

4
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Вельмовский П.В.

2018

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2018

УДК: 579.861.2-547.96

М.А. Добрынина¹, А.В. Зурочка^{1, 2}, Я.В. Тяпаева^{3,4}, Ю.П. Белозерцева³,
В.А. Гриценко⁴

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА – ZP2 НА РОСТ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ *IN VITRO*

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

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

³ Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

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

Цель. Проанализировать характер влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование клинических штаммов энтеробактерий *in vitro*.

Материалы и методы. Опыты *in vitro* проведены на тест-штаммах *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), а также 24 клинических изолятах энтеробактерий, включая *E. coli* (n=12) и *Klebsiella pneumoniae* (n=12), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, желчи у больных с холециститом и холангитом. В экспериментах использовали синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2, полученный на синтезаторе «Applied Biosystems 430A». Влияние разных концентраций данного пептида (3, 10, 30, 100 и 300 мкг/мл) на рост изученных штаммов бактерий в мясопептонном бульоне (МПБ) определялось путем динамического замера оптической плотности (ОД) бактериальных культур на 0, 2, 4, 6 и 24 часах и расчета Индекса ингибирования их роста. Влияние пептида ZP2 (концентрация 10 мкг/мл) на формирование бактериями биопленок оценивалось по модифицированной методике Stepanovic S. et al. [33].

Результаты. На примере тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P, а также клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* охарактеризованы дозо-зависимые эффекты и видоспецифические особенности действия синтетического пептида ZP2 на рост в МПБ изученных штаммов бактерий. Показана межвидовая и внутривидовая (штаммовая) вариабельность энтеробактерий (*E. coli* и *K. pneumoniae*) по их реакции на воздействие синтетического пептида ZP2 в виде изменения динамики в периодических культурах биомассы бактерий и способности микроорганизмов формировать биопленки.

Заключение. Синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ - ZP2 оказывает на рост энтеробактерий (эшерихии, клебсиеллы) в жидкой питательной среде разнонаправленное (преимущественно ингибирующее) действие, характер и выраженность которого зависят от концентрации вещества, таксономической принадлежности бактерий и фазы развития бактериальных культур, что необходимо учитывать при практическом применении препаратов, содержащих в своем составе указанный пептид (например, косметического средства «Ацеграм»).

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), активный центр, синтетический пептид, антибактериальная активность, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, рост, формирование биопленок.

*M.A. Dobrynina¹, A.V. Zurochka^{1,2}, Y.V. Tyapaeva^{3,4}, Y.P. Belozertseva³,
V.A. Gritsenko⁴*

EVALUATION OF THE EFFECT OF THE SYNTHETIC PEPTIDE OF THE ACTIVE CENTER OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR - ZP2 ON THE GROWTH AND BIOFILM FORMATION OF CLINICAL ISOLATES OF ENTEROBACTERIA IN VITRO

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

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

³ Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

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

Objective. Analyze the nature of the effect of the synthetic peptide of the active center of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) – ZP2 on growth in liquid nutrient medium and biofilm formation of clinical strains of enterobacteria in vitro.

Materials and methods. In vitro experiments were performed on *Escherichia coli* K12 test strains (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), as well as 24 clinical isolates of enterobacteria, including *E. coli* (n=12) and *Klebsiella pneumoniae* (n=12), isolated from purulent wounds in patients with diabetic foot syndrome, vaginal discharge in women with uterine myoma, bile in patients with cholecystitis and cholangitis. In the experiments, the synthetic peptide of the active site GM-CSF – ZP2, obtained on the “Applied Biosystems 430A” synthesizer, was used. The effect of different concentrations of this peptide (3, 10, 30, 100, and 300 µg/ml) on the growth of the studied bacterial strains in the meat-peptone bouillon (MPB) was determined by dynamic measurement of the optical density (OD) of bacterial cultures at 0, 2, 4, 6 and 24 hours and the calculation of the Index of inhibition of their growth. The effect of peptide ZP2 (concentration 10µg/ml) on the formation of biofilms by bacteria was evaluated by the modified method Stepanovic S. et al. [33].

Results. Using the example of test strains *E. coli* K12 and *S. aureus* 209P, as well as clinical strains of *E. coli* and *K. pneumoniae*, the dose-dependent effects and species-specific features of the effect of the synthetic peptide ZP2 on the growth in the BCH of the bacterial strains studied were characterized. The interspecific and intraspecific (strain) variability of enterobacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*) was shown in their response to the effect of the ZP2 syn-peptide as changes in the dynamics in periodic cultures of bacterial biomass and the ability of microorganisms to form biofilms.

Conclusion. The synthetic peptide of the active site GM-CSF - ZP2 has a multi-directional (mainly inhibitory) effect on the growth of enterobacteria (*Escherichia*, *Klebsiella*) in a liquid nutrient medium; it is necessary to take into account in the practical application of preparations containing in their composition the indicated peptide (for example, cosmetic product “Acegram”).

Keywords: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), active center, synthetic peptide, antibacterial activity, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, growth, biofilm formation.

Введение

Энтеробактерии, в том числе эшерихии и клебсиеллы, принадлежат к потенциально патогенным микроорганизмам, входящим в состав кишечного микробиоценоза (как его ассоциативный компонент), и, одновременно, являются доминирующими этиологическими агентами эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний разной локализации, включая нозокомиальные

инфекции, в том числе послеоперационные инфекционные осложнения [1-5]. По данным многочисленных исследований и заключению Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), указанные микроорганизмы часто обладают резистентностью к широкому спектру антибиотиков, что затрудняет эмпирический выбор адекватных лекарственных препаратов для стартовой терапии патологии, ассоциированной с этими возбудителями, и критически снижает ее эффективность [6-8].

Такая ситуация побуждает создавать новые антибиотики и химиотерапевтические средства антибактериальной направленности. Одним из перспективных путей решения данной задачи является использование пептидов естественного или искусственного происхождения, которые проявляют антимикробную активность, в том числе в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [9-12]. При этом некоторые антимикробные пептиды, помимо противобактериальной активности, могут обладать иммуномодулирующими эффектами [13-15].

Последнее в полной мере относится к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2, учитывая, что данный пептид проявляет плеiotропные эффекты, обладая не только иммуностимулирующими и репаративными свойствами, но и антимикробной активностью, в том числе в отношении грампозитивной кокковой флоры (микро- и стафилококки) [16-18]. О влиянии указанного синтетического пептида ZP2 на рост энтеробактерий известно гораздо меньше, хотя в ряде экспериментальных работ показан его ингибирующий эффект на развитие тест-культур *E. coli* в жидкой питательной среде [19, 20], а также охарактеризована чувствительность клинических штаммов клебсиелл и некоторых неферментирующих грамотрицательных бактерий (псевдомонады, ацинетобактерии) к новому косметическому средству «Ацеграм», содержащему в своей основе синтетический пептид ZP2 [21-24].

Кроме оценки ингибирующего воздействия указанного синтетического пептида на рост энтеробактерий, не менее интересным представляется изучение его влияния на способность данных микроорганизмов формировать биопленки, поскольку данное свойство относится к факторам персистенции и адаптации бактерий [25, 26], а его модификация может оказать влияние на течение инфекционно-воспалительного процесса.

