степеней свободы (f) равно 13

Парный t-критерий Стьюдента равен -4.575

Критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 2.16.

$t_{\text{набл}} < t_{\text{крит}}$, изменения признака статистически не значимы
($p=0.000638$)

Следующим этапом наших исследований явилась оценка зависимости количества выделенных лейкоцитов от метода заготовки лейкоцитов. На рис. 8 представлен сравнительный анализ зависимости количества выделенных лейкоцитарных клеток от метода заготовки лейкоцитов.

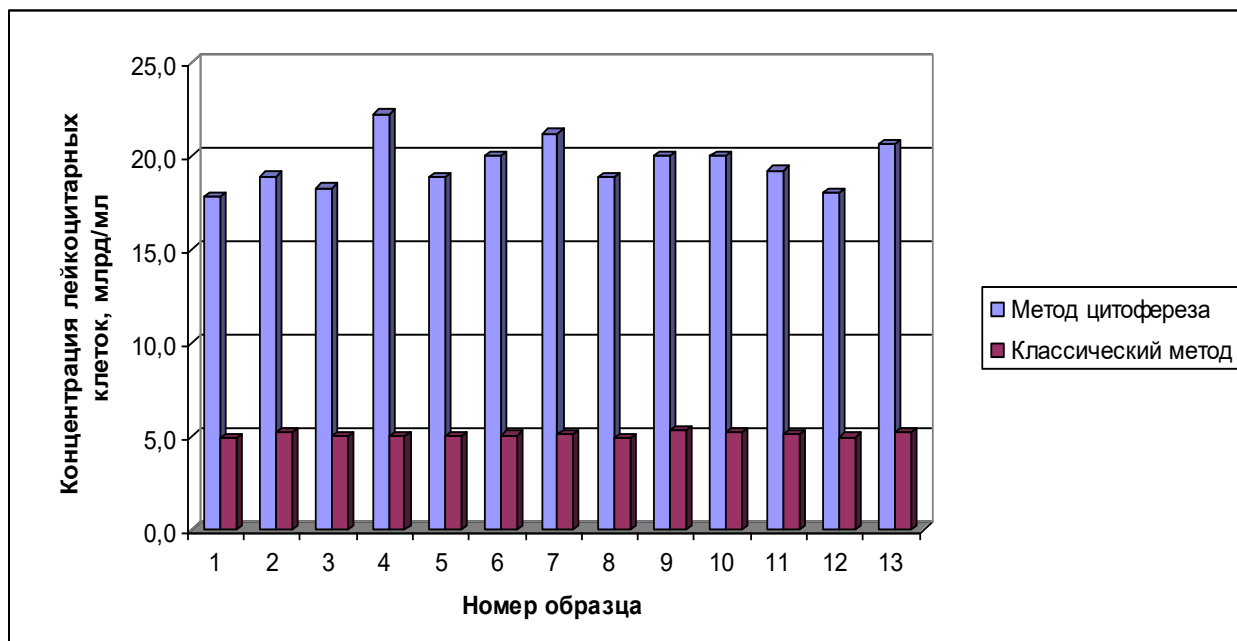


Рисунок 8. Сравнительный анализ зависимости количества выделенных лейкоцитов от метода заготовки лейкомассы

Исходя из полученных данных, представленных на рис. 8 можно сказать, что использование метода цитафереза позволило получать ЛЭМ с концентрацией лейкоцитов в 4 раза выше, нежели использование классического метода забора лейкомассы (19,5 млрд./мл и 5,1 млрд./мл соответственно).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что использование метода цитафереза способствует получению лейкоэритроомассы с максимальным содержанием лейкоцитарных клеток, а также получению лейкоцитов с повышенной продуктивной способностью.

3.4 Изучение влияния лиопротекторов на остаточную влажность и специфическую активность лейкоцитарных полипептидов

Следующим этапом исследования явился поиск оптимальных методов сублимационного высушивания для сохранения качества лейкоцитарных

полипептидов. Чтобы снизить воздействие множества повреждающих факторов в процессе замораживания биологических структур экспериментальным путем, были подобраны так называемые защитные вещества, или лиопротекторы.

Для оценки влияния раствора желатина на остаточную влажность и специфическую активность полипептидов исследовали различные концентрации лиопротектора от 0,5 % до 5,0 %. Сублимационное высушивание проводили в вакуумно-сушильной установке ТГ-50 в течение 48 часов. Результаты анализа влияния раствора желатина в различных концентрациях на влажность и специфическую активность полипептидов представлены в табл. 10.

Таблица 10

Сравнительный анализ влияния различных концентраций раствора желатина на остаточную влажность полипептидов ($n=3$)

Номер образца	Концентрация желатина, %	Остаточная влажность, %	Специфическая активность, МЕ/мл
1	0,5	1,5±0,03	1000,0±25,0
2	1,5	2,1±0,05	1000,0±25,0
3	3	2,5±0,04	1000,0±25,0
4	5	2,6±0,06	1000,0±25,0
5	Контроль (лактоза 3,0%)	1,6±0,03	1000,0±25,0

Исходя из представленных данных следует, что раствор желатина концентрацией 0,5 % наиболее благоприятно воздействует на процесс лиофильного высушивания. Пробы с концентрациями желатина 1,5; 3,0; 5,0 % привели к увеличению остаточной влажности препарата выше нормы – 2,0 %. Полученные результаты показали, что желатин, как наполняющий компонент может использоваться при высушивании природных полипептидов с условием добавления его в концентрации равной 0,5 %.

Согласно литературным данным, оптимальная концентрация L-декстрозы и мальтозы в составе лиофилизированных биопрепаратов составляет 5 – 10 % [99]. Для оценки влияния L-декстрозы и мальтозы на остаточную влажность полипептидов изучены различные концентрации указанных лиопротекторов от 2,5 до 10 %. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 11.

Таблица 11

Сравнительный анализ влияния L-декстрозы и мальтозы на остаточную влажность ($n=3$)

Номер образца	Концентрация лиопротектора, %	Мальтоза		Декстроза	
		Остаточная влажность, %	Специфическая активность, МЕ/мл	Остаточная влажность, %	Специфическая активность, МЕ/мл
1	2,5	0,3±0,01	1000,0±25,0	2,2±0,06	1000,0±25,0
2	5	1,5±0,04	1000,0±25,0	3,4±0,07	1000,0±25,0
3	7,5	1,7±0,05	1000,0±25,0	3,3±0,06	1000,0±25,0
4	10	2±0,06	1000,0±25,0	3,9±0,09	1000,0±25,0
5	Контроль (лактоза 3,0%)	1,6±0,03	1000,0±25,0	1,6±0,03	1000,0±25,0

По результатам проведенного исследования можно сделать вывод что, декстроза, как структурообразующий агент, отрицательно влияла на остаточную влажность природных полипептидов. Увеличение концентрации декстрозы в препарате привело к увеличению концентрации влаги, поэтому декстрозу, как структурообразующий агент не целесообразно использовать при сублимационном высушивании полипептидов. Добавление мальтозы в полупродукт в качестве структурообразующего компонента при высушивании, в концентрации 2,5 % снизило остаточную влажность до показателя 0,3 %. пробы с концентрацией мальтозы 5; 7,5; 10 % не привели к увеличению остаточной влажности выше 2 %, но показатель остаточной

влажности был выше, чем в контрольной пробе. При этом уровень специфической активности оставался неизменным для всех лиопротекторов.

Таким образом, можно сделать вывод, что из трех изученных лиопротекторов (желатин, L-декстроза, мальтоза) наиболее приемлемым защитным агентом является мальтоза в концентрации 2,5 %. Она позволяет снизить остаточную влажность препарата до уровня 0,3 %, при этом, не оказывая негативного влияния на уровень специфической активности полипептидов, что является несомненным преимуществом при лиофилизации биологических препаратов.

3.5 Алгоритм получения лейкоцитарных полипептидов с оптимальными биологическими и физико-химическими свойствами

По результатам проведенных экспериментов разработан алгоритм оптимизации метода получения лейкоцитарных полипептидов (рис. 9).

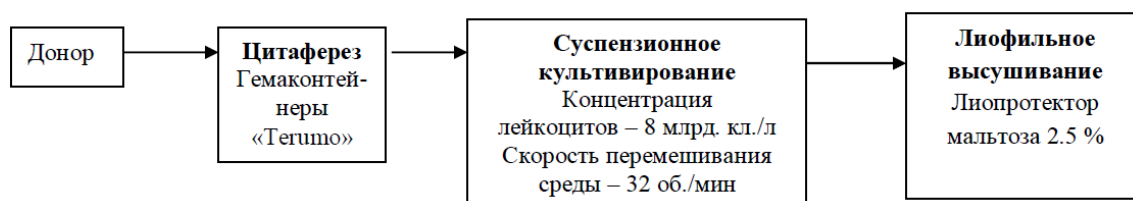


Рисунок 9. Алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных полипептидов

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

Выводы по главе:

В результате проведения серии экспериментов по разработке алгоритма эффективности синтеза лейкоцитарных полипептидов получены следующие результаты:

1. Для повышения биологической активности лейкоцитарных полипептидов проводить культивирование лейкоцитов при следующих параметрах: начальная концентрация лейкоцитов - 8 млрд./л и скорость перемешивания культуральной среды 32 об./мин.

2. Для повышения продуктивной способности лейкоцитарных клеток рекомендуется использовать гемаконтейнеры фирмы «Terumo». Так же, в целях оптимизации синтеза природных полипептидов клетками крови целесообразно использовать способ цитоплазмозереза при заготовке лейкоэритроцитомассы.

3. Для повышения качества лейкоцитарных полипептидов с сохранением специфической активности при проведении лиофилизации наиболее приемлемым лиопротектором является мальтоза в концентрации 2,5 %.

4. Разработан алгоритм получения лейкоцитарных полипептидов с оптимальными биологическими и физико-химическими свойствами.

ГЛАВА 4. Разработка технологии комплекса лейкоцитарных полипептидов с использованием ультразвуковых волн и оценка его физико-химических свойств

Согласно данным литературных источников, при воздействии ультразвука определенных частот на лейкоциты возможно изменение проницаемости клеточной мембраны или полное разрушение клетки [31]. Для получения целевого продукта необходимо провести процесс необратимого нарушения целостности клеток. Использование дезинтеграции, как предшественника фракционированию, позволяет получить содержимое клеток. Разрушение клеток или ультразвуковой лизис служит тонким инструментом разрушения структуры клеток. В связи с этим обусловлена разработка технологии получения полипептидов, содержащихся в лейкоцитах донорских с использованием ультразвуковой кавитации.

4.1 Влияние концентрации клеточной суспензии лейкоцитов на эффективность ультразвуковой обработки

Существенное увеличение скорости гибели клеток при интенсивностях ультразвука, превышающих $0,7 \text{ Вт/см}^2$, обусловлено кавитацией, порог возникновения которой зависит от объемной концентрации клеток в среде, в разбавленных суспензиях совпадает с порогом кавитации в воде и становится весьма значительным, если объем частиц в суспензии превышает 2% [3]. Поэтому, нами было принято решение о поиске оптимальной концентрации лейкоцитарных клеток в суспензии, подвергаемых ультразвуковой обработке.

