

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Научно-исследовательский институт морфологии человека**

На правах рукописи

Хочанский Андрей Николаевич

**ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ АГЛИКОНА НА ИММУНОТРОПНУЮ
АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДОВ МУРАМИЛДИПЕПТИДА**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Калюжин О.В.

доктор медицинских наук, профессор

Киселевский М.В.

Москва – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
Глава 1. ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ	12
1.1. Коррекция состава микробиоты	12
1.2. Модуляция адаптивного иммунного ответа	14
1.3. Модуляция врожденного иммунитета	18
Глава 2. ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ	20
Глава 3. МУРАМИЛПЕПТИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ	24
3.1. Мурамилдипептид: общая характеристика, история изучения	24
3.2. Механизмы иммуностропной активности мурамилпептидов	26
3.3. Модификация структуры МДП в рамках поиска эффективных и безопасных иммуномодуляторов	28
3.3.1. Липофильные производные МДП	28
3.3.2. Производные МДП с модифицированным пептидом	29
3.3.3. Полимурамил как активатор рецепторов NOD1 и NOD2.	31
3.3.4. Влияние модификации сахаридной части мурамилпептидов на их иммуностропную активность	32
3.3.5. Влияние модификаций агликона на иммуностропную активность О-гликозидов МДП	34
3.3.6. Амфифильность β -гликозидов МДП как фактор повышения их биологической активности.	35
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
Материально-техническое обеспечение работы	38
Методы экспериментальных исследований	42
Методы статистической обработки результатов	50

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	51
Глава 1. ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЛИКОЗИДОВ МДП С АЛИФАТИЧЕСКИМИ, ЦИКЛИЧЕСКИМИ И ТРИЦИКЛИЧЕСКИМИ АГЛИКОНАМИ <i>IN VITRO</i>	51
1.1. Влияние гликозидов МДП на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови	51
1.2. Влияние гликозидов МДП на фагоцитарную активность нейтрофилов крови	56
1.3. Влияние МДП и β -гептилгликозида МДП на экспрессию маркеров активации дендритными клетками, полученными из крови здоровых доноров	59
Глава 2. ИММУНОТРОПНАЯ, ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ β -ГЕПТИЛГЛИКОЗИДА МДП <i>IN VIVO</i>	69
2.1. Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей C57BL/6 после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП	69
2.2. Действие β -гептилгликозида МДП на рост меланомы B16 и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей	97
2.3. Влияние β -гептилгликозида МДП на динамику поискового и норкового рефлексов у мышей C57BL/6 с привитой меланомой B16	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ВЫВОДЫ	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	117
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	118
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

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 [28, 149].

Следствием чрезмерного применения антибиотиков явилось возникновение инфекционных агентов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [44]. Клинической проблемой становится развитие среди патогенов устойчивости к антибиотикам резервного ряда. Достаточно часто возбудители инфекционных заболеваний резистентны к подавляющему большинству антибиотиков [225, 61]. 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 [208]. 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 [20, 24, 29].

Перспективной группой мультифункциональных иммуотропных соединений являются лиганды NOD-подобных рецепторов (NLR), активация которых способна не только усиливать экспрессию провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками, но и блокировать флогенные биохимические реакции [10]. 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 [1, 25, 31]. Рациональным подходом к увеличению биологической активности МДП является β -гликозилирование [3, 13, 15]. β -Гликозиды МДП обладают широким спектром иммуотропного действия и при этом характеризуются относительной легкостью синтеза [4].

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 иммуотропную активность гликозидов МДП [8]. Ранее определено влияние некоторых β -гликозидов МДП на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками *in vitro* и *ex vivo* [21]. 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 мышинных 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 [7, 13], 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 -додecilггликозиды МДП), циклическими (β -циклогексил-, β -циклооктил- и β -циклодецилггликозиды МДП) и трициклическим (β -адамантилггликозид МДП) агликонами, на цитотоксическую активность моноклеарных 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 В16, а также продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

6) Изучить влияние наиболее биологически активного β -гликозида МДП на показатели активности ЦНС мышей линии С57В1/6 с привитой меланомой В16.

Научная новизна исследования

Впервые определено влияние структуры агликона на иммуотропную 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 иммуотропной активности новых гликозидов МДП могут служить фундаментом для разработки безопасных и действенных иммуномодулирующих препаратов. Результаты изучения влияния строения агликонов на биологические свойства этих гликопептидов определяют 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 иммуностропной действенности соединений в условиях моделей *in vitro*.

2) β -Гептилгликозид МДП превышает по иммуностропной 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) Внутривбрюшинное 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 цитометрии.

Измерение уровня цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , 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.

Апробация работы

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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Разработка новых иммунотерапевтических методов существенно осложнена постоянной адаптацией и пластичностью иммунной системы в ходе ее ответа как на внешние угрозы, так и на патологию собственных тканей. В настоящее время эмпирический метод поиска перспективных направлений иммунотерапии нельзя считать достаточно рациональным и эффективным.

Задача создания иммуномодуляторов, усиливающих ответ на патоген и при этом не вызывающих или ограничивающих эндогенное поражение хозяина, является невозможной без всестороннего анализа фундаментальной основы механизмов иммунного ответа. Результат применения любого иммуностропного средства определяется целым рядом факторов клеточного, организменного и популяционного уровней, в связи с чем введение одинакового иммуномодулятора может оказывать различное влияние на противоинфекционный ответ в зависимости от экзогенных или эндогенных условий [207].

А.В. Караулов и О.В. Калюжин недавно рассмотрели актуальные проблемы иммунотерапии инфекционных заболеваний через призму решений Комитета по изучению новых направлений в иммунотерапии [21]. Этот Комитет, созданный Национальным исследовательским советом США на основе Научного института аллергии и инфекционных заболеваний в 2005 году, сформулировал требования к рациональному поиску новых иммуномодуляторов и клиническому применению уже существующих препаратов [207]. Одним из наиболее перспективных объектов поиска новых иммуномодуляторов являются бактерии и их структурные компоненты [21].

Глава 1. ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

С учетом вызовов, которые стоят перед современной клинической иммунологией, основными направлениями поиска новых методов иммунотерапии являются: терапия последствий изменений микроэкологии кишечной микробиоты; модулирование систем адаптивного иммунного ответа, в том числе введение терапевтических вакцин; манипулирование системами врожденного иммунитета [18, 194].

1.1. Коррекция состава микробиоты

Исследования, направленные на изучение состав микробиоты, указывают на то, что результаты колонизации человека бактериями-комменсалами являются благоприятными для здоровья организма-хозяина [207]. Информация о взаимодействии микробиоты и иммунной системы является теоретической базой для перспективных стратегий разработки новых иммуномодуляторов. К настоящему времени получена точная информация о количественном и качественном составе популяций комменсалов и симбионтов организма человека, что способствует модернизации представлений о механизмах взаимодействия микроорганизмов с иммунной системой организма-хозяина в контексте морфофункционального баланса Th1/Th2/Th17/Treg-лимфоцитов [180, 195].

Был проведен детальный анализ иммуногомеостатической роли бактерий-комменсалов ЖКТ человека и современных подходов, и принципов модуляции микробиоты с целью повышения эффективности лечения инфекционных болезней [12].

В свете последних открытий особенно перспективным является исследование роли рецепторов к компонентам бактериальных клеток, в частности семейства NOD-подобных рецепторов (NLR) как сенсоров сигналов со стороны комменсалов.

Лигандами NLR являются базовые мономеры пептидогликана – мурамилпептиды (МП). Другие PRR, такие как TLR, имеют либо стимулирующее действие на компоненты иммунной системы, либо, как в случае DC-SIGN, обладают способностью вызывать толерантность к антигенам.

Обнаружена связь болезни Крона, хронического воспалительного заболевания кишечника, с наличием определенных аллельных вариантов NOD2, при которых снижается/теряется функция этих рецепторов [69].

Нарушение проведения сигналов через эти рецепторы является одним из звеньев патогенеза дисбиоза, включающего в себя избыточный рост численности комменсалов кишечника, и связанного с недостаточностью продуцирования эпителиоцитами антимикробных пептидов [58, 71, 114].

В свою очередь, вызванная мутацией гиперчувствительность рецепторов NLR приводит к периодическим синдромам диффузного воспаления ЖКТ, связанными с криопирином [193].

Это указывает на то, что лиганды данных рецепторов участвуют в тонкой регуляции гомеостаза кишечного тракта и обеспечивают взаимодействие микробного и иммунного компонентов. Это позволяет использовать соединения, влияющие на NLR, не только как иммуномодуляторы, но и в качестве регуляторов кишечной микробиоты.

Синтезируемый в слизистых оболочках IgA рассматривается в качестве фактора, поддерживающего колонизацию ЖКТ и, возможно, респираторного тракта симбионтами [70]. Появляется все больше доказательств того, что иммуноглобулины слизистых оболочек не только служат для борьбы с инвазией патогенов, но и обеспечивают нормальный состав и количество резидентной микробиоты. Изучены лиганд-рецепторные системы, за счет которых комменсалы/симбионты усиливают противоифекционный иммунитет или иницируют развитие иммунной толерантности макроорганизма [206].

1.2. Модуляция адаптивного иммунного ответа

Наиболее значимые успехи в борьбе с инфекционными патогенами достигнуты путем манипулирования системой адаптивного иммунного ответа.

Вакцинация как терапия инфекционных заболеваний, за некоторыми исключениями, пока не вошла на широком уровне в медицинскую практику. Тем не менее, остается перспективной разработка и внедрение в клиническую практику вакцинации в качестве средства лечения хронических инфекционных заболеваний с длительной персистенцией возбудителя из-за малой эффективности иммунного ответа или лекарственной устойчивости.

Элиминация вируса ВИЧ-1 является целью для большинства разрабатываемых противоинфекционных терапевтических вакцин. Обнадеживающие результаты достигнуты при использовании сходных вакцин при лечении вируса папилломы человека [48].

Наряду с профилактической иммунизацией активно разрабатываются методы пассивной и активной иммунизации для лечения острых и хронических инфекционных заболеваний в качестве дополнения к химиотерапевтическим препаратам. В частности, был создан ряд препаратов и методик лечения пневмококковой пневмонии и менингококкового менингита, кори, дифтерии и скарлатины.

Несмотря на определенные успехи в лечении данных заболеваний, разработка и широкое внедрение в клиническую практику антибиотиков привело к угасанию интереса к пассивной иммунной терапии. Массовые иммунизации населения к многим ИБ стали причиной снижения заболеваемости и уменьшения масштаба медицинской проблемы, представляемой данными заболеваниями. Развитие все новых штаммов возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью, возродило интерес по отношению к ней. Полученные в ходе исследований данные подтвердили способность антител бороться с такими внутриклеточными патогенами, такими как *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, и

Histoplasma Capsulatum. Подвергается сомнению тезис об относительной функциональной независимости компонентов иммуноглобулина и доказано участие С-доменов вместе с V-областями в связывании антигенов [64].

Успехи в понимании химической природы наследственности позволили к середине 70-х годов разработать гибридную технологию, которая позволила создавать моноклональные антитела (мАТ) в практически неограниченных количествах и применять в клинической практике гибридные рекомбинантные антитела высокой аффинности к практически любым антигенам. 30 препаратов на основе моноклональных рекомбинантных антител допущены к применению в клинической практике при опухолевых или аутоиммунных заболеваниях [182]. В дальнейшем были созданы химерные и гуманизированные антитела, имеющие больший период полувыведения по сравнению с их естественными аналогами.

Значительный интерес вызывает потенциал антительной терапии вирусных инфекционных заболеваний, вызванных вирусом иммунодефицита человека, вирусами гепатита В и С.

Целый ряд мАТ проходит клинические испытания I и II фазы. Мишенями данных препаратов являются не только антигены возбудителей, но и молекулы клеток организма хозяина, участвующие в проникновении возбудителей в цитоплазму клеток (CCR5 и CXCR4 при ВИЧ инфекции, фосфатидилсерин при вирусном гепатите С и ВИЧ-инфекции), а также рецепторы иммунокомпетентных клеток, проводящие регуляторные сигналы (PD-1 при гепатите С, CTLA-4 при ВИЧ инфекции и гепатите С).

В ходе разработки новых препаратов на основе моноклональных антител возникла необходимость в установлении связей между средством, специфичностью, изотипом, дозой и защитной активностью данных молекул, что указывает на то, что дальнейшие исследования взаимодействия системы гуморального иммунитета с системой врожденного иммунитета должны быть направлены на поиск эффективных средств контроля над активацией

противоинфекционного иммунного ответа, а также способов неспецифического контроля врожденного иммунитета, действующих в качестве адъювантов.

Искусственное конструирование миметиков эпитопов возбудителей стало возможным благодаря определению трехмерного строения антигенсвязывающих участков антител и различных антигенов, взаимодействующих с соответствующими рецепторами Т-клеток и иммуноглобулинов [184, 77]. Полученные данные указывают на то, что возможно создание миметиков эпитопов таких возбудителей, как ВИЧ-1, вирусов гепатитов В и С, геморрагических лихорадок Эбола, Денге. Несмотря на это, наличие множества нерешенных проблем технического характера пока делает невозможным внедрение этих методов в клиническую практику.

Поиск новых антигенов для индукции развития приобретенного иммунитета сталкивается с большими трудностями в связи с ограничениями их структуры, из-за чего разработка эффективных и безопасных вакцин нуждается во все более полном понимании механизмов развития адаптивной иммунной реакции, феноменов процессинга, презентации антигенов, рецепторов В- и Т-клеток и свойств комплексов костимулирующих сигналов [186].

Остаются малоизученными перспективы ДНК-вакцин. I поколение ДНК-вакцин характеризуется неудовлетворительным уровнем трансфекции в сочетании с низкой иммуногенностью. ДНК-вакцины II поколения смогли преодолеть большую часть этих недостатков благодаря разработке улучшенного строения кодирующих антигенов нуклеотидных последовательностей, совершенствования способов доставки и включения молекулярных адъювантов [84].

Вакцинация с использованием ДК, включающим в свой состав антигены возбудителей, представляется перспективным подходом к стимуляции или инициации иммунного ответа в связи с ключевой ролью ДК в регуляции работы систем как врожденного и приобретенного иммунитета.

Продолжается разработка новых форм и путей введения вакцин. Подтверждена статистически значимая эффективность иммуностимулирующих комплексов, вирусоподобных средств доставки, используемых в качестве средств доставки антигенов путем захвата дендритными клетками [103, 184]. Перспективным путем введения вакцин является использование виросом – модифицированных липосом, включающих в себя структурные компоненты патогена, связанные с адьювантами. Такие адьюванты, как монофосфорилипид А (TLR4-агонист) липопротеин (TLR2-лиганд), CpG-олигонуклеотиды, а также синтетические аналоги иммуномодуляторов естественного происхождения вызывают статистически значимое увеличение иммуногенности виросом, содержащих антиген возбудителя [126, 190, 196]

В разработке, находятся ректальный, парамукозальный, интравагинальный, сублингвальный методы введения вакцин. Остаются актуальными и вакцины в виде глазных капель [92].

Представляется перспективной разработка аппликаций кожных пластырей, безыгольных методик, основанных на инъекционных растворах высокого давления, бомбардировка микрочастицами, а также методы мукозальной доставки вакцин, имитирующие механизмы естественного инфицирования слизистых оболочек. Главным препятствием на пути к широкому внедрению в клиническую практику мукозальной иммунизации является частое развитие иммунологической толерантности, что приводит к необходимости в пересмотре дизайна вакцин, способов их доставки и более эффективных адьювантов [232].

В ходе исследований было обнаружен потенциал применения иммуномодуляторов естественного происхождения в качестве адьюванта к интраназальным вакцинам против респираторных инфекций [190]. В данном случае агонисты образ-распознающих рецепторов, способны стать эффективными факторами созревания и дифференцировки ДК *ex vivo*.

1.3. Модуляция врожденного иммунитета

Для модуляции врожденного иммунитета необходимы как стимуляторы звеньев системы врожденного иммунитета, так и ингибиторы избыточных воспалительных реакций.

С учетом этого, становятся очевидными три подхода к наиболее рациональному терапевтическому увеличению эффективности систем врожденного иммунного ответа: использование антимикробных пептидов; стимулирование экспансии эффекторных клеток, активируемой системой врожденного иммунитета; применение агонистов PRR и препаратов, модулирующих пути, опосредованного PRR ответа.

Использование катионных антимикробных пептидов

Изучение катионных антимикробных пептидов в качестве кандидатов для создания иммуностропных лекарственных препаратов можно оценивать по их способности к модуляции врожденного иммунного ответа и борьбы с инфекцией, а также по способности модулировать иммунный ответ [93].

Антимикробные пептиды, отличающиеся высокой степенью консервативности, синтезируются эпителиоцитами и фагоцитами и обладают широким спектром действия и активности по отношению к грибам, простейшим, оболочным вирусам и бактериям.

Эти пептиды, содержащиеся в слизи и других биологических жидкостях, находящихся на границе организма и окружающей среды, являются одним из базовых компонентов врожденного иммунитета эпителиальных поверхностей, и участвуют в первичном контакте с патогеном [155]. В высокой концентрации они проявляют бактерицидные свойства, а в малых дозах модулируют другие звенья врожденного иммунитета. Однако в ходе создания препаратов на основе данных пептидов возник ряд существенных трудностей, связанных с чувствительностью к протеазам и выраженной токсичностью [127].

Наиболее рациональным путем их преодоления представляется модификация первичной структуры этих пептидов и разработка аналогичным им синтетических миметиков [189].

Использование агонистов PRR и препаратов, модулирующих PRR-опосредованный ответ

Обнаружены и описаны многие PRR, такие как мусорные рецепторы, TLR-, NLR-, RIG1-подобные рецепторы (RLR), рецепторы к компоненту C3b-комплемента (CR3), дектин-1 и некоторые другие молекулы, реагирующие на микробные сигналы различных классов. Открытие PRR вызвало появление широкого интереса к их лигандам как перспективным иммуномодуляторам, действующим на врожденный и приобретенный иммунитет. Более того, прояснились механизмы фармакологических эффектов целого ряда ранее созданных и уже внедренных в клинику иммуномодуляторов, например бактериальных лизатов [56].

Является оправданным поиск более эффективных и безопасных адъювантов среди агонистов PRR с целью увеличения эффективности вакцин. Несмотря на наличие адъювантной активности у множества известных соединений, лишь некоторые из них нашли свое место в клинической практике. Соли алюминия и AS04 (гидроксид алюминия + монофосфорилипид A) являются одними из немногих адъювантных препаратов, используемых в клинической практике на территории США и других развитых стран.

Во время поиска более эффективных адъювантов была обнаружена биологическая активность микроб-ассоциированных молекулярных паттернов (MAMP), включающих лиганды TLR. Относящиеся к группе TLR-агонистов соединения, такие как CpG-олигонуклеотиды (TLR9-лиганды) и поли(I:C) (лиганды TLR3), индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов, и интерферонов 1-го типа, стимулируя адаптивные Th1-зависимые защитные механизмы и потенцируют врожденные эффекторные реакции против патогенов [68, 198].

Еще одной группой веществ с доказанной адъювантной активностью, распознаваемых PRR, являются мурамилпептиды. Адъюванты этой группы являются агонистами NLR и способны воспроизводить механизмы

активирования адаптивного иммунного ответа, в естественных условиях происходящие при контакте с бактериями или их частями [231].

Глава 2. ИММУНОТЕРАПИЯ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Разностороннего анализа требуют проблемы и вызовы иммунотерапии опухолевых заболеваний. Несмотря на то, что многие иммунные механизмы борьбы с вирусным заражением схожи с таковыми при борьбе с переродившимися клетками, защита от новообразований поддерживается другими механизмами, нежели защита от инфекционных патогенов. Главным отличием новообразований от инфекционных процессов является филогенетическая тождественность опухолевых клеток клеткам макроорганизма. Это создает препятствия, как к их распознаванию клетками иммунной системы, так к их элиминации. Эти же проблемы являются актуальными и при попытках применения иммунотерапии в качестве способа борьбы с новообразованиями. Опухолевые клетки способны вырабатывать механизмы избегания или подавления иммунного ответа.

Иммунотерапия новообразований основана на опосредованном уничтожении опухолей посредством манипуляций компонентов иммунной системы. В связи с тем, что объектом манипуляции могут стать различные звенья противоопухолевого иммунного ответа, в разработке находятся различные методики иммунотерапии, которые можно условно разделить на активные и пассивные, каждая группа которых может быть специфической по отношению к конкретному типу опухолевых клеток или неспецифической.