В этой связи целью настоящего исследования явился анализ характера

влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) – ZP2 на рост в жидкой питательной среде и биопленкообразование клинических штаммов энтеробактерий *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использованы тест-штаммы *Escherichia coli* K12 (ATCC 25922) и *Staphylococcus aureus* 209P (ATCC 6538-P), а также 24 клинических изолята энтеробактерий, включая *E. coli* (n=12) и *Klebsiella pneumoniae* (n=12), выделенных из гнойных ран у больных с синдромом диабетической стопы, отделяемого влагалища у женщин с миомой матки, желчи у больных с холециститом и холангитом (из коллекции культур микроорганизмов ИКВС УрО РАН). Выделение чистых культур микроорганизмов осуществляли общепринятыми методами, а их видовую идентификацию проводили с использованием официальных биохимических наборов компании Erba Lachema s.r.o. (Чехия) [27, 28].

В экспериментах использован опытный образец синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (химическая формула: THR NLE NLE ALA SER HIS TYR LYS GLN HIS CYS PRO), синтезированного твердофазным способом на синтезаторе «Applied Biosystems 430A» (USA) по методу *in situ* [29].

Изучение влияния *in vitro* синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* и *S. aureus*, а также клинических изолятов энтеробактерий осуществлялось путем инкубации бактериальных культур в течение 24 часов в микроячейках стерильной пластиковой планшеты в присутствии ZP-2. Для этого 25 мкл бактериальной взвеси, содержащей 5×10^8 КОЕ/мл, приготовленной из суточной агаровой культуры бактерий, и 25 мкл раствора с определенной концентрацией ZP-2 (в контроле использовали 25 мкл изотонического раствора NaCl) инокулировали в микроячейки, содержащие 200 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ), с последующей инкубацией в термостате при 37°C. Развитие бактерий в МПБ оценивалось по динамике оптической плотности культуры (ОД, усл. ед.), замеряемой в каждой микроячейке при длине волны (λ) 492 нм на Multiscan Accent (Thermo Labsystems, Финляндия). Измерение ОД культур проводилось на 0 (исходный уровень), 2, 4, 6 и 24 часах инкубации. Каждый вариант опыта и контроля делался в трех повторностях с вычислением средних значений ОД.

Для определения степени влияния ZP2 на рост бактериальных культур

рассчитывали Индекс ингибирования (ИИ) по формуле [30]:

$$\text{ИИ} = \text{ОДк} - \text{ОДо} / \text{ОДк} * 100\%,$$

где ИИ – Индекс ингибирования (%); ОДк и ОДо – оптические плотности контрольной и опытной культур соответственно. Индекс ингибирования бактериальных популяций оценивался на 2, 4, 6 и 24 часах. Чувствительными считались штаммы при ИИ $\geq 5\%$.

Кроме того рассчитывали удельную скорость роста (μ , ч⁻¹) бактерий в МПБ на разных этапах развития бактериальных культур (0-4 и 4-24 часа) по формулам [31]:

$$\mu_{T1-T2} = (\text{LnOD}_{T2} - \text{LnOD}_{T1}) / (T2 - T1),$$

где μ_{T1-T2} – удельная скорость роста (ч⁻¹) бактерий на временном интервале T1-T2 (час); LnOD_{T1} и LnOD_{T2} – натуральные логарифмы оптической плотности (ОД) бульонных культур на соответствующих часах инкубации во временных интервалах: 0-2, 2-4, 4-6 и 6-24 часа.

Изучение влияния синтетического пептида ZP2 на биопленкообразование (БПО) клиническими штаммами энтеробактерий осуществлялось с помощью "планшетного метода" с незначительными модификациями путем их выращивания в стерильной 96-луночной полистироловой планшете [32, по протоколу 33]. Для этого в микроячейки с 225 мкл мясопептонного бульона (МПБ) без синтетического пептида ZP2 (контроль) и с его наличием в концентрации 10 мкг/мл (опыт) вносили 25 мкл взвесей микроорганизмов, приготовленных из суточных агаровых культур бактерий и содержащих 5×10^8 КОЕ/мл. После инкубирования планшет в течение 24 ч при 37°C из лунок удаляли планктонные клетки, отсасывая микропипеткой надосадов; образовавшиеся на дне микроячеек биопленки трехкратно отмывали 300 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера (рН 7,2), фиксировали (подсушивание при 37°C в течение 2 ч) и окрашивали 1% раствором кристаллвиолета (15 мин при комнатной температуре), после чего лунки четырехкратно промывали дистиллированной водой (до ее полного просветления); для экстракции красителя из биопленок в лунки вносили по 200 мкл 96% этанола, выдерживали 30 мин, а затем 150 мкл надосадка отсасывали микропипеткой и переносили в чистую планшету для замера оптической плотности (OD) при длине волны 540 нм с помощью планшетного фотометра Multiscan ascent (Thermo Electron Co., China). Интенсивность окрашивания надосадка, рассчитанная пу-

тем вычитания из значения OD (биопенка) значения OD отрицательного контроля (лунка с МПБ без культуры бактерий), соответствовала степени биопенкообразования (БПО, усл. ед.) исследуемыми культурами энтеробактерий. Эксперименты делали в трех препаративных повторностях, высчитывая средние значения БПО.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с вычислением средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). О достоверности межвидовых отличий судили по критерию Стьюдента - t и/или критерию Манна-Уитни – U [34, 35].

Результаты и обсуждение

Полученные в сравнительных экспериментах *in vitro* данные свидетельствовали, что внесенный в жидкую питательную среду синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 ингибировал рост изученных тест-штаммов бактерий – *E. coli* K12 (АТСС №25922) и *S. aureus* 209P (АТСС №6538-P), дозо-зависимо снижая биомассу опытных культур в процессе развития бактериальных популяций (рис. 1).