Проведена серия экспериментов по облучению ультразвуковыми волнами лейкоцитарной суспензии с различной концентрацией клеток. Оценку жизнеспособности клеток осуществляли по методике, изложенной в главе 2. Ультразвуковую обработку проводили при следующих условиях: мощность 50 Вт, частота 30 кГц, амплитуда варьировала в пределах от 20 % до 100 %. Продолжительность обработки клеток ультразвуком составила от 30 сек. до 90 сек. Оценку эффективности ультразвуковой обработки

производили по количеству деструктурированных клеток. Данные по среднему количеству деструктурированных лейкоцитов после ультразвуковой обработки в зависимости от концентрации лейкоцитов в клеточной суспензии представлены в табл. 12.

Таблица 12

Зависимость деструкции лейкоцитов при УЗ-обработке от их
концентрации

№ опыта	Концентрация лейкоцитов в клеточной суспензии млн./мл	Процент деструктурированных лейкоцитарных клеток, после УЗ-обработки
1	56,0	нагрев смеси, полное разрушение
2	35,8	37,5
3	13,3	40,8
4	10,0	65,8
5	6,7	73,2

Как видно из результатов табл. 12 можно сделать предположение о том, что оптимальной концентрацией лейкоцитов в клеточной суспензии для проведения клеточной деструкции путем УЗ-обработки является 6,7 млн./мл. Полученная оптимальная концентрация лейкоцитов использована во всех последующих экспериментах.

4.2 Влияние амплитуды ультразвуковой обработки на степень разрушения лейкоцитарных клеток

При повышении интенсивности ультразвука до значений, когда в среде возникают механические усилия, сравнимые с прочностью клеточных мембран, начинается процесс разрушения клеток. Обычно появление значительных механических возмущений в жидкостях связано с возникновением в них стабильных и нестабильных газовых пузырьков, которые могут образоваться в воде и водных средах, если интенсивность

ультразвука превышает порог кавитации. Так, разрушение лейкоцитов в поле стабильных, пульсирующих с частотой 20 кГц пузырьков начинается при увеличении амплитуды колебаний до 8 мкм [4].

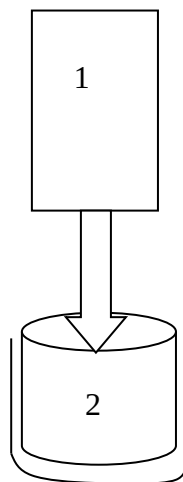


Рисунок 10. Схема модели УЗ облучения: 1 – ультразвуковая установка, 2 – емкость с рубашкой охлаждения.

Для разрушения лейкоцитарных клеток был использован метод ультразвукового лизиса (рис. 10). При введении ультразвукового зонда в кювету с суспензией лейкоцитов, клетки начинали разрушаться, образуя мутную суспензию, которую изучали на предмет количества живых лейкоцитов (глава 2). В результате исследования были получены следующие показатели, представленные в табл. 13.

Среднее количество погибших лейкоцитов в зависимости от амплитуды
ультразвука

Время воздействия, сек	Амплитуда, %	Среднее количество погибших лейкоцитов, %
30	20,0	15,0
	40,0	19,0
	60,0	23,0
	80,0	35,0
	100,0	39,0
60	20,0	21,0
	40,0	27,0
	60,0	38,0
	80,0	49,0
	100,0	61,0
90	20,0	38,0
	40,0	50,0
	60,0	69,0
	80,0	80,0
	100,0	89,0

Количество разрушенных лейкоцитов рассчитывали по формуле:

$$X_{\text{в}} = \frac{(N1 \cdot 100)}{N2}$$

где N1- общее количество лейкоцитов в пробе, N2- количество выживших лейкоцитов.

Получив процентное содержание жизнеспособных лейкоцитов в пробе, рассчитывали процент погибших:

где $X_{\text{в}}$ - количество лейкоцитов «выживших» после обработки ультразвуком, N1- общее количество лейкоцитов в пробе.

Из полученных результатов табл. 13 следует, что ультразвук оказывал значительное влияние на разрушение лейкоцитов, тем самым высвобождая белковые соединения, которые находились в исследуемых клетках.

Таким образом, для разрушения лейкоцитарных клеток и высвобождения пептидных соединений наиболее эффективен ультразвук, используемый при амплитуде 80-100 %.

4.3 Оптимизация условий биотрансформации лейкоцитов под действием ультразвуковых волн

Для разработки технологии получения белково-пептидного комплекса необходимо рассчитать оптимальные условия ультразвуковой дезинтеграции лейкоцитарных клеток. Для проведения математических расчетов по оптимизации необходимо получить уравнение, выражающее влияние на выход продукта биосинтеза двух факторов: z_1 – амплитуда, в диапазоне 60 – 80 %; z_2 – время воздействия, в диапазоне 60 – 90 секунд (табл. 14). В центре плана поставлено три параллельных опыта $m = 3$ и получены следующие значения параметра оптимизации y_u^0 : $y_1^0 = 110$; $y_2^0 = 165$; $y_3^0 = 82,5$.

Табличное значение критерия Стьюдента для уровня значимости $p = 0,05$ и числа степеней свободы $f = 2$ равно $t_p(f) = 4,3$.

Критическое значение критерия Фишера для $p = 0,05$; $f_{ад} = 4$ и $f_{вос} = 2$ равно $F_{кр} = 19,3$.

Таблица 14

Факторы их уровни и интервалы варьирования

Факторы	Нижний уровень	Верхний уровень	Основной уровень, z_0	Интервал варьирования, Δz
z_1	60	80	70	10
z_2	60	90	75	15

Основной уровень и интервал варьирования определяли по формулам

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\max} + z_j^{\min}}{2}; \quad \Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2}.$$

Для математической обработки результатов удобнее перейти к безразмерной системе координат $x_1, x_2, \dots, x_n$ путем следующего преобразования

$$x_j = \frac{z_j - z_j^0}{\Delta z_j}.$$

После преобразования получены следующие данные (табл. 15)

Таблица 15

План полного факторного эксперимента размер таблицы сделать одинаковый с другими.

Факторы	Нижний уровень	Верхний уровень
x_1	-1	1
x_2	-1	1

Количество факторов $k = 2$. Число возможных комбинаций равно $N = 2^k = 2^2 = 4$. План ПФЭ в безразмерном виде с результатами эксперимента приведены в табл. 16.

Таблица 16

**Матрица планирования ПФЭ типа 2^2 с учетом коэффициентов
взаимодействия**

№ опыта	Названия факторов				Параметр оптимизации, МЕ/мл	
	x_0	x_1	x_2	x_{12}	y^3	y_p
1	+1	-1	-1	+1	110	116,875
2	+1	+1	-1	-1	165	158,125
3	+1	-1	+1	-1	85,5	75,625
4	+1	+1	+1	+1	110	116,875

В табл. 17 представлены результаты влияния амплитуды ультразвука и времени воздействия ультразвука на уровень противовирусной активности пептида. Сравнение проводили согласно ОФС.1.7.2.0002.15.

Таблица 17

Результаты влияния факторов оптимизации на параметр оптимизации

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

По результатам табл. 6 можно предположить, что увеличение времени воздействия до 90 сек. (опыт № 2) способствовал увеличению уровня противовирусной активности пептида (в 1,5 раз). При увеличении амплитуды ультразвука до 80% (опыт № 3) уровень противовирусной активности снизился в 1,3 раза. При одновременном увеличении амплитуды ультразвука

до 80 % и времени воздействия до 90 сек. (опыт № 4) уровень специфической активности не изменился по сравнению с образцом № 1.

Далее были определены коэффициенты уравнения регрессии:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2,$$

Коэффициенты уравнения регрессии b_j определяли произведением столбца Y на соответствующий столбец X , деленным на число опытов в матрице планирования N .

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i.$$

Пользуясь планом, представленным в табл. 17, определили коэффициенты линейного уравнения регрессии.

Например, для определения коэффициента b_1 при x_1 необходимо получить сумму произведений:

x_{1i}	y_i	$x_{1i}y_i$
-1	110	-110
1	165	165
-1	82,5	-82,5
1	110	110

$$\sum_{i=1}^N x_{1i} y_i = 82,5$$

$$b_1 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{1i} y_i = \frac{82,5}{4} = 20,625.$$

Аналогично получили $b_0 = 116,875$; $b_2 = -20,625$ и $b_{12} = 6,875$.

Для оценки значимости коэффициентов рассчитали для опытов в центре плана следующие величины:

$$\bar{y}^0 = \frac{\sum_{u=1}^3 y_u^0}{m} = 112 \quad S_{\text{ср}}^2 = \frac{\sum_{u=1}^3 (y_u^0 - \bar{y}^0)^2}{m-1} = 8,5 \quad S_{\text{ср}} = 2,915 \quad s_{b_j} = \frac{S_{\text{ср}}}{\sqrt{N}} = 1,4575$$

Оценили значимость коэффициентов по критерию Стьюдента:

$$t_0 = |b_0|/s_{b0} = |116,875| / 1,4575 = 80,2.$$

Аналогично для остальных:

$$t_1 = 14,15; \quad t_2 = 9,5; \quad t_{12} = 1,375.$$

Сравнивая полученные значения критериев Стьюдента с табличным значением пришли к выводу, что коэффициент b_{12} незначим и его следует исключить из уравнения. После его исключения уравнение регрессии приняло вид

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

Проверили адекватность полученного уравнения по критерию Фишера:

$$S_{ad}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - L} = \frac{189,0625}{4 - 3} = 189,0625; \quad F = S_{ad}^2 / S_{soc}^2$$

где L – число значимых факторов в уравнении регрессии, равное 3.

Тогда $F = 189,0625/18,75 = 10,08$.

Так как $F < F_{кр}$ – уравнение регрессии адекватно.

В ходе проведения планирования эксперимента по влиянию внешних факторов, таких как амплитуда и время воздействия, на биологическую активность пептидных соединений получено уравнение регрессии, которое может быть использовано для расчетов по проведению оптимизации процесса синтеза пептидов под воздействием ультразвука.

Для оптимизации выхода целевого продукта проводили трансформацию методом крутого восхождения. В качестве базового фактора приняли время воздействия. Считая, что в ходе эксперимента интервал варьирования $\Delta z_2 = 15$, приняли шаг движения на крутом восхождении $\Delta z_2^* = 1$, тогда

$$\gamma = \Delta z_j^* / (b_2 \Delta z_2) = 1 / (20,625 \cdot 15) = 0,0033$$

Шаг изменения концентрации на крутом восхождении равен:

$$\Delta z_1^* = \gamma b_1 \Delta z_1 = 0,0033 \cdot 20,265 \cdot 10 \approx 1 \, \%.$$

Здесь $\Delta z_1 = 10$ принято по условиям полного факторного эксперимента.

