*На правах рукописи*

**Хочанский Андрей Николаевич**

# ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ АГЛИКОНА НА ИММУНОТРОПНУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДА

**14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология**

**Автореферат**
**диссертации на соискание ученой степени**
**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2018**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека»

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор **Калюжин Олег Витальевич**

доктор медицинских наук, профессор **Киселевский Михаил Валентинович**

**Официальные оппоненты:**

**Козлов Иван Генрихович** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, лаборатория экспериментальной и клинической фармакологии, заведующий лабораторией;

**Нестерова Ирина Вадимовна** – доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ «Российский университет дружбы народов», кафедра аллергологии и иммунологии факультета повышения квалификации медицинских работников, профессор кафедры.

**Ведущая организация:** ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Защита диссертации состоится «____» _____2018 г. в ____часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.08 в ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119992, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: https://www.sechenov.ru/

Автореферат разослан «___» _____2018 года.

**Ученый секретарь диссертационного совета**

доктор медицинских наук, профессор **Калюжин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования**

Несмотря на успехи в этиотропной терапии инфекционных заболеваний, сегодня общая смертность от них остается на высоком уровне. В развитых странах инфекционные болезни занимают 4-е место среди причин смерти, в то время как в некоторых развивающихся странах они остаются главной причиной летальности населения [Нечаева О.Б., 2016; Lozano R., 2012].

Следствием чрезмерного применения антибиотиков явилось возникновение инфекционных агентов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [Andersson, 2014]. Клинической проблемой становится развитие среди патогенов устойчивости к антибиотикам резервного ряда. Достаточно часто возбудители инфекционных заболеваний резистентны к подавляющему большинству антибиотиков [World Health Organization, 2014; Bush K., 2011]. В связи с этим этиотропная терапия во многих аспектах зашла в тупик.

Также становится все более актуальной проблема повышения частоты развития опухолевых процессов, приводящих к увеличению смертности и инвалидизации населения. Традиционная химиотерапия характеризуется высокой стоимостью и обладает множеством побочных эффектов, в том числе иммуносупрессивным действием. Опухолевые заболевания становятся всё более распространенными среди населения всех возрастных групп, что ставит новые вызовы перед современными протоколами химиотерапии [Torre L.A. et al. 2012.]. Финансовая нагрузка на здравоохранение, вызванная необходимостью долговременной поддержки таких больных, в некоторых случаях сравнима и даже превосходит таковую у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В этой ситуации не теряют своей актуальности дополнительные методы и средства, способные повысить эффективность терапии указанных групп заболеваний. Одним из подобных направлений стала иммунотерапия, обладающая рядом преимуществ перед традиционным этиотропным лечением как инфекционных, так и неопластических болезней [Караулов А.В., Калюжин О.В., 2007; Козлов И.Г., Тимаков М.А., 2009; Нуриев Р.И. и др., 2017].

Перспективной группой мультифункциональных иммунотропных соединений являются лиганды NOD-подобных рецепторов (NLR), активация которых способна не только усиливать экспрессию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками, но и блокировать флогогенные биохимические реакции [Караулов А.В., Калюжин О.В.,2013]. Пожалуй, наиболее изученным NOD-лигандом, а именно

агонистом цитоплазматических рецепторов NOD2, является мономер пептидогликана клеточной стенки бактерий N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин, или мурамилдипептид (МДП). Созданы различные модификации МДП, некоторые из которых уже нашли клиническое применение в качестве иммуномодуляторов широкого спектра действия [Андронова Т.М. и др., 2009; Матвеев Д.А. и др., 2014; Пащенков М.В. и др., 2012]. Рациональным подходом к увеличению биологической активности МДП является β-гликозилирование [Земляков А.Е. и др., 2003, Калюжин О.В., 2003]. β-Гликозиды МДП обладают широким спектром иммунотропного действия и при этом характеризуются относительной легкостью синтеза [Земляков А.Е., Чирва В.Я., 1987].

**Степень разработанности темы**

Несмотря на достаточно большое количество работ по изучению механизмов иммуномодулирующих эффектов гликозидных производных МДП, остается не до конца решенным вопрос о влиянии структуры агликона на иммунотропную активность гликозидов МДП [Калюжин О.В.,2003]. Ранее определено влияние некоторых β-гликозидов МДП на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками *in vitro* и *ex vivo* [Караулов А.В. и др., 2002; Михайлова Л.П. и др., 2004]. Однако динамика концентрации этих цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных после введения этих иммуностимуляторов остается неизученной. Большая часть доклинических исследований биологической активности β-гликозидов МДП проведена на мышиных моделях *in vitro* и *in vivo*. Учитывая наличие существенных отличий между иммунным ответом у лабораторных животных и человека, представляется актуальным определение влияния вновь и ранее синтезированных β-гликозидов МДП на функцию человеческих иммунокомпетентных клеток. Открыт и вопрос о влиянии гликозидов МДП на морфологические характеристики и иммунофенотип дендритных клеток человека.

Некоторые мурамилпептиды (мифамуртид, ромуртид) уже используются в качестве компонентов комплексного лечения ряда опухолевых заболеваний. Вместе с тем среди практикующих врачей и ученых достаточно распространено мнение о возможном ускорении роста опухолей при использовании иммуностимуляторов. Влияние некоторых гликозидов МДП на рост и метастазирование опухолей *in vivo* уже было предметом исследования [Калюжин О.В., 2001], однако выраженность противоопухолевых эффектов и динамика опухолевого роста на фоне применения этих гликопептидов требуют уточнения.

Остается неизученной нейротропная активность гликозидов МДП.

**Цель исследования** – определить влияние структуры агликона на иммуномодулирующее действие β-гликозидов мурамилдипептида для дальнейшего детального изучения иммунотропной и противоопухолевой эффективности наиболее активного соединения.

**Задачи исследования:**

1) Провести сравнительное изучение влияния МДП и семи β-гликозидов МДП с алифатическими (β-гептил-, β-децил-, β-додецилгликозиды МДП), циклическими (β-циклогексил-, β-циклооктил- и β-циклодецилгликозиды МДП) и трициклическим (β-адамантилгликозид МДП) агликонами, на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови человека.

2) Изучить влияние МДП и его семи β-гликозидов на фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови человека.

3) Сравнить влияние МДП и наиболее эффективного иммуномодулятора из изученных β-гликозидов МДП на экспрессию маркеров активации и созревания дендритными клетками человека.

4) Сравнить динамику концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей линии C57BL/6 после внутрибрюшинного введения МДП и наиболее биологически активного β-гликозида МДП.