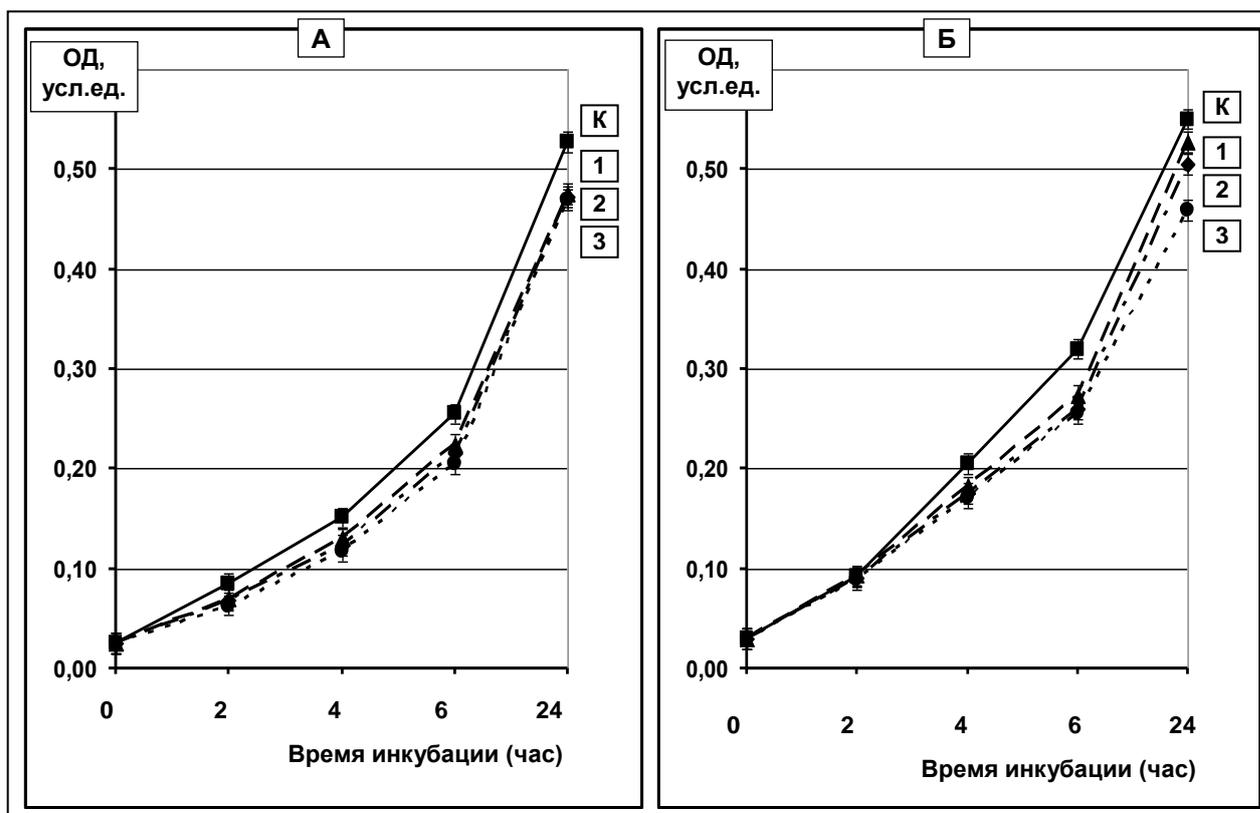


Рис. 1. Рост тест-штаммов *E. coli* K12 (А) и *S. aureus* 209P (Б) в МПБ (ОД, усл. ед.) при разной концентрации ZP2: 1 – 10 мкг/мл; 2 – 30 мкг/мл; 3 – 100 мкг/мл; К – контроль.

При этом характер ингибирующего действия синтетического пептида ZP2 на рост изученных тест-штаммов бактерий зависел от вида микроорганизмов (табл. 1). Отличие, в частности, касалось динамики Индекса ингибирования (ИИ, %) роста *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P в процессе развития контрольных и опытных культур: если у эшерихии максимальные значения ИИ регистрировались на 2 часах от начала культивирования (12,2-34,0%), а затем прогрессивно снижались, достигая к 24 часам минимальных значений (6,9-12,6%), то у золотистого стафилококка ИИ с 2 до 6 часов постепенно нарастал (с 2,3-12,0 до 11,4-25,7% соответственно), а затем к 24 часам снижался (3,2-17,8%).

Подобная закономерность наблюдалась вне зависимости от использованных концентраций синтетического пептида ZP2 и, скорее всего, была связана с видовыми особенностями строения клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий (*E. coli* и *S. aureus*), архитектура и физико-химические свойства которых могут меняться на разных этапах развития периодических культур.

Таблица 1. Индекс ингибирования (ИИ, %) роста в МПБ *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P на разных этапах развития культур в зависимости от концентрации ZP2

Концентрация пептида ZP2 (мкг/мл)	Индекс ингибирования (ИИ, %) пептидом ZP2 роста <i>E. coli</i> K12 и <i>S. aureus</i> 209P в МПБ на разных этапах развития культур							
	<i>E. coli</i> K12				<i>S. aureus</i> 209P			
	2 час	4 час	6 час	24 час	2 час	4 час	6 час	24 час
3 мкг/мл	12,2±0,6*	10,4±0,3	9,2±0,7	6,9±0,3*	2,3±0,6	8,3±1,2	11,4±0,9	3,2±0,8
10 мкг/мл	19,5±1,4*	14,1±1,1	12,0±0,8	10,4±0,3*	3,8±0,9	10,1±1,4	14,2±0,8	4,6±0,3
30 мкг/мл	22,7±1,6*	18,9±0,9*	15,7±1,0	11,0±0,6*	5,4±1,5	13,0±0,9	17,4±0,8	7,8±0,6
100 мкг/мл	26,2±0,8*	22,9±0,5*	19,3±0,7	12,4±1,1*	9,3±0,4	15,0±1,2	20,4±0,9	16,0±0,3
300 мкг/мл	34,0±1,4*	32,8±0,5*	28,8±0,4*	12,6±1,0*	12,0±0,6	22,5±1,1	25,7±0,5	17,8±0,3

Примечание: * - достоверные отличия между *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P (p<0,05).

Следует отметить, что на 6 часах культивирования значения ИИ роста *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P существенно не отличались между собой в диапазоне концентраций пептида ZP2 3-100 мкг/мл, хотя в опытах с более высокой его концентрацией (300 мкг/мл) уровень ингибирования роста кишечной палочки был несколько выше, чем подавление золотистого стафилококка (28,8±0,4 против 25,7±0,5%, p<0,05).

Кроме того необходимо подчеркнуть, что для оценки влияния синтети-

ческого пептида ZP2 на рост микроорганизмов (как эшерихий, так и стафилококков) более предпочтительным временным интервалом является период развития культур с 2 до 6 часов, так как к этому времени нивелируются естественные «погрешности» в количестве инокулируемых бактерий, которые неминуемо сказываются на параметрах бактериального роста на начальных этапах культивирования.

Биомасса бактерий (ОД) и ее динамика в периодической культуре являются производными от такой интегральной характеристики, как удельная скорость роста микроорганизмов (μ , $ч^{-1}$), которая изменяется на разных этапах развития бактериальных популяций в периодических культурах. Как видно из демонстрационных графиков, представленных на рисунке 2, изменение удельной скорости роста в контрольных (без пептида ZP2) и опытных (с пептидом ZP2 в концентрациях 10 и 100 мкг/мл) культурах изученных тест-штаммов бактерий (*E. coli* K12 и *S. aureus* 209P) имело определенные видоспецифические особенности.