Расчетные значения критерия оптимальности непрерывно возрастали на крутом восхождении. В отличие от этого экспериментальные значения сначала возрастали, а затем, пройдя через максимум, начинали убывать. Такое расхождение между расчетными и экспериментальными значениями объясняется тем, что в процессе крутого восхождения мы выходим за пределы области адекватности уравнения регрессии.

По результатам проведения оптимизации можно сделать вывод, что при амплитуде воздействия ультразвука 60% и времени воздействия 90 сек. (образец № 2) достигался максимальный уровень специфической активности получаемого в результате биотрансформации лейкоцитов белково-пептидного комплекса. При дальнейшем увеличении амплитуды воздействия ультразвука происходит снижение уровня специфической активности продуцируемых лейкоцитарных полипептидов. Увеличение времени воздействия не является целесообразным, поскольку длительное воздействие ультразвука на клетки млекопитающих и биологически активные молекулы может вызвать необратимые разрушения.

4.4 Разработка условий получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Технологический процесс производства лейкоцитарного пептидного комплекса начинается со вспомогательных работ по подготовке очищенной воды, стерильной посуды, санитарной подготовки помещений, приготовления рабочих растворов.

ТП 4- Выделение лейкоцитов.

Выделение пептидного комплекса проводили из лейкоцитов, освобожденных от примеси эритроцитов.

ТП 4.2. Ресуспендирование клеток

Для проведения ультразвукового облучения полученные ранее лейкоцитарные клетки ресуспендировали в растворе 0,9 % хлорида натрия. Расчет необходимого количества физиологического раствора проводили, исходя из начальной концентрации лейкоцитов.

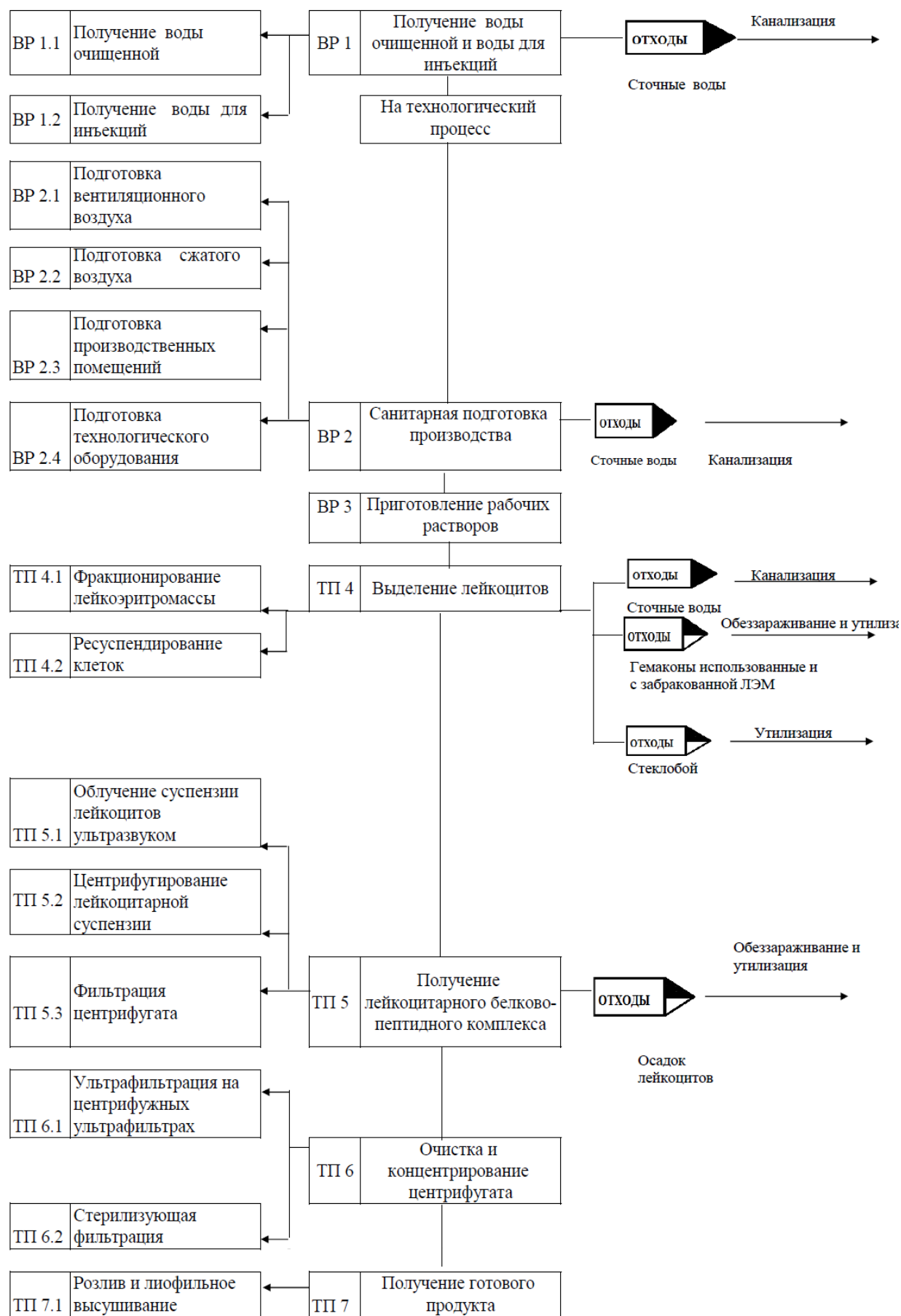


Рисунок 11. Технологическая схема получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

ТП 5 – Получение лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

На этой стадии проводили выделение белковых и пептидных молекул из лейкоцитарных клеток под действием ультразвуковых волн определенной интенсивности.

ТП 5.1. Облучение суспензии лейкоцитов ультразвуком

Суспензию лейкоцитов слегка взбалтывали для равномерного распределения клеток и разливали в открытые емкости. Каждую емкость помещали в водяную рубашку с температурой от 4 до 6 °С, для предотвращения перегрева суспензии. На ультразвуковой установке выставляли необходимые параметры амплитуды и интенсивности ультразвука. Ультразвуковой зонд помещали в емкость с клетками и подвергали облучению в течение необходимого времени.

ТП 5.2. Центрифугирование лейкоцитарной суспензии

Суспензию облученных лейкоцитов подвергали центрифугированию для удаления клеточной стромы. Центрифугирование проводили в течение 10 – 15 мин. при скорости 4100 об./мин. По окончании центрифугирования визуально оценивали степень разделения смеси. При необходимости центрифугирование повторяли. После разделения смеси центрифугат сливали в отдельную емкость, клеточную массу утилизировали. Центрифугат представлял собой смесь выделенных из лейкоцитов белков и пептидов.

ТП 5.3. Фильтрация центрифугата

Полученный центрифугат подвергали стерилизующей фильтрации через мелкопористые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Стерильный фильтрат хранили температуре от 2 до 8 °С.

ТП 6- Очистка и концентрирование центрифугата

Полученный на предыдущей стадии центрифугат подвергали очистке от белковых высокомолекулярных соединений.

ТП 6.1 Ультрафильтрация на центрифужных ультрафильтрах

Для отделения белкового балласта центрифугат подвергали ультрафильтрации с помощью ультрафильтров Амикон Ультра-15 или

аналогичных. Таким образом, одновременно повышали концентрацию целевых продуктов – низкомолекулярных пептидов, обладающих биологической активностью.

ТП 6.2. Стерилизующая фильтрация

Получаемые концентраты подвергали стерилизующей фильтрации на мелкопористых фильтрах с диаметром пор 0,22 мкм.

ТП 7 – Получение готового продукта

ТП 7.1. Розлив и лиофильное высушивание

Во флаконы емкостью 5 мл продукт разливали по 2 мл. Флаконы с продуктом помещали в кассеты, которые сверху накрывали стерильной безворсовой тканью и устанавливали вертикально в сушильный аппарат типа ТГ-50. Кассеты с продуктом подвергали замораживанию при температуре минус 36-40°C в течение 48-72 час. Лиофилизацию проводили в вакуумсушильных аппаратах любой системы. Хранили в сухом, защищенном от света месте при температурах от 4 – 8 °C.

4.5 Характеристика физико-химических свойств ЛБПК

Для доказательства принадлежности полученного в ходе ультразвукового облучения лейкоцитов препарата к антимикробным пептидам необходимо изучить его физико-химические характеристики. В качестве основных определяемых параметров выступили молекулярный состав и размер частиц, проведена оценка влияния физических параметров на свойства ЛБПК.

Известно, что антимикробные пептиды фагоцитов и клеток барьерных эпителиев являются одними из ключевых молекул врожденного иммунитета, обеспечивающих противoinфекционную защиту организма. Наличие в структуре АМП ароматических аминокислот способствует увеличению их антимикробной активности. Это связывают с катионными взаимодействиями, за счет которых положительно заряженные аминокислотные осадки в составе АМП экранируются от гидрофобного липидного окружения, что облегчает встраивание пептида в мембрану [51, 70]. Так, в АМПК синтезируемом

вирусиндуцированными лейкоцитами в процессе интерфероногенеза присутствую тирозин (0,27%) и фенилаланин (2,10%) [12]. В связи с этим выполнен ряд качественных реакций на наличие аминокислот и пептидов. Известно, что биуретовой реакцией обнаруживаются все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза – пептоны и полипептиды [46]. В качестве исходного образца использовали белково-пептидный комплекс, полученный в процессе ультразвуковой обработки лейкоцитов. Результаты качественной оценки представлены в табл. 18.

Таблица 18

Результат проведения качественных реакций на белковые соединения
лейкоцитарного препарата

Характеристика образца до проведения качественной реакции	Результаты качественной реакции	
	Биуретовая реакция	Ксантопротеиновая реакция
Прозрачная жидкость с характерным светло-желтым цветом	Фиолетовое окрашивание	Темно-синее окрашивание

Оценивая результаты проведенного эксперимента можно сказать о том, что пептидные компоненты присутствуют в исследуемом образце, поскольку произошло фиолетовое окрашивание согласно используемой методике (глава 2). Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина, – содержащих в своем составе бензольное ядро.

Согласно представленной методике присутствие ароматических аминокислот в исследуемом образце должно окрашиваться в желтый\оранжевый цвет. Однако, в ходе исследования установлено, что ароматические аминокислоты в анализируемом образце отсутствуют, поскольку образец окрасился в темно-синий цвет.

Полученное предположение было доказано хроматографическим анализом исследуемого образца. Результат представлен на рис. 12.