5) Оценить влияние наиболее эффективного иммуномодулятора из изученных β-гликозидов МДП на динамику роста и метастазирование меланомы B16, а также продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

6) Изучить влияние наиболее биологически активного β-гликозида МДП на показатели активности ЦНС мышей линии C57Bl/6 с привитой меланомой B16.

**Научная новизна исследования**

Впервые определено влияние структуры агликона на иммунотропную активность семи β-гликозидов МДП по отношению к мононуклеарным лейкоцитам и нейтрофилам периферической крови человека.

Впервые изучено действие β-гептилгликозида МДП на экспрессию дендритными клетками человека маркеров, ассоциированных со стимуляцией клеточного иммунитета и презентацией антигена.

Впервые определена динамика концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей после внутрибрюшинного введения β-гептилгликозида МДП.

Впервые оценено действие β-гептилгликозида МДП на функцию ЦНС у экспериментальных животных-опухоленосителей.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Данные об иммунотропной активности новых гликозидов МДП могут служить фундаментом для разработки безопасных и действенных иммуномодулирующих препаратов. Результаты изучения влияния строения агликонов на биологические свойства этих гликопептидов предопределяют рациональные направления для дальнейшего поиска новых высокоэффективных производных МДП. Гликозиды МДП могут найти применение в клинической практике инфекционистов, клинических иммунологов и онкологов. Наиболее вероятными сферами использования данных препаратов представляются профилактика острых и рецидивов хронических инфекционных заболеваний, повышение эффективности этиотропного лечения этих болезней, адъювантная иммунотерапия злокачественных новообразований и коррекция вызванных химиотерапией иммунных и гематологических расстройств у онкологических пациентов.

**Основные положения, выносимые на защиту**

1) β-Гликозиды МДП с алифатическими агликонами обладают большей биологической активностью в сравнении с β-гликозидами МДП с циклическими и трициклическим агликонами; при этом увеличение числа атомов углерода с 7 до 12 в алифатической цепи агликона приводит к снижению иммунотропной действенности соединений в условиях моделей *in vitro*.

2) β-Гептилгликозид МДП превышает по иммунотропной эффективности другие изученные гликозиды МДП и при этом обладает сходной с немодифицированным МДП биологической активностью по отношению к мононуклеарным лейкоцитам и нейтрофилам крови человека *in vitro*.

3) β-Гептилгликозид МДП увеличивает экспрессию молекул CD14 дендритными клетками человека *in vitro*.

4) Внутрибрюшинное введение β-гептилгликозида МДП повышает концентрацию провоспалительных и регуляторных цитокинов в сыворотке крови мышей линии C57Bl/6, при этом в большинстве случаев β-гептилгликозид МДП превосходит МДП по цитокин-индуцирующей активности.

5) β-Гептилгликозид МДП при применении в терапевтическом режиме подавляет рост подкожного узла привитой меланомы B16 и повышает продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация отвечает критериям формулы специальности 14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология. Проведенное исследование соответствуют разделу «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики аллергических и иммунопатологических процессов» области исследования, указанной в паспорте этой специальности.

**Методология и методы исследования**

Методы исследования включали в себя колориметрическое определение цитотоксической активности NK-клеток, измерение фагоцитарной активности нейтрофилов и их фагоцитарного числа по отношению к частицам латекса.

Определение экспрессии маркеров активации (CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14, HLA-DR) дендритными клетками человека методом проточной цитофлуориметрии.

Измерение уровня цитокинов (IL-1β, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-a, GM-CSF, IL-4) в сыворотке крови мышей линии C57BL/6 при помощи системы FlowCytomix на проточном цитометре.

Определение линейного объема опухоли у животных с опухолью B16, определение активности ЦНС у животных путем оценки норкового и поискового рефлексов.

Математическая обработка данных была проведена с помощью программы Statistica 10 (StatSoft, США). Для расчета статистической значимости отличий групп по количественным показателям использовались непараметрические критерии парного и множественного сравнения.

**Степень достоверности и апробация работы**

В работе использовано достаточное количество экспериментальных групп и объем данных для каждой группы, результаты воспроизводимы, использованы современные адекватные методы исследования. Сформулированные автором выводы достоверны и логически следуют из результатов, полученных в ходе исследования.

Материалы диссертационного исследования докладывались и обсуждались на Всероссийской научно-практической конференции «Иммунопатология и иммунореабилитация: от теории к практике» (Пенза, 2015) и Международной конференции “PhD Scientific Days 2017” (Венгрия, Будапешт, 2017).

Апробация диссертации была проведена на заседании межлабораторной научной конференции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (протокол №8 от 17 апреля 2016 года).

**Личный вклад автора в получение результатов**

Автор разработал дизайн диссертационной работы, освоил и эффективно применил экспериментальные методы исследования для решения поставленных задач; выполнил статистическую обработку и описал полученные результаты; сформулировал выводы и положения, выносимые на защиту. В получении и публикации части данных, помимо научных руководителей О.В. Калюжина и М.В. Киселевского, вместе с автором участвовали В.В. Решетникова (НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России) и Н.К. Ахматова (ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»). Синтез изучаемых соединений осуществлен профессором А.Е. Земляковым (Таврическая академия ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского»). При этом вклад автора в подготовку диссертации, автореферата и научных публикаций по теме диссертационного исследования является определяющим.

**Публикации**

По теме диссертации опубликованы 7 печатных работ, из них 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России.

**Объем и структура работы**

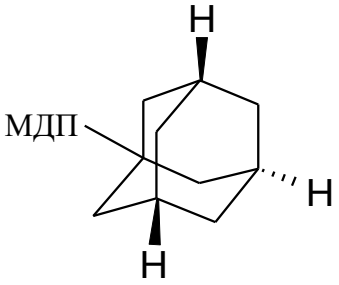
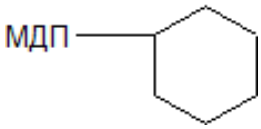
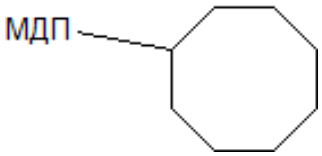
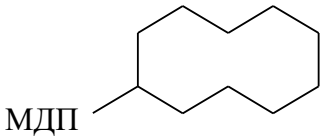
Диссертация изложена на 146 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 2 глав результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 5 таблицами и 49 рисунками. Указатель использованной литературы содержит 234 библиографических источника, в том числе 40 отечественных и 194 иностранных публикаций.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые β-гептил-, β-децил-, β-додецил-, β-адамантил-, β-циклогексил-, β-циклооктил- и β-циклодецилгликозиды МДП (табл. 1), а также МДП были любезно предоставлены профессором кафедры органической и биологической химии химического факультета Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского А.Е. Земляковым. Все испытуемые соединения предварительно были разведены в 0,9 % растворе NaCl.