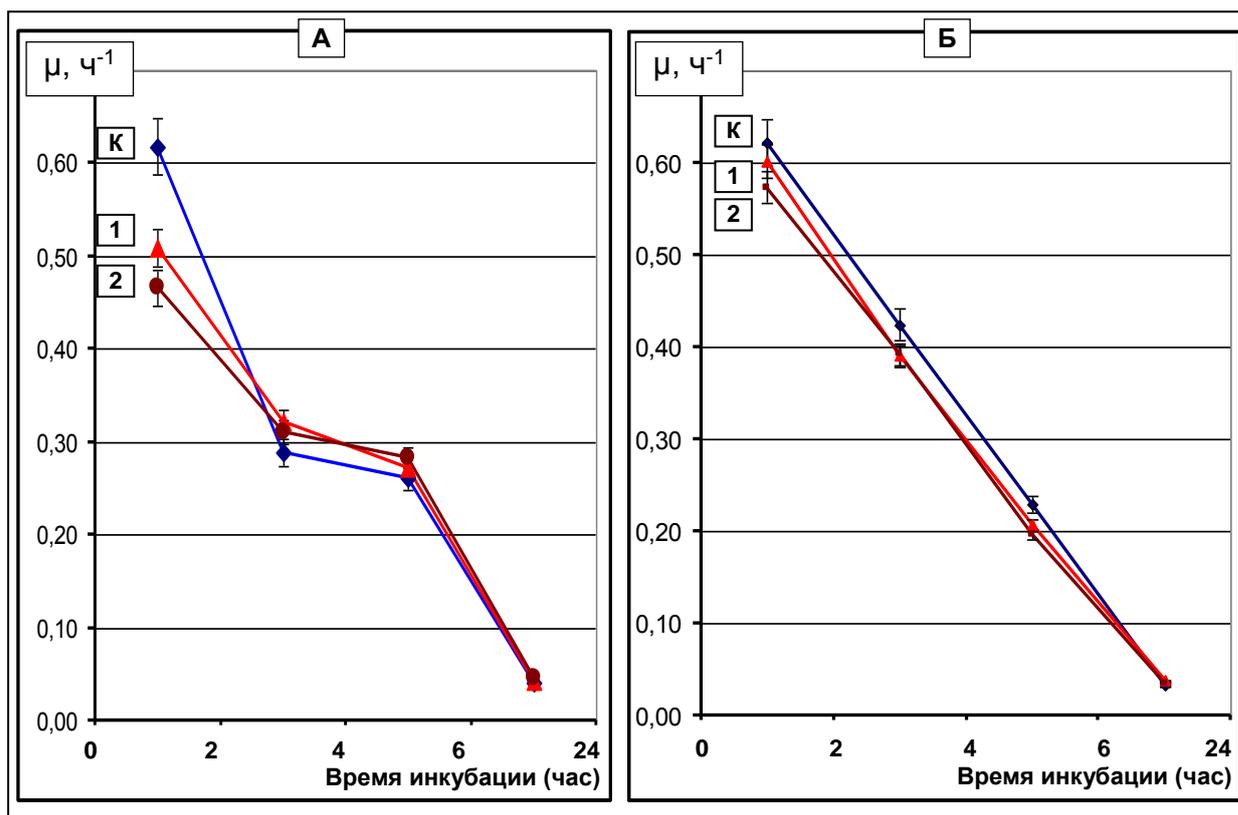


Рис. 2. Удельная скорость роста (μ , $ч^{-1}$) *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P в МПБ на разных этапах развития культур в зависимости от концентрации пептида ZP2: К (синяя линия) – контроль; 1 (красная линия) – 10 мкг/мл; 2 (коричневая линия) – 100 мкг/мл.

Так, на начальном этапе культивирования (0-2 час) удельная скорость роста (μ_{0-2}) *E. coli* K12 в контроле была в 1,12-1,51 раза выше, чем в опытах с градиентом концентраций пептида ZP2 3-300 мкг/мл ($0,62 \pm 0,04$ против $0,55-0,41$ ч⁻¹, $p < 0,05$), однако уже на следующих временных интервалах развития культур (2-4 и 4-6 час) удельные скорости роста эшерихий в экспериментальных культурах не только выравнивались с показателями контрольных проб, но даже несколько их превышали ($0,30-0,32$ и $0,27-0,29$ ч⁻¹ против $0,29 \pm 0,01$ и $0,26 \pm 0,01$ ч⁻¹ соответственно, $p > 0,05$). В то же время в экспериментах с *S. aureus* 209P удельная скорость роста золотистого стафилококка в опытных культурах была снижена на всех начальных этапах развития (0-6 часов) в сравнении с контролем, и особенно заметно – во временных интервалах 2-4 и 4-6 часов (соответственно на 7,5-14,9 и 7,3-14,4%).

Характер выявленных особенностей влияния синтетического пептида ZP2 на рост тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P, помимо прочего, указывал на то, что клетки кишечной палочки, взятые из «стационарной» (суточной) агаровой культуры проявляли более выраженную чувствительность к антибактериальному действию данного пептида, чем клетки золотистого стафилококка.

Учитывая известные данные об ингибирующем действии синтетического пептида ZP2 на способность клинических изолятов стафилококков образовывать биопленки [36], важным представлялось оценить его влияние на биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12.

В серии специальных экспериментов *in vitro* было установлено, что синтетический пептид ZP2 в диапазоне изученных концентраций (3-300 мкг/мл) дозо-зависимо снижал способность эшерихий формировать биопленки (рис. 3). Как видно из представленной на рисунке диаграммы, в опыте достоверное снижение биопленкообразования тест-штаммом кишечной палочки (на 10,3% от контроля, $p < 0,05$) наблюдалось уже при концентрации синтетического пептида ZP2 10 мкг/мл, которое по мере увеличения в питательной среде концентрации пептида возрастало, достигая максимальных значений (снижение на 28,4%, $p < 0,05$) при концентрации 300 мкг/мл.

Анализ взаимосвязи уровня БПО эшерихиями с биомассой (ОД) микроорганизмов на 24 часах показал прямую зависимость с относительно высоким коэффициентом корреляции ($r=0,89$) между указанными параметрами бактериальных культур.

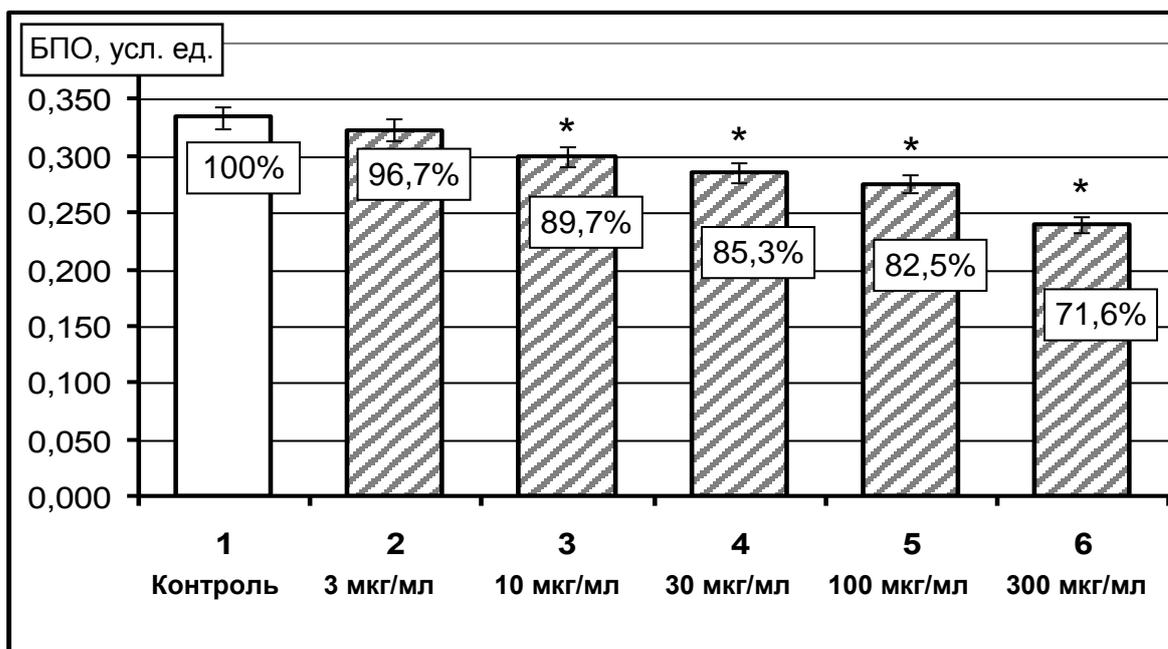


Рис. 3. Биопленкообразование (БПО, усл. ед.) тест-штаммом *E. coli* K12 в зависимости от концентрации пептида ZP2: 1 – Контроль; 2 – 3 мкг/мл; 3 – 10 мкг/мл; 4 – 30 мкг/мл; 5 – 100 мкг/мл; 6 – 300 мкг/мл. * - достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$).

На заключительном этапе исследования было решено изучить влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в концентрации 10 мкг/мл на рост и БПО клинических штаммов энтеробактерий (эшерихии и клебсиеллы). Выбор этой концентрации пептида ZP2 был обусловлен несколькими моментами: во-первых, вышеприведенными результатами, указывающими на то, что она является минимально, но достоверно действующей на тест-штамм *E. coli* K12; во-вторых, известными экспериментальными данными о влиянии этой концентрации пептида ZP2 на рост клинических штаммов стафилококков и их биопленкообразование [17, 20, 36]; в-третьих, имеющейся информацией о ее репарационном действии и эффективной иммуотропной активности в отношении разных иммунокомпетентных клеток [18, 21, 23].