К методам активной иммунотерапии относится индукция противоопухолевого иммунитета стимуляцией звеньев иммунного ответа.

Активная специфическая иммунотерапия заключается в искусственном формировании специфического клеточного противоопухолевого ответа. Малая иммуногенность большинства видов опухолей является главным препятствием к созданию эффективных видов подобной иммунотерапии [29].

Активная неспецифическая иммунотерапия действует на все звенья противоопухолевого иммунитета посредством использования цитокинов и адъювантов различного происхождения. Неспецифичность воздействия ограничивает эффективность терапии, основанной на подобной методике, и требует более полного понимания механизмов работы иммуностимуляторов и иммунорегуляторов.

Пассивная специфическая иммунотерапия заключается в применении моноклональных антител к антигенам, экспрессируемым опухолевыми клетками или же в адоптивном переносе в организм иммунных эффекторов, активированных по отношению к перерожденным клеткам.

Адоптивная иммунная терапия позволяет активировать звенья противоопухолевого иммунитета посредством переноса аутологичных или аллогенных иммунокомпетентных клеток, активированных *ex vivo* [23].

Основными популяциями клеток, применяемыми для адоптивной терапии, являются генетически модифицированные иммунокомпетентные клетки (CART), опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL), а также популяции киллерных клеток, такие как цитокин-индуцированные киллеры (CIK) или лимфокин-активированные киллеры (LAK).

CART-клетки, являющиеся искусственной популяцией иммуноцитов, несут на своей поверхности химерные структуры, мимикрирующие или воспроизводящие опухолевые антигены. Данные клетки способны пролиферировать и поддерживать выживание собственной популяции после переноса в макроорганизм и их применение является одним из наиболее перспективных направлений адоптивной иммунотерапии [164, 177, 136, 179].

TIL-клетки, или опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, рассматриваются в качестве метода лечения меланомы в виде селекции *in vitro* опухоль-специфичных линий Т-клеток с МНС-обусловленной противоопухолевой активностью [185]. Однако иммунотерапия, основанная на использовании популяций TIL-клеток, имеет неудовлетворительную эффективность в условиях клиники, что возможно связано с частой потерей

экспрессии неоантигенов опухолевыми клетками и слабой иммунной инфильтрацией новообразований. Также большим недостатком данного метода является высокая стоимость и техническая сложность [122].

Цитокин-индуцированные киллеры (CIK) показали свою эффективность в предотвращении рецидивов опухолевых заболеваний после радикального удаления пораженного органа. Данная популяция клеток, являющаяся аутологично измененными Т-клетками, которые после манипуляции приобретают свойства как Т-клеток, так и NK-клеток. [187 222]. Лимфокин-активированные киллеры (LAK) производятся путем коинкубации моноклеарных лейкоцитов с IL-2, что приводит к проявлению ими цитотоксических свойств. Полученные в ходе манипуляции NK-клетки обладают более широкой противоопухолевой активностью и способны уничтожать широкий диапазон перерожденных клеток. LAK терапия испытывается на случаях рака легкого, почки, молочной железы и меланомы. Главными недостатками данного метода является необходимость поддержания жизнеспособности модифицированных клеток путем постоянного введения IL-2, который способен ускорять пролиферацию нативных иммуносупрессорных Treg-клеток. В связи с этим в качестве альтернативного фактора созревания LAK-клеток рассматривается IL-15 [176, 106].

Несмотря на постоянный поиск новых антигенов, специфичных только для опухолей, эффективность моноклональных антител уменьшается при избегании опухолью иммунного ответа и изменении антигенов в результате мутации. Так же остается высокой цена производства моноклональных антител, особенно в индивидуальных случаях.

Исследование возможности применения пассивной неспецифической иммунотерапии опухолей в клинике не является приоритетным направлением научного поиска в связи с малым количеством известных соединений, обладающим выраженным противоопухолевым эффектом, и высоким риском развития осложнений и побочных реакций при их применении.

Активная неспецифическая иммунотерапия является перспективной в плане создания эффективного лечения опухолевых заболеваний.

Одним из походов к разработке новых методов активной неспецифической терапии является борьба с иммуносупрессией, вызываемой опухолевыми клетками. В условиях клиники в настоящее время проходят испытания препараты на основе моноклональных антител к рецептору CTLA-4, экспрессируемому иммунокомпетентными клетками, и рецептору PD-1, экспрессируемому опухолевыми клетками.

CTLA-4 вызывает при активации иммуносупрессию и лиганды к нему часто присутствуют на мембране высокоагрессивных форм опухолей. В то же время контакт с PD-1 вызывает у иммунокомпетентных клеток преждевременный апоптоз [149, 154, 181, 183].

Несмотря на продолжающиеся клинические испытания, пока не доказано достоверного эффекта у пациентов, получающих препараты, блокирующие данные рецепторы. Также были выявлены тяжелые и иногда жизнеугрожающие побочные действия испытываемых препаратов, что связано с недостаточной изученностью роли блокируемых ими рецепторов в иммунорегуляции.

Альтернативой изолированному применению моноклональных антител и средств адоптивной терапии может стать их совместное использование. Наиболее перспективным на данный момент является комбинирование двух методик на стадии создания адоптивных популяций, а также использование модифицированных дендритных клеток для манипуляции клетками *ex vivo* [153, 102].

В связи с вышеперечисленными проблемами, обнаруженными в ходе лабораторных и клинических испытаний, сохраняет свою актуальность и изучение иммуномодуляторов широкого спектра действия как средств неспецифической активной иммунотерапии опухолей. Они способны усиливать иммунный ответ на переродившиеся клетки, подавлять производимую ими иммуносупрессию и обладают меньшей стоимостью и более

простым применением по сравнению с другими методами иммунотерапии. Механизмы действия многих иммуномодуляторов хорошо изучены и поэтому становится возможным создавать при их применении прогностические критерии эффективности. Среди иммуномодуляторов, обладающих доказанной эффективностью при опухолевых заболеваниях, перспективными являются иммуномодуляторы естественного происхождения, такие как мурамилпептиды.

Глава 3. МУРАМИЛПЕПТИДЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

3.1. Мурамилдипептид: общая характеристика, история изучения

Мурамилпептиды являются мономерами пептидогликана клеточной стенки бактерий. Гибридная структура (олигопептид + моносахарид или дисахарид) позволяет мурамилпептидам формировать гетерополимеры с достаточно высокой механической и химической устойчивостью, в которых горизонтальные соединения мономеров обеспечивают β -1,4-гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и остатком N-ацетилмурамовой кислоты, в то время как роль вертикальных связывающих цепей выполняют олигопептиды, состоящие из 4-5 аминокислот.

Первый представитель группы данных соединений, МДП, был открыт в 1974 году при поиске минимального действующего компонента адъюванта Фрейнда [82]. Адъювант Фрейнда был разработан в 1937 году и является масляной эмульсией, содержащей убитые термическим воздействием микобактерии. Он способен инициировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет [89]. В связи с высокой токсичностью адъюванта Фрейнда, его практическое применение ограничено ветеринарной практикой и фундаментальными исследованиями, но дальнейший поиск активных компонентов адъюванта Фрейнда привел к получению нескольких гликопептидов, в том числе МДП [157, 221]. Было выявлено, что МДП

является минимально возможным компонентом, способным заместить микобактерию в составе адьюванта Фрейнда [137].

МДП имеет в своем составе N-ацетилмурамовую кислоту, D-аланин и D-изоглутамин (или D-глутамин). D-аланин находится на первой позиции, D-изоглутамин на второй, L-лизин или DAP занимают позицию третьей аминокислоты.

МДП способен вызвать индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Но, в отличие от полного адьюванта Фрейнда, МДП не несет в своей структуре антигенов и, таким образом, не инициирует выработку специфических иммуноглобулинов [137]. МДП усиливает иммунный ответ за счет усиления синтеза IFN- γ и других цитокинов и запускает процессы пролиферации и дифференцировки у иммунокомпетентных клеток [188, 201, 210].

В то время как основным рецептором, распознающими МДП, является NOD2, муропептиды, содержащие DAP распознаются рецептором NOD1. МДП и подобные ему молекулы усиливают экспрессию поверхностных маркеров, необходимых для клеточной адгезии и презентации антигенов и, таким образом, вызывают усиление фагоцитарной активности и иммуноглобулин-ассоциированной цитотоксичности [74, 76, 113, 160, 168, 215,]

Химическая структура муропептидов играет ключевую роль в их распознавании иммунокомпетентными клетками в качестве адьювантов. Муропептиды способны к синергии с другими адьювантами, такими как Липополисахарид (ЛПС) распознаваемый Toll-подобным рецепторами-4 (TLR4), что увеличивает эффективность муропептидов при совместном введении. Данный эффект был обнаружен при исследовании эффекта синергии адьювантов на мононуклеарных лейкоцитов цельной крови, моноцитов и других клеточных линии иммунокомпетентных клеток, а также на модели крысиной анорексии [72, 123, 142, 162, 209, 211, 214, 220, 230].

3.2. Механизмы иммунотропной активности мурамилпептидов

Рецептор NOD2, распознающий МДП и его производные, играет роль регулятора адаптивного и врожденного звеньев иммунного ответа, экспрессируется макрофагами, дендритными клетками, мононуклеарными лейкоцитами периферической крови и кишечными эпителиальными клетками (в том числе клетками Панета) [105, 132, 141, 166, 167]. NOD2 регулирует синтез цитокинов, хемокинов и антимикробных белков [97, 117, 174, 224] и характеризуется наличием трех составных частей:

- 1) Эффекторный N-терминальный участок, содержащий участок присоединения каспазы (CARD);
- 2) Участок связывания нуклеотида (NBD), и зона связывания АТФ, необходимая для олигомеризации сигнальной цепи;
- 3) Богатые лейцином повторения (LRR) [83, 118, 119, 156]

После конъюгации с МДП рецептор NOD2 присоединяется к RIP2 киназе посредством CARD-CARD гомофильных взаимодействий [55, 116, 133]. Передача сигнала к RIP2 киназе ведет к запуску NF- κ B транскрипторной активности посредством передачи сигнала по комплексам ИКК (И κ B киназа) и MAP киназы. В результате начинается продукция провосполительных цитокинов и хемокинов, таких, как интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-8), интерлейкин 12 (IL-12) и фактор некроза опухоли- α (TNF- α) [131, 147].

Остаются неизвестными строение и функциональные особенности белков, регулирующих прохождение сигналов через систему NOD2. К таким белкам относится Эрбин. Данный белок является ингибитором активации NOD2 посредством блокирования CARD и остановки передачи сигнала и активации NF- κ B NOD2 и RIP2 киназа так же принимают участие в регуляции апоптоза и воспалительных процессов через влияние на каспаза-1 зависимое созревание L-1 β и IL-18 [51, 67, 138, 152, 228]. Для инициации каспаза-1 зависимой продукции IL-1 β после контакта клетки с МДП необходима стимуляция NOD2 и RIP2 киназы [169].

Нарушение сигнального пути, в котором участвует рецептор NOD2, может способствовать развитию хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта у человека. В ходе генетического скрининга, у 30-40 % больных болезнью Крона были обнаружены 3 вида мутации генов, ответственных за экспрессию NOD2 [115, 167]. Воспалительные заболевания толстой кишки, такие как болезнь Крона, вызываются сочетанием факторов генетики, эпигенетики, условий окружающей среды и сопровождаются чрезмерной выработкой цитокинов и хронической гиперстимуляцией энтеральной иммунной системы [60, 87, 143, 152]. Секвенирование генетического кода определило местоположение генов, кодирующих NOD2, которые у человека данные гены расположены в локусе IBD1. на хромосоме 16q12. Была выявлена связь между мутациями на данном локусе и развитием болезни Крона [115]. Все мутации, ассоциированные с развитием болезни Крона были обнаружены рядом с участком, кодирующим LRR, находящимся на С-конечном участке белка. Мутация 3020insC приводит к возникновению преждевременного стоп-кодона, который частично прерывает участок LRR, в то время как мутации R702W и G908R приводят к одиночному полиморфизму нуклеотидов [43, 128]. Точный механизм развития болезни Крона при данных мутациях остается неизвестным. Ведущей гипотезой связи данных мутаций и болезни Крона является гипотеза о развитии нерегулируемого иммунного ответа из-за нарушения регуляционных сигналов от мутантного Toll-подобного рецептора иммунокомпетентных клеток. Также проверяется гипотеза о нарушении функционирования клеток Панета [54, 132, 175, 218, 219, 223].

Нейротропность МДП и его производных остается плохо изученной по сравнению с таковой у ЛПС. Исследования, проведенные на крысах, показали способность МДП влиять на функции центральной нервной системы, но точный субстрат нейротропного действия МДП пока не известен [45]. Активация NOD2 рецепторов и последующая экспрессия провоспалительных и пирогенных цитокинов может оказывать влияние на клетки центральной

нервной системы, что указывает на неспецифичность действия МДП [57]. До конца не ясно, в какой степени нейротропные эффекты МДП являются прямыми или опосредованными [86].

3.3. Модификация структуры МДП в рамках поиска эффективных и безопасных иммуномодуляторов

Клиническое применение немодифицированного МДП затруднено в связи с его пирогенной активностью, которая связана с индукцией выработки эндогенных пирогенов. Ограничение дозы препарата делает его применение неэффективным из-за быстрого выведения МДП с мочой, что является следствием высокой гидрофильностью молекулы МДП.

Структура молекулы МДП может быть с относительной легкостью модифицирована, что позволяет создавать ее синтетические аналоги с целью улучшения биодоступности или усиления иммунотропной активности. Раскрытие механизма действия МДП и его производных привело к увеличению интереса научного сообщества к влиянию структуры производных МДП на их взаимодействие с рецептором NOD2.

3.3.1. Липофильные производные МДП

Липофильные соединения обладают большей биодоступностью по сравнению с их липофобными аналогами, что позволяет уменьшить наименьшую эффективную дозу препарата.

Мурабутид (N -ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин-n-бутиловый эфир) является одним из производных МДП с увеличенной липофильностью, находящихся в стадии клинических испытаний. Мурабутид усиливает неспецифическую резистентность к бактериальным и вирусным инфекциям, имеет малую пирогенность и уменьшает летальность у мышей после введения LPS [66, 98, 172, 173]. Мурабутид способен к синергии с противовирусными и противовоспалительными цитокинами, такими как IFN- α , а также может

усиливать противоопухолевый эффект IFN- α и IL-2 на мышинных моделях [49, 178].

Экспериментальные данные указывают на то, что Мурабутид оказывает влияние на продукцию цитокинов без активации синтеза провосполительных факторов [50]. Введение данного вещества совместно с интерлейкином-2 мышам с саркомой линии Meth-A вызвало значимое торможение роста опухоли у 70 % животных экспериментальной группы. Мурабутид способен тормозить репликацию ВИЧ-1 в остро зараженных макрофагах и дендритных клетках моноцитарного происхождения [74].

Инкапсулированное в липосомы производное МДП, иммуномодулятор (МТР-РЕ), или МДП, конъюгированный полигуалиновой кислотой, показали значимые значения противоопухолевой активности в эксперименте [129, 202]. Паклитаксель (Taxol®), конъюгированный с МДП обладает не только противоопухолевой активностью, но и иммуностимулирующим эффектом [146].

N-ацетилглюкозамин-N-ацетил-мурамил-L-аланил-D-изоглютамин-L-аланил-глицерил дипальмитат (ImmTher) способен инициировать нейтрофильный лейкоцитоз и повышение экспрессии TNF.

3.3.2. Производные МДП с модифицированным пептидом

С точки зрения эффективности разработки новых лекарственных препаратов наиболее легким элементом для модифицирования МДП является олигопептид.

В ходе поиска новых более эффективных и безопасных модификаций и аналогов МДП было проведено экспериментальное испытание гликомурид-пептидов с измененной пептидной цепью. Для определения адъювантной активности у вновь синтезированных модификаций МДП испытуемое соединение в растворе воды и минеральных масел вводилось морским свинкам совместно с гетерологичными белковыми антигенами или азобензенарсонат-N-Ацетил-L-Тирозином для определения влияния испытуемого соединения на

развитие реакции замедленного типа. В ходе испытания исследуемых препаратов на модели индуцированного энцефалита, модифицированные муропептиды вводились лабораторным животным совместно с энцефалолитогенными антигенами. Данные, полученные в ходе этой работы, указывают на то, что аминокислота L-Аланин, входящая в состав N-ацетилмурамил-L-Аланин-D-Изоглутамин (МДП-L-D), может быть заменена другой L-аминокислотой, такой как L-Серин, в то время как замена L-Аланина на D-Аланин (МДП-D-D) резко снижает адьювантную активность.

Также было выявлено, что функциональность D-глутамовой кислоты важна для общей иммуотропной активности, в то время, как изменение структуры α -амида не оказывает влияния на иммуотропность. D-аспартановый, D-норлейциновый и L-изоглутаминовый аналоги МДП (MDD-L) не имели иммуотропной активности. Но гликомуриды с заменой D-изоглутамин на D-глутамовую кислоту или на α , γ -диметил эфирные аналоги обладали повышенной иммуотропностью по сравнению с немодифицированным соединением [41, 42, 78].

Аналог МДП, у которого D-изоглутамин заменен на D-глутамин, D-глутаминовую кислоту или D-изоаспарагин, имеет значительно меньшую адьювантную активность, в то время как замена D-аминокислот пептидной цепи на L-аналоги вызывает полное исчезновение иммуотропности. Изменение структуры пептида МДП позволяет менять не только их иммуномодулирующую активность, но и липофильность всей молекулы.

Среди липофильных аналогов МДП с модифицированным пептидом иммуотропную активность в эксперименте показали Мурамилтрипептид (МТП)-Холестерол, содержащий гидролизуемый сложный эфир и МТП-октадекан или МТП-гептадекафтороктадекан, содержащие негидролизруемые эфиры. Изучение МТП-холестерола показало наличие у него выраженной иммуотропной активностью по отношению к макрофагам линии RAW264.7. На это указывает повышение концентрации нитритов внутри этих клеток, что позволяет предположить об повышении активности

НО-синтетазы. Данный фермент является одним из основных факторов цитостатической активности макрофагов в противомикробных звеньях иммунной системы. С другой стороны, липофильные эфиры МДП не имели иммуотропной активности, что позволяет предположить, что липофильные аналоги МДП нуждаются в гидролизации внутри клеток для превращения в иммуотропные гидрофильные метаболиты [139, 233].

3.3.3. Полимурамил как активатор рецепторов NOD1 и NOD2

Несмотря на то, что большинство изучаемых муропептидов являются синтетическими или полусинтетическими соединениями, поиск эффективных иммуномодуляторов естественного происхождения остается актуальной задачей. Новые методики очистки позволили создать соединения, более безопасные, нежели адьювант Фрейнда. Перспективным препаратом на основе продуктов лизоцимного гидролиза *Salmonellae typhi* является полимурамил, представляющий из себя собой комплекс муропептидов [32]. Данное соединение является смесью из трех муропептидов : β -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мура-моил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновая кислота, β -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезодиаминопиме - лоил-D-аланин); 3) димер предыдущего соединения в котором мономерные остатки соединены амидной связью между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка и ω -аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого остатка.

В работах М.В.Пашенкова и соавторов показано, что данный комплекс соединений обладает иммуотропной активностью по отношению к широкому спектру иммунокомпетентных клеток, а также умеренной эффективностью в комплексной терапии гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей [33, 34]. Тем не менее, степень клинической эффективности полимурамила требует уточнения в дальнейших контролируемых испытаниях с большим количеством больных [30, 31].

3.3.4. Влияние модификации сахаридной части мурамилпептидов на их иммуотропную активность

Влияние изменения участка молочной кислоты (C3) на биологическую активность производных МДП

Хиральность участка молочной кислоты МДП влияет как на стабильность, так и на иммуотропную активность соединения. В то же время, нор-МДП, не обладающий метиловым радикалом на той же позиции, отличается таким же уровнем иммуотропности при меньшей токсичности [73].