***Таблица 1***

**Характеристика исследованных β-гликозидов МДП**

| Название | Строение агликона | Молекулярный вес (Да) |
|---|---|---|
| **β-Гептилгликозид МДП** | | 590 |
| **β-Децилгликозид МДП** | | 632 |
| **β-Додецилгликозид МДП** | | 660 |
| **β-Адамантилгликозид МДП** |   | 640 |
| **β-Циклогексилгликозид МДП** |   | 574 |
| **β-Циклоктилгликозид МДП** |   | 602 |
| **β-Циклодецилгликозид МДП** |   | 630 |

В работе использованы клетки эритролейкемии человека линии К562, полученные из банка клеточных линий ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», мононуклеарные лейкоциты (МНК) крови здоровых доноров, выделенные стандартной методикой, и дендритные клетки крови здоровых доноров, полученные по методу [Romani N., 1994].

Эксперименты *in vivo* выполнены на половозрелых самцах мышей линии С57Bl/6 и СВА массой тела 18-22 г, полученных из Филиала "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства".

Влияние исследуемых соединений на цитотоксическую активность МНК крови здоровых доноров по отношению к клеткам линии K562 исследовали при помощи колориметрического метода. В экспериментальных группах клетки были инкубированы с исследуемыми соединениями и немодифицированным МДП в концентрациях 1, 5 и 25 мкмоль/мл.

Фагоцитарную активность нейтрофилов крови донора, коинкубированных с исследуемыми соединениями, определяли по методу [Гордиенко Г.И., 1984] с некоторыми изменениями. После коинкубации каждый образец ресуспендировали и забирали по 4 мкл крови из каждой виалы с последующим нанесением на предметное стекло с формированием мазка, окрашенного по методике Романовского-Гимза. Фагоцитарная активность была определена в виде числа фагоцитирующих нейтрофильных гранулоцитов от общего числа обнаруженных клеток. Фагоцитарное число было вычислено как среднее количество частиц, захваченных одной клеткой.

При изучении влияния β-гептилгликозида МДП на созревание ДК человека эти клетки, полученные по стандартной методике [Romani N., 1994], инкубировали с исследуемым веществом или МДП в качестве референс-контроля в концентрации 10 мкмоль/мл в течение 48 часов. После окончания инкубации в лунки добавляли антитела к CD1a, CD40, CD80, HLA-DR, CD86, CD14 и CD83, меченные флуорохромами (флуоресцеин-изотиоцинат, фикоэритрин). Через 30 мин определяли количество клеток, экспрессирующих данные маркеры, при помощи проточного цитофлуориметра BD Canto II («Becton Dickinson», США).

Кроме того, после 48 часов культивирования ДК с β-гептилгликозидом МДП или МДП и последующей 30-минутной инкубации с мечеными антителами к CD14, CD80 и HLA-DR в концентрации 10 мкг/мл проводилась флуоресцентная микроскопия при помощи системы Axiovision.

Для определения влияния β-гептилгликозида МДП на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышам линии C57BL/6 внутрибрюшинно вводили 100 мкл физиологического раствора β-гептилгликозида МДП в концентрации 100 мкг/мл. В качестве референс-контроля и контроля использовали группы животных с внутрибрюшинным введением соответственно 100 мкл физиологического раствора МДП в концентрации 100 мкг/мл или 100 мкл физиологического раствора. Забор крови животных производился через 1 час, 8 часов и 24 часа после введения препаратов. Сыворотку крови отделяли при помощи центрифугирования с последующим измерением уровня цитокинов при помощи системы FlowCytomix на проточном цитометре.

Противоопухолевое действие β-гептилгликозида МДП оценивали по изменению средней продолжительности жизни (СПЖ) и торможению роста опухоли (ТРО) у животных с привитой опухолью меланомы В16. Суспензию клеток меланомы В16 ($1\times10^5$ клеток в 0,1 мл питательной среды 199) трансплантировали самцам линии С57Bl/6 подкожно в область боковой поверхности грудной клетки.

Исследуемое соединение вводили внутрибрюшинно в дозах 1 мкг; 5 мкг; 25 мкг на животное в 2 режимах (профилактический и терапевтический):

- однократное введение за 24 часа до перевивки опухоли (профилактический режим);

- введение через 24, 48 и 72 часов после перевивки опухоли, затем один раз каждые трое суток до гибели животных (терапевтический режим).

ТРО определяли на основании измерения линейных размеров опухоли с вычислением ее объема (V) и последующей оценки показателя ТРО по формуле: ТРО = (V в контроле – V в опыте) / V в контроле × 100%.

Поведенческие реакции определяли в течение 90 секунд на каждое животное у 6 животных, случайно выбранных из каждой группы на 10-е и 20-е сутки после перевивки опухоли. Животных из экспериментальных групп помещали на поверхность, имеющую равномерно распределенные отверстия диаметром в 1 см. Попытка животного изучить отверстие расценивалась как проявление норкового рефлекса, а принятие животным вертикального положения служило подтверждением рефлекса вертикальной стойки.

Все полученные данные были обработаны в программе Statistica 10 (StatSoft, США). Статистическую значимость отличий количественных показателей независимых выборок определяли с помощью непараметрических критериев для парного и множественного сравнения (*U*-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уолиса, критерий Данна). Статистически значимыми считали отличия при $p<0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние гликозидов МДП на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови

При коинкубации МНК с β-гликозидами МДП с алифатическими агликонами или референс-контролем в концентрации 1 мкмоль/мл не обнаружено статистически значимого изменения цитотоксической активности клеток. Среди гликозидов с циклическими агликонами только β-циклооктилгликозид МДП в этой концентрации повышал NK-зависимую цитотоксичность, а β-адамантилгликозид МДП снижал ее.

При внесении в культуру МНК немодифицированного МДП и β-гептилгликозида МДП в концентрации 10 мкмоль/мл зафиксировано существенное и примерно одинаковое повышение цитототоксической активности в сравнении с контролем. β-Адамантилгликозид МДП снижал NK-активность лейкоцитов, а другие β-гликозиды МДП в этой же концентрации не оказывали значимого влияния на способность МНК лизировать NK-чувствительные клетки-мишени (рис. 1).

