

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 года № 14.604.21.0017 с Минобрнауки России в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014- 2020 годы» на этапе № 2 в период с 01 января 2015 года по 30 июня 2015 года в соответствии с «План-графиком исполнения обязательств» по Соглашению **выполнялись следующие работы:**

Разработаны лабораторные технологические регламенты получения экспериментальных образцов препарата на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, иммобилизованного на разные формы полимерного носителя.

Проведен синтез в соответствии с разработанными лабораторными регламентами экспериментальных образцов препарата на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, иммобилизованного на разные формы полимерного носителя.

Разработана Программа и методики исследовательских испытаний синтезированных экспериментальных образцов препарата на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, иммобилизованного на разные формы полимерного носителя.

Проведены исследования кинетики выхода пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, из полимерного носителя. Оценка влияния среды инкубации на кинетику выхода пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, из полимерного носителя.

Выполнен анализ влияния пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на пролиферацию астроцитов в модели воспаления *in vitro*, спровоцированного высокими концентрациями тромбина. Сопоставление эффектов пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, и эндогенного белка АПС на пролиферацию астроцитов в условиях токсического действия тромбина.

Исследовано влияния синтезированного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на скорость заживление раны эпителиального пласта. Выявление наиболее эффективных концентраций пептида в соответствии с данными зависимости «доза-эффект».

Выполнен сравнительный анализ ранозаживляющих свойств пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, с влиянием эндогенного белка АПС на данный процесс. Сопоставление временных характеристик и дозозависимых показателей влияния исследуемых веществ на процесс ранозаживления.

Исследовано противовоспалительного действия иммобилизованной формы пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на культивируемые клетки мозга животных (астроциты) и тучные клетки в норме и при провокации воспаления *in vitro*.

Проведен сравнительный анализ противовоспалительного действия нативного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, с разными видами его иммобилизованных форм.

Исследовано влияния нативного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, на экспрессию факторов роста, белков внеклеточного

матрикса и факторов ремоделирования внеклеточного матрикса клетками кожи (кератиноцитами, фибробластами). Определение наиболее эффективных концентраций пептида на основе анализа зависимости «доза-эффект». Сопоставление влияний нативного пептида – агониста рецепторов PAR1, освобождаемого АПС, и его иммобилизованных форм на активность клеток кожи (на примере кератиноцитов и фибробластов).

Выполнено материально-техническое обеспечение работ этапа

При этом были получены следующие результаты:

Предлагаемый проект представляет интерес как с точки зрения создания новых эффективных средств для лечения травматических и ишемических повреждений тканей на основе пептидов–агонистов рецепторов PAR1 иммобилизованных в полимерные носители, так и выявления новых механизмов направленного действия агонистов рецепторов семейства PAR на различные клетки, вовлекаемые в процессы воспаления, нейродегенерации и репарации тканей (*in vitro*).

Предыдущий (первый) этап проекта был в основном посвящен выбору направления исследований, теоретическим исследованиям поставленных задач, разработке экспериментальных основ, направленных на дальнейшее создание и исследование новых средств для лечения травматических и ишемических повреждений тканей на основе биodeградируемых материалов с иммобилизованными пептидами-агонистами рецепторов, активируемых протеиназами. В ходе анализа научно-технической литературы было установлено, что иммобилизованный в полимерные матриксы или биodeградебельные микрочастицы пептид-агонист PAR1, освобождаемый тромбином, может имитировать пролиферативные свойства фермента в процессе регенерации ткани и ускорять заживление ран у мышей и крыс (Strukova et al., 2001). Пептиды-агонисты PAR1, освобождаемые АПС, являются более дешевыми препаратами, по сравнению с рекомбинантным и модифицированным АПС, однако есть опасность их быстрого расщепления пептидазами в организме. Иммобилизация пептидов в полимерные матрицы или микрочастицы позволяет защитить пептиды от разрушения, а также направленно регулировать скорость их выхода как в условиях *in vitro* так и *in vivo*. Однако, до настоящего времени не были созданы эффективные формы пептидов со свойствами АПС и не было исследовано влияние этих пептидов и их иммобилизованных в полимерные носители форм, на функции клеток нейроваскулярной единицы мозга (тучные, астроциты и др.) и клеток, вовлекаемых в регуляцию процессов воспаления и репарации ткани (тучные, кератиноциты, фибробласты и др.) и сравнение его действия с действием протеиназы – АПС.

Препараты пептида-агониста PAR1, освобождаемого АПС, и их иммобилизованные в биосовместимые и биodeградируемые матрицы формы, защищающие клетки от гибели и восстанавливающие ткани, могут быть весьма перспективными среди лекарств для терапии травматических и ишемических повреждений тканей, в том числе мозга (при инсульте), заживления ран и язвы желудка.

При выполнении второго этапа проекта были разработаны лабораторные технологические регламенты получения экспериментальных образцов препарата на

основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, иммобилизованного на разные формы полимерного носителя: покрытие, пленка, трехмерный матрикс и Программы и методики исследовательских испытаний синтезированных экспериментальных образцов препарата на основе пептида – агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, иммобилизованного на разные формы полимерного носителя. По утвержденным регламентам синтезированы экспериментальные образцы.