Влияние изменения N-ацетильного участка (C2) МДП на иммуотропность производных МДП

Замена ацетоамидной группы на ОН-, NH₂- или N-группы не снижает иммуотропности производных МДП. В то же время, деаминовые или деоксные модификации теряют способность вызывать реакцию замедленного типа на азобензарсонат-N-ацетил-L-тирозин у морских свинок. Введение липофильной ацетиламидной группы увеличивает адъювантную активность полученного соединения [46, 108].

Влияние 4, 6-О-замещения D-глюкозамина (C4, C6) на иммуномодулирующую активность мурамилпептидов

N-Ацетил-β-D-глюкозаминил МДП превосходил МДП в способности вызывать у морских свинок реакцию замедленного типа и повышать уровень антител к овобулину [108, 140]. В положении C-6, гидроксильная группа может быть заменена на тиольную, аминную или на неацилированную аминную группу без потери иммуотропности у полученного соединения 46[4]. Уместно сравнение липофильных 6-S-ацил производных МДП с 6-О-ацил производными МДП, которые обладают высокой активностью [109]. Ациляция углевода в положении 6 при помощи миколческих кислот, гидроокисных жирных кислот и хининалканоиков, усиливала активность полученного препарата по отношению к ВИЧ-1 и опухолям различного генеза

[91, 135]. 6-O-(тетрадецилгексадеканоил)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (В30-МДП) показал наличие адьювантной активности при индукции адаптивного иммунного ответа [192]. Модификации МДП, основанные на ваминоалканокарболовой кислоте, замещенной N-Акридином, показали наличие стимуляции цитотоксической активности НК клеток, полученных из селезенок здоровых животных и животных с меланомой АВ [80,81]

Дезмурамилпептиды

Карбоциклический аналог МДП, в котором N-ацетилмурамовая кислота была заменена на циклогексанол, был не способен усиливать реакцию замедленного типа у морских свинок [46]. Другие карбоциклические аналоги, синтезированные в реакции перестановки Ферье, не имели отличий в активности от немодифицированного МДП, стимулируя неспецифические механизмы защиты от вирусных и бактериальных инфекций, высвобождение колониестимулирующих факторов, противоопухолевую активность и синтез IL-1 макрофагами [94].

A-карбоциклический нор-МДП аналог, в котором N-ацетилмурановая кислота была заменена на транс-2-[[2'-(ацетиламино)циклогексил] окси] ацетиловую группу, а D-изоглутамин на D-глутамовую кислоту, обладал той же степенью адьювантной активности, что и немодифицированный МДП. В то же время данное соединение было апирогенным и менее токсичным [130]. Были проведены попытки замещения N-ацетилмурановой кислоты на N-фталоитированные аминокислоты и фталамидо-дополненную аминоэтоксуксусную кислоту [99, 212]. Дезмурамилпептид LK423 усиливает синтез IL-10 клетками селезенок мышей, подвергшихся действию циклофосфороамида, а также уменьшает тяжесть декстранового колита у лабораторных животных. Это делает данное соединение базой для перспективной разработки новых противовоспалительных препаратов. LK423 стимулирует продукцию фактора некроза опухоли у культуры человеческих мононуклеарных лейкоцитов, стимулированных 13-ацетатом и иономицином

[100, 159, 165, 194]. Аналоги LK 415 и LK 517 с добавлением Адамантана, а также LK 423 являются регуляторами синтеза IL-12 и IFN- γ . Фосфонатный участок, введенный в LK 415 играет ключевую роль в усилении синтеза цитокинов Т-клетками [144, 213]. В ходе исследований было обнаружено, что DFK1012, производное МДП, обладает выраженным противовоспалительным эффектом. Данное свойство этого соединения является следствием его взаимодействия с TLR и NLR рецепторам.

3.3.5. Влияние модификаций агликона на иммуностимулирующую активность гликозидов МДП

Гидроксильная группа в положении C1 может быть удалена или заменена тиольной группой без изменения иммуностимулирующей способности [108]. Замена на липофильные α - или β -бензил-гликозидные группы и 1-О-ацильные и 1-S-ацильные группы, изменяет адъювантную активность соединения [109]. Отдельные исследования показали, что увеличение углеродного числа агликона соответственно увеличивает способность производного МДП усиливать цитотоксическую активность натуральных киллерных клеток. Эти данные противоречат исследованиями, проведенным коллективом во главе с О.В. Каляжиным [13]. 1-О-арилы и 1-S-арилы показали в экспериментах способность стимулировать устойчивость макроорганизма к бактериальному заражению. Замещение в ароматическом кольце может вызывать изменение цитолитической активности по отношению к клеткам линии K562. На это указывает отсутствие заметного цитолитического эффекта у незамещенного фенил-тиогликозида в отличие от его замещенных аналогов [213]. Некоторые исследования показали наличие большего адъювантного эффекта у β -метилгликозида МДП по сравнению с α -метил гликозидом [63]. Другие исследования показали полное отсутствие иммуностимулирующей способности у α -гликозидов МДП, что говорит о важности конформационной структуры гликозидов при их распознавании NOD2 рецептором. Подтверждением этому является потеря соединениями иммуностимулирующей способности при введении в аномерный центр аминофенильной группы. В то же время присоединение неактивного

p-аминофенил β -гликозида к глуталальдегиду приводит к частичному восстановлению иммунотропности полученного олигомера. Более того, данный олигомер превосходил немодифицированный МДП по способности защищать экспериментальных животных от инфекционных заболеваний [200]. Эксперименты *in vivo* показали, что степень липофильности агликона способна оказывать влияние на биологическую активность производных МДП путем увеличения адъювантной активности и снижения пирогенности [101]. Примером манипуляции с липофильностью соединений является введение перфторалкильной группы в аномерное положение глюкоидного участка [52].

3.3.6. Амфифильность β -гликозидов МДП как фактор повышения их биологической активности

β -гликозиды МДП стали объектом интереса для отечественной иммунологии и фармакологии в начале 90-х годов XX века, когда были проведены первые работы по изучению их иммунотропной активности на базовых иммунологических моделях. В ходе данных экспериментов была выявлена значимая иммунотропная активность производных МДП, сравнимая или превышающая таковую у немодифицированного МДП [8, 11]. Обнадеживающие результаты первых серий исследований подтолкнули научный коллектив во главе с О.В. Калюжиным к расширению спектра работ как по поиску наиболее активного β -гликозида МДП, так и по попытке объяснить более высокую активность данной группы соединений по сравнению со сходными α -гликозидами МДП. Серии экспериментов, проведенных *in vitro* указывали на то, что степень липофильности соединений влияет на биологическую активность гликозидов МДП и подтвердили, что амфифильные β -гликозиды МДП обладают биологической активностью, превышающую таковую у их липофильных аналогов [3, 5].

В ходе последовавших серий экспериментов среди изучаемых соединений было отобрано соединение, наиболее подходящее для внедрения в клиническую практику. Таким соединением оказался β -гептилгликозид МДП, использовавшийся определенный период времени на практике в качестве

биологической активной добавки к пище под коммерческим названием Глимурид [5]. Первоначальной сферой применения данного препарата стала неспецифическая стимуляция иммунного ответа при хронических инфекционных заболеваниях. Достоинством β -гептилгликозида МДП по сравнению с другими соединениями данной группы является легкость синтеза, что позволяет снизить расходы при массовом производстве и таким образом снизить цену готового препарата при коммерческой продаже [4].

Одновременно с началом клинических исследований этого иммуномодулятора продолжилось более подробное изучение свойств новых производных МДП с применением различных экспериментальных моделей. Проведена серия исследований на предмет изучения активности β -гептилгликозида МДП *in vivo* на модели лимфомы EL-4 у мышей [7]. Исследования на моделях *in vivo* показали наличие противоопухолевого эффекта введения препарата животным-опухоленосителям.

Доказана перспективность применения β -гептилгликозида МДП для профилактики инфекционных осложнений у онкологических больных [25].

Использование Глимурида у больных хроническим описторхозом позволило снизить выраженность иммунных расстройств после проведенной дегельминтизации. Глимурид также явился эффективным средством для терапии клинических проявлений резидуального описторхоза [6].

Анализ опыта клинического применения Глимурида говорит о потенциале β -гликозидов МДП как средств патогенетического лечения персистирующих инфекций [22].

β -Гликозиды МДП рассмотрены в качестве индукторов иммунозависимых аборт у мышей. Введение гликозидов МДП достоверно увеличивало частоту резорбции эмбрионов у животных [2].

Изучено влияние β -гептилгликозида МДП на продукцию цитокинов спленоцитами мышей *ex vivo* [26]. Также определено влияние β -гептилгликозида МДП на пролиферацию спленоцитов, тимоцитов у мышей с индуцированным гепатитом. Внутривентральное введение гликозида МДП

уменьшало распространенность некроза гепатоцитов с подавлением пролиферации тимоцитов на третьи сутки и с ее последующим усилением на седьмые сутки. Введение препарата не вызвало значимого изменения пролиферации спленоцитов у животных [37].

Остаются недостаточно изученными биологические эффекты β -гликозидов МДП *in vivo*. Так, открыт вопрос о влиянии этого иммуномодулятора на динамику концентрации про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови лабораторных животных. Большая часть экспериментов *in vitro* осуществлена с применением клеточных культур мышей, но не человека. Действие β -гликозидов МДП на экспрессию дендритными клетками маркеров созревания и активации ранее не оценивалось.

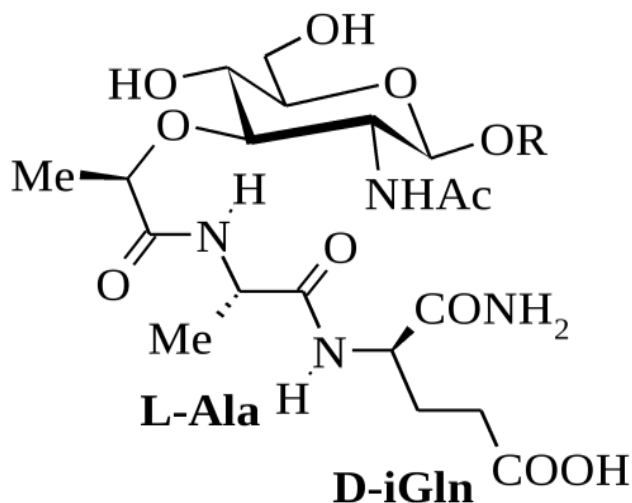
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Материально-техническое обеспечение работы

Характеристика исследуемых соединений

Исследуемые β -гептил-, β -децил-, β -додecil-, β -адамантил-, β -циклогексил-, β -циклооктил- и β -циклодецилгликозиды МДП, а также МДП синтезированы и любезно предоставлены заведующим кафедрой органической и биологической химии факультета биологии и химии Таврической академии ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского».

Общая структура β -гликозидов МДП представлена на рисунке 1.



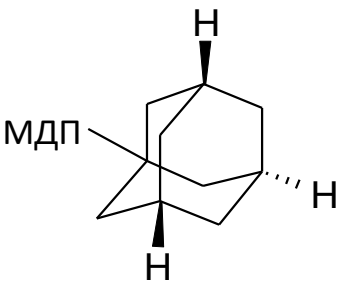
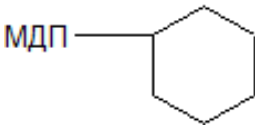
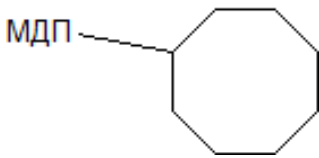
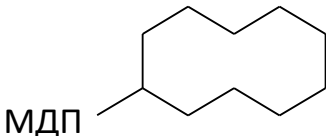
Примечание: R – агликон

Рисунок 1. Структура β -гликозидов МДП

Структура агликонов и молекулярный вес изучаемых веществ представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика исследованных β -гликозидов МДП

Название	Строение агликона	Молекулярный вес (Да)
Гептилглюкозид МДП		590
Децилглюкозид МДП		632
Додецилглюкозид МДП		660
Адамантилглюкозид МДП		640
Циклогексилглюкозид МДП		574
Циклоктилглюкозид МДП		602
Циклодецилглюкозид МДП		630

Клеточные линии

В работе были использованы клетки эритролейкемии человека линии K562 полученные из банка клеточных линий ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все клеточные культуры культивировались в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамина, 25000 ЕД стрептомицина, пенициллина с добавлением фетальной телячьей сыворотки в концентрации 10% (полная питательная среда – ППС), в условиях поддержания концентрации атмосферного CO₂ равной 5 %, абсолютной влажности атмосферы 10% и температуры 37°C ± 0,5°C.

Лабораторные животные

В работе были использованы половозрелые самцы мышей линии C57Bl/6 и CBA массой тела 18-22 г, полученные в филиале "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства".

Экспериментальных животных содержали на стандартном пищевом рационе брикетированных экструдированных кормов, со свободным доступом к корму и питьевой воде.

Манипуляции с лабораторными животными проводили в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей ЕЭС (Страсбург, 1985), руководствуясь требованиями Хельсинской декларации и Всемирной медицинской ассоциации (2000), а также рекомендациями, содержащимися в Директивах Европейского сообщества (86/609 ЕС), Приложении к приказу министра здравоохранения СССР №755 от 12.08.1977, Приказом Минсельхоза РФ №490 от 05.11.2008 «Об утверждении правил проведения лабораторных исследований в области ветеринарии» и Национальным Стандартом

Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 53434-2009).

Использованные химические реактивы и наборы

В экспериментальной части работы применяли следующие материалы: Азур-Эозин для окрашивания по Романовскому («МиниМед», Украина), метиленовый синий для окрашивания по Май-Грюнвальду («МиниМед», Украина), формальдегид («ХимМед», Россия), 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил4]-2,5дифенилтетразолий бромид (МТТ) («ПанЭко», Россия), среда RPMI-1640 (Sigma) с 25 mM HEPES («ПанЭко», Россия), раствор Хенкса («ПанЭко», Россия), сыворотка крови телячья эмбриональная («ПанЭко», Россия), раствор фикола-урографина $\rho=1,077$ г/см³ («ПанЭко», Россия), таблетки для приготовления фосфатно-солевого буфера, pH=7.4 («ПанЭко», Россия), глутамин натрия («ПанЭко», Россия), пеницилин (25 000 ЕД) («ПанЭко», Россия), стрептомицин (25 000 мг) («ПанЭко», Россия), NaCl 0,9% (физиологический раствор) (ООО «Гемотек», Россия), латекс для фагоцитоза 1,5 мкм 10 мл («ПанЭко», Россия), нитросиний тетразолий (НСТ) («MERCK», Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) («ПанЭко», Россия), антитела к CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14, HLA-DR («Becton Dickinson», США, и «Beckman Coulter», США), Flow Cytomix Mouse Th1/Th2 10 plex Kit («Bender MedSystems», Австрия).

Использованное оборудование и расходные материалы

При выполнении работы были использованы нижеперечисленные виды аналитического и лабораторного оборудования и инструментов: центрифуга («Joan», Франция), пластиковые пробирки 14 мл и 50 мл («Termo Scientific», США), матрасы для культивирования клеточных культур («SPL», США), CO₂-инкубатор («NuAire», США), автоматические дозаторы фиксированного и переменного объема («BIOHIT», Финляндия), весы лабораторные электронные («Adventure Pro AV 264C ohaus corp», США) камера Горяева («МиниМед», Украина), термостатический шейкер («ELMI», США), фотометр («Labsystems Multiskan MS original», Финляндия), световой микроскоп

(«ZEISS», Германия), предметные стекла («Menzel», Германия) 96-луночные планшеты («Corning Costar», США), проточный цитофлюориметр BD Canto II («Becton Dickinson», США), центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R («Eppendorf», США), виалы («ПанЭко», Россия), микропоровые фильтры («GE Infrastructure», США)

2. Методы экспериментальных исследований

Выделение МНК из периферической крови

Для получения МНК осуществляли забор периферической крови здоровых доноров. Образцы крови вносили в гепаринизированные пробирки с добавлением раствора Хэнкса в соотношении 1:1.

Разбавленную таким образом кровь наносили в виде кольца на фиколаурографин с $\rho=1,077$ г/мл, ранее внесенный в пластиковые пробирки с $V=15$ мл. Образцы центрифугировали в течение 20 мин при 350 G до разделения образцов на фракции.

Взвешенные МНК выделяли из интерфазного кольца образцов и переносили в новую емкость для отмывания от фиколаурографина. Отмывание проводили путем трехкратного разведения суспензии раствором Хэнкса и последующего центрифугирования в течение 5 минут при 300 G с удалением надосадочной жидкости на каждом этапе.

Подсчет количества МНК проводили в камере Горяева. Для определения жизнеспособности клеток применяли предварительное окрашивание каждого исследуемого образца равным объемом 0,1%-ного трипанового синего, окрашивающего погибшие клетки.

Клетки культивировали в пластиковых планшетах в полной среде RPMI-1640.

Колориметрический метод определения цитотоксической активности НК-клеток

В качестве клеток эффекторов (КЭ) использовали МНК, выделенные из

крови здоровых доноров. В качестве клеток-мишеней (КМ) использовали клетки эритролейкемии человека линии K562. Для контроля стерильности используемой среды использовали свободные лунки планшета с добавленным в них 200 мкл полной питательной среды RPMI-1640. При исследовании цитотоксической реакции в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл суспензии клеток-эффекторов и по 100 мкл суспензии клеток-мишеней. Соотношение КМ к КЭ составляло 1:5. В группе референс-контроля рассматривалась цитотоксичность КЭ, коинкубированных с немодифицированным МДП. В качестве группы контроля рассматривалась цитотоксичность интактных КЭ.

Коинкубацию клеток эффекторов и клеток мишеней проводили течение 24 ч, в условиях поддержания концентрации атмосферного CO₂ на уровне 5 %, абсолютной влажности атмосферы 10% и температуры 37±0,5°C в CO₂-инкубаторе (Joan). При завершении срока коинкубации в лунки добавляли по 20 мкл 5% раствора МТТ, с последующей инкубацией планшета в тех же условиях на протяжении 180-240 минут до выпадения кристаллов восстановленного МТТ (рис. 3).

После визуальной верификации наличия выпадения кристаллов формазана, удаляли супернатант с последующим добавлением 150 мкл ДМСО. Через 30 минут инкубации при температуре 20°C проводили определение оптической плотности на спектрофотометре Labsystems Multiskan MS original» (Финляндия) при λ=540 нм.

Цитотоксичность выражали цитотоксическим индексом в процентах и определяли по формуле:

$$\text{ИЦА} = [(1 - (\text{ОП}_{\text{КЭ+КМ}} + \text{ОП}_{\text{КЭ}}) / \text{ОП}_{\text{КМ}}) \times 100\%]$$

где ОП_{КЭ+КМ} – оптическая плотность МТТ-тетразолия в лунках, содержащих КЭ и КМ, ОП_{КЭ} – оптическая плотность в лунках с наличием только КЭ, ОП_{КМ} – оптическая плотность в лунках с наличием только КМ.

Определение влияния исследуемых соединений на фагоцитарную активность нейтрофилов крови человека

Фагоцитарную активность нейтрофилов крови донора, коинкубированных с исследуемыми соединениями, определяли по методике Гордиенко Г.И. (1984) с некоторыми изменениями. В качестве источника нейтрофилов была использована кровь здорового донора. В стерильные вials вносили гепаринизированную кровь в объеме, равном 150 мкл, суспензию частиц латекса с диаметром 1,5 мкм и стерильные водные растворы исследуемых гликозидов в концентрации равной 1×10^{-5} моль/л в объеме 1-5 мкл. Коинкубацию проводили в течение 40 мин при 37⁰С с использованием шейкера. После коинкубации ресуспендировали каждый образец и забирали по 4 мкл крови из каждой вials с последующим нанесением на предварительное обезжиренное предметное стекло с формированием мазка. Окрашивание образцов по методике Романовского-Гимза проводили после испарения жидкости. Подсчет фагоцитирующих клеток проводили в световом микроскопе под иммерсией. Подсчет исследуемых показателей проводился на 100 клеток каждого образца. Фагоцитарная активность была вычислена как процент фагоцитирующих нейтрофильных гранулоцитов от общего числа обнаруженных клеток; Фагоцитарное число было вычислено как среднее количество частиц, захваченных одной клеткой.

Получение и активация дендритных клеток человека

Дендритные клетки получали по стандартной методике (Romani N. 1994.).