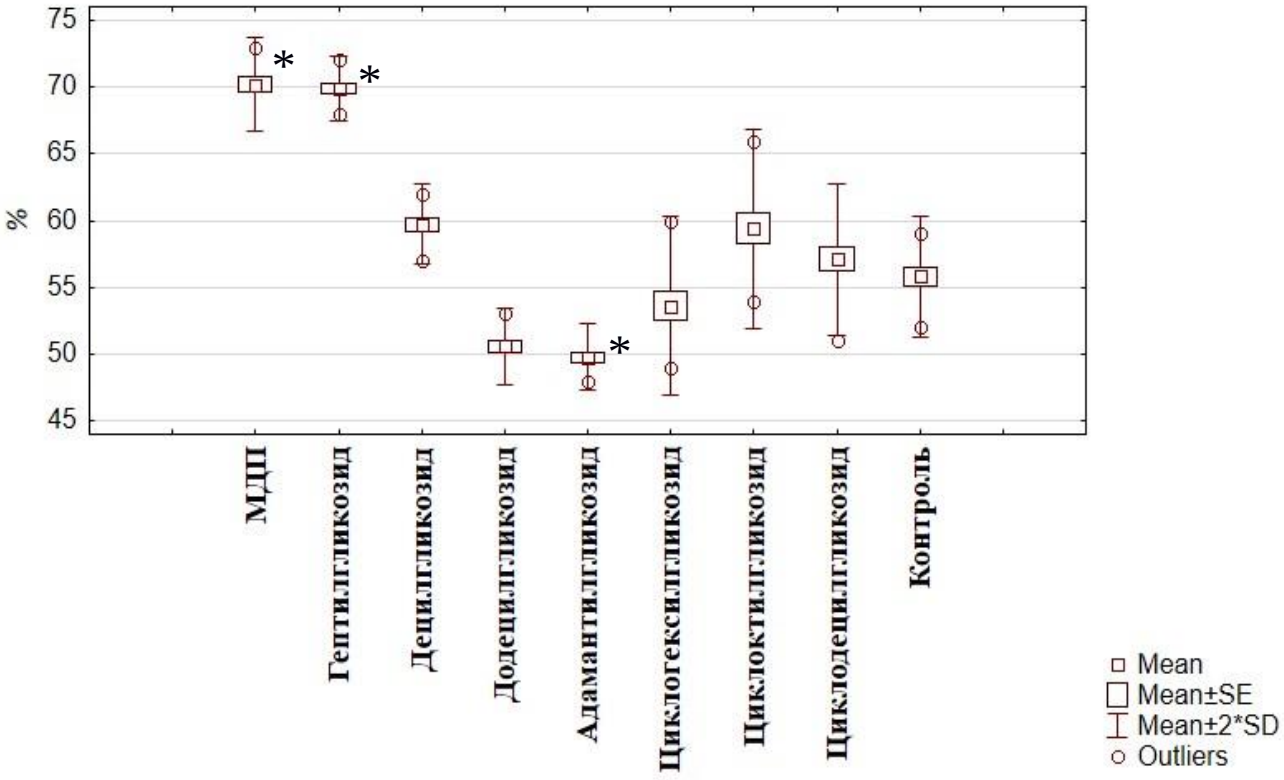



***Рисунок 1.*** **Влияние гликозидов МДП в концентрации 10 мкмоль/мл на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови по отношению к клеткам линии К562**

*– $p<0,05$ по сравнению с контролем

Среди всех исследованных соединений только немодифицированный МДП и β-гептилгликозид МДП в концентрации 100 мкмоль/мл статистически значимо и примерно в равной степени увеличивали NK-активность мононуклеарных лейкоцитов. Другие гликопептиды в этой дозе не влияли на NK-зависимую цитотоксичность мононуклеаров (рис. 2).

Вызванный МДП и β-гептилгликозидом МДП цитолиз NK-чувствительных клеток мононуклеарными лейкоцитами коррелировал с усилением контактов клеток-эффекторов и клеток-мишеней. В контрольных лунках МНК и клетки линии К562 при

инкубации в среде без добавления мурамилпептидов образовывали в поле зрения лишь единичные конгломераты, состоящие из 3-5 клеток.

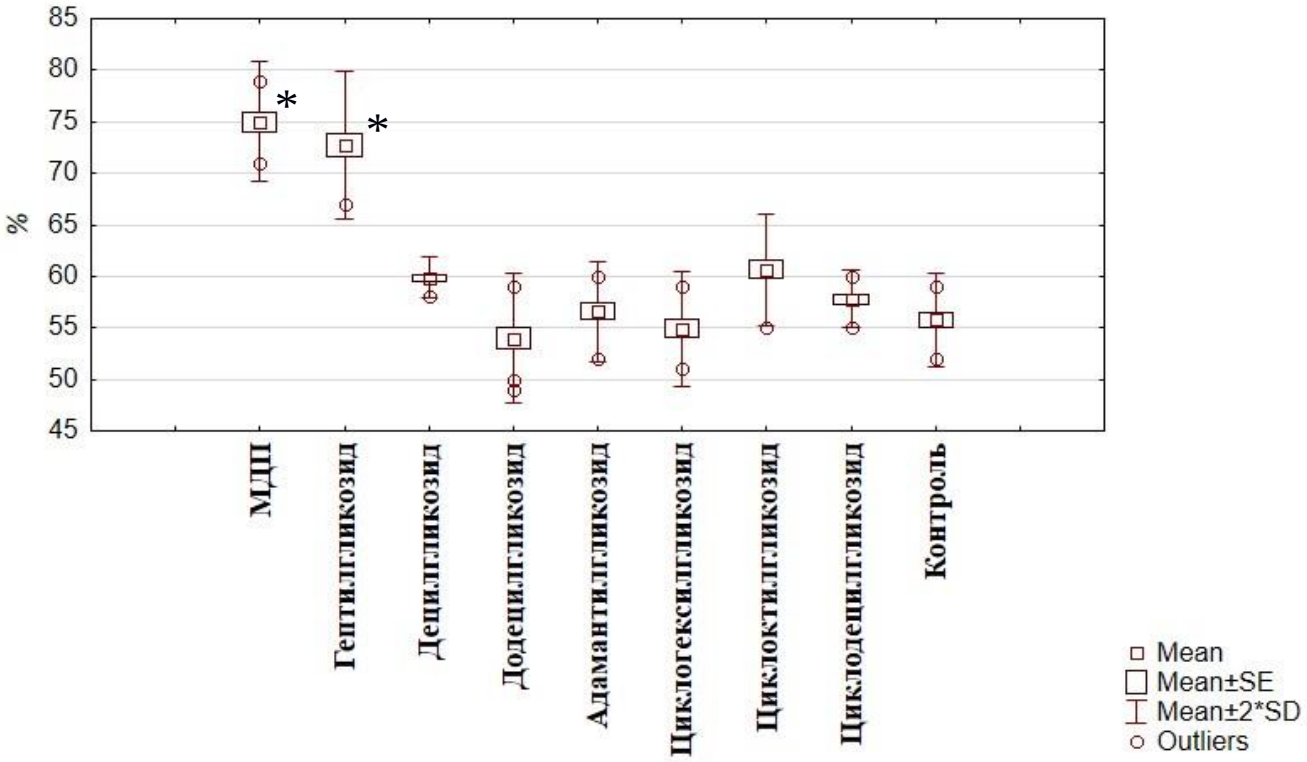



***Рисунок 2.*** **Влияние гликозидов МДП в концентрации 100 мкмоль/мл на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови по отношению к клеткам линии К562**