Эксперименты *in vitro* показали, что синтетический пептид ZP2 в концентрации 10 мкг/мл существенно подавлял рост к 4 и 6 часам инкубации примерно у половины (58,3 и 50,0% соответственно) клинических штаммов *E. coli* и у трети (33,3%) клинических изолятов *K. pneumoniae* (табл. 3). При этом Индексы ингибирования роста клинических штаммов энтеробактерий вне зависимости от изученных видов колебались в широком диапазоне (от -11,0 до +20,8%), что определяло низкие средние значения в изученных выборках изолятов эшерихий и клебсиелл (3,0-3,5 и 1,8-2,4% соответственно) и, кроме того,

свидетельствовало о внутривидовом (межштаммовом) разнообразии энтеробактерий по уровню их чувствительности к синтетическому пептиду ZP2.

Таблица 3. Показатели чувствительности клинических штаммов энтеробактерий к синтетическому пептиду ZP2 в концентрации 10 мкг/мл

Анализируемые показатели	Показатели чувствительности энтеробактерий к пептиду ZP2 на разных этапах развития культур			
	<i>Escherichia coli</i> (n=12)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=12)	
	4 час	6 час	4 час	6 час
Диапазон ИИ (%)*; min – max	-11,0 – 12,3	-12,4 – 20,8	-7,1 – 11,7	-6,5 – 11,8
Среднее значение ИИ (%) в выборке штаммов	3,5±1,8	3,0±2,4	1,8±1,6	2,4±1,5
Доля чувствительных штаммов, %	58,3±14,9	50,0±15,1	33,3±14,2	33,3±14,2
Диапазон ИИ (%) в группе чувствительных штаммов; min – max	5,0 – 12,3	5,0 – 20,8	5,1 – 11,7	5,1 – 11,8
Среднее значение ИИ (%) в группе чувствительных штаммов	7,2±1,0	9,1±2,6	8,1±1,6	8,5±1,5

Примечание: * - ИИ – индекс ингибирования роста бактерий (%).

Анализ особенностей подавления синтетическим пептидом ZP2 роста штаммов энтеробактерий из группы чувствительных бактериальных изолятов (то есть тех, у которых ингибирующий эффект превышал 5%) показал, что средние значения ИИ роста клинических штаммов эшерихий и клебсиелл на 4-6 часах между собой существенно не отличались (7,2-9,1 и 8,1-8,5% соответственно), но были в 1,32-1,98 раза ниже, чем аналогичные параметры тест-штамма *E. coli* K12 (табл. 2).

Наличие отрицательных значений Индекса ингибирования роста на 4 и 6 часах, зафиксированные у небольшого числа изученных клинических штаммов эшерихий и клебсиелл (у 8,3±8,3%), указывало на то, что в использованной концентрации (10 мкг/мл) синтетический пептид ZP2 способен оказывать не только ингибирующее, но и стимулирующее действие на отдельные клинические изоляты энтеробактерий. Аналогичный (стимулирующий) эффект синтетического пептида ZP2 ранее был описан при изучении его влияния на рост в жидкой питательной среде микрококка [16]. Подобное действие могут ока-

зывать и иные антибактериальные вещества, например, лейкоцитарный катионный пептид «Интерцид», в присутствии которого тест-штамм *E. coli* K12 демонстрировал более высокий темп роста на ранних стадиях развития культуры в сравнении с контролем [37].

Таким образом, представленные данные свидетельствовали о том, что синтетический пептид активного центра ГМ-КСФ – ZP2 в относительно низкой концентрации (10 мкг/мл) на 4 и 6 часах роста энтеробактерий в периодических культурах оказывал на них ингибирующее действие, которому было подвержено от 33,3% изолятов клебсиелл до 58,3% штаммов эшерихий.

При оценке влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (в концентрации 10 мкг/мл) на способность клинических штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* формировать биопленки было установлено, что в изученных выборках бактериальных изолятов имеется 3 группы: 1 группа – штаммы, у которых наблюдалось снижение БПО больше, чем на 5% от контрольных значений; 2 – «индифферентные» штаммы, то есть без существенного изменения у них этого показателя (отклонение от контроля менее 5%); 3 – штаммы, у которых БПО увеличивалось на 5% и более относительно контроля (рис. 4).

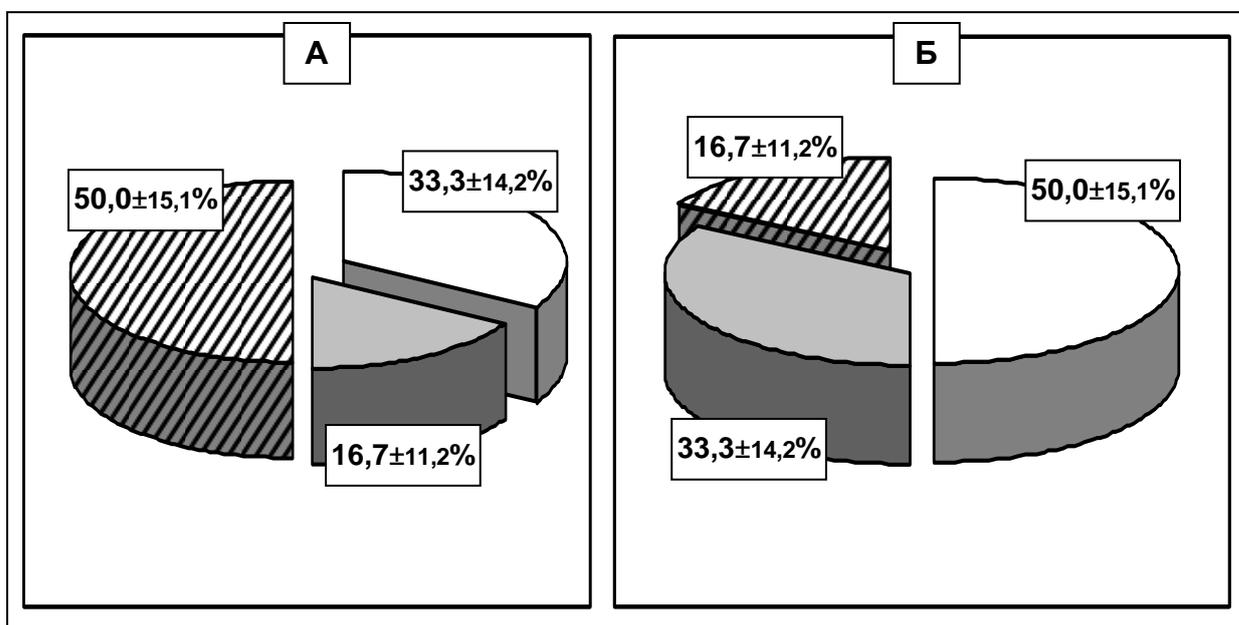


Рис. 4. Структура штаммов *E. coli* (А) и *K. pneumoniae* по эффектам пептида ZP2 на их БПО: белый сектор – ингибирование; серый сектор – индифферентность; заштрихованный сектор – стимулирование.

Как видно из представленных на рисунке диаграмм, в выборках изученных клинических штаммов энтеробактерий размеры соответствующих групп изолятов и их соотношение между собой зависели от видовой принадлежности

микроорганизмов. Так, среди эшерихий группа штаммов, у которых синтетический пептид ZP2 подавлял образование биопленок, включала $33,3 \pm 14,2\%$ изолятов, в то время как в выборке клебсиелл доля таких изолятов была в 1,5 раза больше и составила $50,0 \pm 15,1\%$. Индифферентно реагирующие на пептид ZP2 штаммы среди клебсиелл встречались в 2 раза чаще, чем среди эшерихий ($33,3 \pm 14,2$ против $16,7 \pm 11,2\%$), тогда как доля штаммов, у которых увеличивалась БПО, была, наоборот, в 3 раза меньше, чем в выборке эшерихий ($16,7 \pm 11,2$ против $50,0 \pm 15,1\%$, $p < 0,05$).