МНК выделяли из донорской крови по методике, описанной выше. Полученные МНК после их осаждения и концентрирования путем центрифугирования инкубировали в течение 18 часов в полной среде в CO₂-инкубаторе (Joan) при 37⁰С в атмосфере 5% CO₂. После инкубации проводили механическое удаление неприлипающих клеток и отмывание теплой средой RPMI-1640. В среду добавляли человеческий рекомбинантный ИЛ-4 до достижения рабочей концентрации 10 нг/мл (200 U/мл) и ГМ-КСФ до

достижения концентрации 10 нг/мл (500 U/мл).

Последующую инкубацию проводили в течение 6 суток в полной среде с добавлением половинной дозы цитокинов (1 раз в 72 часа) и заменой среды и факторов созревания по мере необходимости.

Фенотипический анализ влияния гептилгдикозида МДП на созревание ДК человека

За 48 часов до анализа в матрасы с созревшими ДК добавляли гептигглизид МДП до достижения концентрации 10 мкмоль/мл. В качестве референс-контроля использовали немодифицированный МДП в такой же концентрации. В качестве контроля использовали интактные ДК.

В цитофлюориметрические пробирки вносили по 4 мкл соответствующих меченых флуорохромами антител к CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, CD14, HLA-DR. Функциональное значение этих фенотипических маркеров ДК представлено в табл. 2.

Таблица 2

Функциональное значение фенотипических маркеров ДК

Мембранный антиген ДК	Функция/значение фенотипического маркера
CD1a	Презентация антигена Т-клеткам
CD40	Костимулирующая молекула антигенпредставляющих клеток
CD80	Костимулирующая молекула антигенпредставляющих клеток
HLA-DR	МНС II класса, участие в презентации антигена
CD83	Маркер терминальной дифференцировки (зрелости) дендритных клеток
CD86	Костимулирующая молекула антигенпредставляющих клеток
CD14	Рецептор ЛПС

В качестве красителей использовали комбинации флюоресцеинизотиоцината (FITC) и фикоэритрина (PE),

После внесения антител в пробирки добавляли суспензию ДК человека в объеме 50 мкл, полученные вышеописанным методом. Каждый образец подвергали ресуспендированию и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. По завершению инкубации, в каждую пробирку было добавлено по 450 мкл фиксирующего раствора (1 % формальдегид в пара-бензоальдегиде). Пробирки с образцами хранили при температуре -10°C . Уровень экспрессии клетками исследуемых маркеров оценивали с использованием цитофлюориметра BD Canto II, не позднее чем на 7 сутки после нанесения меченных антител.

В каждом образце анализировали не менее 10000 событий. Исследование особенностей фенотипа проводили после предварительного гейтирования лейкоцитов на точечной иммуноцитогамме CD45^{+} -клеток (рис. 2). Следует отметить, что в каждом образце CD45^{+} -клеток составляло не менее 95-98 %.

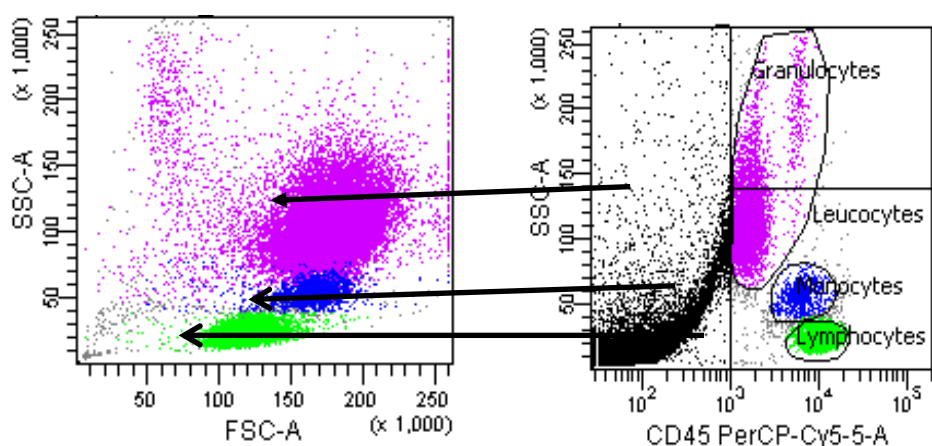


Рисунок 2. Гейтирование лейкоцитов (CD45^{+}) на точечной иммуноцитогамме

а) по сигналам SSC/FSC, б) по сигналам SSC/CD45: FSC-A соответствует прямому светорассеянию (ось x), SSC-A соответствует боковому светорассеянию (ось y), CD45^{+} соответствует интенсивности флюоресценции (MFI) данного флюорохрома (ось x).

Для определения негативной или позитивной экспрессии антигена клетками в каждом случае использовался негативный контроль с изотипическими мышиными антителами IgG1/IgG2/ IgG3/CD45. При этом немеченые клетки находились в пределах третьей декады (рис. 3).

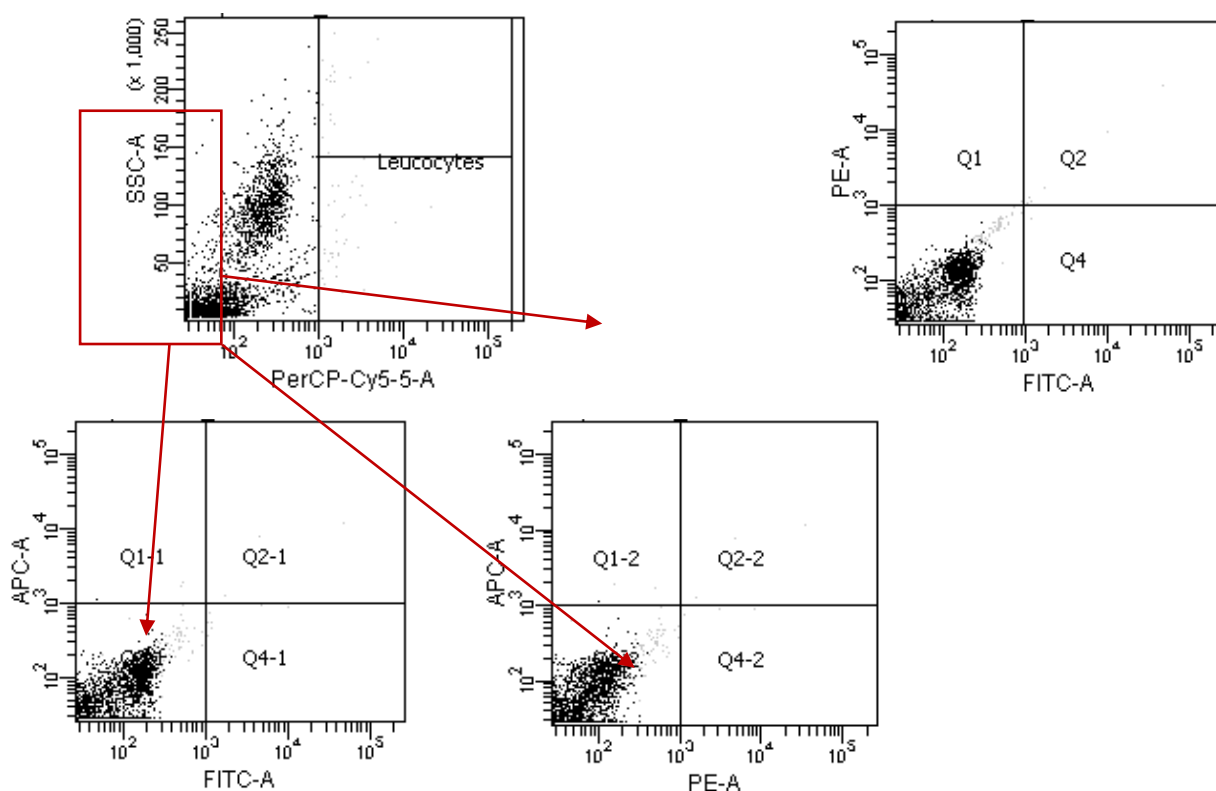


Рисунок 3. Гистограмма распределения немеченых клеток периферической крови

Анализ результатов проводили в программе Win MDI 2.8 for Windows 7 (США).

Уровень экспрессии антигена выражали в виде доли клеток, экспрессирующих исследуемый маркер, в общей популяции клеток (%).

Флуоресцентная микроскопия мононуклеарных лейкоцитов человека с использованием окрашивания моноклональными антителами

За 48 часов до микроскопии в матрасы с ДК добавляли гептигликозид МДП до достижения концентрации 10 мкмоль/мл. В качестве референс-контроля использовали немодифицированный МДП в такой же концентрации.

В качестве контроля использовали интактные ДК.

К полученным вышеуказанным способом ДК добавляли моноклональные антитела к человеческим CD14, CD80, HLA-DR до достижения концентрации 10 мкг/мл. После 30 минут инкубации в атмосфере 5% CO₂ при температуре равной 37°C было проведено микроскопирование с использованием системы Axiovision.

Изучение влияния исследуемых веществ на концентрацию цитокинов в сыворотке крови мышей линии C57BL/6

Животным линии C57BL/6 внутрибрюшинно вводили по 10 мкг β -гептилгликозида МДП в 100 мкл физиологического раствора (экспериментальная группа). В качестве референс-контроля использовали группу животных с внутрибрюшинным введением 10 мкг МДП в 100 мкл физиологического раствора. В качестве контроля использовали группу с введением внутрибрюшинно 100 мкл физиологического раствора. Забор крови животных производился через 1 час, 8 часов и 24 часа после введения препаратов. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 350 G, затем производили отделение сыворотки крови с последующим измерением уровня цитокинов при помощи системы FlowCytomix на проточном цитометре согласно инструкции производителя.

Изучение влияния β -гептилгликозида МДП на динамику роста и метастазирования меланомы B16 и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей

Исследование было проведено на 160 половозрелых мышах, самцах линии C57Bl/6, массой тела 18-22 г. Животных содержали на стандартном пищевом рационе, со свободным доступом к корму и питьевой воде. Меланому B16 трансплантировали животным подкожно в область боковой поверхности грудной клетки. В опытах использовали 5-й пассаж опухоли *in vivo*. Трансплантацию опухолевой ткани осуществляли путем введения суспензии клеток меланомы B16 в количестве 1×10^5 клеток в 0,1 мл питательной среды 199.

β-Гептилглизид МДП вводили внутривбрюшинно 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).

В исследование были включены следующие группы по 20 животных:

1. Контрольная №1 (интактным животным вводился физиологический раствор);
2. Контрольная №2 (животным с опухолью вводился физиологический раствор)
3. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 1 мкг/животное в профилактическом режиме;
4. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 5 мкг/животное в профилактическом режиме;
5. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 25 мкг/животное в профилактическом режиме;
6. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 1 мкг/животное в терапевтическом режиме;
7. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 5 мкг/животное в терапевтическом режиме;
8. β-Гептилглизид МДП вводился в дозе 25 мкг/животное в терапевтическом режиме.

Критериями оценки действия препаратов были средняя продолжительность жизни (СПЖ) и торможение роста опухоли (ТРО).

ТРО определяли на основании измерения линейных размеров подкожной опухоли с вычислением объема опухоли (V). Эффективность проведенного лечения была оценена по величине ТРО, которую вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО} = (V \text{ в контроле} - V \text{ в опыте}) / V \text{ в контроле} \times 100\%$$

Выживаемость животных вычисляли как отношение количества умерших животных к живым животным, выраженное в процентах. Интегральный показатель – увеличение продолжительности жизни (УПЖ).

Изучение влияния β -гептилгликозида МДП на динамику поискового рефлекса и рефлекса вертикальной стойки у мышей

Определение норкового рефлекса и рефлекса вертикальных стоек служило для количественного измерения изменения функциональной активности центральной нервной системы животных при развитии опухолевого процесса. Моделирование меланомы и введение β -гептилгликозида МДП проводили как описано выше.

Мышей линии C57Bl/6 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. Поведенческие реакции определяли в течение 90 секунд на каждое животное у 6 животных, случайно выбранных из каждой группы на 10 и 20 сутки после перевивки опухоли.

3. Методы статистической обработки результатов

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 $p < 0,05$.

На рисунках количественные данные представлены в виде: среднее, стандартная ошибка среднего, удвоенное стандартное отклонение (mean; SE; $SD \times 2$). В таблицах данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

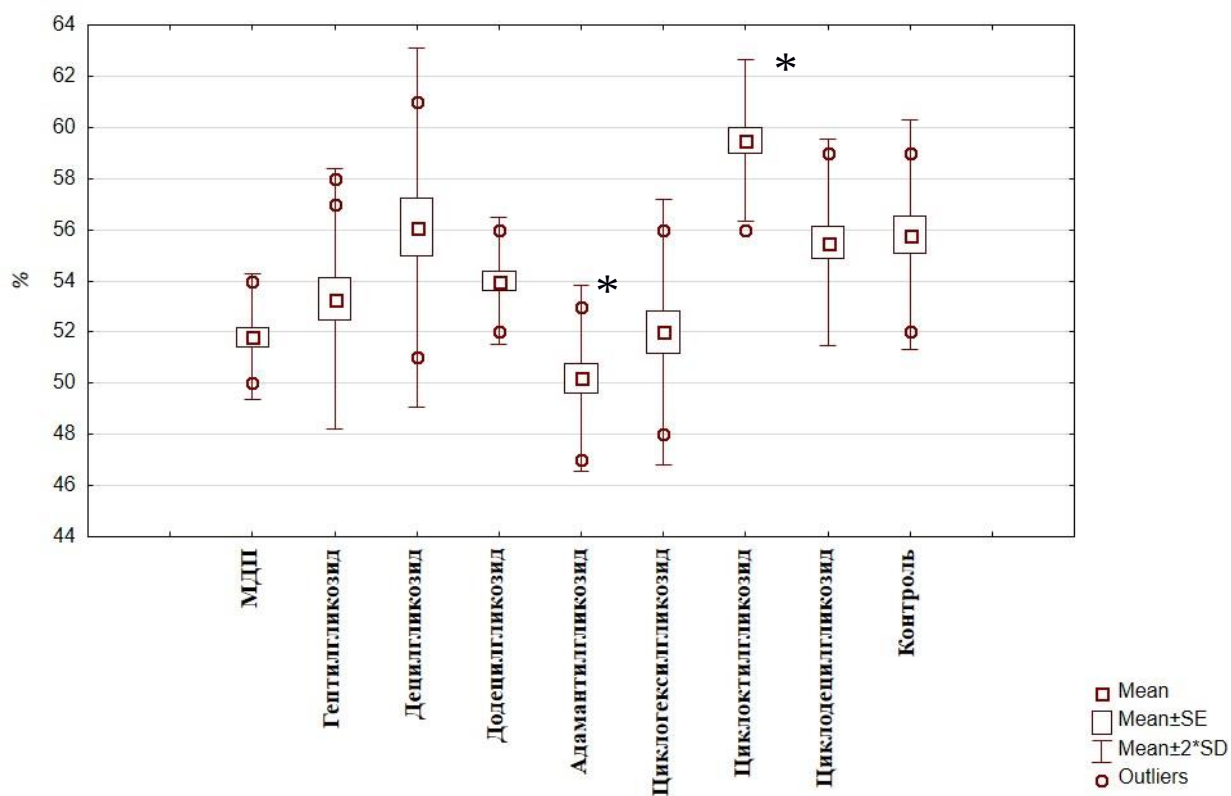
Глава 1. ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ β -ГЛИКОЗИДОВ МДП С АЛИФАТИЧЕСКИМИ, ЦИКЛИЧЕСКИМИ И ТРИЦИКЛИЧЕСКИМИ АГЛИКОНАМИ *IN VITRO*

1.1. Влияние гликозидов МДП на цитотоксическую активность моноклеарных лейкоцитов крови

На первом этапе работы для сравнения биологической активности β -гликозидов МДП по отношению к иммунокомпетентным клеткам человека *in vitro* оценили изменение цитотоксической активности НК-клеток при инкубации моноклеарных лейкоцитов крови с этими соединениями в эквимольных концентрациях. Немодифицированный МДП использовали в качестве референс-контроля.

При коинкубации моноклеаров с β -гликозидами МДП с алифатическими агликонами или референс-контролем в концентрации 1 мкмоль/мл не обнаружено статистически значимого изменения цитотоксической активности клеток (рис. 4).

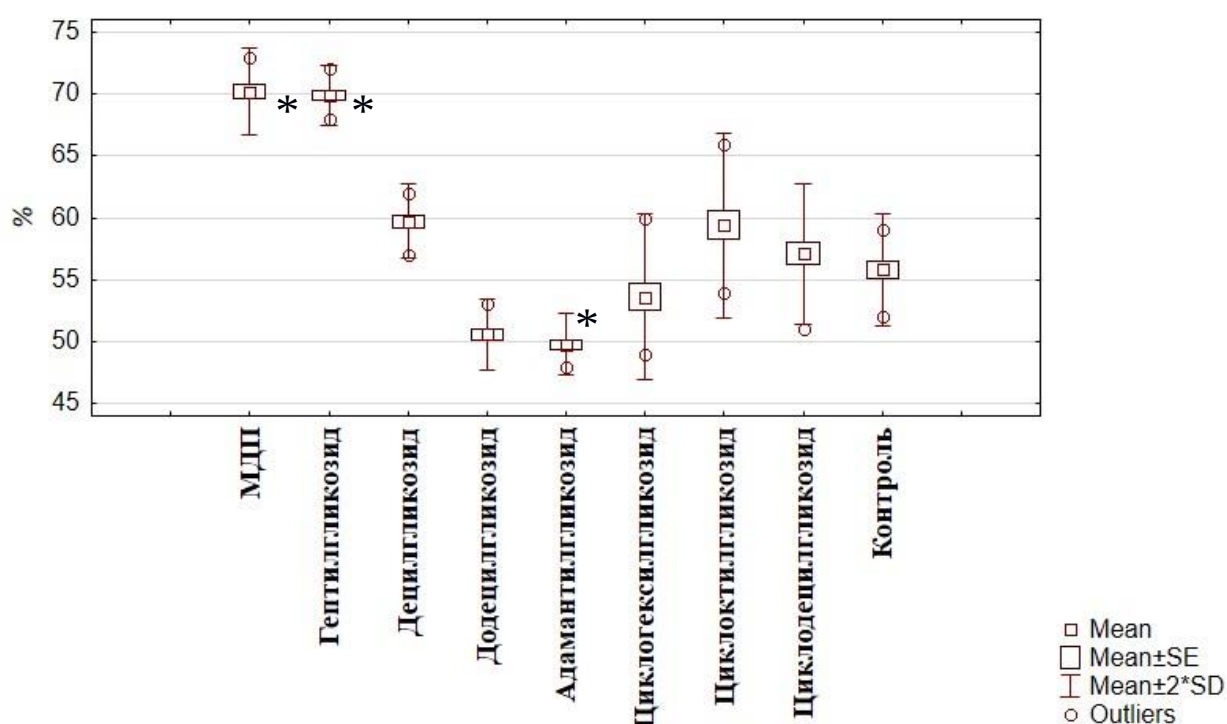
Среди гликозидов с циклическими агликонами только β -циклооктилгликозид МДП в этой концентрации повышал НК-зависимую цитотоксичность, а β -адамантилгликозид МДП снижал ее (рис. 4).



* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Рисунок 4. Влияние гликозидов МДП в концентрации 1 мкмоль/мл на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови по отношению к клеткам линии K562

При внесении в культуру мононуклеаров периферической крови немодифицированного МДП и β -гептилгликозида МДП в концентрации 10 мкмоль/мл зафиксировано существенное и примерно одинаковое повышение цитотоксической активности в сравнении с контролем. β -Адамантилгликозид МДП снижал НК-активность лейкоцитов, а другие β -гликозиды МДП в этой же концентрации не оказывали значимого влияния на способность мононуклеаров лизировать НК-чувствительные клетки-мишени (рис. 5).