*– $p<0,05$ по сравнению с контролем

**Влияние гликозидов МДП на фагоцитарную активность нейтрофилов**

Оценивали изменение способности нейтрофилов цельной крови человека к фагоцитозу гранул латекса после инкубации с испытуемыми гликозидами МДП в концентрации 10 мкмоль/мл и МДП в такой же концентрации в качестве референс-контроля.

Из исследуемых соединений только β-гептилгликозид МДП вызывал повышение фагоцитарного индекса в сопоставимой степени с референс-препаратом. В остальных случаях отличия от контроля отсутствовали (рис. 3).

Фагоцитарное число нейтрофилов крови здоровых доноров статистически значимо не изменялось в ответ на воздействие тестируемых веществ в концентрации 10 мкмоль/мл. Вместе с тем следует отметить тенденцию к повышению фагоцитарного числа при внесении в культуральную среду немодифицированного МДП, а также тренд

к снижению этого показателя при использовании β-адамантилгликозида и β-циклодецилгликозида МДП.

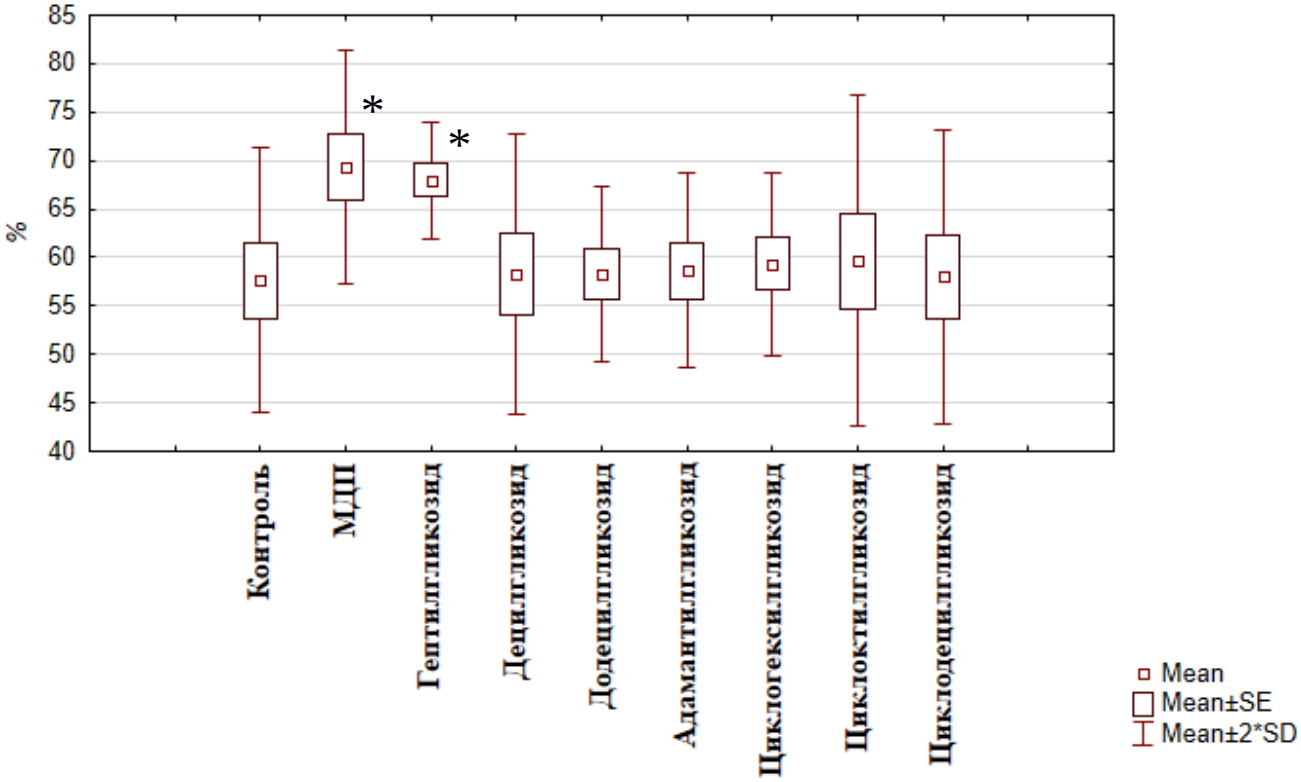



***Рисунок 3.*** **Фагоцитарный индекс нейтрофилов крови, инкубированных с гликозидами МДП**

* – $p<0,05$ по сравнению с контролем

**Влияние МДП и β-гептилгликозида МДП на экспрессию маркеров активации дендритными клетками человека**

Определено количество и соотношение $CD1a^+$, $CD40^+$, $CD80^+$, $HLA^+$, $CD86^+$, $CD14^+$, $CD83^+$ клеток в общей популяции ДК, инкубированных с β-гептигликозидом МДП в концентрации 10 мкмоль/мл в течение 48 часов. В качестве референс-контроля использовали показатели экспрессии этих молекул ДК, подвергнутыми инкубации с немодифицированным МДП в той же концентрации.

При культивировании ДК в среде с добавлением МДП или β-гептигликозида МДП отмечалось формирование конгломератов $CD14^+$-клеток.

Оба мурамилпептида увеличивали количество $CD14^+$-клеток в общей клеточной популяции.

В то же время МДП и β-гептилгликозид МДП не вызывали статистически значимых изменений экспрессии клетками других изучаемых маркеров (табл.2).