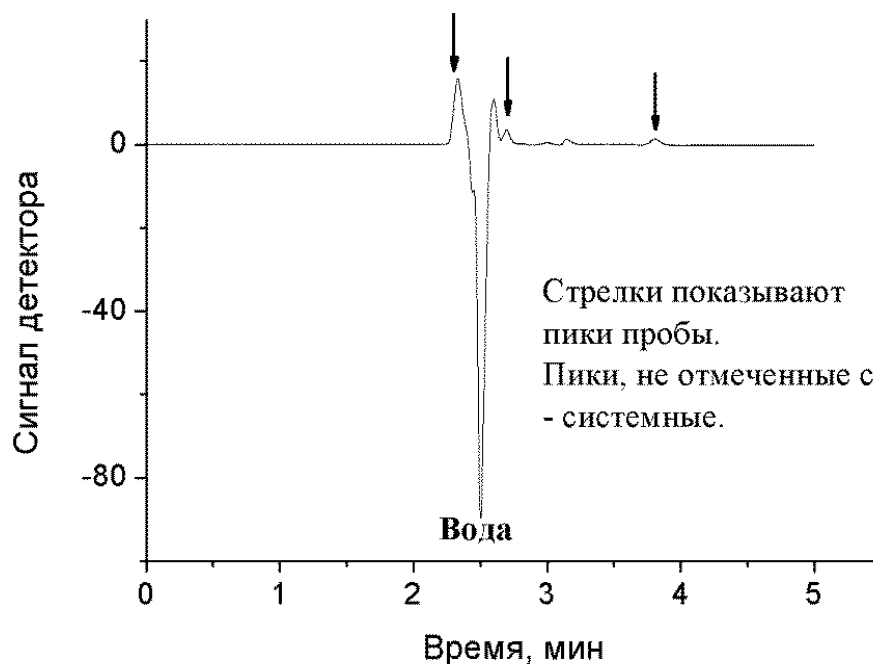


Рисунок 12. Хроматограмма лейкоцитарного полипептида

Компоненты исследуемого образца (3 пика) характеризовались небольшим удерживанием. Основной компонент элюировался до пика растворителя (воды). По результатам хроматограммы можно сделать вывод, что исследуемый образец не содержит в своем составе ароматических аминокислот, а именно фенилаланина, триптофана и тирозина.

Проведенное исследование доказало, что полученные в результате УЗ-обработки лейкоцитов вещества действительно являются пептидами, а также было получено, что лейкоцитарные пептиды не содержат в своем составе ароматических аминокислот.

Определение молекулярной массы лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

Для определения молекулярной массы лейкоцитарного белково-пептидного комплекса, полученного после обработки ультразвуком, нами проведен анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ проводили на образце №1, полученном при следующих параметрах: амплитуда 60 %, время обработки клеток УЗ – 90 сек. 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.

В результате проведения анализа ВЭЖХ были получены результаты, представленные на рис. 13 и табл. 19.

MAU

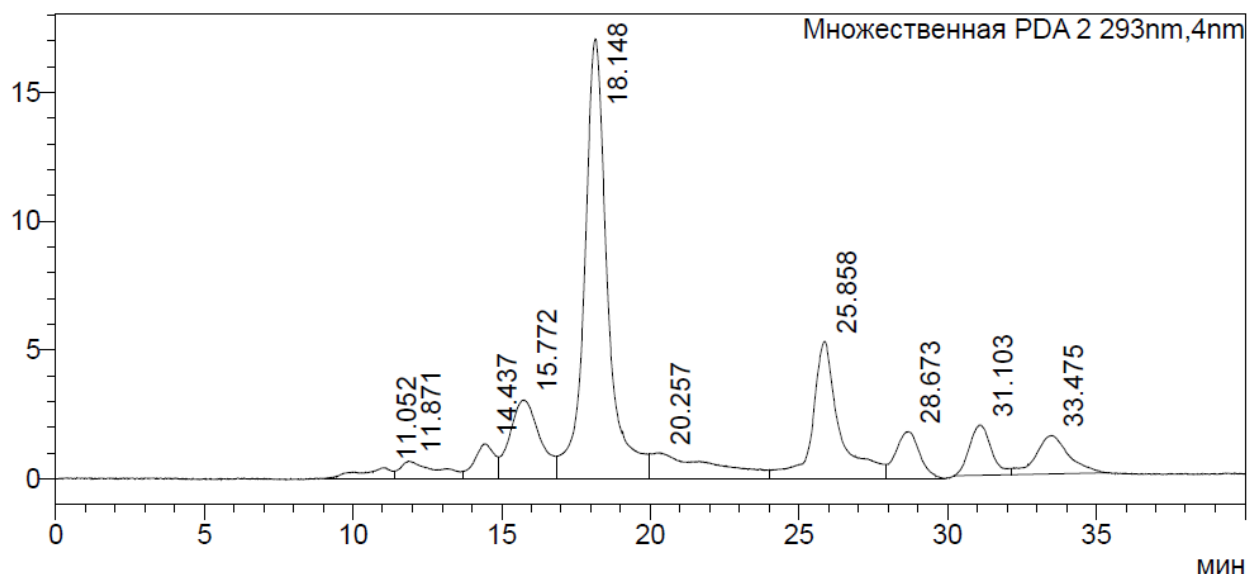


Рисунок. 13. Результаты проведения ВЭЖХ лейкоцитарного белково-пептидного комплекса до очистки (образец №1)

Таблица 19

Молекулярный состав лейкоцитарного белково-пептидного комплекса до очистки (образец №1)

Номер пика	Процентное содержание	Молекулярная масса, кДа
1	3.644	440
2	9.806	От 440 до 158
3	43.583	75
4	26.155	От 43 до 29
5	16.812	Менее 6,5

По полученным результатам следует, что лейкоцитарный белково-пептидный комплекс содержит в своем составе высоко и низкомолекулярные молекулы. Однако, следует заметить, около половины от всего состава (43,583%) составляют молекулы со средней массой (75 кДа) и 42,967% молекулы с массой от 43 до 6,5 кДа.

Из представленных данных следует, что ЛБПК содержит значительное количество белкового балласта. Поэтому, была проведена его очистка методом ультрафильтрации на фильтрах Амикон Ультра-15 "Millipore" (Ирландия). После проведения очистки получен образец №2. Молекулярный состав лейкоцитарного белково-пептидного комплекса определяли методом ВЭЖХ. Результаты представлены на рисунке 14 и табл. 20.

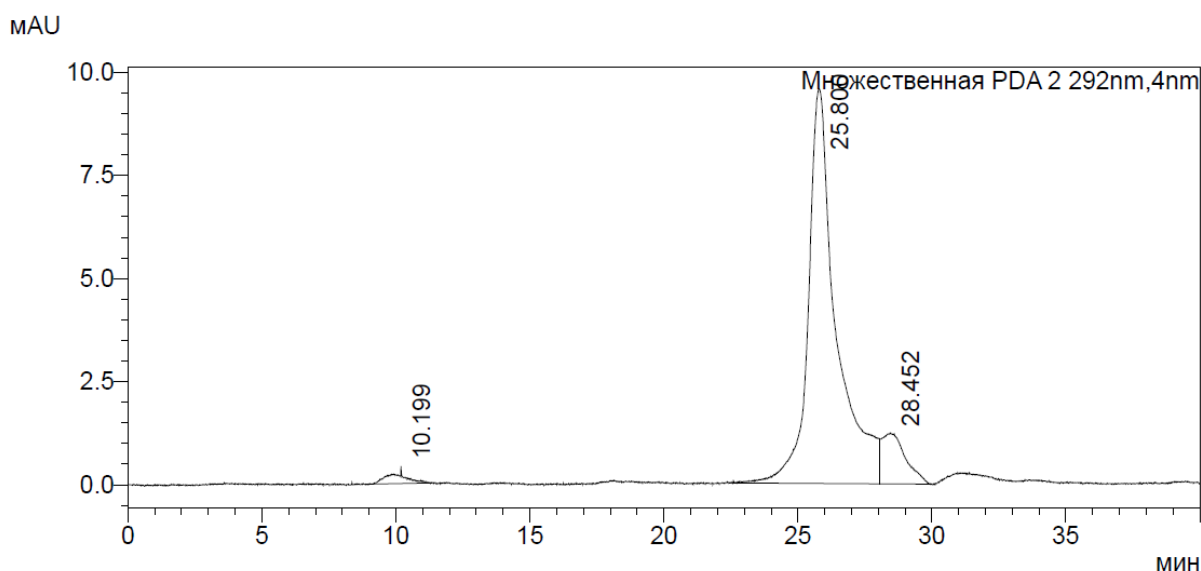


Рисунок 14. Результаты проведения ВЭЖХ лейкоцитарного белково-пептидного комплекса после проведения очистки (образец №2)

Молекулярный состав лейкоцитарного белково-пептидного комплекса
после проведения очистки (образец №2)

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. 10 и 11 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 % соответственно).

Изучение размеров частиц выделенных фракций ЛБПК

Полученный препарат ЛБПК был исследован на определение размеров частиц прибором Zetasizer Nano ZS. Анализатор Zetasizer Nano предназначен для измерения наиболее важных параметров, характеризующих наночастицы, коллоидные системы, белки и полимеры. Данный метод способен на определение размера частиц в диапазоне от 0.3 нм до 10 микрон методом динамического рассеяния света (динамическое светорассеяние, фотонная корреляционная спектроскопия) с использованием технологии NIBS (неинвазивного обратного рассеяния). В результате было показано, что в суспензии присутствуют частицы размером приблизительно 16 нм, о чем свидетельствует пик 2 на рисунке 15.

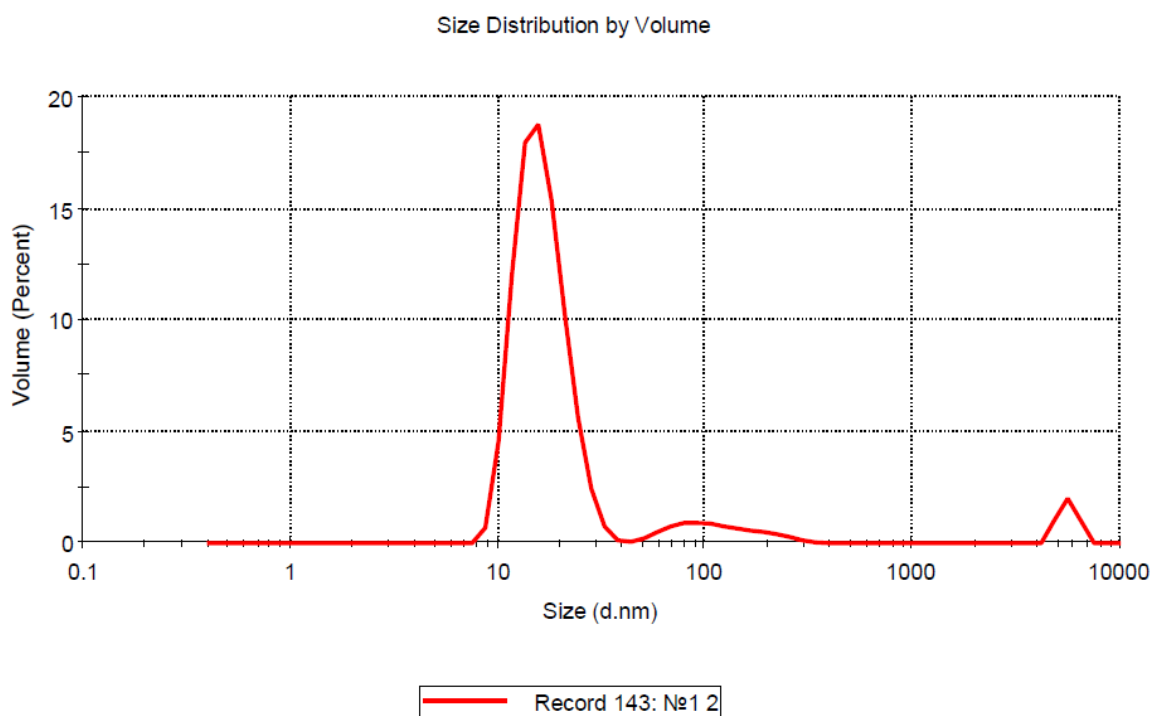


Рисунок 15. Распределение частиц, находящихся в суспензии по размерам

Таблица 21

Результаты измерений частиц в суспензии прибором Zetasizer Nano ZS

№ Пика	Размер частиц (нм)	Объем, %
Пик 1	122,9	7,5
Пик 2	16,51	88,5
Пик 3	5581	4,0

Результаты, представленные в табл. 18 демонстрируют, что 88,5 процентов от общего объема занимают частицы размером 16,51 нм. Частицы подобного размера относятся к полипептидам [46], поэтому можно предположить, что большую часть лейкоцитарного белково-пептидного комплекса занимают именно полипептиды.