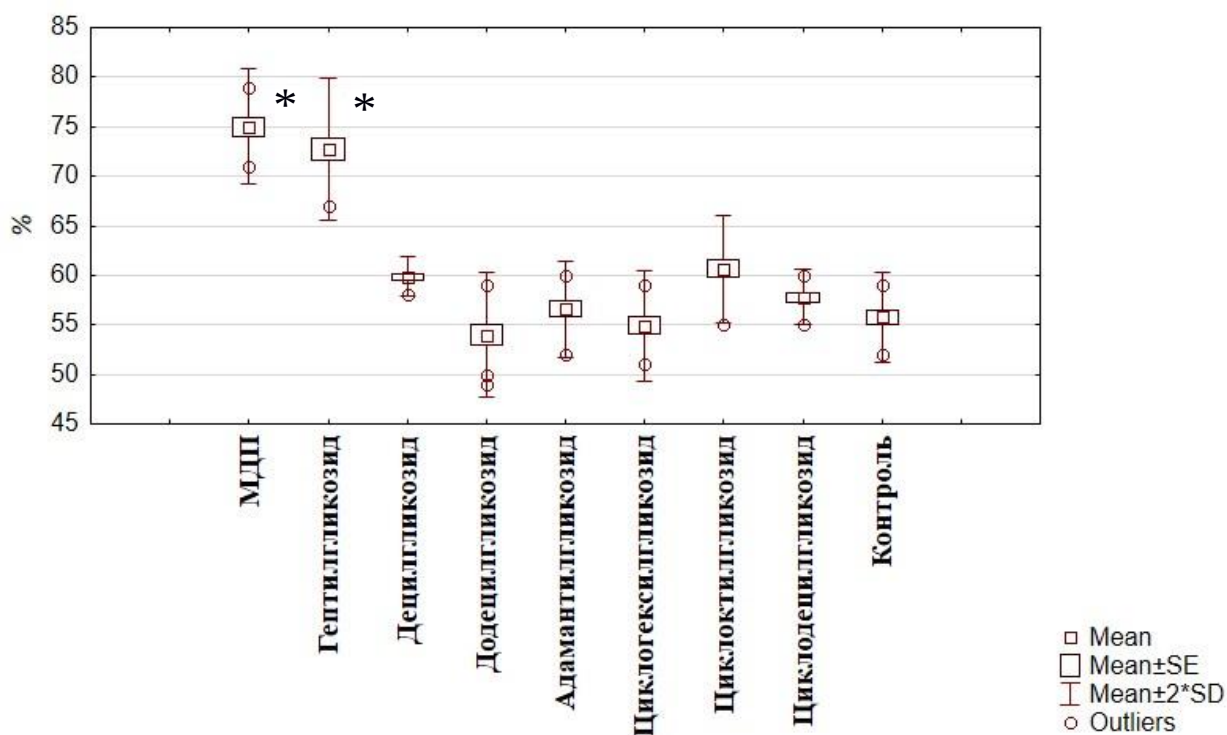
* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Рисунок 5. Влияние гликозидов МДП в концентрации 10 мкмоль/мл на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови по отношению к клеткам линии K562

Среди всех исследованных соединений только немодифицированный МДП и β -гептилгликозид МДП в концентрации 100 мкмоль/мл статистически

значимо и примерно в равной степени увеличивали НК-активность мононуклеарных лейкоцитов (рис. 6).

Другие гликопептиды в этой дозе не влияли на НК-зависимую цитотоксичность мононуклеаров (рис. 6).



* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Рисунок 6. Влияние гликозидов МДП в концентрации 100 мкмоль/мл на цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов крови по отношению к клеткам линии K562

Вызванный МДП и β -гептилгликозидом МДП цитолиз НК-чувствительных клеток мононуклеарами периферической крови коррелировал с усилением контактов клеток-эффекторов и клеток-мишеней.

В контрольных лунках мононуклеарные лейкоциты и клетки линии K562 при инкубации в среде без добавления мурамипептидов образовывали в поле зрения лишь единичные конгломераты, состоящие из 3-5 клеток (рис. 7А).

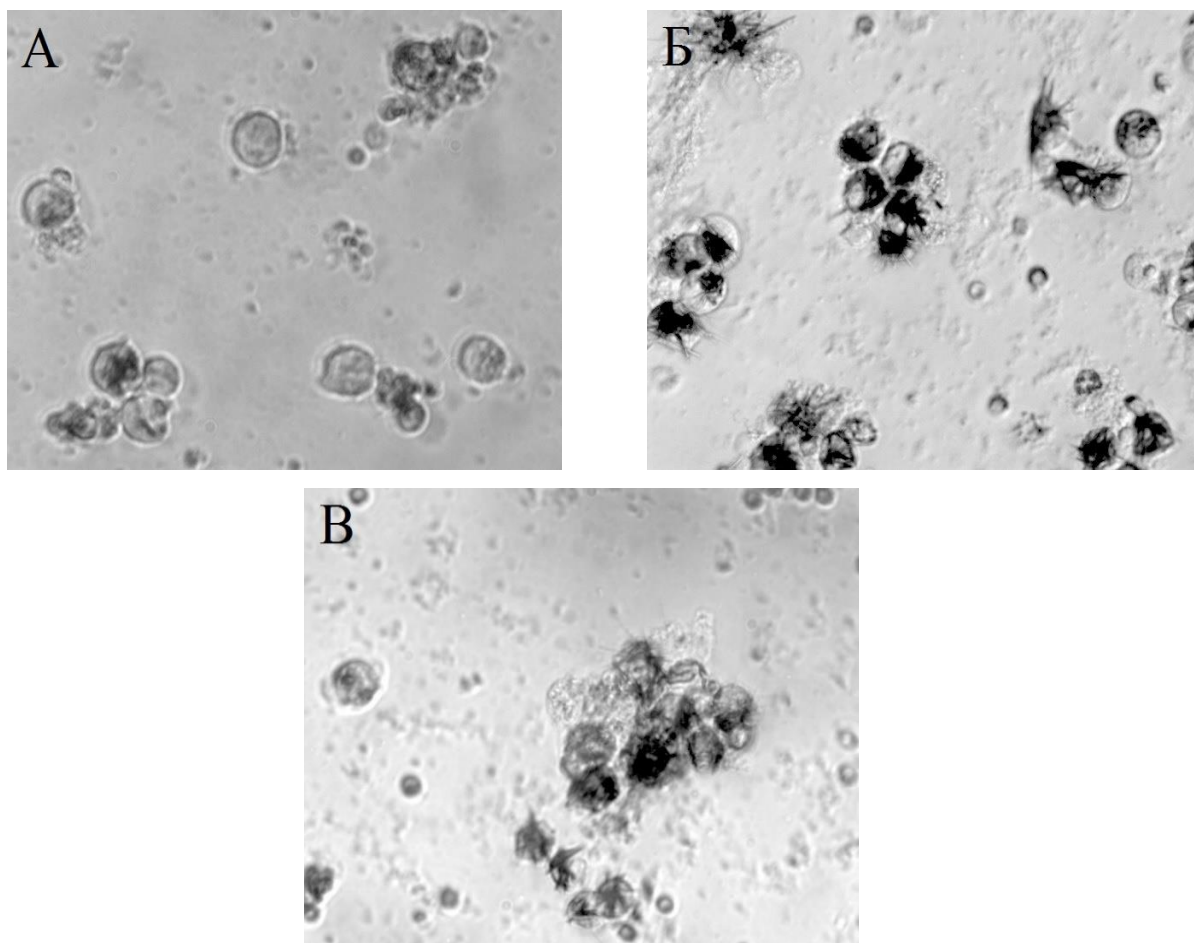


Рисунок 7. Образование конгломератов мононуклеарных лейкоцитов периферической крови и клеток K562

Инвертированный микроскоп. Фазовое контрастирование Ув. $\times 400$.

А – Единичные конгломераты мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии K562 (контроль). **Б** – Образование конгломератов мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии K562 при инкубации с МДП. **В** – Образование крупных конгломератов мононуклеарных лейкоцитов и клеток линии K562, инкубированных с β -гептилгликозидом МДП.

Добавление в культуральную среду МДП или β -гептилгликозида МДП в концентрации 10 мкмоль/мл вызывало образование многочисленных конгломератов клеток-эффекторов и клеток-мишеней, состоящих из 3-10 клеток (рис. 7Б и 7В).

Таким образом, внесение в культуру мононуклеарных лейкоцитов немодифицированного МДП и его гликозидных аналогов по-разному влияло

на цитотоксическую активность этих клеток по отношению к НК-чувствительной линии K562.

β -Гептилгликозид МДП оказывал выраженный дозозависимый стимулирующий эффект, сопоставимый с таковым референс-иммуностимулятора.

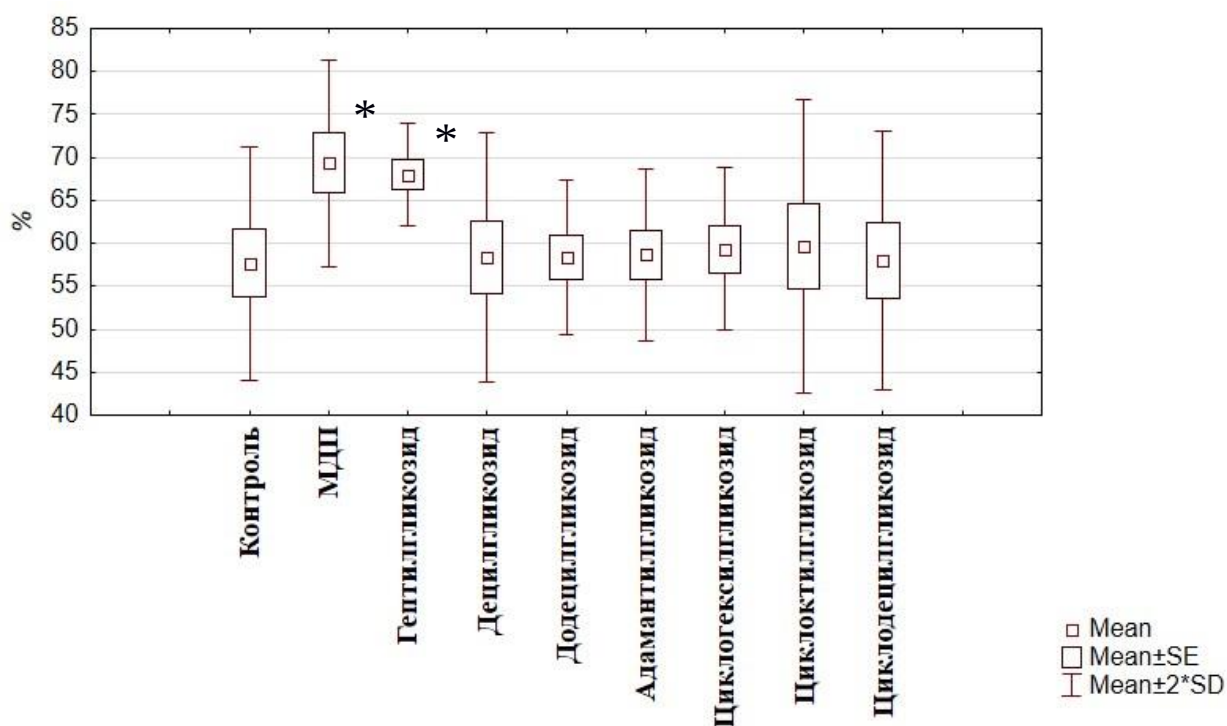
Коинкубация клеток-эффекторов с децилгликозидом МДП и циклооктилгликозидом МДП вызывала лишь тенденцию к повышению цитотоксической активности клеток-эффекторов при применении в дозе 100 мкмоль/мл.

Додецилгликозид МДП в дозе 10 мкмоль/мл и β -адамантилгликозид МДП дозах 1 и 10 мкмоль/мл статистически значимо снижали НК-активность моноклеаров.

1.2. Влияние гликозидов МДП на фагоцитарную активность нейтрофилов крови

На втором этапе исследования оценили способность нейтрофилов цельной крови к фагоцитозу гранул латекса после инкубации с β -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. 8).



* – $p < 0,05$ в сравнении с контролем

Рисунок 8. Фагоцитарный индекс нейтрофилов крови, инкубированных с гликозидами МДП

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 (рис. 9)

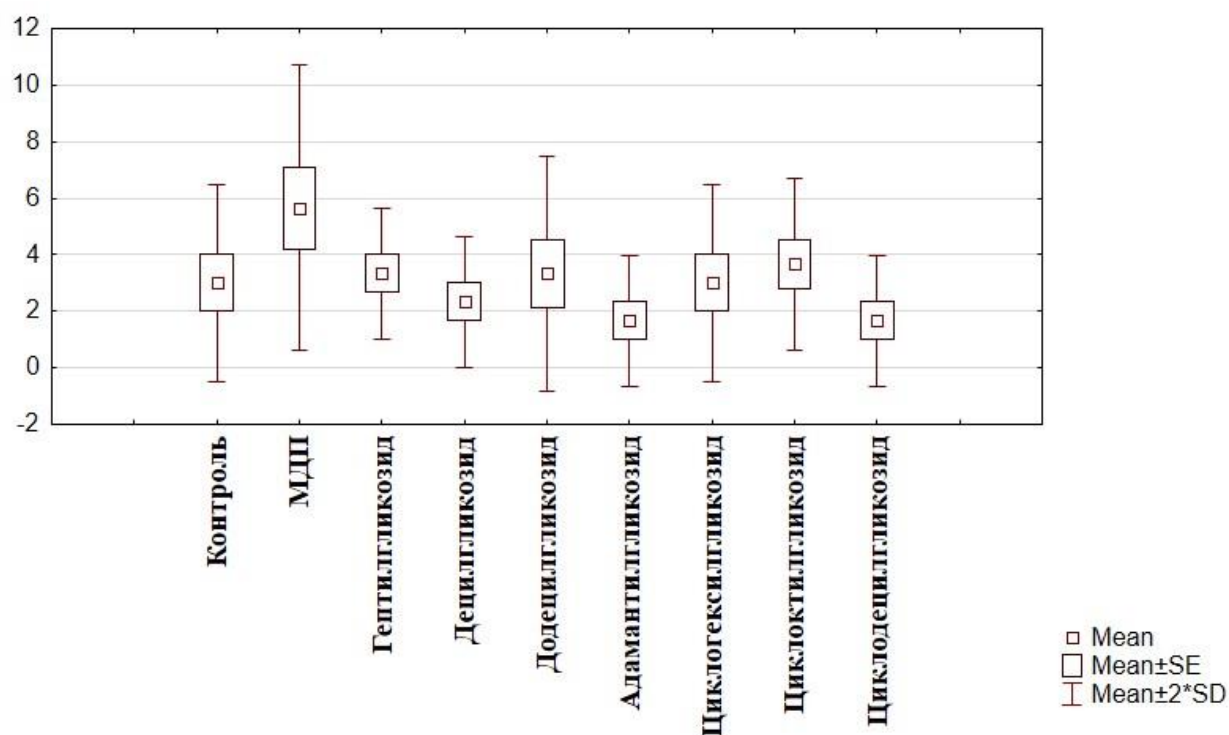


Рисунок 9. Фагоцитарное число нейтрофилов крови, инкубированных с гликозидами МДП

Таким образом, из исследованных гликозидов МДП, только β -гептилгликозид МДП обладал математически подтвержденной способностью увеличивать фагоцитарную активность (фагоцитарный индекс) нейтрофилов цельной крови.

Данные первых двух блоков работы, представленных в разделах 1.1. и 1.2. позволили отобрать β -гептилгликозид МДП как наиболее перспективное соединение для дальнейших углубленных исследований.

1.3. Влияние МДП и β -гептилгликозида МДП на экспрессию маркеров активации дендритными клетками, полученными из крови здоровых доноров

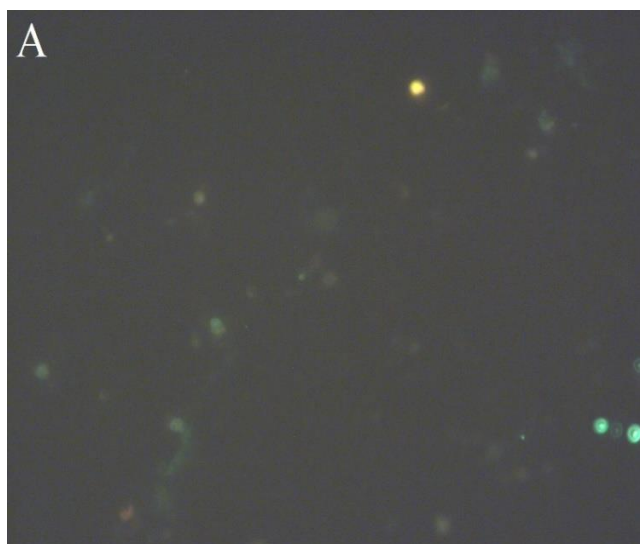
В данном разделе рассмотрено влияние β -гептилгликозида МДП на экспрессию ДК человека мембраноассоциированных молекул, связанных с созреванием этих клеток.

Было определено количество и соотношение $CD1a^+$, $CD40^+$, $CD80^+$, HLA^+ , $CD86^+$, $CD14^+$, $CD83^+$ клеток в общей популяции ДК, инкубированных с β -гептилгликозидом 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 -гептилгликозидом МДП отмечалось формирование конгломератов $CD14^+$ -клеток (рис. 10).

Оба мураamilпептида увеличивали количество $CD14^+$ -клеток в общей клеточной популяции (табл. 3; рис. 10).

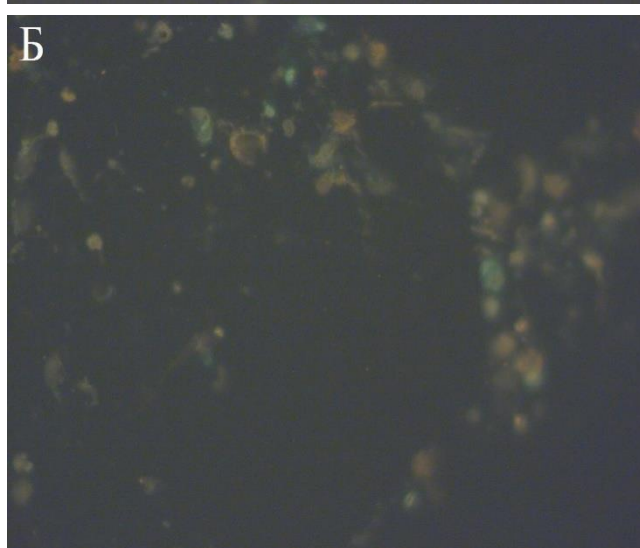
В то же время МДП и β -гептилгликозид МДП не вызывали статистически значимых изменений экспрессии клетками других изучаемых маркеров (табл. 3; рис. 11-16).



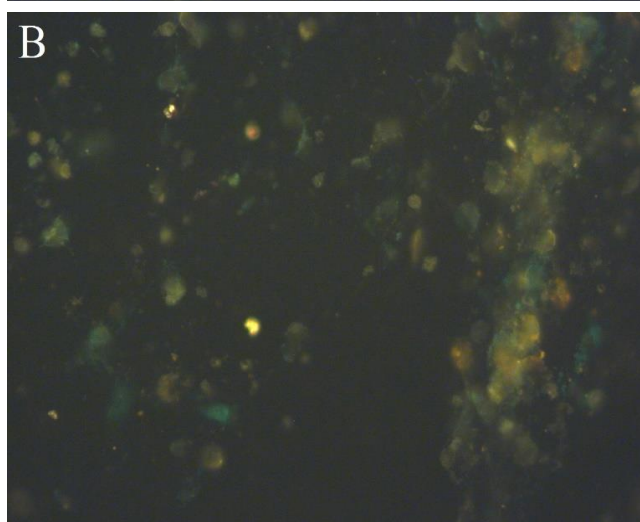
Иммунофлюоресценция (антитела к CD14, меченные FITC).

Инвертированный микроскоп, с подсветкой УФ излучением. Ув. $\times 400$.

А – Культура клеток, выделенных из крови здорового донора (контроль).

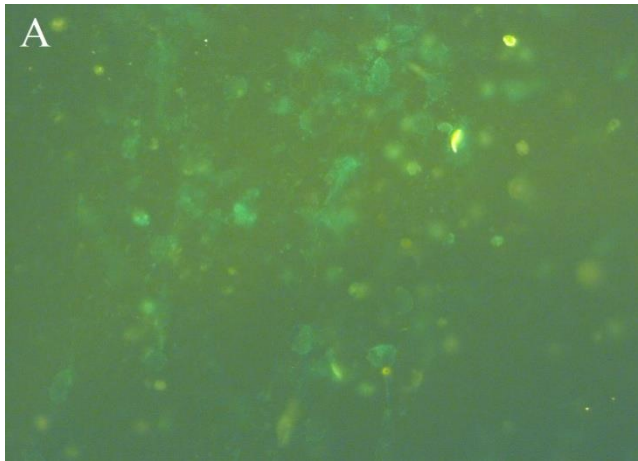


Б – Конгломераты CD14⁺-клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с МДП.