*Таблица 2*

**Влияние МДП или β-гептилгликозида МДП на экспрессию мембранно-ассоциированных молекул ДК**

| | Доля ДК, экспрессирующих мембранно-ассоциированный маркер (%) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | CD1a | CD40 | CD1a+ CD40 | CD80 | HLA-DR | CD80+ HLA-DR | CD86 | CD14 | CD86+ CD14 | CD83 |
| **Контроль** | **0** | **2±0,2** | **0** | **1,4±0,1** | **2,4±1,5** | **0,5±0,2** | **13±2** | **2,2±1,2** | **2,3±1,1** | **0,9±0,2** |
| **МДП** | **0** | **1,6±0,3** | **0** | **1,5±0,3** | **0,6±0,5** | **0** | **6,4±3** | **16,2±2*** | **0,9±1** | **1,7±0,1** |
| **β-Гептилгликозид МДП** | **0** | **2,1±0,4** | **0** | **1,4±0,1** | **4,6±1** | **0** | **11,9±3** | **9,9±1,1*** | **0,7±0,8** | **1,5±0,2** |

* – $p<0,05$ по сравнению с контролем

Таким образом, культивирование дендритных клеток мононуклеарного происхождения в среде, содержащей МДП или β-гептилгликозид МДП, вызывало существенное повышение экспрессии CD14, но не оказывало статистически значимого влияния на экспрессию других мембранно-ассоциированных маркеров, характерных для созревающих и зрелых дендритных клеток.

Следует отметить наличие тенденции к увеличению экспрессии CD83 под влиянием обоих гликопептидов, HLA-DR – под действием β-гептилгликозида МДП, а также тенденцию к снижению экспрессии молекул HLA-DR и CD86 – под влиянием МДП, комбинаций молекул CD80+HLA-DR и CD86+CD14 – под действием обоих гликопептидов.

**Влияние внутрибрюшинного введения МДП и β-гептилгликозида МДП на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей C57BL/6**

Для оценки влияния β-гептилгликозида МДП на продукцию цитокинов *in vivo* это соединение или МДП в качестве референс-контроля вводили внутрибрюшинно мышам линии C57BL/6 в дозе 10 мкг/животное с последующим забором крови через 1, 8 и 24 часа.

Введение β-гептилгликозида МДП вызывало через 1 час повышение концентрации IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-4 и IL-10 в сыворотке крови, при этом β-гептилгликозид МДП в большей степени увеличивал уровень IL-1β, TNF-α, GM-CSF, IL-4 и IL-10 по сравнению с немодифицированным МДП (табл. 3).

***Таблица 3***

**Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей после внутрибрюшинного введения МДП или β-гептилгликозида МДП**

| Исследуемый цитокин/время | | Концентрация цитокинов (пг/мл) | | | МДП в сравнении с контролем | β-гептилгликозид МДП в сравнении с контролем | β-гептилгликозид в сравнении с МДП |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **Контроль** (0,9% раствор NaCl) | **МДП** | **β-Гептил-гликозид МДП** | | | |
| ***IL-1*** | **1 ч** | **10,1±1,1** | **10,6±0,5** | **16,9±0,4** | - | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **14,4±2** | **19,6±2,4** | **17,9±1,2** | ↑ | ↑ | - |
| | **24 ч** | **10,7±2,5** | **14,3±1,7** | **15,4±1,1** | - | ↑ | - |
| ***IL-2*** | **1 ч** | **1,4±0,2** | **1,7±0,4** | **2,2±0,4** | - | ↑ | - |
| | **8 ч** | **1,76±0,4** | **1,6±0,7** | **1,8±0,3** | - | - | - |
| | **24 ч** | **1,0±0,3** | **1,7±0,2** | **1,7±0,4** | ↑ | ↑ | - |
| ***IL-5*** | **1 ч** | **3,4±0,6** | **3,4±0,3** | **3,9±0,5** | - | - | - |
| | **8 ч** | **2,8±0,4** | **11,9±0,8** | **56,3±3,8** | - | ↑ | ↑ |
| | **24 ч** | **3,2±0,5** | **6,4±0,4** | **6,4± 0,4** | ↑ | ↑ | - |
| ***IL-6*** | **1 ч** | **15,4±1,2** | **18,2±1,6** | **30,6 ±1,85** | - | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **13,0±0,6** | **30,6±1,85** | **41,5±5,37** | ↑ | ↑ | ↑ |
| | **24 ч** | **15,4±1,2** | **16,8±0,9** | **20,5±1,83** | - | ↑ | ↑ |
| ***IL-10*** | **1 ч** | **83,1±15,2** | **83,1±15,2** | **163±11,7** | ↓ | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **125,3±29,1** | **406,4±24,4** | **612±45,9** | ↑ | ↑ | ↑ |
| | **24 ч** | **250,0±25,7** | **721±41,2** | **223,9±23,7** | ↑ | - | ↓ |
| ***IFN-γ*** | **1 ч** | **3,0±0,4** | **16,4±0,4** | **13,9±0,3** | ↑ | ↑ | ↓ |
| | **8 ч** | **3,0±0,5** | **17,2±0,4** | **16,4±0,6** | ↑ | ↑ | - |
| | **24 ч** | **17,6±0,6** | **18,5±0,4** | **17,6±0,6** | ↑ | - | ↓ |
| ***TNF-α*** | **1 ч** | **18,5±1,7** | **69,9±5,8** | **46±4,9** | ↑ | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **19,0±1,1** | **83±6,6** | **54,7±4,4** | ↑ | ↑ | ↓ |
| | **24 ч** | **32,1±3,1** | **59,2±3,9** | **34,2±3,3** | ↑ | - | ↓ |
| ***GM-CSF*** | **1 ч** | **3,9±0,4** | **10,8±0,9** | **16,9±0,7** | ↑ | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **14,8±1,4** | **12,8±0,3** | **14,8±1,4** | ↓ | ↓ | ↑ |
| | **24 ч** | **10,8±1,6** | **13,3±1,4** | **11,9±1,3** | - | - | - |
| ***IL-4*** | **1 ч** | **3,3±0.2** | **5,6±0,4** | **4,7±0,3** | ↑ | ↑ | ↑ |
| | **8 ч** | **5,6±0,4** | **5,3±0,5** | **4,2±0,3** | - | ↓ | ↓ |
| | **24 ч** | **4,0±0,5** | **4,7±0,18** | **3,9±0,4** | ↑ | - | ↓ |

*Примечание:* стрелками в таблице обозначены статистически значимые ($p<0,05$) различия.