Изучение влияния физических параметров на полученный лейкоцитарный белково-пептидный комплекс

Важной характеристикой ЛБПК является его устойчивость к температурным воздействиям. Оценку влияния высоких температур проводили на образце №2 ЛБПК. Для определения физико-химических характеристик полученной субстанции изучено влияние температуры и pH на свойства лейкоцитарного белково-пептидного комплекса. Результаты влияния различных температур представлены в табл. 22.

Таблица 22

Влияние температурной обработки на антибактериальную активность лейкоцитарного БПК

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. 22 можно сделать вывод, что ЛБПК 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 ЛБПК препарата серии № 1. Раствор исследуемого препарата подвергали воздействию 1 М раствора кислоты соляной в диапазоне pH от 6,9 до pH 2,0 и 1 М раствора натрия гидроксида в диапазоне pH от 7,0 до 12,0. Полученные результаты представлены на рис. 16.

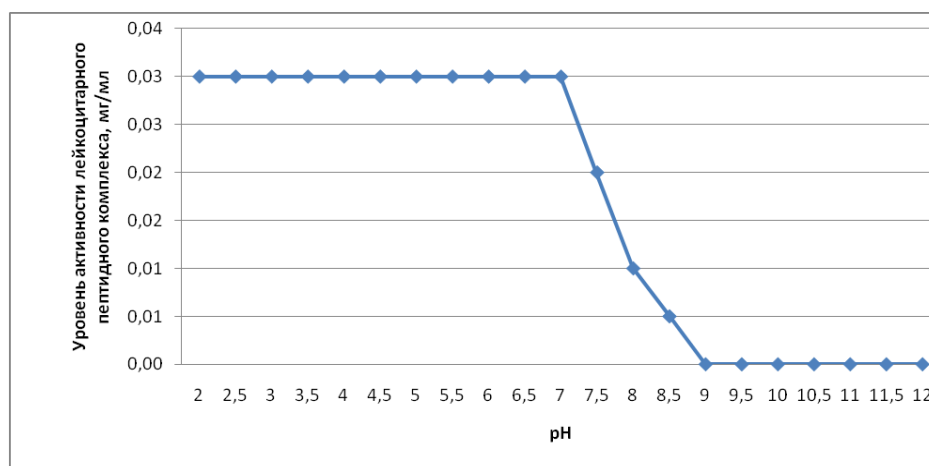


Рисунок 16. Зависимость активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса от значения pH

Как следует из представленных данных на рис. 16, препарат сохранял исходную биологическую активность в диапазоне pH от 2,0 до 7,0 в течение двух часов в условиях комнатной температуры, в то время как при повышении pH до значений 9,0 отмечали резкое падение активности до нуля.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что с применением очистки и концентрирования лейкоцитарного супернатанта повышался выход целевого продукта (низкомолекулярных пептидов) до 99 %; биологическая активность препарата определялась в температурных пределах от 10 до 55 °С и значении pH от 2 до 8,5.

Выводы по главе:

В результате проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. Для максимального выделения белково-пептидных соединений наиболее эффективна ультразвуковая обработки при амплитуде 80-100 % вне зависимости от времени обработки при концентрации лейкоцитов в клеточной суспензии 6,7 млн./мл.

2. Проведенная оптимизация условий биотрансформации лейкоцитов показала, что при амплитуде воздействия ультразвука 60% и времени воздействия 90 секунд достигается максимальный уровень специфической

активности получаемого в результате биотрансформации лейкоцитов белково-пептидного комплекса.

3. С учетом выявленных оптимальных параметров разработана технологическая схема получения лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.

4. Доказана белковая природа полученной лейкоцитарной субстанции. Качественные реакции подтвердили наличие в субстанции белков и пептидов, а так же продуктов их неполного гидролиза.

5. Проведенный анализ ВЭЖХ подтвердил наличие в ЛБПК низкомолекулярных пептидов. Так же с помощью ВЭЖХ была доказана эффективность применения очистки и концентрирования лейкоцитарного супернатанта с повышением выхода целевого продукта (низкомолекулярных пептидов) до 99 %.

6. Определение размеров частиц ЛБПК показало, что большую часть от общего объема субстанции занимают частицы размером 16,51 нм. Частицы подобного размера относятся к полипептидам.

7. При изучении влияния температуры и pH на свойства ЛБПК получено, что биологическая активность препарата определялась в температурных пределах от 10 до 55 °С и значении pH от 2 до 8,5.

ГЛАВА 5. Изучение биологических свойств лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

В последние годы в научно-исследовательской литературе все чаще встречаются сообщения о выделенных из живых организмов пептидах, обладающих антибактериальной активностью. Способность животных противостоять инфицированию микроорганизмами зависит в первую очередь от механизмов, ответственных за распознавание, инактивацию и элиминирование потенциально патогенных микробов. Катионные белки нейтрофилов и макрофагов, локализованные в лизосомах клеток, являются эффекторами кислороднезависимого киллинга бактерий и относятся к факторам неспецифической антибактериальной резистентности макроорганизма [21, 28].

5.1 Изучение антибактериальной активности лейкоцитарных полипептидов

В начале прошлого столетия стало очевидно, что организм млекопитающих обладает способностью к выработке антимикробных соединений. Известно, что антибактериальный фактор, синтезируемый донорскими лейкоцитами в процессе интерфероногенеза под действием вируса-индуктора обладает антимикробным действием на ряд грамположительных и грамотрицательных бактерий [12, 13].

Далее представлен цикл исследований по оценке антибактериальной активности, с учетом, что многие [12] природные пептиды обладают антибактериальной активностью.

После обработки лейкоцитарной суспензии ультразвуковыми волнами получен ряд образцов с характеристиками, представленными в табл. 23.

Определение антибактериальной активности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

№ образца	Время воздействия, сек	Амплитуда воздействия, %	Уровень антибактериальной активности, мг/мл*	
			<i>St. cohnii</i>	<i>E. coli</i>
1	30	60	0,0547	0,875
2	60	60	0,0547	0,875
3	90	60	0,0273	0,219
4	30	80	0,1094	0,875
5	60	80	0,0547	0,437
M±m**			0,060±0,015	0,656±0,155

* - необходимая концентрация пептидного комплекса, при которой прекращается рост тестовых штаммов.

** - Число степеней свободы (f) равно 4. Парный t-критерий Стьюдента равен 4.098. Критическое значение t-критерия Стьюдента при данном числе степеней свободы составляет 2.776. $t_{\text{набл}} > t_{\text{крит}}$, изменения признака статистически значимы.

По результатам проведенных экспериментов видно, что полученный лейкоцитарный препарат обладал антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Наиболее высокую активность проявил образец под номером 3, который выбран для дальнейшей очистки методом ультрафильтрации и концентрирования.

Полученный очищенный образец по технологии описанной в главе 4 данной работы был изучен на антибактериальную активность на штаммах *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885-653, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus vulgaris* №HX 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (глава 2). Ниже представлены результаты определения

антибактериальной активности в отношении родов *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*.

Таблица 24

Чувствительность микроорганизмов к лейкоцитарному пептидному комплексу

Исследованные бактерии	Штамм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл	Контроль	
			Диоксидин (1% раствор)	Флуконазол
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538-P	2,0/2,0	62,5	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	1,0/1,0	500	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	0,25/0,25	31,2	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	62,5/62,5	500	-
<i>Proteus vulgaris</i>	№НХ 19/222	1,0/2,0	7,8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	125/62,5	500	-
<i>Candida albicans</i>	NCTC 885-653	2000/2000	-	2 – >64

Известно, что антимикробные пептиды более активны в отношении грамположительной, нежели грамотрицательной микрофлоры. По результатам, представленным в таблице 24, можно сделать вывод о том, что очищенный ЛБПК обладает высокой антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* и средне выраженной активностью в отношении изученных штаммов *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. Однако, полученный лейкоцитарный белково-пептидный комплекс не обладал фунгицидным действием.

5.2 Оценка противовирусной активности лейкоцитарных полипептидов

Специальный интерес представляют антивирусные свойства пептидов, относящихся к классу дефенсинов. Обладая способностью связывать гликопротеины вирусных оболочек, дефенсины *in vitro* предотвращают заражение клеток вирусами гриппа, герпеса, иммунодефицита человека [44, 53]. В связи с чем, проведен ряд исследований по изучению противовирусных свойств лейкоцитарного белково-пептидного комплекса.

Изучение противовирусной активности проводили согласно методике, указанной в главе 2, с использованием культур клеток путем сравнения протективного действия полученного пептидного комплекса с аналогичным действием международного стандартного образца (МСО).

После обработки суспензии лейкоцитов ультразвуковыми волнами получен ряд образцов с характеристиками, представленными в табл. 25.

Таблица 25

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.

Из приведенных данных табл. 22 и 25 можно сделать вывод, что

оптимальными условиями ультразвуковой обработки лейкоцитов для получения полипептидов с высокой биологической активностью являются время воздействия 90 секунд при амплитуде 60 %.

5.3 Оценка безвредности лейкоцитарных полипептидов

При оценке безвредности фармацевтической субстанции устанавливается характер и выраженность его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности. Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение общетоксического действия и исследование специфических видов токсичности.

Изучение острой токсичности ЛБПК

Изучение острой токсичности проводится для определения влияния однократного введения дозы исследуемого препарата на животных для оценки безвредных, токсических, летальных доз вещества, его способности к кумуляции, а также причин гибели животных.

О токсическом действии потенциальной субстанции лекарственного средства судили по состоянию животных и их выживаемости. Подсчет выживших и погибших животных проводили в течение 14 суток после затравки препаратом с последующим наблюдением.

Для оценки острой токсичности полученного лейкоцитарного белково-пептидного комплекса использовался метод Прозоровского В.В.