Эти данные указывают не только на внутривидовое (межштаммовое) разнообразие клинических изолятов эшерихий и клебсиелл, но и на наличие выраженных межвидовых отличий энтеробактерий по их реакции (в данном случае в виде изменения у них способности формировать биопленки) на действие синтетического пептида ZP2, причины и механизмы которых предстоит выяснить в дальнейших исследованиях.

Возможно, это каким-то образом связано с исходными различиями эшерихий и клебсиелл в способности к БПО, так как в контроле клебсиеллы формировали в 1,5 раза более выраженные биопленки, чем эшерихии ($0,37 \pm 0,02$ против $0,25 \pm 0,05$ усл. ед., $p < 0,05$).

Кроме того нами было замечено, что ингибирующий или стимулирующий эффекты синтетического пептида ZP2 на способность эшерихий формировать биопленки зависели от исходных значений БПО клинических штаммов *E. coli* в контроле, о чем свидетельствовали относительно высокие коэффициенты корреляции между соответствующими показателями ($r = 0,89$ и $r = -0,74$).

Заключение

Полученные результаты интересны в нескольких аспектах.

Анализируя представленные сравнительные данные о влиянии синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (в диапазоне концентраций 3-300 мкг/мл) на развитие бактериальных популяций тест-штаммов *E. coli* K12 и *S. aureus* 209P, необходимо подчеркнуть, что при общем дозозависимом антибактериальном действии данного пептида на указанные микроорганизмы имеются его видоспецифические особенности, которые отчетливо выявляются при оценке динамики таких интегральных показателей, как Индекс ингибирования (%) и удельная скорость роста ($ч^{-1}$) кишечной палочки и золотистого стафилококка в периодических культурах. Очевидно, вышеописанные видовые/родовые отличия динамики указанных показателей, на

которые раньше мы уже обращали внимание при оценке действия синтетического пептида ZP2 на музейные штаммы грампозитивных кокков разной видовой принадлежности (*Micrococcus luteus* var. *lysodeikticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*) [16], обусловлены, с одной стороны, особенностями строения клеточных стенок кишечной палочки и золотистого стафилококка как грамотрицательного и грамположительного микроорганизмов, а с другой стороны, теми изменениями поверхностных структур (химический состав, степень гидрофильности/гидрофобности, архитектура макромолекул и др.) бактерий, которые они претерпевают в процессе периодического культивирования на разных этапах развития бактериальных популяций – от лаг-фазы до стационарной фазы [38-40].

Иначе говоря, имеется определенная видоспецифичность ингибирующего действия синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на микроорганизмы, которая не является его исключительной прерогативой, поскольку известно, что интерлейкин 26 способен подавлять рост *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), некоторых штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae*, но не *Enterococcus faecalis* [41], причем эффективная его концентрация в отношении *E. coli* была в 2,5 раза выше, чем в опытах с *S. aureus*. Кроме того в недавней работе с использованием IFN- β , спирали 4 как части молекулы IFN- β и ее синтетического аналога было показано их антимикробное действие на *S. aureus*, но не на грамотрицательные бактерии (в частности *E. coli*) [42].

Наши результаты и имеющиеся немногочисленные литературные данные указывают на то, что некоторые цитокины и их активные центры в макроорганизме выполняют не только иммунорегуляторную сигнальную функцию (хотя, очевидно, она является ведущей), но и способны непосредственно участвовать в киллинге бактерий, формируя совместно с рядом хемокинов семейство киноцидинов, обладающих противомикробными свойствами [42].

В этом плане интересны полученные данные об ингибирующем действии синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических штаммов энтеробактерий разной видовой принадлежности, которые, с одной стороны, подтверждали его видо- и родоспецифические эффекты, а с другой – указывали на внутривидовую (межштаммовую) вариабельность эшерихий и клебсиелл по их реакции на воздействие указанного пептида.

Эти экспериментальные результаты дополняют ранее опубликованные данные [24] об ингибирующем влиянии синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 (в составе косметического препарата «Ацеграм») на рост грамотрицательных бактерий, в том числе *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae*, и расширяет спектр клинического применения препаратов, включающих указанный пептид.

(Работа выполнена по темам из Плана НИР ИИФ УрО РАН «Фармакологическая коррекция нарушений физиологических функций»; Рег. № НИОКТР АААА-А18-118020690020-1, Рег. № ИКРБС АААА-Б18-218122490065-4 и Плана НИР ИКВС УрО РАН «Эндогенные бактериальные инфекции: возбудители, факторы риска, биомаркеры, разработка алгоритмов диагностики, лечения и профилактики; № гос. рег. 116021510075)

ЛИТЕРАТУРА

1. Гриценко В.А., Ляшенко И.Э., Гордиенко Л.М., Вялкова А.А., Бухарин О.В. Информативность маркеров персистенции *Escherichia coli* при бактериологической диагностике хронического пиелонефрита у детей. Журн. микробиол. 1996. 3: 80-83.
2. Гриценко В.А., Брудастов Ю.А., Шухман М.Г., Данилова М.Ф., Сапрыкин В.Б. Характеристика энтеробактерий, выделенных от больных с урогенитальной патологией. Журн. микробиол. 2001. 4: 107-111.
3. Иванов Д.В., Крапивина И.В., Галева Е.В. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, этиология, антибактериальная терапия и профилактика. Антибиотики и химиотерапия. 2005. 50(12): 19-28.
4. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D. et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. Clinical Infectious Diseases. 2008. 46: 155-164.
5. Гриценко В.А., Иванов Ю.Б. Роль персистентных свойств в патогенезе эндогенных бактериальных инфекций. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. 2 (25): 35-39.
6. Мругова Т.М., Качалова И.В. Особенности таксономической структуры и резистентности к антибиотикам микрофлоры, изолированной от больных в многопрофильном хирургическом стационаре. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2. 12с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>).
7. Leopold S. J., van Leth F., Tarekegn H., and Schults C. Antimicrobial Drug Resistance Among Clinically Relevant Bacterial Isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014. 69(9): 2337-2353.
8. WHO: First ever list of antibiotic-resistant "priority pathogens". GENEVA, 2017 (URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>).
9. Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб.: Наука, 1999. 162 с.
10. Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nat. Rev. Microbiol. 2003. 1 (1): 65-70 (DOI: 10.1038/nrmicro727).
11. Finlay B.V., Hancock R.E.W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? Nat. Rev. Microbiol. 2004. 2: 497-504 (DOI: 10.1038/nrmicro908).
12. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? Nat. Rev. Microbiol. 2005. 3: 238-250 (DOI:10.1038/nrmicro1098).
13. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
14. Vasilchenko A.S., Vasilchenko A.V., Pashkova T.M., Smirnova M.P., Kolodkin N.I., Ma-