Через 8 часов после введения исследуемых соединений в экспериментальной группе концентрации IL-5, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-4 и IL-17 превышали таковые в группе контроля. В этот период β-гептилгликозид МДП индуцировал больший подъем сывороточного содержания IL-5, IL-10, TNF-α и GM-CSF, чем референс-препарат. Через 24 часа после введения β-гептилгликозид МДП вызывал повышение концентрации IL-5, IL-6 и IL-17 в сыворотке крови. Уровень IL-6 в экспериментальной группе был выше, чем в группе референс-контроля

Повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-6, а также GM-CSF через 1 час после введения β-гептилгликозида МДП указывает на активацию моноцитов/макрофагов. Высокий уровень IL-6 сохранялся спустя 24 часа после введения препаратов, что может отражать не только высвобождение этого и некоторых других цитокинов под влиянием иммуностимулятора, но и стимуляцию их синтеза *de novo*.

Повышение концентрации IL-10 после введения препарата можно трактовать как активацию и запуск компенсаторного противовоспалительного каскада.

Рост уровня IFN-γ через 1 час у животных экспериментальной группы указывает на раннюю активацию клеточных механизмов противовирусной защиты.

Содержание IFN-γ снизилось до значений, равных показателям контрольной группы, через 24 часов после введения β-гептилгликозида МДП, что говорит о транзиторном характере усиления синтеза или только о высвобождении внутриклеточного пула этого цитокина, синтезированного ранее.

Рост концентрации IL-4 и IL-5 в сыворотке крови отражает потенцирование компонентов гуморального иммунного ответа, зависимых от Th2- и ILC-2-клеток. В то же время отсутствие статистически значимых изменений уровня IL-2 указывает на неполную стимуляцию В-клеточных реакций.

Повышение содержания IL-17, вызванное введением β-гептилгликозида МДП, говорит о потенциале этого гликопептида стимулировать Th17/ILC-17-ассоциированные мобилизацию и активацию нейтрофильных гранулоцитов.

**Действие β-гептилгликозида МДП на рост меланомы В16 и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей**

Однократное внутрибрюшинное введение β-гептилгликозида МДП в диапазоне доз от 1 до 25 мкг/животное за 24 часа до прививки меланомы В16 не вызывало статистически значимого изменения средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей (табл. 4). Статистически значимое увеличение продолжительности жизни на 28% было зарегистрировано в группе мышей с привитой меланомой В16,

получавших β-гептилгликозид МДП в дозе 5 мкг/животное в терапевтическом режиме. В других дозах исследуемый гликопептид не влиял на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

***Таблица 4***

**Влияние β-гептилгликозида МДП на среднюю продолжительность жизни животных с привитой меланомой В16**

| Группа/доза препарата | | Средняя продолжительность жизни (сутки) | Изменение продолжительности жизни (%) |
|---|---|---|---|
| **Контроль** | | **27,3±1,6** | **–** |
| **β-Гептилгликозид МДП** | **Профилактический режим** | | |
| | 1мкг/мышь (50 мкг/кг) | **27,8± 1,3** | **+1** |
| | 5мкг/мышь (250 мкг/кг) | **26,9 ± 0,9** | **–1,4** |
| | 25 мкг/мышь (1,25 мг/кг) | **28,0± 1,7** | **+2** |
| | **Терапевтический режим** | | |
| | 1мкг/мышь (50 мкг/кг) | **27.6 ± 1,2** | **+1** |
| | 5 мкг/мышь (250 мкг/кг) | **38,4 ±3,0*** | **+28*** |
| | 25 мкг/мышь (1,25 мг/кг) | **25,2 ± 1,1** | **–7** |

* – $p<0,05$ по сравнению с контролем

Однократное профилактическое введение β-гептилгликозида МДП в дозах 1, 5 и 25 мкг/мышь не изменяло объем растущего опухолевого узла ни на 10-е, ни на 15-е, ни на 20-е сутки после инокуляции клеток меланомы (табл. 5).

При использовании β-гептилгликозида МДП в терапевтическом режиме обнаружено статистически значимое и дозозависимое торможение опухолевого роста на 10-е и 20-е сутки после имплантации опухоли. Наиболее выраженное уменьшение объема узла меланомы (-57% и -74%) установлено на 10-е сутки при терапевтическом введении иммуностимулятора в дозах 5 мкг и 25 мкг/животное, соответственно. На 20-е сутки угнетающее действие этих доз β-гептилгликозида МДП на рост опухоли несколько снижалось (-48%). При промежуточном измерении объема опухолевого узла (15-е сутки) не обнаружено противоопухолевого действия, исследуемого гликопептида.

Таким образом, β-гептилгликозид МДП проявлял значимый дозозависимый противоопухолевый эффект при использовании в терапевтическом режиме.

***Таблица 5***

**Влияние β-гептилгликозида МДП на объем первичного опухолевого узла меланомы В16, привитой мышам линии С57Bl/6**

| Группа / доза препарата | | Количество суток после трансплантации опухоли | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 10 | 15 | 20 |
| **Контроль** | | **510 ± 114** | **724± 142** | **3516±298** |
| **β-Гептилгликозид МДП** | **Профилактический режим** | | | |
| | 1мкг/мышь (50 мкг/кг) | **498 ±74 (2 %)** | **800±97 (10%)** | **3214±119 (8 %)** |
| | 5мкг/мышь (250 мкг/кг) | **542±102 (-6%)** | **756±178 (- 4 %)** | **4006 ±227 (-14%)** |
| | 25 мкг/мышь (1,25 мг/кг) | **578±118 (-13%)** | **719±202 (0,6%)** | **3432 ±347 (2 %)** |
| | **Терапевтический режим** | | | |
| | 1мкг/мышь (50 мкг/кг) | **266± 89 (48%)*** | **900± 93 (-24 %)** | **3000±354 (14%)** |
| | 5 мкг/мышь (250 мкг/кг) | **221±58( 57%)*** | **723 ±221 (0,13%)*** | **1819±319 (48%)*** |
| | 25 мкг/мышь (1,25 мг/кг) | **128±42 (74%)*** | **560 ± 136 (23 %)** | **1875± 89 (47%)*** |

* – $p<0,05$ – по сравнению с контролем

***Поисковый и норковый рефлекс*** отражают функциональную активность ЦНС лабораторных животных. Изменение этих рефлексов может, с одной стороны, свидетельствовать о нейтротропном действии испытуемых соединений на животных с привитой опухолью, а с другой – отражать клиническое состояние животных и эффективность экспериментальной профилактики или лечения. Мурамилпептиды обладают непосредственной нейрофармакологической активностью. Более того, некоторые иммунные медиаторы, выработку которых стимулируют мурамилпептиды, обладают в той или иной степени нейротропными эффектами.

Введение β-гептигликозида МДП не оказало влияния на динамику норкового и поискового рефлексов у животных экспериментальных групп по сравнению с животными контрольной группы. Это может указывать на отсутствие нейротоксического эффекта у животных с привитой опухолью, в том числе при введении испытуемого соединения в дозе, вызывающей сокращение средней продолжительности жизни.