Острая токсичность определена в опытах на белых мышах обоего пола массой 24-26 г, содержащихся на обычном рационе вивария. Исследуемое соединение вводили внутрибрюшинно в четырех дозах. Каждой паре вводили одну дозу в порядке возрастания 2500,0 мг/кг; 3160, 0 мг/кг; 3980,0 мг/кг; 5000,0 мг/кг. Для расчета ДЛ₅₀ использовали результаты, полученные на 8 мышах. Препараты перед применением растворяли в физиологическом растворе. Мыши контрольной группы получали экви-объемное количество растворителя. Результаты представлены в табл. 26.

Таблица 26

Оценка острой токсичности лейкоцитарного белково-пептидного комплекса

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

Исследования острой токсичности показали, что испытуемый ЛБПК относится к 6 классу токсичности по классификации К.К. Сидорова и к 4 классу токсичности по ГОСТу 12.1.007-76 (являются малотоксичными).

Исследования специфических видов токсичности проводили на клеточных культурах. Известно, что некоторые антимикробные пептиды, полученные из лейкоцитов животных обладают противоопухолевой активностью [Овчинникова Т.В., 2011]. В связи с этим, нами проведено изучение цитотоксичности полученного ЛБПК.

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. 27.

Таблица 27

Оценка уровня цитотоксичности
лейкоцитарного 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 (меланома)	3155±645	0,7±0,09

Исследования показали, что исследуемый лейкоцитарный белково-пептидный комплекс не проявлял цитотоксического действия в отношении клеток колоректальной карциномы (HCT 116) и меланомы (MS), так как рассчитанные для них концентрации IC_{50} во всех случаях превышали IC_{50} 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 28). Как известно, ИП – безразмерная величина, которая показывает, во сколько раз возросло количество клеток, от изначально засеянного количества [10].

Таблица 28

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

Условия культивирования	Номер пассажа				
	1	2	3	4	Степень увеличения ИП*
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*

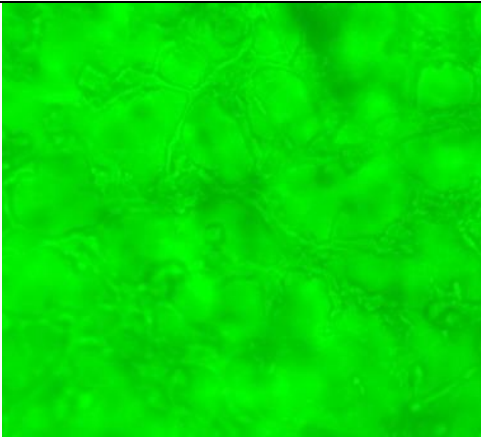
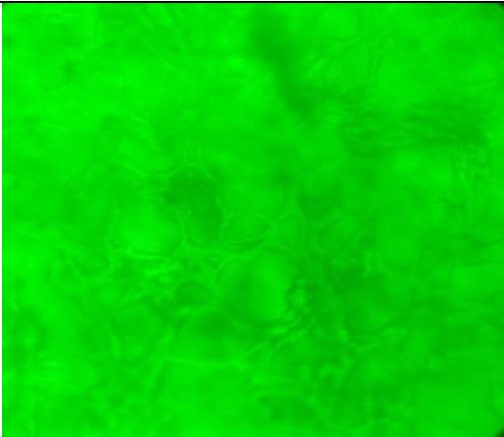
Примечание: * достоверно при $P=0,95$.

Анализ полученных результатов показал, что добавление экспериментального образца ЛБПК в ростовую среду для культивирования клеточной линии *SPEV* благоприятно сказывалось на рост 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.

Проведена оценка морфологии клеточной линии *SPEV*, используемой для оценки ИП исследуемых составов питательной среды (таблица 29).

Таблица 29

Монослой клеток *SPEV*, культивируемых на питательной среде, содержащей 30% лейкоцитарных пептидов от общего объема среды

Монослой клеток <i>SPEV</i> со стандартной питательной средой	Монослой клеток <i>SPEV</i> с 30%-м содержанием лейкоцитарных пептидов в среде
	

Использование лейкоцитарных пептидов в качестве компонента питательной среды при культивировании клеток *SPEV* продемонстрировало хорошие показатели без признаков токсического воздействия среды, сформирован сплошной монослой идентичный контрольной культуре клеток. Добавление лейкоцитарных пептидов в питательную среду не угнетало рост клеточной культуры *SPEV*, а напротив, отмечали нарастание количества клеток. Клетки, культивированные на питательной среде с добавлением 30% ЛБПК, имели правильную округлую форму без признаков деформации.

Выводы по главе:

1. Очищенный ЛБПК обладал высокой антибактериальной активностью в отношении изученных штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* и средне выраженной активностью в отношении изученных штаммов *E. faecalis*, *P. aeruginosa*. При этом, полученный лейкоцитарный белково-пептидный комплекс не обладал противогрибковой активностью.
2. Полученный лейкоцитарный белково-пептидный комплекс обладал умеренной противовирусной активностью.
3. Лейкоцитарный белково-пептидный комплекс не проявляет цитотоксического действия отношении клеток колоректальной карциномы (НСТ 116).
4. Испытуемый ЛБПК относится к 6 классу токсичности по классификации К.К. Сидорова и к 4 классу токсичности по ГОСТу 12.1.007-76 (являются малотоксичными).

ВЫВОДЫ

1. Разработан алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных пептидов: использовать метод цитофереза 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 отсека 15 кДа. Проведенный анализ ВЭЖХ подтвердил наличие в лейкоцитарном белково-пептидном комплексе низкомолекулярных пептидов, с количественным содержанием до 99 %.
4. Лейкоцитарный белково-пептидный комплекс обладает высокой антибактериальной активностью в отношении штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* 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 ГОСТу 12.1.007-76 (является малотоксичным).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Устойчивость к антибиотикам имеет большое социально-экономическое значение и в развитых странах мира рассматривается как угроза национальной безопасности. Болезни, вызванные резистентными штаммами, отличаются более длительным течением, чаще требуют госпитализации и увеличивают продолжительность пребывания больных в стационарах и ухудшают прогноз для пациентов. В течение долгих лет поиск новых препаратов, необходимых для борьбы с бактериальными инфекциями, был сосредоточен на получении новых естественных и искусственных антибиотиков – соединений сложного химического строения [8, 66, 78].

В последние годы в зарубежной литературе все чаще встречаются данные о выделенных из живых организмов пептидах, обладающих антибактериальной активностью [62, 75]. В научной литературе имеются данные о том, что бактерии после их взаимодействия с антибактериальными белками теряют жизнеспособность значительно раньше, чем способность к поглощению кислорода, осуществлению макромолекулярных синтезов [85, 86].

В начале прошлого столетия стало очевидно, что организм млекопитающих обладает способностью к выработке антимикробных соединений. Анализ научной литературы свидетельствует о том, что низкомолекулярные катионные пептиды не обладают негативными свойствами классических антибактериальных препаратов: для них не описаны анафилактические реакции, поскольку они не антигенны [106], к ним практически не вырабатывается устойчивость со стороны микроорганизмов [107]. Использование лейкоцитов млекопитающих в качестве сырьевого источника получения полипептидов весьма актуальное направление в настоящее время. Получаемый при этом препарат обладает антибактериальным эффектом и противовирусным действием, что является несомненным преимуществом при разработке комбинированных терапевтических препаратов. Объектом настоящего исследования явились

донорские лейкоциты человека. Для получения веществ, обладающих предположительно антимикробной активностью, было использовано ультразвуковое воздействие на лейкоцитарные клетки. Ультразвук при определенных условиях может вызывать разрушение клеток, тем самым высвобождая клеточное содержимое наружу [4]. В зависимости от параметров ультразвук может оказывать деструктивное или конструктивное действие на клетки.

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 необходимо проводить 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. 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 снизилась от 200 ГАЕ/мл до 0 ГАЕ/мл.

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 по влиянию внешних факторов – скорости перемешивания среды и концентрации вирусиндуцированных лейкоцитов, на интенсивность процесса синтеза

альфа-интерферона. При этом температура и pH 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 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. Оценку 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»; аналогичное отмечалось и при оценке морфологии клеток, которые не имели видоизмененные формы. Уровень специфической активности полипептидов, синтезированных лейкоцитами, собранных в гемоконтейнеры производителя «Terumo» в 3,4 выше, чем в контейнеры «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.

Следующим этапом исследования явилась разработка технологии новой биологически активной субстанции с использованием ультразвуковой дезинтеграции. Ультразвуковую обработку проводили при следующих условиях: мощность 50 Вт, частота 30 кГц, амплитуда варьировала в пределах от 20 % до 100 %. Продолжительность обработки клеток ультразвуком составила от 30 до 90 сек.

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

Проведены математические расчеты по оптимизации условий ультразвукового воздействия на лейкоцитарные клетки. Полученное уравнение выражало влияние двух факторов – амплитуды воздействия ультразвука и времени воздействия на уровень биологической активности полученных лейкоцитарных пептидов. После проведения расчетов уравнение регрессии приняло следующий вид:

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

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

Из результатов проведения оптимизации был сделан вывод о том, что при амплитуде воздействия ультразвука 60% и времени воздействия 90 сек. достигался 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. 3), 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 ультразвукового облучения лейкоцитарные клетки ресуспендировали в растворе 0,9 % хлорида натрия. На ультразвуковой установке выставляли необходимые параметры амплитуды и интенсивности ультразвука. Ультразвуковой зонд помещали в емкость с клетками и подвергали облучению в течение необходимого времени. Полученную суспензию облученных лейкоцитов центрифугировали, для удаления клеточной стромы. Центрифугат фильтровали через мелкопористые фильтры. Для отделения белкового балласта полученный фильтрат подвергали ультрафильтрации с последующей стерилизующей фильтрацией. Полученный концентрат подвергали лиофильному высушиванию в вакуумсушильном аппарате типа ТГ-50. Продукт хранили в сухом, защищенном от света месте при температурах от 4 – 8 °С.

Далее проведен цикл исследований по оценке физико-химических свойств, выделенного из лейкоцитов человека белково-пептидного комплекса, под действием ультразвуковых волн.

Для определения молекулярного состава лейкоцитарного пептидного комплекса, полученного обработкой препаратов 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. 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% соответственно).

Полученный препарат ЛБПК был исследован на определение размеров частиц прибором Zetasizer Nano ZS. Анализ результатов показал, что в исследуемом препарате присутствуют частицы размером 16,51 нм в количестве 88,5% от общего объема. Частицы подобного размера обычно относятся к полипептидам, поэтому можно предположить, что большую часть лейкоцитарного белково-пептидного комплекса составляют именно полипептиды.

Важной характеристикой лейкоцитарного белково-пептидного комплекса явилась его устойчивость к температурным воздействиям. По полученным результатам, можно сделать вывод, что ЛБПК 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 ЛБПК. Раствор исследуемого препарата закисляли 1 М раствором соляной кислоты в диапазоне pH от 6,9

до pH 2,0 и защелачивали 1 М раствором гидроокиси натрия в диапазоне от 7,0 до 12,0. Как следует из полученных данных, препарат сохраняет исходную биологическую активность в диапазоне pH от 2,0 до 7,0 в течение двух часов в условиях комнатной температуры, в то время как при повышении pH до значений 9,0 отмечается резкое падение активности до нуля.