В – Крупные конгломераты CD14⁺-клеток в культуре мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с β -гептилгликозидом МДП.

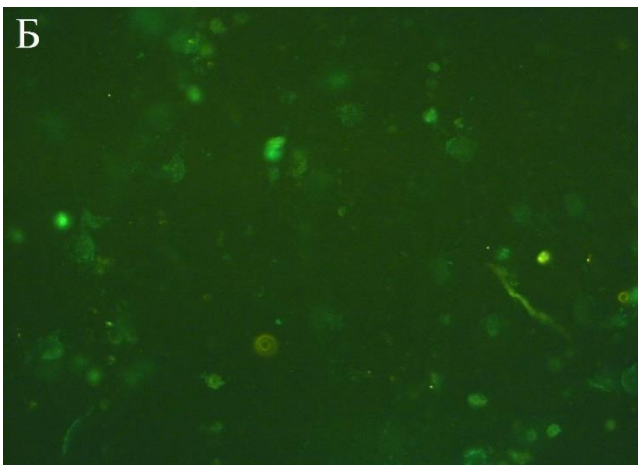
Рисунок 10. CD14⁺-клетки в культуре ДК, подвергнутых воздействию МДП или β -гептилгликозида МДП



Иммунофлюоресценция (антитела к CD80, меченные FITC).

Инвертированный микроскоп, с подсветкой УФ излучением. Ув. $\times 400$

А – Культура клеток, выделенных из крови здорового донора (контроль).



Б – Культура мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с МДП.

В – Культура мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с β -гептилгликозидом МДП.

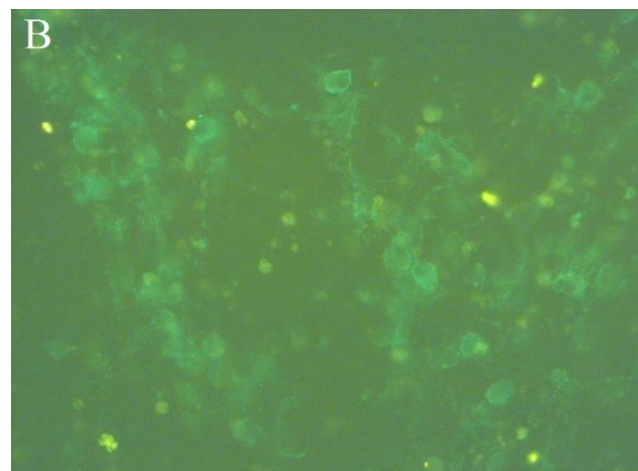
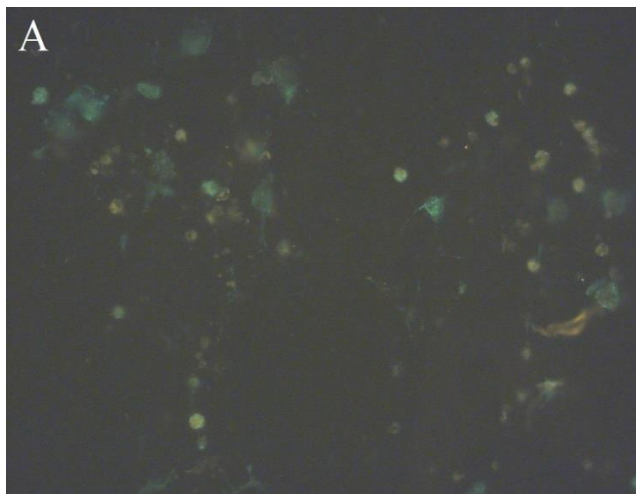


Рисунок 11. CD80⁺-клетки в культуре ДК, подвергнутых воздействию МДП или β -гептилгликозида МДП

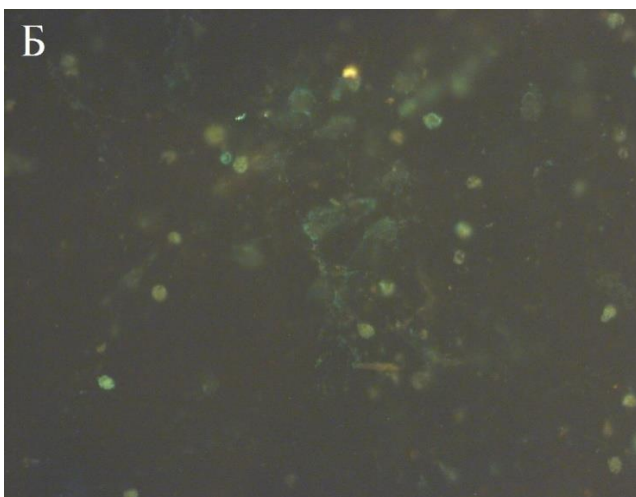


Иммунофлюоресценция (антитела к HLA-DR, меченные FITC).

Инвертированный микроскоп, с подсветкой УФ излучением. Ув. $\times 400$

А– Культура клеток, выделенных из крови здорового донора (контроль).

Б – Культура мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с МДП.



В – Культура мононуклеарных лейкоцитов, инкубированных с β -гептилгликозидом МДП.

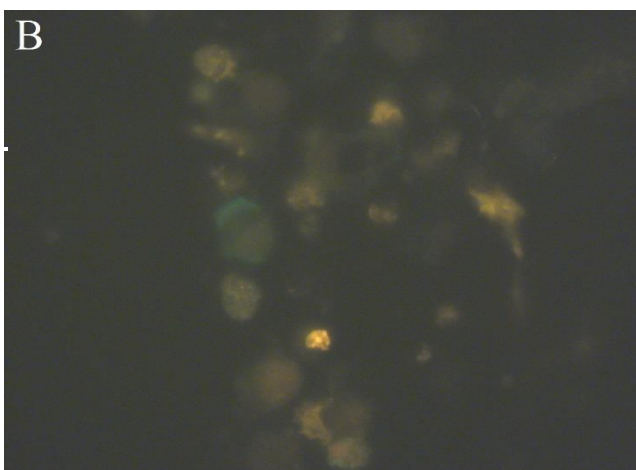


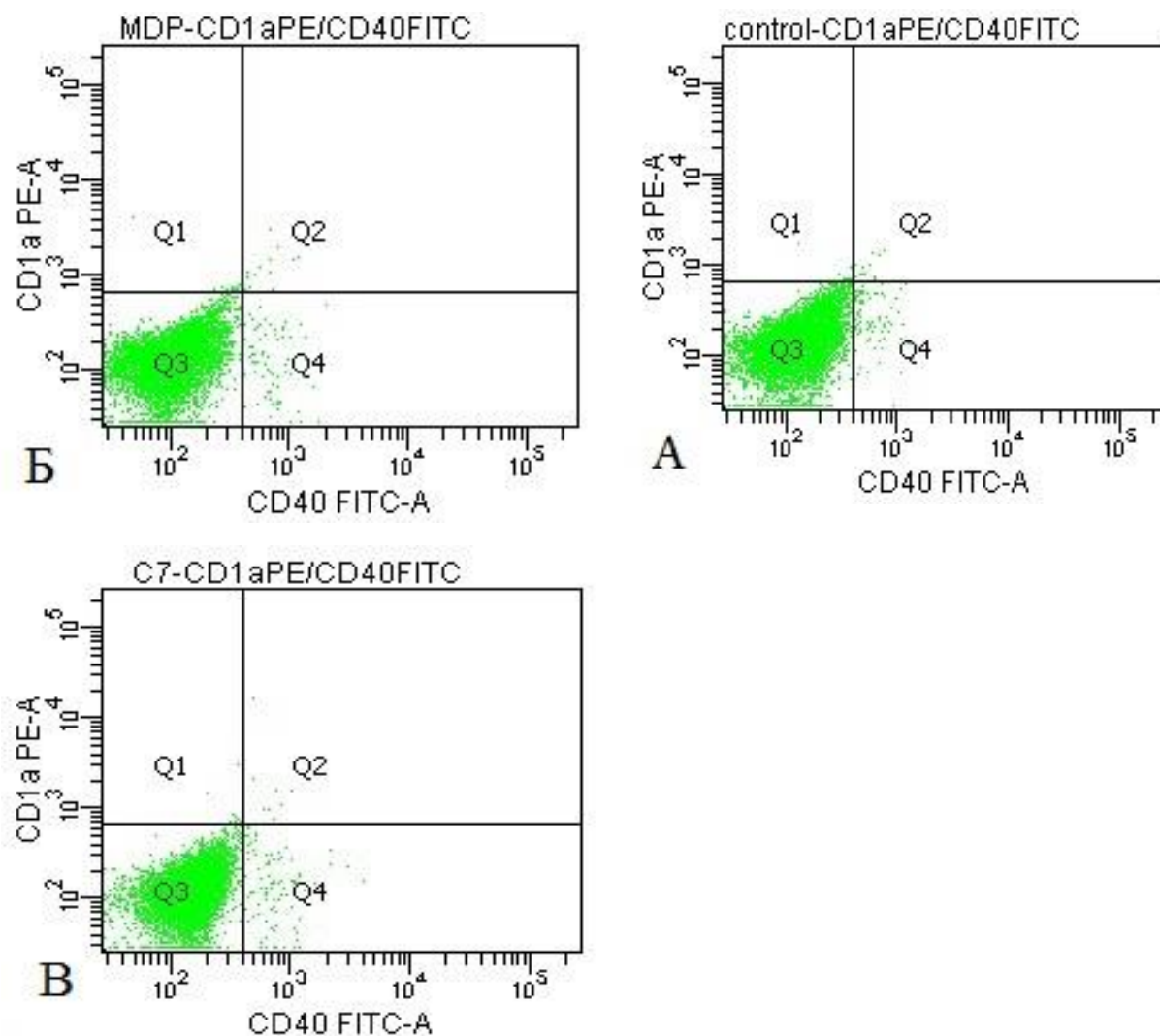
Рисунок 12. HLA-DR⁺-клетки в культуре ДК, подвергнутых воздействию МДП или β -гептилгликозида МДП

Таблица 3

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

	Мембранно-ассоциированные маркеры									
	CD1a	CD4 0	CD1a + CD40	CD80	HLA- DR	CD80+ HLA- DR	CD86	CD14	CD86+ CD14	CD83
Контроль	0	2 $\pm$ 0,2	0	1,4 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 0,2	13 $\pm$ 2	2,2 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 1,1	0,9 $\pm$ 0,2
МДП	0	1,6 $\pm$ 0,3	0	1,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,5	0	6,4 $\pm$ 3	16,2 $\pm$ 2*	0,9 $\pm$ 1	1,7 $\pm$ 0,1
Гептилгликозид МДП	0	2,1 $\pm$ 0,4	0	1,4 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 1	0	11,9 $\pm$ 3	9,9 $\pm$ 1,1*	0,7 $\pm$ 0,8	1,5 $\pm$ 0,2

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

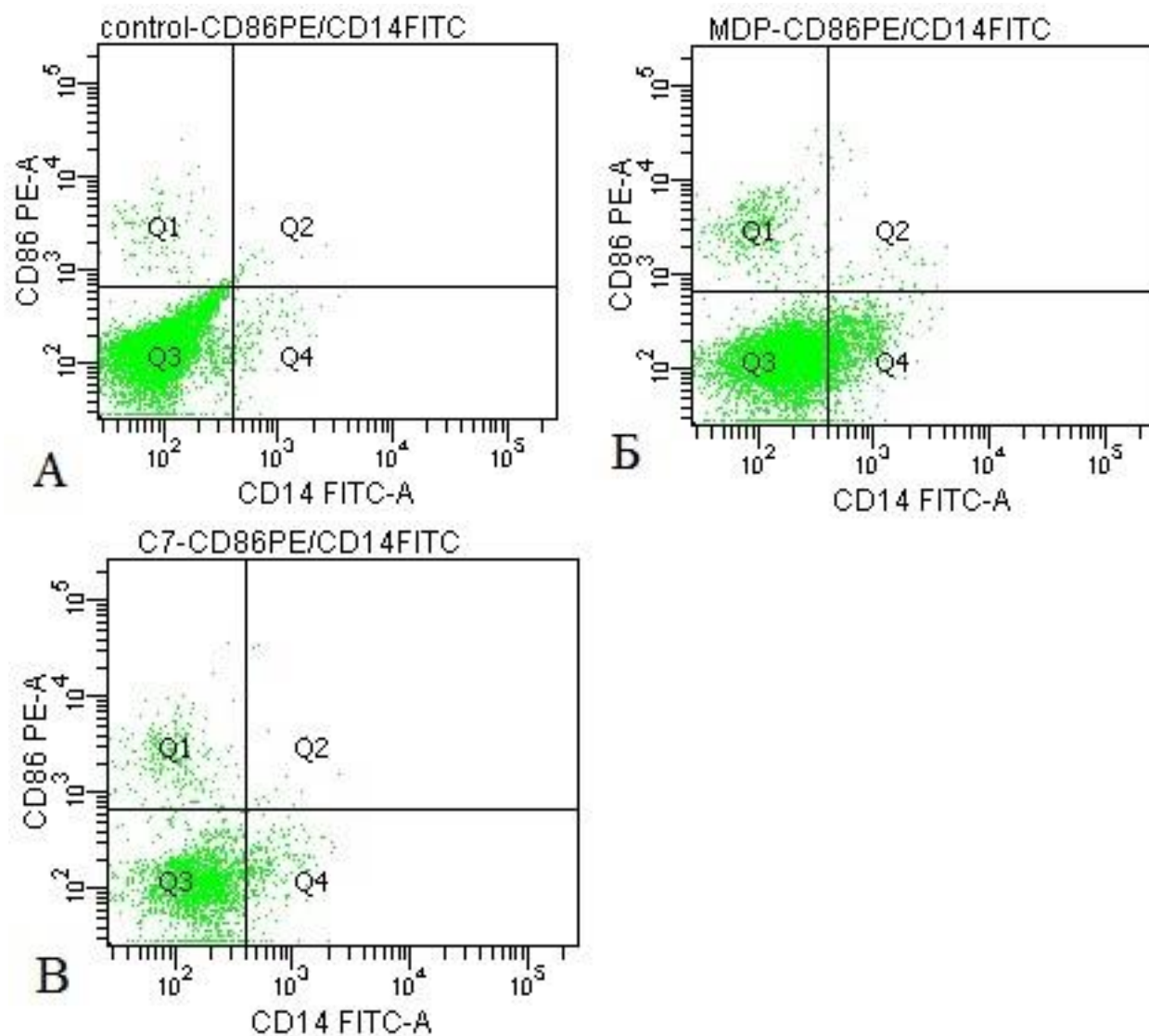


А – контроль.

Б – инкубация с МДП.

В – инкубация с β-гептилгликозидом МДП.

Рисунок 13. Экспрессия мембранно-ассоциированных молекул CD1a и CD40 ДК, подвергнутыми воздействию МДП или β-гептилгликозида МДП

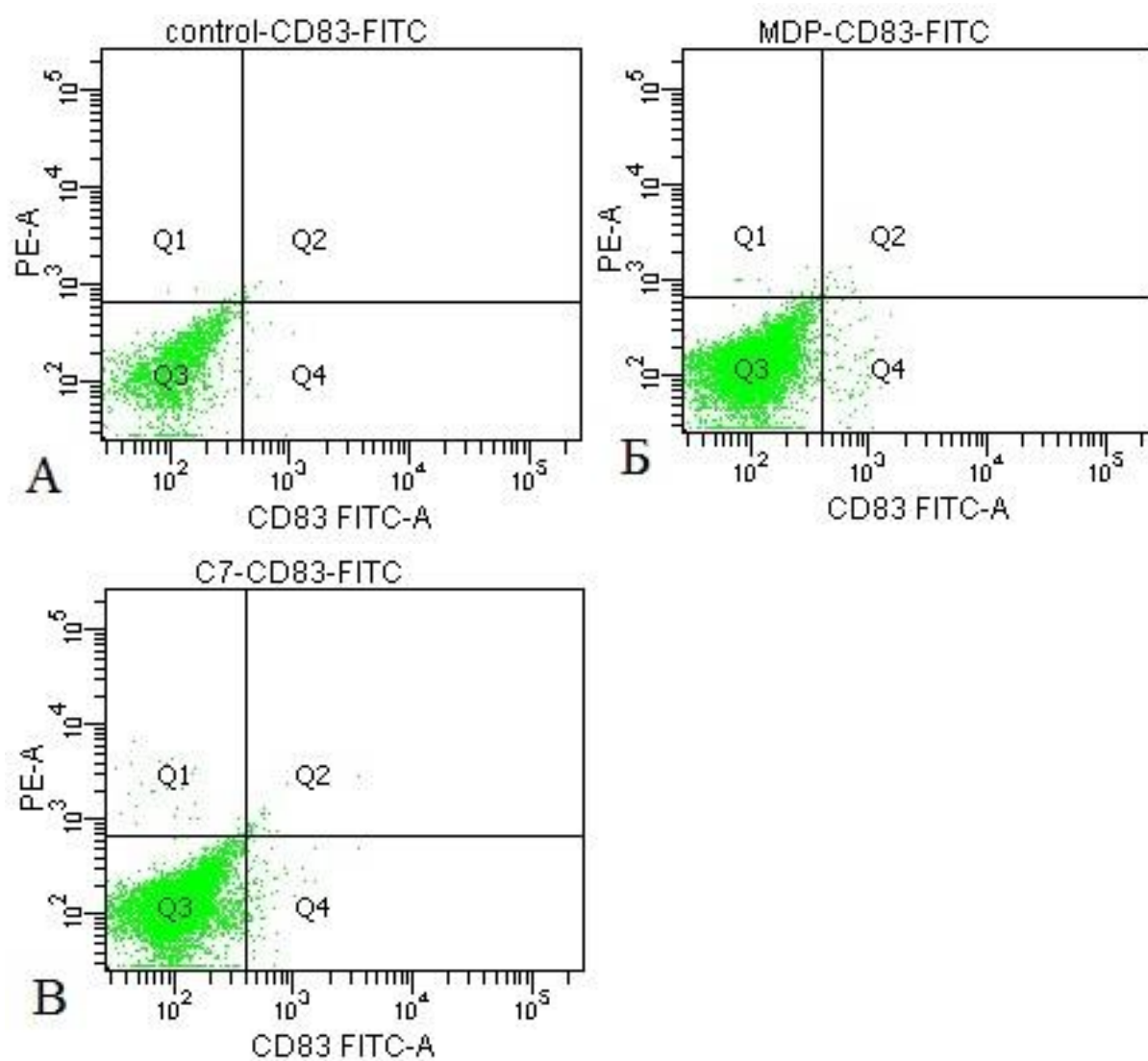


А – контроль.

Б – инкубация с МДП.

В – инкубация с β -гептилгликозидом МДП.