- nukhov I.V., Zavilgelsky G.B., Sizova E.A., Kartashova O.L., Simbirtsev A.S., Rogozhin E.A., Duskaev G.K., Sycheva M.V. Antimicrobial activity of the indolicidin derived novel synthetic peptide In-58. *J. Pept. Sci.* 2017. 23: 855-863 (DOI: 10.1002/psc.3049).
15. Бибикова М.В., Егоров А.М., Катлинский А.В. Природные пептиды с антимикробным и иммуномодулирующим действием. *Антибиотики и химиотерапия.* 2005. 50 (8-9): 57-66.
 16. Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зурочка А.В., Гриценко В.А. Особенности влияния синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ на рост грамположительных кокков *in vitro*. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2015. 1: 1-10 [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-1/Articles/VAZ-2015-1.pdf>).
 17. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П. Анализ чувствительности клинических изолятов стафилококков к синтетическому пептиду активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9 (18). 3(1): 82-85.
 18. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Гриценко В.А., Тяпаева Я.В., Черешнев В.А. Феномен наличия уникальной комбинации иммунобиологических свойств у синтетического аналога активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2016. 2: 30с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).
 19. Добрынина М.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Гриценко В.А. Сравнительный анализ влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 на рост музейных культур бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia in vitro*. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2015. 2: 1-10 [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-2/Articles/DMV-2015-2.pdf>).
 20. Зурочка А.В., Гриценко В.А., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Зуева Е.Б. Влияние синтетического пептида активного центра ГМ-КСФ – ZP2 на кинетику развития популяций грамположительных кокков и энтеробактерий в культуре. *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9 (18). № 2(2): 30-35.
 21. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания лекарств нового поколения с комбинированными эффектами. *Российский иммунологический журнал.* 2016. Т. 10 (19). 2(1): 433-435.
 22. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Зуева Е.Б., Добрынина М.А., Дукардт В.В., Гриценко В.А. Синтетический пептид активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами – АЦЕГРАМ-ГЕЛЬ и АЦЕГРАМ-СПРЕЙ. *Российский иммунологический журнал.* 2016. Т. 10 (19). 3: 269-272.
 23. Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Дукардт В.В., Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Гриценко В.А. Исследование спектра иммунобиологической активности синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) как основа для расширения возможностей создания косметических средств нового поколения с комбинированными эффектами. *Российский иммунологический журнал.* 2017. Т. 11 (20). 3: 377-380.
 24. Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Мругова Т.М., Гриценко В.А. Антибактериальная активность косметического средства «Ацеграм» в отношении грамотрицательных бактерий. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2017. 4. 13с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/VAG-2017-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2017-00030.

25. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 49-79.
26. Бухарин О.В. Инфекционная симбиология. *Журн. микробиол.* 2015. 4: 4-9.
27. Приказ МЗ СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». М., 1989. 126 с.
28. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. М.: Медицина, 1982. 464с.
29. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Суховой Ю.Г. и др. Иммунотропные и биологические эффекты синтетических пептидов активного центра ГМ-КСФ. *Вестник уральской медицинской академической науки.* 2011. 2/2 (35): 23-24.
30. Бухарин О.В., Гриценко В.А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка «Интерцид» на *Escherichia coli*. *Антибиот. и химиотер.* 2000. 45 (1): 16-20.
31. Шлегель Г. *Общая микробиология.* М.: Мир, 1987. 567 с.
32. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985. 22: 996-1006.
33. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007. 115: 891-899.
34. Лакин Г.Ф. *Биометрия.* М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
35. Трухачева Н.В. *Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica.* М.: ГОЭТАР-Медиа, 2013.
36. Гриценко В.А., Зурочка В.А., Зурочка А.В., Добрынина М.А., Зуева Е.Б., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П. Влияние синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) на формирование биопленок клиническими изолятами стафилококков. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2015. 4: 1-11 [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>).
37. Бухарин О.В., Гриценко В.А. Влияние *in vitro* препарата лейкоцитарного катионного белка «Интерцид» на *Escherichia coli*. *Антибиот. и химиотер.* 2000. 45 (1): 16-20.
38. Кислухина О.В., Калунянц К.А., Аленова Д.Ж. *Ферментативный лизис микроорганизмов.* Алма-Ата: Рауан, 1990. 200 с.
39. Дерябин Д.Г. *Функциональная морфология клетки.* М.: КДУ, 2005. 320 с.
40. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003. 55: 27-55.
41. Meller S., Domizio J.D., Voo K.S., Friedrich H.C., Chamilos G., Ganguly D., Conrad C., Gregorio J., Roy D.L., Roger T., Ladbury J.E., Homey B., Watowich S., Modlin R.L., Kontoyiannis D.P., Liu Y.-J., Arold S.T., Gilliet M. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nature Immunology.* 2015. 16 (9): 970-979. doi:10.1038/ni.3211
42. Kaplan A., Lee M.W., Wolf A.J., Limon J.J., Becker C.A., Ding M., Murali R., Lee E.Y., Liu G.Y., Wong G.C. L., Underhill D.M. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . *J Immunol.* 2017. 198: 4036-4045. doi: 10.4049/jimmunol.1601226

Поступила 03.12.2018

(Контактная информация: Добрынина Мария Александровна – научный сотрудник Института иммунологии и физиологии УрО РАН; адрес: 620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106; тел.: +7(343)374-00-70; E-mail: a_zurochka@mail.ru;

Гриценко Виктор Александрович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН,

LITERATURA

1. Gricenko V.A., Lyashenko I.Eh., Gordienko L.M., Vyalkova A.A., Buharin O.V. Informativnost' markerov persistencii *Escherichia coli* pri bakteriologicheskoj diagnostike hronicheskogo pielonefrita u detej. *ZHurn. mikrobiol.* 1996. 3: 80-83.
2. Gricenko V.A., Brudastov Yu.A., SHuhman M.G., Danilova M.F., Saprykin V.B. Harakteristika ehnterobakterij, vydelennyh ot bol'nyh s urogenital'noj patologiej. *Zhurn. mikrobiol.* 2001. 4: 107-111.
3. Ivanov D.V., Krapivina I.V., Galeva E.V. Nozokomial'nye infekcii: ehpidemiologiya, patogenez, ehtiologiya, antibakterial'naya terapiya i profilaktika. *Antibiotiki i himioterapiya.* 2005. 50(12): 19-28.
4. Spellberg B., Guidos R., Gilbert D. et al. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases.* 2008. 46: 155-164.
5. Gricenko V.A., Ivanov Yu.B. Rol' persistentnyh svojstv v patogeneze ehndogennyh bakteri-al'nyh infekcij. *Vestnik Ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2009. 2 (25): 35-39.
6. Mrugova T.M., Kachalova I.V. Osobennosti taksonomicheskoy struktury i rezistentnosti k anti-biotikam mikroflory, izolirovannoj ot bol'nyh v mnogoprofil'nom hirurgicheskom stacionare. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN.* 2016. 2. 12s. [Ehlektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/MTM-2016-2.pdf>).
7. Leopold S. J., van Leth F., Tarekegn H., and Schults C. Antimicrobial Drug Resistance Among Clinically Relevant Bacterial Isolates in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2014. 69(9): 2337-2353.
8. WHO: First ever list of antibiotic-resistant "priority pathogens". GENEVA, 2017 (URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed>).
9. Kokryakov V.N. *Biologiya antibiotikov zhivotnogo proiskhozhdeniya.* SPb.: Nauka, 1999. 162 s.
10. Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microbiol.* 2003. 1 (1): 65-70 (DOI: 10.1038/nrmicro727).
11. Finlay B.B., Hancock R.E.W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infec-tions? *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. 2: 497-504 (DOI: 10.1038/nrmicro908).
12. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. 3: 238-250 (DOI:10.1038/nrmicro1098).
13. Kokryakov V.N. *Ocherki o vrozhdennom immunitete.* SPb.: Nauka, 2006. 261 s.
14. Vasilchenko A.S., Vasilchenko A.V., Pashkova T.M., Smirnova M.P., Kolodkin N.I., Ma-nukhov I.V., Zavilgelsky G.B., Sizova E.A., Kartashova O.L., Simbirtsev A.S., Rogozhin E.A, Duskaev G.K., Sycheva M.V. Antimicrobial activity of the indolicidin derived novel synthetic peptide In-58. *J. Pept. Sci.* 2017. 23: 855-863 (DOI: 10.1002/psc.3049).
15. Bibikova M.V., Egorov A.M., Katlinskij A.V. Prirodnye peptidy s antimikrobnym i im-munomoduliruyushchim dejstviem. *Antibiotiki i himioterapiya.* 2005. 50 (8-9): 57-66.
16. Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Gricenko V.A. Osobennosti vliyaniya sin-teticheskogo peptida aktivnogo centra GM-CSF na rost grampolozhitel'nyh kokkov in vitro. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN.* 2015. 1: 1-10 [Ehlektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-1/Articles/VAZ-2015-1.pdf>).
17. Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Gricenko V.A., Tyapaeva Ya.V., Belozerceva Yu.P. Analiz chuvstvitel'nosti klinicheskikh izolyatov stafilokokkov k sinteticheskomu peptidu aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliru-yushchego faktora (GM-CSF). *Rossijskij immunologicheskij zhurnal.* 2015. T. 9 (18). 3(1):