В соответствии с утвержденными Программами и методиками проведены сравнительные исследования разрабатываемых препаратов. В ходе проведенных исследований показано, что иммобилизация пептида – агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, на разные формы носителей не влияет на его биологическую активность в отношении культивируемых клеток кожи (кератиноцитов и фибробластов). Как и нативный пептид-агонист рецепторов PAR1, освобожденного АПС, иммобилизованные формы пептида стимулируют пролиферацию первичных кератиноцитов человека и эпидермальных клеток линии HaCaT и стимулируют закрытие раны эпителиального пласта. Также в результате экспериментальных исследований установлено, что тип носителя не влияет на биологическую активность пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС.

По результатам проведенных исследований 2 этапа установлено, что характер биологической активности пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, зависит от типа модели, в которой он используется. В модели системного воспаления, где в качестве объекта использовали перитонеальные тучные клетки, иммобилизация пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, на полимерные носители не приводила к инвертированию его эффекта, хотя и изменяла его выраженность. В тоже время использование в качестве модели нейровоспаления активированных тромбином культивируемых астроцитов, показало смену действия пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, по направленности. Возможно, что в используемой в экспериментах модели нейровоспаления иммобилизация пептида повышает его эффективность, т.к. наблюдаемый эффект синтезированного пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, в концентрации 30 мкМ соотносится с потенцирующим эффектом нативного пептида в концентрации 500 мкМ. В ходе выполнения экспериментальных работ этапа показано, что:

1. Синтезированный пептид-агонист рецепторов PAR1, освобожденного АПС, подобно протеазе АПС, стимулирует пролиферативную активность кератиноцитов человека, но в концентрации на несколько порядков выше концентрации протеазы АПС. Максимальная эффективная концентрация исследуемого пептида – 10 мкМ, АПС – 1 нМ.

2. Анализ рецепторного механизма действия синтезированного пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, на пролиферативную активность кератиноцитов в сравнении с действием протеазы – АПС, выявил участие PAR1 и корецептора ЭПСР в действии обоих агонистов – синтезированного пептида-агониста рецепторов PAR1, освобожденного АПС, и АПС.

3. Исследуемый пептид-агонист рецепторов PAR1, освобожденного АПС, подобно протеазе АПС стимулирует закрытие ран эпителиального пласта. Временные характеристики стимулирующего действия пептида и АПС совпадают:

10 мкМ для пептида и 1 нМ АПС ускоряют ранозаживление уже через 24 часа после нанесения раны.

4. В ходе проведенных исследований показано, что иммобилизация синтезированного пептида в носители не влияет на биологическую активность пептида при высвобождении, а также тип носителя не влияет на биологическую активность пептида. Как и нативный пептид, иммобилизованные формы пептида не влияют на пролиферацию дермальных фибробластов, стимулируют пролиферацию первичных кератиноцитов человека и эпидермальных клеток линии HaCaT и стимулируют закрытие раны эпителиального пласта.

Результаты второго этапа ПНИ были доложены на VII Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии (с международным участием), проводившейся 29-31 января 2015 года в г. Москва, НИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева, на Одиннадцатом международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» в рамках подготовки к XXIII Съезду Российского Физиологического Общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2017), посвященному 100-летию создания этого общества Иваном Петровичем Павловым, проходившим 2-12 июня 2015 года в г. Судак и на международной конференции the XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis в период с 20 по 25 июня 2015 года в городе Торонто (Канада).

Также по результатам второго этапа проекта была подготовлена к публикации статья в научном журнале, индексируемом в базе данных Scopus, «Современные технологии в медицине», авторов Л.А. Сафоновой, М.М. Бобровой, О.И. Агаповой, М.С. Котляровой, А.Ю. Архиповой, М.М. Мойсеновича и И.И. Агапова. «Биологические свойства пленок из регенерированного фиброина шелка». Плановая дата выхода публикации 4 квартал 2015 года.

В дальнейшем результаты данной работы и созданная технология могут быть использованы для создания лекарственных препаратов нового поколения, как в нашей стране, так и за рубежом. Создаваемая технология может быть востребована как научно-исследовательскими центрами, так и фармацевтическими компаниями, ведущими исследования в области создания новых медицинских средств. Все полученные на 2 этапе данные и документы, содержащие конструктивные и технологические (методические) решения, будут использованы для реализации следующего этапа и выполнения ПНИ в целом.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом:

Использование средств субсидии в размере 2 700 000 (Два миллиона семьсот тысяч) рублей, предоставленных Получателю субсидии по Соглашению с Минобрнауки России от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0017 на этапе № 2 Плана-графика исполнения обязательств условиям Соглашения с Минобрнауки России соответствует.

Работы по Соглашению о предоставлении субсидии от 17 июня 2014 г. №14.604.21.0017 на этапе №2 Плана-графика исполнения обязательств выполнены в установленный срок и удовлетворяют условиям данного Соглашения, в том числе Техническому заданию и Плану-графику исполнения обязательств