Для изучения 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* № HX 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.

Лейкоцитарный белково-пептидный комплекс (ЛБПК) 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. По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что полученный пептидный комплекс обладал умеренной противовирусной активностью.

Цитотоксичность ЛБПК исследована *in vitro* на опухолевой линии клеток человека НСТ 116 (колоректальная карцинома) и на культуре клеток человека MS (меланоме) с помощью МТТ-теста. Исследования 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 IC_{50} во всех случаях превышали IC_{50} для препарата сравнения (доксорубина).

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. Исследования острой токсичности показали, что исследуемые лейкоцитарные пептиды относятся к 4 классу токсичности по ГОСТу 12.1.007-76 (т.е. являются малотоксичными).

В ходе проведенного диссертационного исследования разработан алгоритм оптимизации синтеза лейкоцитарных пептидов. Разработана методика ультразвукового воздействия на лейкоцитарные клетки, позволяющая получить белково-пептидный комплекс. Разработана технологическая схема получения лейкоцитарных пептидов. Изучены физико-химические биологические свойства полученных лейкоцитарных пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров А.Е. Катионные антимикробные пептиды системы неспецифической защиты респираторного тракта: дефензины и кателицидины. Дефензины — молекулы, переживающие ренессанс (часть 2) // Здоровье ребенка. 2011. Т. 7. С. 34.
2. Азимова В.Т., Потатуркина-Нестерова Н.И., Нестеров А.С. Эндогенные антимикробные пептиды человека // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 1-1. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=17746> (дата обращения: 30.07.2018).
3. Акопян В.Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами / ред. С. Щукин. М.: МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2005. 224 с.
4. Акопян В.Б., Ершов Ю.А., Щукин С.И. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии: учебное пособие для бакалавриата и магистратуры / Под ред. С. И. Щукина. 2-е изд., испр. и доп. М.: Юрайт, 2017. 223 с.
5. Антибиотикорезистентность: взгляды и практика рекомендаций использования антибиотиков работниками фармации в Узбекистане / Мухсимов Ф. М. [и др.] // Молодой ученый. 2017. №41. С. 25-32. URL <https://moluch.ru/archive/175/45903/> (дата обращения: 25.08.2018).
6. Березняков И.Г. Резистентность к антибиотикам: причины, механизмы, пути преодоления // Клиническая антибиотикотерапия. 2001. №. 4. С. 12.
7. Бочков В.Н. Добровольский А.Б. Клиническая биохимия / ред. В.А. Ткачук. – 2-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР–МЕД, 2004. 512 с.
8. Бриан Л.Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам / Пер. с англ. М.: Медицина, 1984. 272 с.
9. Будихина А.С., Пинегин Б.В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2008. №. 2. С. 31.
10. Бухарин О.В., Черешнев В.А., Сулейманов К.Г. Антимикробный белок тромбоцитов. Екатеринбург: УрОРАН, 2000. 199 с.

11. Влияние антибактериального пептидного комплекса на морфометрические параметры и клеточный состав органов иммунной системы у лабораторных животных / Мелехин С.В. [и др.]// Материалы Международной научно-практической телеконференции «Актуальные проблемы современной науки». Томск, 2012. Т. I. № 1. С. 34-36.
12. Волкова Л.В. Природные α -интерферон и антибактериальный пептидный комплекс: технология получения, новые лекарственные формы, оценка эффективности: дисс. ... док. мед. наук. Пермь, 2004. 287 с.
13. Волкова Л.В. Физико-химическая характеристика низкомолекулярного пептидного комплекса, ассоциированного с интерфероногенезом // Сибирский медицинский журнал. 2004. №2. С. 53-55.
14. Волкова Л.В., Гришина Т.А. Влияние гемопластика различных производителей на продуктивную способность клеток млекопитающих // Биофармацевтический журнал. 2019. Т 11. № 2. С. 8 – 11.
15. Волкова Л.В., Гришина Т.А., Волков А.Г. Низкомолекулярные катионные пептиды лейкоцитов, индуцированные различными антигенами // Химическая технология и биотехнология. Вестник ПНИПУ. 2015. № 4. С. 35-48.
16. Волкова Л.В., Казьянин А.В., Грязнова Д.В. Перспективы использования отходов производства препаратов крови на Пермском НПО «Биомед» // Химическая технология и биотехнология. Вестник Перм. гос. тех. ун-та. 2007. № 7(1). С. 176 – 180.
17. Гаврилов Л.Р., Цирульников Е.М. Фокусированный ультразвук в физиологии и медицине. Л.: Наука, 1980.
18. Гиноман Л.М. Хромотография белков на ионообменниках и фракционирование смесей, содержащих белки, на колонках с сефадексом // Современные методы в биохимии. 1964. Т.1. С. 37-73.
19. ГОСТ 24061-2012. Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги.

20. Дудник Ю.В. Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий // Антибиотики и химиотерапия. 1999. №12. С. 15-18.
21. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор литературы) // Вестник Санкт-Петербургского университета. 2009. №11 (3). С. 78-93.
22. Животная клетка в культуре под. ред. Л.П. Дьяконова, В.И. Ситькова. М.: Спутник+. 2000. 400 с.
23. Заривчацкий М.Ф., Волков А.Г., Коробов В.П. Антимикробные препараты при лечении абдоминальных хирургических инфекций // Пермский медицинский журнал. 2013. №2. Т.30. С. 130-140.
24. Ибрагимова Р.Р., Кузнецов П.А. Проблема антибиотикорезистентности в современном мире // Материалы IX Международной студенческой научной конференции «Студенческий научный форум» URL: <https://scienceforum.ru/2017/article/2017031534> (дата обращения: 30.06.2018).
25. Игнатенко В.А. Механизмы действия ультразвука на белки крови и эритроциты. Автореферат дисс. ... канд. биол. наук. Минск, 1992. 24 с.
26. Изменение микробиоценоза толстого кишечника при воспалительных заболеваниях, вызванных *staphylococcus aureus* / Годовалов А.П. [и др.] // Сборник научных статей участников Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты современной инфектологии». 2016. С. 70-73.
27. Изучение взаимодействия антимикробных пептидов с белками из семейства ингибиторов сериновых протеиназ / Шамова О.В. [и др.] // Фундаментальные исследования. 2011. № 9-2. С. 344-348; URL: <http://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=28158> (дата обращения: 30.07.2018).
28. Ильяшенко М.Г., Тарасова Г.Н., Гусева А.И. Эндогенные антимикробные пептиды и их клинико-патогенетическая значимость при

- воспалительных заболеваниях кишечника // Медицинские науки. 2012. №. 2.
29. Катионные белки из нейтрофилов как ингибиторы неферментативной фибринолитической и антикоагулянтной активности плазмы крови / Кудряшов Б.А. [и др.] // Вопросы мед. химии. 1989. № 3. С. 103- 108.
30. Клональное распространение штаммов *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентов металло-бета-лактамаз на территории Беларуси / Осипов В.А. [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. №4. С. 92-97.
31. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения // СПб: Наука, 1999. 62 с.
32. Кокряков В.Н. Катионные белки лизосом нейтрофильных гранулоцитов при фагоцитозе и воспалении // Вопросы медицинской химии. 1990. Т. 36. №6. С. 13-16.
33. Кокряков В.Н. Очерки о врождённом иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
34. Кулакова Е.В., Елизарова В.М., Пампура А.Н. Эндогенные антимикробные полипептиды - факторы неспецифической защиты организма // Российский стоматологический журнал. 2012. С. 42-45.
35. Культивирование клеток и тканей животных / Дьяконов Л.П. [и др.] // Ставрополь: Ставропольская Правда. 1988. 2 часть. 91 с.
36. Культура животных клеток. Методы. / Под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
37. Металло-бета-лактамазы и другие карбапенемазы экстремальноантибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси / Тапальский Д.В. [и др.] // Здравоохранение. 2017. №3. С. 40-47.
38. Мирошниченко Ю.А., Шестопалов А.В., Смольянинова Л.П. Роль факторов врожденного иммунитета слизистой оболочки репродуктивного тракта // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2013. №. 1. С. 11.

39. Мошев Е.Р. Математическое моделирование процессов и аппаратов химической технологии. Конспект лекций. Перм. гос. техн. ун-т. Пермь. 2003. 83 с.
40. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.
41. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания.
42. Навашин С.М., Сазыкин Ю.О. Антибиотики: новые механизмы передачи резистентности // Антибиотики и химиотерапия. 1998. №. 6. С. 3-6.
43. Некоторые аспекты совершенствования технологии препаратов крови / Петровских В.П. [и др.] // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. 2007. № 2. С.337-339.
44. Овчинникова Т.В. Структурно – функциональное исследование природных пептидных антибиотиков: Автореферат дисс. ... док. хим. наук. Москва, 2011. 77 с.
45. Окороченков С.А., Желтухина Г.А., Небольсин В.Е. Антимикробные пептиды: механизмы действия и перспективы практического применения // Биомедицинская химия. 2012. Т. 58. №. 2. С. 131-143.
46. Определение стерильности лекарственных средств: ОФС. 1.2.4.0003.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. [Электронный ресурс] URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php/>
47. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 536 с.
48. Применение ультразвука в медицине. Физические основы / Пер. с англ.; Под ред. К. Хилла. М.: Мир, 1989. 568 с.
49. Пути совершенствования производства человеческого лейкоцитарного интерферона / Кулагин В.Ф. [и др.] // Вопросы медицинской биотехнологии и иммунопрепаратов: Сб. статей. Уфа. 1988. С. 87-88.

50. Сидоренко С.В. Перспективы в области создания препаратов для лечения инфекций, вызываемых грамположительными микроорганизмами // Антибиотики и химиотерапия. 2000. №. 10. С. 3-4.
51. Симбирцев А.С. Цитокины - новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. 2014. Т. 2002. №. 1. С. 9 – 16.
52. Сипайлова О.Ю., Корнеев Г.И. Исследование противоопухолевой активности тромбодесфинов *in vivo* // Вестник ОГУ. 2009. № 6. С. 344 – 347.
53. Сипайлова О.Ю., Нестеров Д.В. Антимикробные низкомолекулярные пептиды: факторы неспецифической защиты организма животных // Вестник ОГУ. 2013. №12. С. 169-172.
54. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. 358 с.
55. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета / Алешина Г.М. [и др.] // Медицинский академический журнал. 2010. № 4. С. 149-160.
56. Тапальский Д.В., Мозгова А.В., Козлова А.И. Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемрезистентных госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii* // Клиническая инфектология и паразитология. Спецвыпуск в Беларуси. 2014. С. 95- 103.
57. Фадеев С.Б. Изменение способности формировать биоплёнки госпитальными метициллинорезистентными штаммами *Staphylococcus aureus* под действием антибиотиков // Раны и раневые инфекции с конференцией: проблемы анестезии и интенсивной терапии раневых инфекций : материалы 2-го междунар. конгр., Москва, 14–17 окт. 2014 г. – М., 2014. С. 369–371.
58. Хвещук П.Ф., Рудакова А.В. Оптимизация антибактериальной терапии в лечебно-профилактических учреждениях // Военно-медицинский журнал. 2000. Т. 321. № 2. С. 72–76.
59. Шагинян И.А., Дмитриенко О.А. Молекулярная эпидемиология инфекций, вызываемых метициллинустойчивыми стафилококками //

Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2003. № 3. С. 99–109.