- 82-85.
18. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Gricenko V.A., Tyapaeva Ya.V., Chereshev V.A. Fenomen nalichiya unikal'noj kombinacii immunobiologicheskikh svojstv u sinteticheskogo analoga aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora (GM-CSF). Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2016. 2: 30c. [Ehlektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/ZAV-2016-2.pdf>).
 19. Dobrynina M.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Gricenko V.A. Sravnitel'nyj analiz vliyaniya sinteticheskogo peptida aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora – ZP2 na rost muzejnyh kul'tur bakterij rodov *Staphylococcus* i *Escherichia* in vitro. Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2015. 2: 1-10 [Ehlektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-2/Articles/DMV-2015-2.pdf>).
 20. Zurochka A.V., Gricenko V.A., Zurochka V.A., Dobrynina M.A., Zueva E.B. Vliyanie sinteticheskogo peptida aktivnogo centra GM-CSF – ZP2 na kinetiku razvitiya populyacij grampolozhitel'nyh kokkov i ehnterobakterij v kul'ture. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2015. T. 9 (18). № 2(2): 30-35.
 21. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Gricenko V.A. Sinteticheskij peptid aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora (GM-CSF) kak osnova dlya sozdaniya lekarstv novogo pokoleniya s kombinirovannymi ehffektami. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2016. T. 10 (19). 2(1): 433-435.
 22. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Zueva E.B., Dobrynina M.A., Dukardt V.V., Gricenko V.A. Sinteticheskij peptid aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora (GM-CSF) kak osnova dlya sozdaniya kosmeticheskikh sredstv novogo pokoleniya s kombinirovannymi ehffektami – ACEGRAM-GEL' i ACEGRAM-SPREJ. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2016. T. 10 (19). 3: 269-272.
 23. Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Dukardt V.V., Lavrent'eva I.N., Suhobaevskaya L.P., Gricenko V.A. Issledovanie spektra immunobiologicheskoy aktivnosti sinteticheskogo peptida aktivnogo centra granulocitarno-makrofa-gal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora (GM-CSF) kak osnova dlya rasshireniya vozmozhnostej sozdaniya kosmeticheskikh sredstv novogo pokoleniya s kombinirovannymi ehffektami. Rossijskij immunologicheskij zhurnal. 2017. T. 11 (20). 3: 377-380.
 24. Dobrynina M.A., Zurochka A.V., Tyapaeva YA.V., Belozerceva YU.P., Mrugova T.M., Gricenko V.A. Antibakterial'naya aktivnost' kosmeticheskogo sredstva «Acegram» v otnoshenii gramotricatel'nyh bakterij. Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN. 2017. 4. 13c. [Ehlektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/VAG-2017-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2017-00030.
 25. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 49-79.
 26. Buharin O.V. Infekcionnaya simbiologiya. *Zhurn. mikrobiol.* 2015. 4: 4-9.
 27. Prikaz MZ SSSR ot 22 aprelya 1985 g. № 535 «Ob unifikacii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemyh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyah lechebno-profilakticheskikh uchrezhdenij». M., 1989. 126 s.
 28. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya / Pod red. M.O. Birgera. M.: Medicina, 1982. 464s.
 29. Zurochka A.V., Zurochka V.A., Suhovej YU.G. i dr. Immunotropnye i biologicheskie ehffekty sinteticheskikh peptidov aktivnogo centra GM-CSF. *Vestnik ural'skoj medicinskoj akademicheskoy nauki.* 2011. 2/2 (35): 23-24.
 30. Buharin O.V., Gricenko V.A. Vliyanie in vitro preparata lejkocitarnogo kationnogo belka “Intercid” na *Escherichia coli*. *Antibiot. i himioter.* 2000. 45 (1): 16-20.
 31. Shlegel' G. *Obshchaya mikrobiologiya.* M.: Mir, 1987. 567 s.

32. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985. 22: 996-1006.
33. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007. 115: 891-899.
34. Lakin G.F. *Биометриya*. М.: Vysshaya shkola, 1990. 352 s.
35. Truhacheva N.V. *Matematicheskaya statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s primeneniem paketa Statistica*. М.: GOEHTAR-Media, 2013.
36. Gricenko V.A., Zurochka V.A., Zurochka A.V., Dobrynina M.A., Zueva E.B., Tyapaeva YA.V., Belozerceva YU.P., Kurlaev P.P. Vliyanie sinteticheskogo peptida aktivnogo centra granulocitarno-makrofagal'nogo koloniestimuliruyushchego faktora (GM-CSF) na formirovanie bioplenok klinicheskimi izolyatami stafilokokkov. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo centra UrO RAN*. 2015. 4: 1-11 [Elektr. resurs] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/VAG-2015-4.pdf>).
37. Buharin O.V., Gricenko V.A. Vliyanie in vitro preparata lejkocitarnogo kationnogo belka "Intercid" na *Escherichia coli*. *Antibiot. i himioter.* 2000. 45 (1): 16-20.
38. Kisluhina O.V., Kalunyanc K.A., Alenova D.ZH. *Fermentativnyj lizis mikroorganizmov*. Alma-Ata: Rauan, 1990. 200 s.
39. Deryabin D.G. *Funkcional'naya morfologiya kletki*. М.: KDU, 2005. 320 s.
40. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003. 55: 27-55.
41. Meller S., Domizio J.D., Voo K.S., Friedrich H.C., Chamilos G., Ganguly D., Conrad C., Gregorio J., Roy D.L., Roger T., Ladbury J.E., Homey B., Watowich S., Modlin R.L., Kontoyiannis D.P., Liu Y.-J., Arold S.T., Gilliet M. Th17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nature Immunology*. 2015. 16 (9): 970-979. doi:10.1038/ni.3211
42. Kaplan A., Lee M.W., Wolf A.J., Limon J.J., Becker C.A., Ding M., Murali R., Lee E.Y., Liu G.Y., Wong G.C. L., Underhill D.M. Direct Antimicrobial Activity of IFN- β . *J Immunol*. 2017. 198: 4036-4045. doi: 10.4049/jimmunol.1601226

Образец ссылки на статью:

Добрынина М.А., Зурочка А.В., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Гриценко В.А. Оценка влияния синтетического пептида активного центра гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора – ZP2 на рост и биопленкообразование клинических изолятов энтеробактерий *in vitro*. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2018. 4. 17с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/MAD-2018-4.pdf>). (DOI: 10.24411/2304-9081-2019-14011)