Рисунок 14. Экспрессия мембранно-ассоциированных молекул CD86 и CD14 мононуклеарными лейкоцитами здорового донора, инкубированными с МДП или β -гептилгликозидом МДП

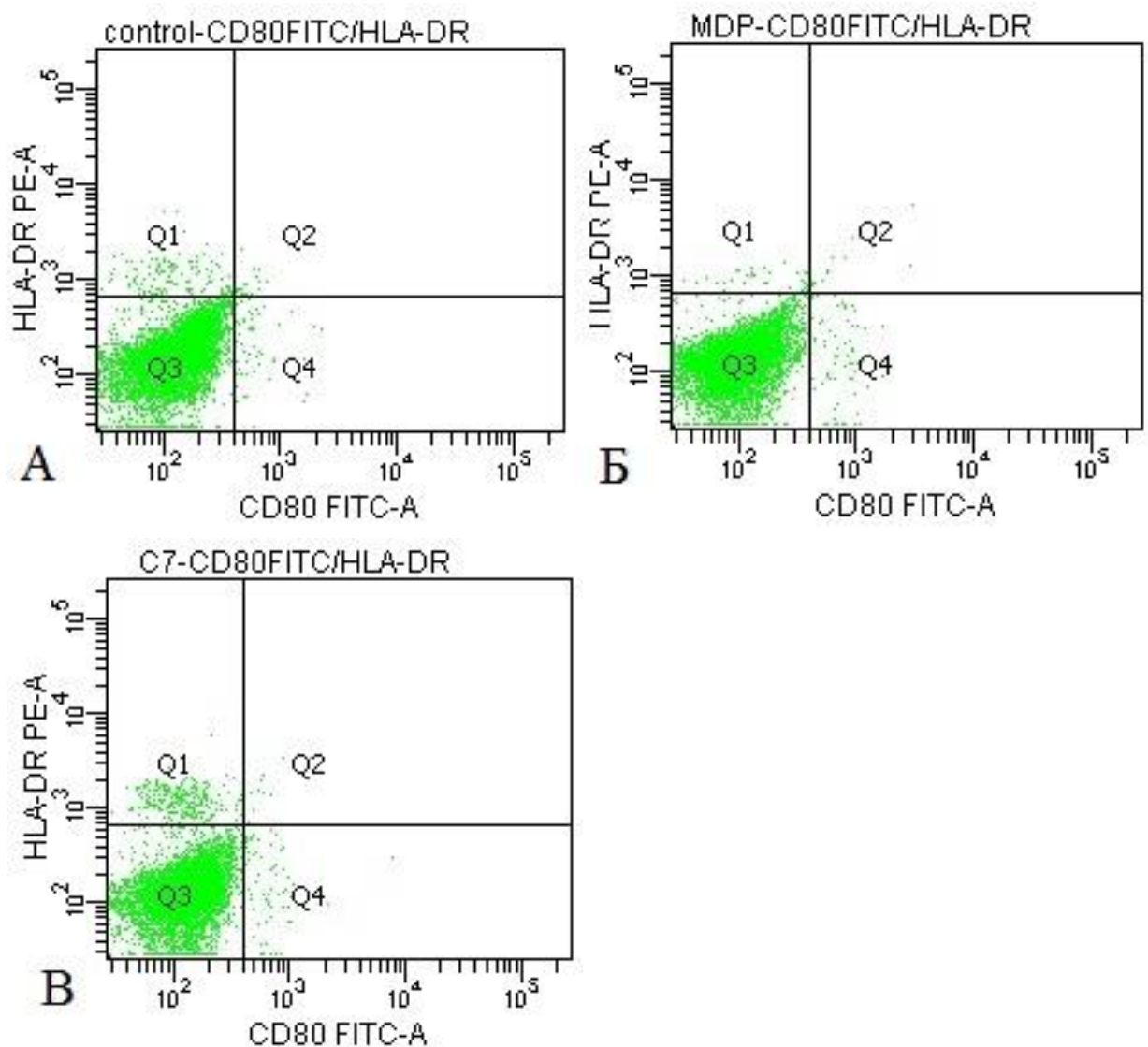


А – контроль.

Б – инкубация с МДП.

В – инкубация с β -гептилгликозидом МДП.

Рисунок 15. Экспрессия мембранно-ассоциированной молекулы CD83 ДК, подвергнутыми воздействию МДП или β -гептилгликозида МДП



А – контроль.

Б – инкубация с МДП.

В – инкубация с β -гептилгликозидом МДП.

Рисунок 16. Экспрессия мембранно-ассоциированных молекул CD80 и HLA-DR ДК, подвергнутыми воздействию МДП или β -гептилгликозида МДП

Таким образом, культивирование дендритных клеток моноклеарного происхождения в среде, содержащей МДП или β -гептилгликозид МДП, вызывало существенное повышение экспрессии молекулы 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.

Глава 2. ИММУНОТРОПНАЯ, ПРОТИВОПУХОЛЕВАЯ И НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ β - ГЕПТИЛГЛИКОЗИДА МДП *IN VIVO*

2.1. Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей C57BL/6 после внутрибрюшинного введения МДП или β - гептилгликозида МДП

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.

Концентрация IL-1 β в сыворотке крови животных через 1 час после введения β -гептилгликозида МДП была в полтора раза выше таковой в группах контроля и референс-контроля (рис. 17). При этом статистическая значимость этих различий подтверждалась при парных, но не множественных межгрупповых сравнениях.

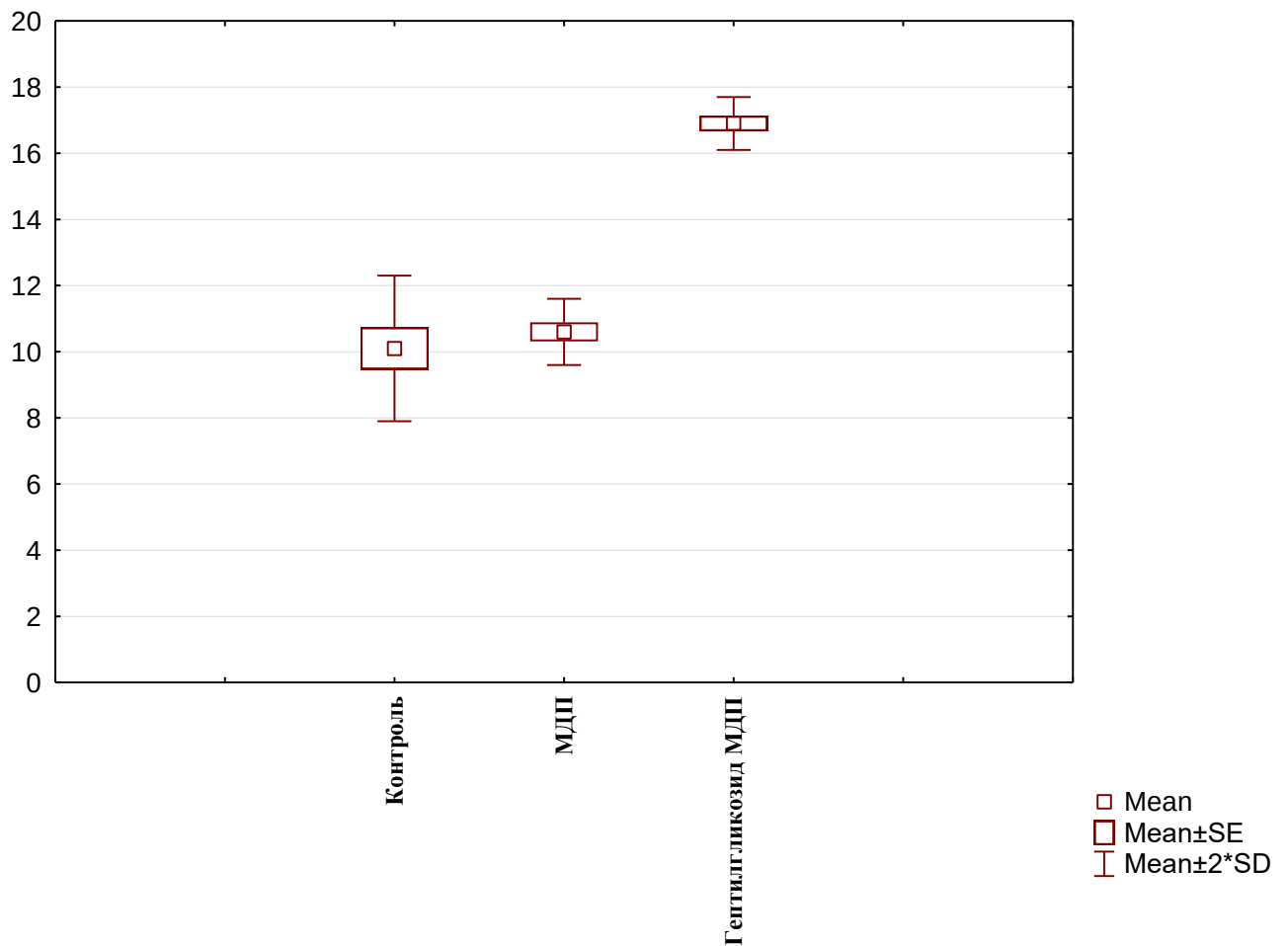


Рисунок 17. Концентрация IL-1 β (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,063$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,092$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сра * $\#$ и с МДП: # – $p=0,187$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов после введения β -гептилгликозида МДП повышенная концентрация этого цитокина сохранялась. В этот период также повышалось содержание IL-1 β под влиянием референс-препарата (рис. 18).

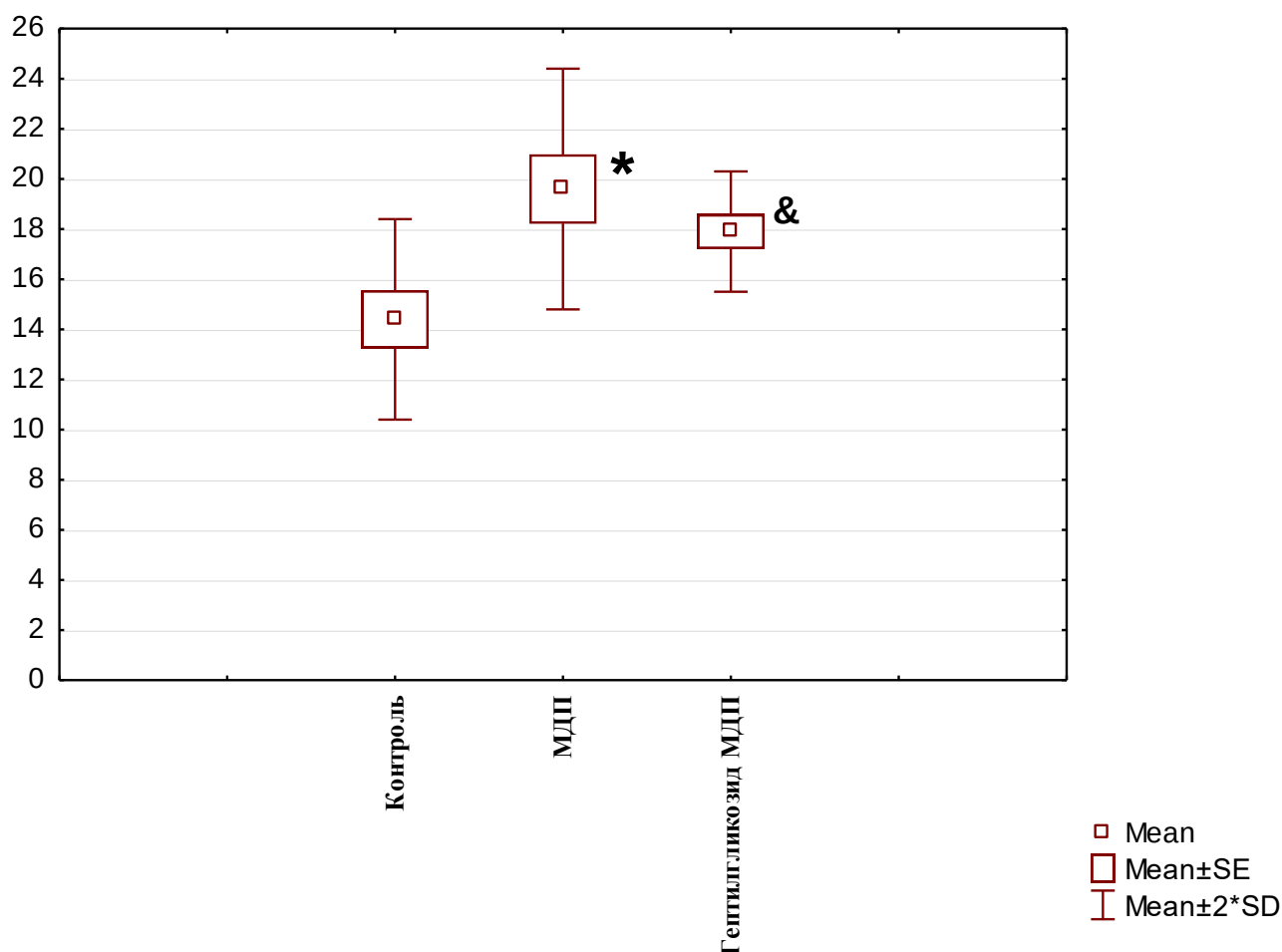


Рисунок 18. Концентрация IL-1 β (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,051$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,051$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,303$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа более высокие цифры этого показателя, чем в контроле, были только у животных, получавших внутрибрюшинную инъекцию β -гептилгликозида МДП (рис. 19).

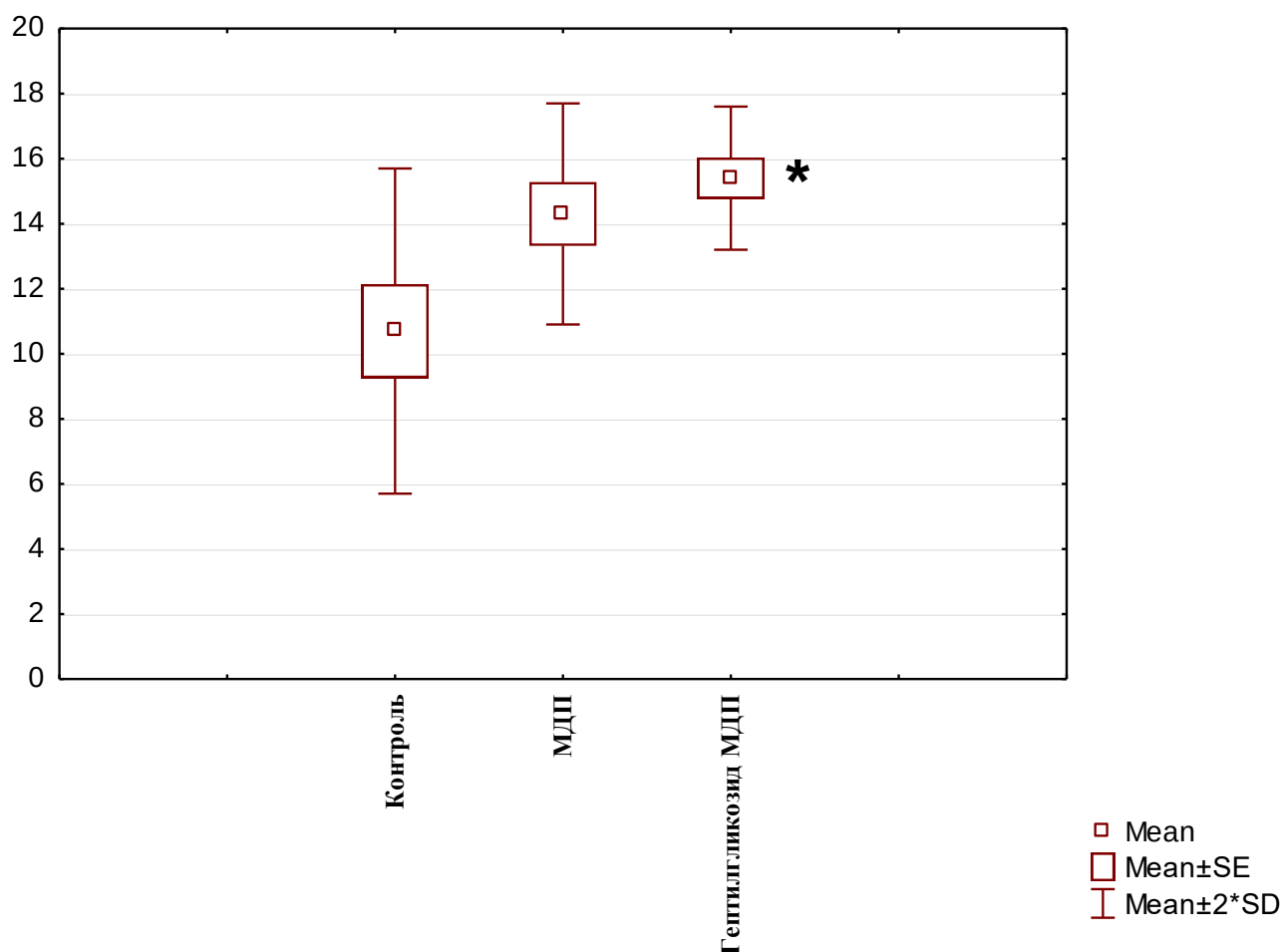


Рисунок 19. Концентрация IL-1 β (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,088$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,092$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Концентрация IL-2 в сыворотке животных через 1 час после введения β -гептилгликозида МДП была выше показателей контрольной группы, что подтверждалось в рамках парного сравнения с помощью критерия Манна-Уитни. При множественном сравнении группы животных, получивших иммуномодуляторы, и контрольная группа не различались по этому показателю (Рис. 20).

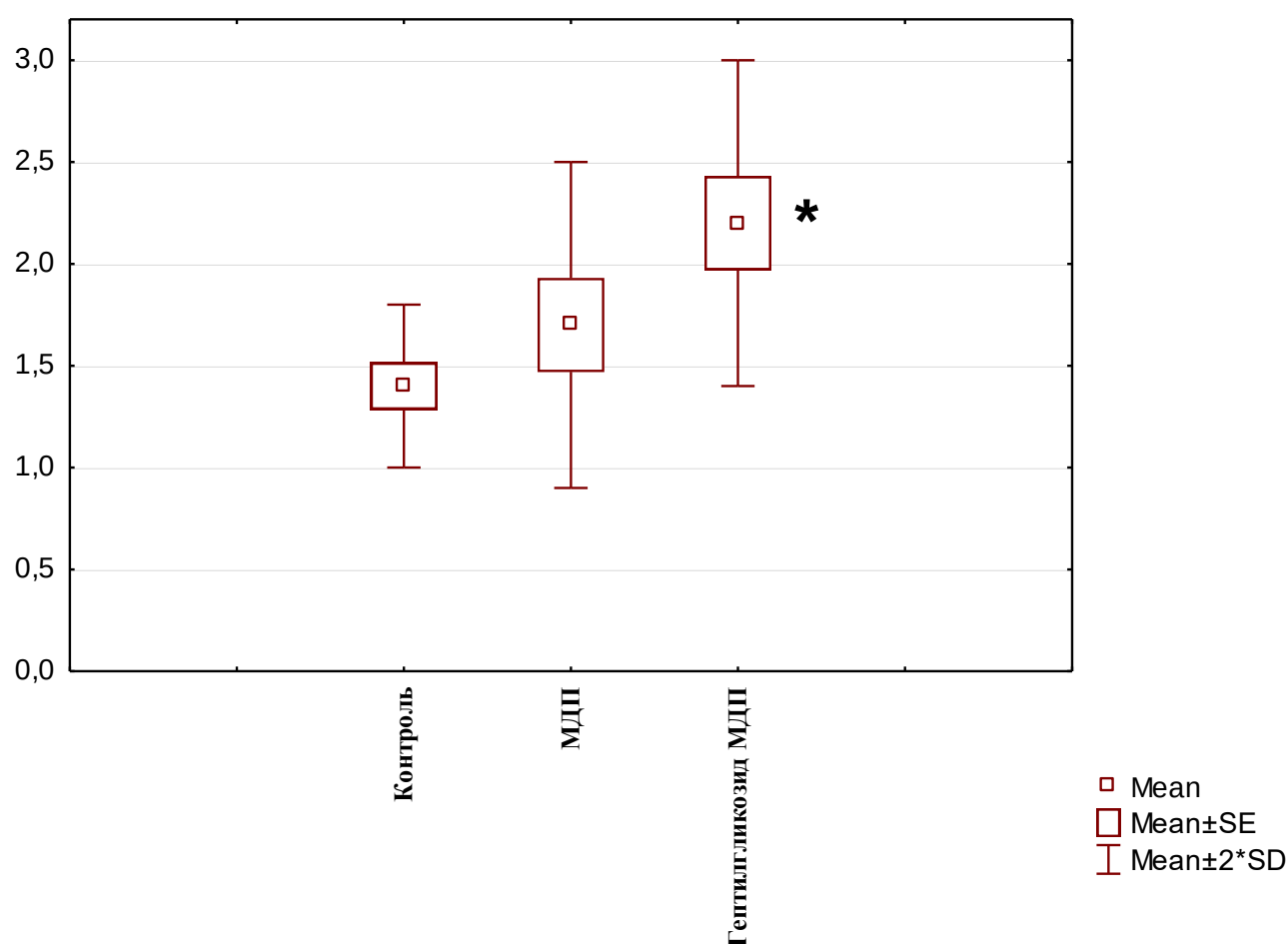


Рисунок 20. Концентрация IL-2 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,079$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,076$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов после введения препаратов при сохранении несколько повышенной концентрации IL-2 у животных, которым вводили β -гептилгликозид МДП, статистически значимые различия между группами отсутствовали (Рис. 21).