60. Шамова О.В. Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов: Дисс. ... док. биол. наук. С.-Петербург, 2013. 343 с.
61. Электрохимический способ получения ферментативных белковых гидролизатов из гидробионтов, используемых для приготовления микробиологических питательных сред / Кучина Ю.А. [и др.] // Вестник МГТУ. 2007. Т. 10. №4. С.628-632.
62. Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate / X. Hao [et al.] // Amino Acids. 2012. - Vol. – 43. - P. 677–685.
63. Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins / B. Ericksen [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005. - Vol. 49. - P. 269–275.
64. Antimicrobial mechanism of pore-forming protegrin peptides: 100 pores to kill *E. coli* / D. Bolintineanu [et al.] // Peptides. 2010. – V. 31. P. 1–8.
65. Antimicrobial peptides: therapeutic potential / S.J. Kang [et al.] // Journal Expert Review of Anti-infective Therapy. 2006. — Vol. 7. — P. 653 – 663.
66. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application / S.J. Kang [et al.] // Archives of Pharmacal Research. 2012. – Vol. 35. – P. 409–413.
67. Antimicrobial properties of amyloid peptides / B.L. Kagan [et al.] // Molecular Pharmaceutics. 2012. – Vol. 9. – P. 708–717.
68. Antimicrobial specificity and mechanism of action of disulfide-removed linear analogs of the plant-derived Cys-rich antimicrobial peptide lb-AMPI / P. Wang [et al.] // Peptides. 2009. — Vol. 30(12). — P. 2144 - 2149.
69. Arnett E. The multifaceted activities of mammalian defensins / E. Arnett, S. Seveau // Current Pharmaceutical Design. 2011. – V. 17. - P. 4254–4269.

70. Baltzer S.A. Antimicrobial peptides – promising alternatives to conventional antibiotics / S.A. Baltzer, M.H. Brown // *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2011. – V. 20. – P. 228–235.
71. Bastian A. Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro / A. Bastian, H. Schafer // *Regulatory Peptides*. 2001. — Vol. 101. — P. 157 - 161.
72. Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin / M. Murakami [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. 2002. — Vol. 119. — P. 1090 - 1095.
73. Colistin and doripenem combinations against *Pseudomonas aeruginosa*: profiling the time course of synergistic killing and prevention of resistance / N. Ly [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015. - Vol.70. – P. 1434-1442.
74. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test / R.L. White // *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1996. - Vol. 40. - P. 1914–1918.
75. Cotter P.D. Bacteriocins: developing innate immunity for food / P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross // *Nature Reviews Microbiology*. 2005. — Vol. 3. — P. 777 - 788.
76. Cyclotides, a novel ultrastable polypeptide scaffold for drug discovery / A. Gould [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. 2011. – Vol. 17. – P. 4294–4307.
77. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gpl20 / S. Liu [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 2005. — Vol. 280. - №12. — P. 11259 - 11273.
78. Effect of Leucine and Lysine substitution on the antimicrobial activity and evaluation of the mechanism of the HPA3NT3 analog peptide / R. Gopal [et al.] // *Journal of Peptide Science*. 2009. — Vol. 15(9). — P. 589 - 594.

79. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: New insight into its potential role in cancer / R.S. Bullard [et al.] // *Molecular Immunology*. 2008. - Vol. - 45. P. 839–848.
80. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nature Reviews Immunology*. 2003. — Vol. 3. — P. 710 - 720.
81. Glycine and histidine-rich antifungal peptides: on the way to the mode of action of shepherin I / C.R. Remuzgo [et al.] // *Peptides 2010: Tales of Peptides. Proceedings of the Thirty-First European Peptide Symposium*. 2010. - P. 414 – 415.
82. Harder J. Human antimicrobial proteins – effectors of innate immunity / J. Harder, R. Glaser, J.M. Schroder // *Journal of Endotoxin Research*. 2007. – V. 13. - P. 317–338.
83. Henriques S.T. Importance of the cell membrane on the mechanism of action of cyclotides / S.T. Henriques, D.J. Craik // *ACS Chemical Biology*. 2012. – Vol. 7. - P. 626–636.
84. Hoskin D.W. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides/ D.W. Hoskin; A. Ramamoorthy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2008. - Vol. 1778. – P. 357–375.
85. Huang L. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human beta-defensin 26 and 27 / L. Huang, S.S. Leong, R. Jiang // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009. - Vol. 84. P. 301–308.
86. Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E. Hancock // *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. — Vol. 19. — No 3. — P. 491 - 511.
87. Keratinocyte production of cathelicidin provides direct activity against bacterial skin pathogens / M.H. Braff [et al.] // *Infection and Immunity*. 2005. - Vol. - 73. P. 6771–6781.
88. Li C.Y. Proline-rich domain of penaeidin molecule exhibits autocrine feature by attracting penaeidin-positive granulocytes toward the wound-induced

- inflammatory site / C.Y. Li, Y.L. Song // Fish Shellfish Immunology. 2010. Vol. 29 — P. 1044 - 1052.
89. Membrane-active peptides as anti-infectious agents / L. Rivas [et al.] // Journal of Applied Biomedicine. 2010. — Vol. 8. — P. 159–167.
 90. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // Journal of Immunological Methods. 1983. - Vol. 65. - P. 55–63.
 91. Novel synthetic, salt-resistant analogs of human beta-defensins 1 and 3 endowed with enhanced antimicrobial activity / O. Scudiero [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2010. — Vol. 54. -P. 2312 - 2322.
 92. Pacidamycin biosynthesis: identification and heterologous expression of the first uridyl peptide antibiotic gene cluster / E. J. Rackham [et al.] // Chembiochem. 2010. — Vol. 11.- P. 1700 – 1709.
 93. Powers J.P. The relationship between peptide structure and antibacterial activity / J.P. Powers, R.E. Hancock // Peptides. 2003. — Vol. 24.- P. 1681 – 1691.
 94. Protection of the oral mucosa by salivary histatin-5 against *Candida albicans* in an *ex vivo* murine model of oral infection / B.M. Peters [et al.] // FEMS Yeast Research. 2010. — Vol. 10. - P. 597–604.
 95. Rahal J.J. Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species* / J.J. Rahal // Clinical Infectious Diseases. 2006. - Vol. 43. - P. 95 – 99.
 96. Salivary defense proteins: their network and role in innate and acquired oral immunity / T.K. Fabian [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. 2012. - Vol. 13. - P. 4295–4320.
 97. Selsted M.E. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response / M.E. Selsted, A.J. Ouellette // Nature Immunology. 2005. — Vol. 6. -P. 551 – 557.

98. Semple F. Beta-defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more / F. Semple, J.R. Dorin // Journal of Innate Immunity. 2012. – Vol. 4. – P. 337–348.
99. Shahnawaz M. Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species / M. Shahnawaz, C. Soto // Journal of Biological Chemistry. 2012. Vol. – 287. P. 11665–11676.
100. The antimicrobial peptide cathelicidin protects the urinary tract against invasive bacterial infection / M. Chromek [et al.] // Nature Medicine. 2006. - Vol. 12. - P. 636–641.
101. The antipathogen activities of eosinophil cationic protein / E. Boix [et al.] // Current Pharmaceutical Biotechnology 2008. - Vol. – 9. P. 141–152.
102. The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro / S.T. Mc Keown [et al.] // Oral oncology. 2006. — Vol. 42. — P. 685 - 690.
103. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections / N.J. Afacan [et al.] // Current Pharmaceutical Design. 2012. – V. 18. – P. 807–819.
104. Two human host defense ribonucleases against mycobacteria, the eosinophil cationic protein (RNase 3) and RNase 7 / D. Pulido [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2013. Vol. – 57. P. 3797–3805.
105. Urban C. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. / C. Urban, N. Mariano, J.J. Rahal // Antimicrobial Agents Chemotherapy. 2010. - Vol. 54. - P. 2732–2734.
106. Wang G. Database-guided discovery of potent peptides to combat HIV-1 or superbugs / G. Wang // Pharmaceuticals. 2013. – Vol. 6. – P. 728–758.
107. Yamasaki K. Antimicrobial peptides in human skin disease / K. Yamasaki, R.L. Gallo // European journal of dermatology. 2008. — Vol. 18. — P. 11-21.

108. Yeaman M.R. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance / M.R. Yeaman, N.Y. Yount // *Pharmacological Reviews*. 2003. — Vol.55 — P. 27-55.
109. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity / M. Zanetti // *Journal of Leukocyte Biology*. 2004. — Vol. 75. — P. 39-48.
110. Zusman O. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems / O. Zusman, T. Avni, L. Leibovici // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013. - Vol. 57. - P. 5104–5111.

ПРИЛОЖЕНИЯ

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. директора по производству
филиала ФГУП «НПО «Микроген»

Минздрава России в г. Пермь

«Пермское НПО «Биомед»

И.А. Бахтин

«6» сентября 2018 г.

АКТ

внедрения в производство филиала ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед» результатов диссертационной работы Гришиной Татьяны Алексеевны «Лейкоцитарный белково-пептидный комплекс: технология ультразвуковой обработки лейкоцитов и оценка его биологических свойств»

Разработан алгоритм оптимизации технологии получения природного интерферона. Изучено влияние внешних физических параметров на синтезируемые полипептиды. Проведено математическое моделирование условий синтеза природных полипептидов лейкоцитарными клетками.

Разработаны проекты нормативной документации на технологию получения природных полипептидов.

Полученные данные по оптимизации технологии апробированы в отделении интерферона, получены экспериментальные серии препарата «Интерферон». Внедрение в производство новой технологии позволит более полно использовать донорское сырье и расширить ассортимент выпускаемых препаратов крови.

Начальник ПТС
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед»



Савченко М.В.

Начальник отделения интерферона
филиала ФГУП «НПО «Микроген»
Минздрава России в г. Пермь
«Пермское НПО «Биомед», к.м.н.



Перевозчикова Е.Н.

Личные подписи Савченко Марины Васильевны и Перевозчиковой Елены Николаевны заверяю:

И.А. Бахтин



09

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2737730

СПОСОБ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ЛЕЙКОЦИТАРНЫХ
БЕЛКОВ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Пермский национальный исследовательский
политехнический университет" (RU)*

Авторы: *Волкова Лариса Владимировна (RU), Гришина
Татьяна Алексеевна (RU), Волков Александр Геннадьевич
(RU)*

Заявка № 2019114590

Приоритет изобретения 13 мая 2019 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 02 декабря 2020 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 13 мая 2039 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев Г.П. Ивлиев