Таким образом, проведенное исследование позволило уточнить влияние структуры агликона на иммуномодулирующую активность гликозидов МДП в отношении иммунокомпетентных клеток человека, и сделать еще один шаг на пути создания на основе β-гептилгликозида МДП иммунотропного препарата, имеющего потенциал к внедрению в комплексное лечение инфекционных и опухолевых заболеваний.

## ВЫВОДЫ

1) В концентрации 1 мкмоль/мл β-гликозиды мурамилдипептида (МДП) с алифатическими агликонами, также как и МДП, не влияли на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови человека; среди гликозидов с циклическими агликонами только β-циклооктилгликозид МДП повышал NK-зависимую цитотоксичность, а β-адамантилгликозид МДП снижал ее. При увеличении концентрации до 10 и 100 мкмоль/мл наибольшую активность, сопоставимую с таковой у МДП, проявлял β-гептилгликозид МДП; увеличение числа атомов углерода в алифатической цепи агликона от 7 до 12 коррелировало со снижением способности гликозидов МДП стимулировать NK-активность мононуклеарных лейкоцитов.

2) β-Гептилгликозид МДП в концентрации 10 мкмоль/мл в той же степени, что и МДП, увеличивал долю нейтрофилов, активно фагоцитирующих частицы латекса в образцах цельной крови человека. Другие β-гликозиды МДП с алифатическими, циклическими и адамантильным агликонами не влияли на фагоцитарную функцию нейтрофилов.

3) МДП и β-гептилгликозид МДП повышали экспрессию CD14 на дендритных клетках человека *in vitro*, но не изменяли статистически значимо экспрессию других мембранных маркеров, характерных для созревающих и зрелых дендритных клеток. При этом обнаружена выраженная тенденция к увеличению экспрессии CD83 под влиянием обоих гликопептидов, HLA-DR – под действием β-гептилгликозида МДП, а также тенденция к снижению экспрессии HLA-DR и CD86 – под влиянием МДП, комбинаций молекул CD80+HLA-DR и CD86+CD14 – под действием обоих гликопептидов.

4) Через 1 час после внутрибрюшинного введения β-гептилгликозида МДП в сыворотке крови мышей повышалось содержание IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α и GM-CSF; в большинстве случаев это соединение превосходило МДП по цитокин-индуцирующей активности. Через 8 часов после инъекции β-гептилгликозида МДП в сыворотке крови сохранялась повышенная концентрация IL-1β и IFN-γ; в

большей степени, чем под влиянием МДП, возрастал уровень IL-5 и продолжалось увеличение содержания IL-6 и IL-10; концентрация TNF-α сменяла восходящий тренд на нисходящий, оставаясь на уровне выше, чем в контроле; содержание IL-2, IL-4 и GM-CSF практически возвращалось к контрольным значениям. Через 24 часа после введения β-гептилгликозида МДП сохранялся более высокий уровень IL-6, чем после инъекции МДП; МДП в большей степени, чем β-гептилгликозид МДП, поддерживал высокие концентрации IL-10 и TNF-α.

5) β-Гептилгликозид МДП при повторных внутрибрюшинных инъекциях в дозе 5 мкг/животное в терапевтическом режиме увеличивал продолжительность жизни мышей C57Bl/6 с имплантированной меланомой B16; в дозах 5 и 25 мкг/животное этот гликопептид, кроме того, вызывал значимое торможение роста опухоли. При однократном профилактическом введении β-гептилгликозид МДП статистически значимо не изменял рост узла меланомы и длительность жизни мышей-опухоленосителей.

6) Внутрибрюшинное введение β-гептилгликозида МДП в терапевтическом и профилактическом режиме не влияло на динамику норкового и поискового рефлексов у мышей линии C57Bl/6 с привитой меланомой B16.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты диссертационного исследования, углубляя и расширяя представления о спектре биологической активности β-гептилгликозида МДП, в том числе в отношении иммунокомпетентных клеток человека, позволяют рекомендовать этот гликопептид как перспективную субстанцию для создания на ее основе иммунотропного лекарственного средства.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Хочанский А.Н.,** Земляков А.Е., Калюжин О.В., Киселевский М.В Влияние В-гликозидов мурамилдипептида на NK-активность мононуклеаров человека. // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10. № 1. – С. 31.

2. **Хочанский А.Н.** Влияние модификации агликона на противоопухолевую активность мурамил дипептида in vivo // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. № 2. – С. 60а.

3. **Хочанский А.Н.** Влияние В-гептигликозида мурамилдипептида на рост и метастазирование меланомы В16 у мышей С57BL/6 // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. № 2. – С. 87.

4. **Хочанский А.Н**. Влияние гептилгликозида мурамилдипептида на динамику роста опухоли меланомы В16 и продолжительность жизни мышей линии С57BL // **Российский биотерапевтический журнал**. – 2013. – Т. 12. № 4. – С. 43-46.

5. **Хочанский А.Н**., Земляков А.Е., Калюжин О.В., Решетникова В.В. Влияние В-гликозидов мурамилдипептида на NK-активность мононуклеарных лейкоцитов и фагоцитарную функцию нейтрофилов человека // **Российский биотерапевтический журнал**. — 2014. – Т. 13. № 1. – С. 27-30.

6. **Хочанский А.Н**., Ахматова Н.К., Киселевский М.В., Калюжин О.В. Влияние внутрибрюшинного введения мурамилдипептида и его гликозида на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Иммунопатология и иммунореабилитация: от теории к практике» – Пенза. – 2015. – С. 81-82.

7. **Khochanskiy A.N**. The influence of muramyl dipeptide derivative on tumor-bearing mice // “PhD Scientific Days 2017”, 2017, Будапешт, Венгрия, электронная публикация. – http://phd.kmcongress.com/osszefoglalo/1971 (дата обращения 15.10.2017).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВГС – вирус гепатита С

ДК – дендритные клетки

ЛПС – липополисахарид

МДП – мурамилдипептид

МНК – мононуклеарные лейкоциты периферической крови

CD – кластер дифференцировки

FITS – флуоресцеин-изотиоцианат

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

HLA – человеческий лейкоцитарный антиген

IFN-γ – интереферон-γ

IL – интерлейкин

NLR – NOD-подобные рецепторы

MCHII – главный комплекс гистосовместимости

TCR – Т-клеточный рецептор

TLR – Toll-подобные рецепторы

Th – Т-хелперы

TNFα – фактор некроза опухоли α

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PRR – паттернз-распознающие рецепторы