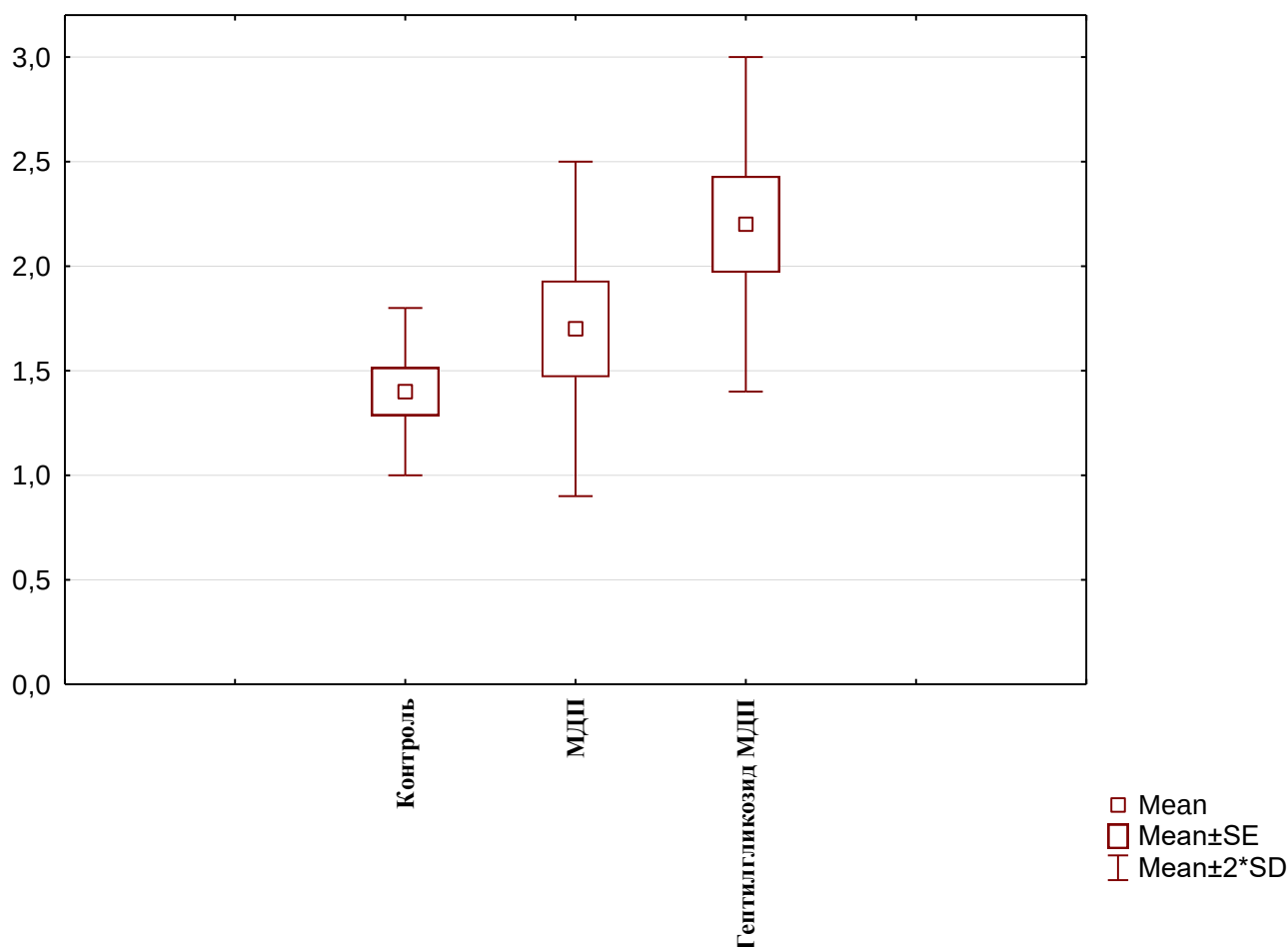


Рисунок 21. Концентрация IL-2 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Через 24 часа после введения МДП и в несколько большей степени β -гептилгликозид МДП проявляли тенденцию к повышению содержания этого

цитокина в сыворотке крови животных в сравнении с контролем. В случае с β -гептилгликозидом МДП эта тенденция лишь немного не достигала порога статистической значимости (Рис. 22).

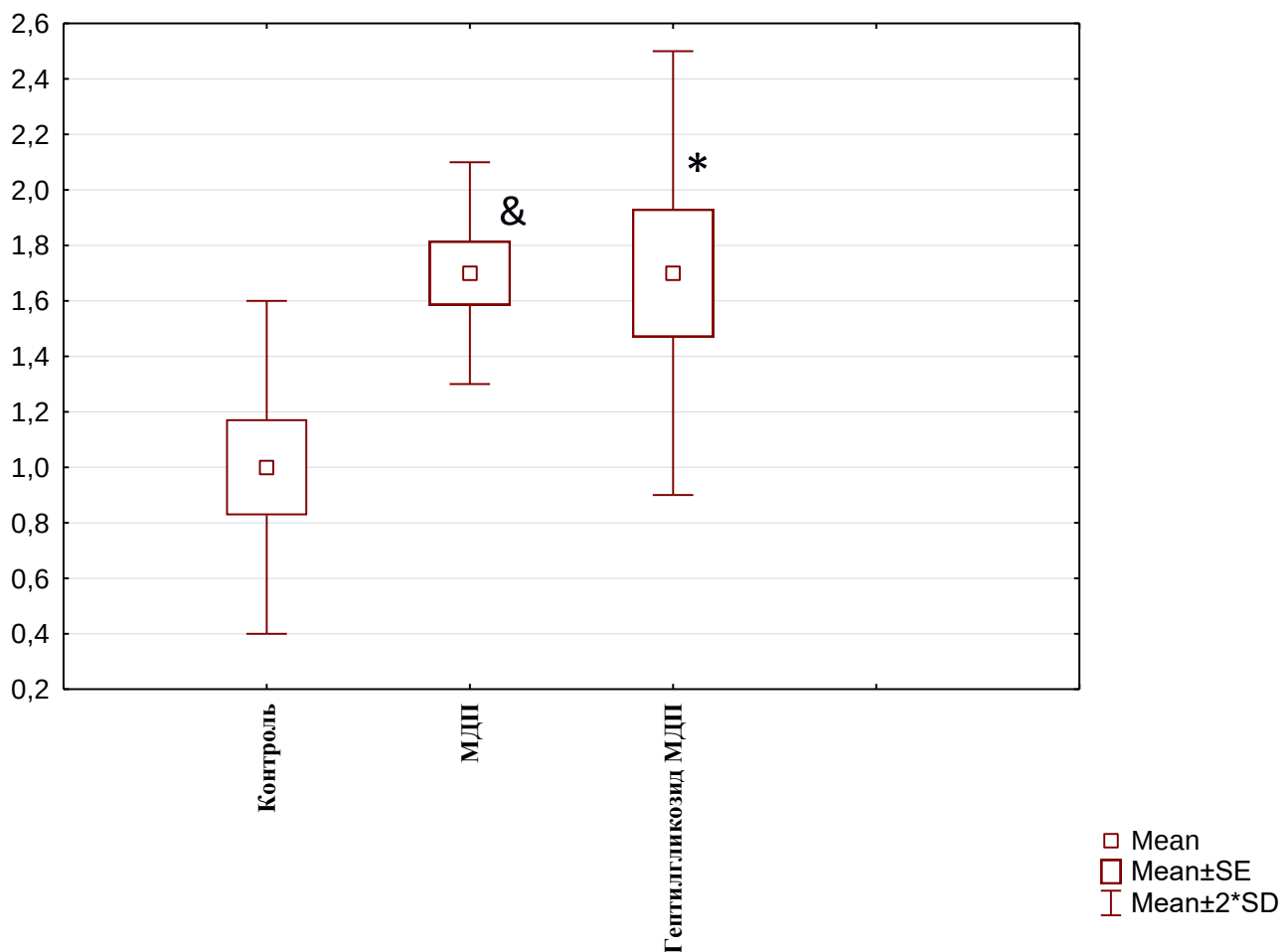


Рисунок 22. Концентрация IL-2 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,088$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,092$ (критерий Данна) или $p=0,077$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,470$ (критерий Данна) или $p=0,127$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 1 час после внутрибрюшинной инъекции мурамилпептидов статистически значимые различия между уровнями IL-5 в сыворотке крови животных разных групп отсутствовали (Рис. 23).

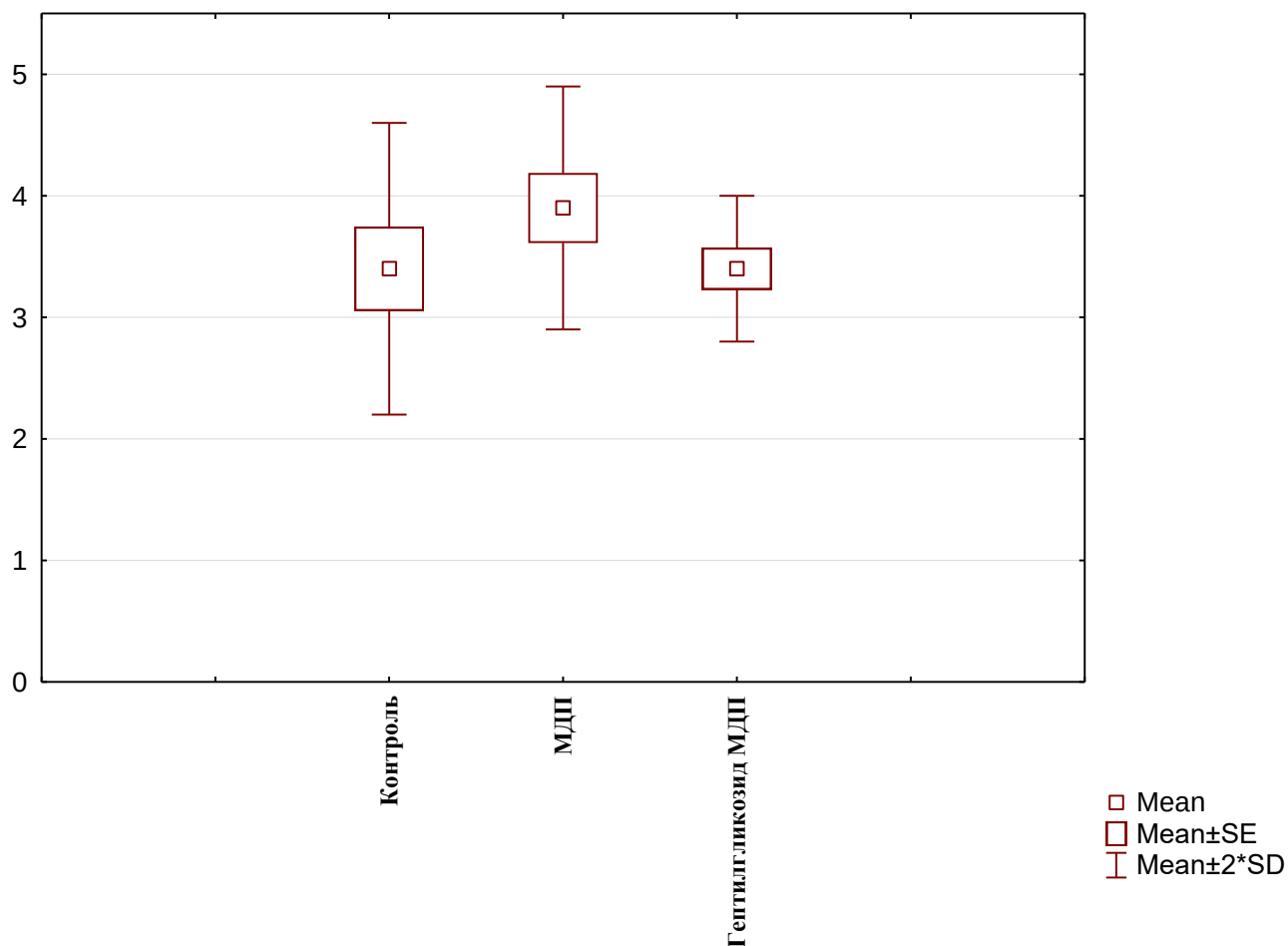


Рисунок 23. Концентрация IL-5 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Через 8 часов от начала эксперимента концентрация IL-5 у животных, получивших β -гептилгликозид МДП, достоверно превышала таковую в группах контроля и референс-контроля (Рис. 24).

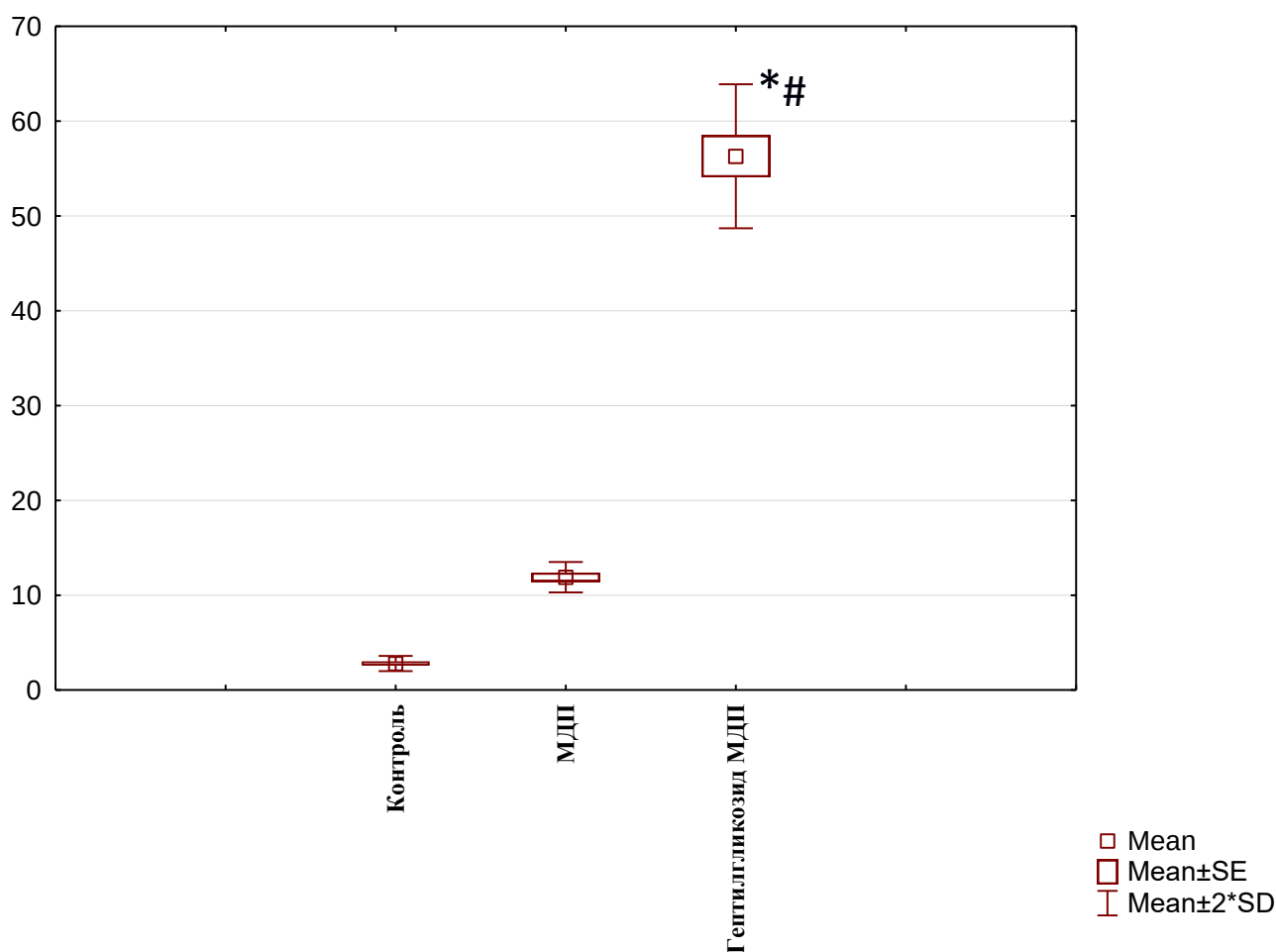


Рисунок 24. Концентрация IL-5 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через сутки после начала эксперимента содержание IL-5 в сыворотке крови животных обеих групп, получавших мурамилпептиды, превышало соответствующий показатель в группе контроля при парных сравнениях с использованием критерия Манна-Уитни. В рамках множественного сравнения эти отличия математически не подтверждались (Рис. 25).

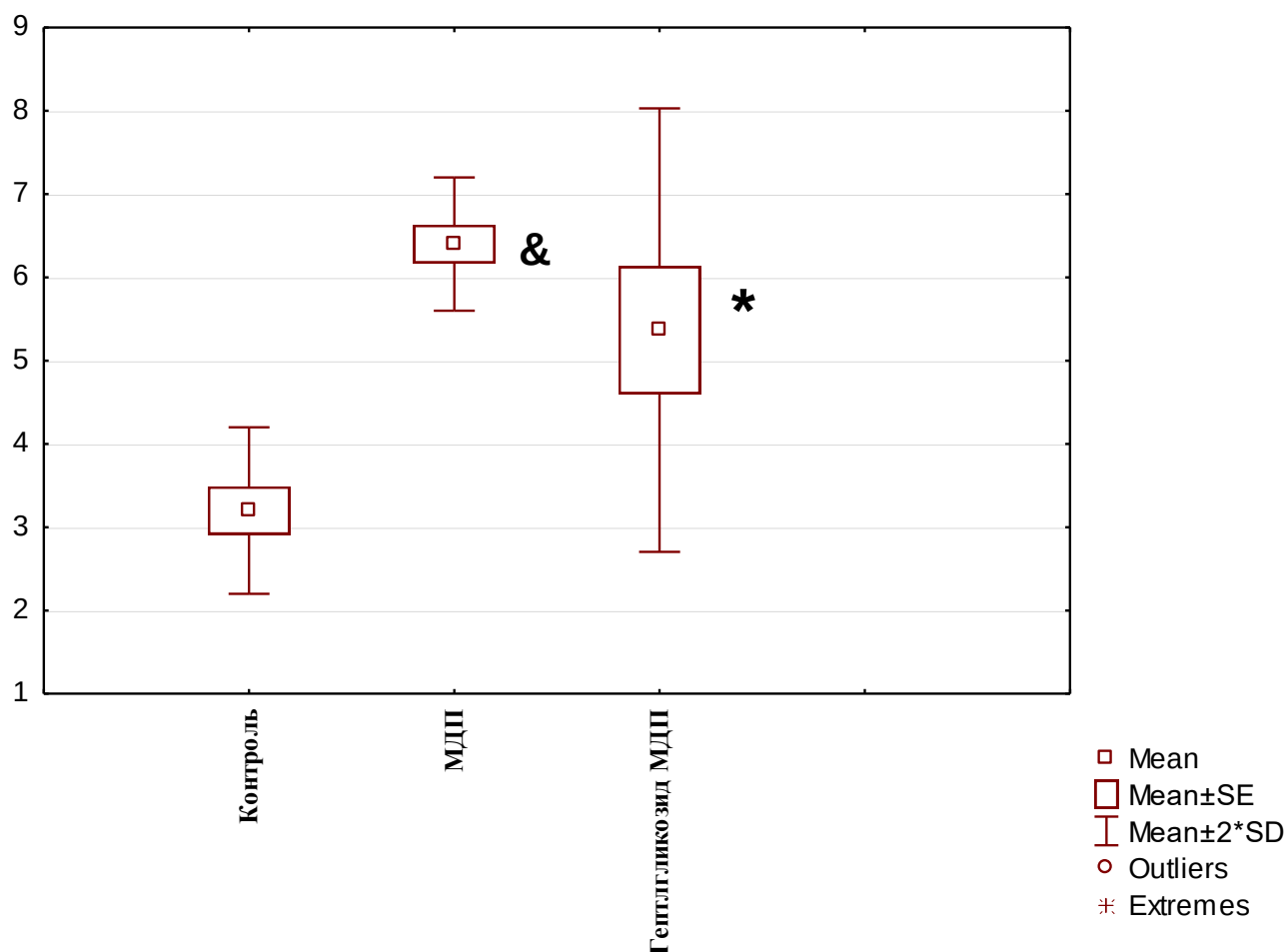


Рисунок 25. Концентрация IL-5 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β-гептилглюкозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,061$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,220$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,076$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Уровень IL-6 через 1 час после введения β -гептилгликозида МДП превышал таковой в группах контроля и референс-контроля (Рис. 26).

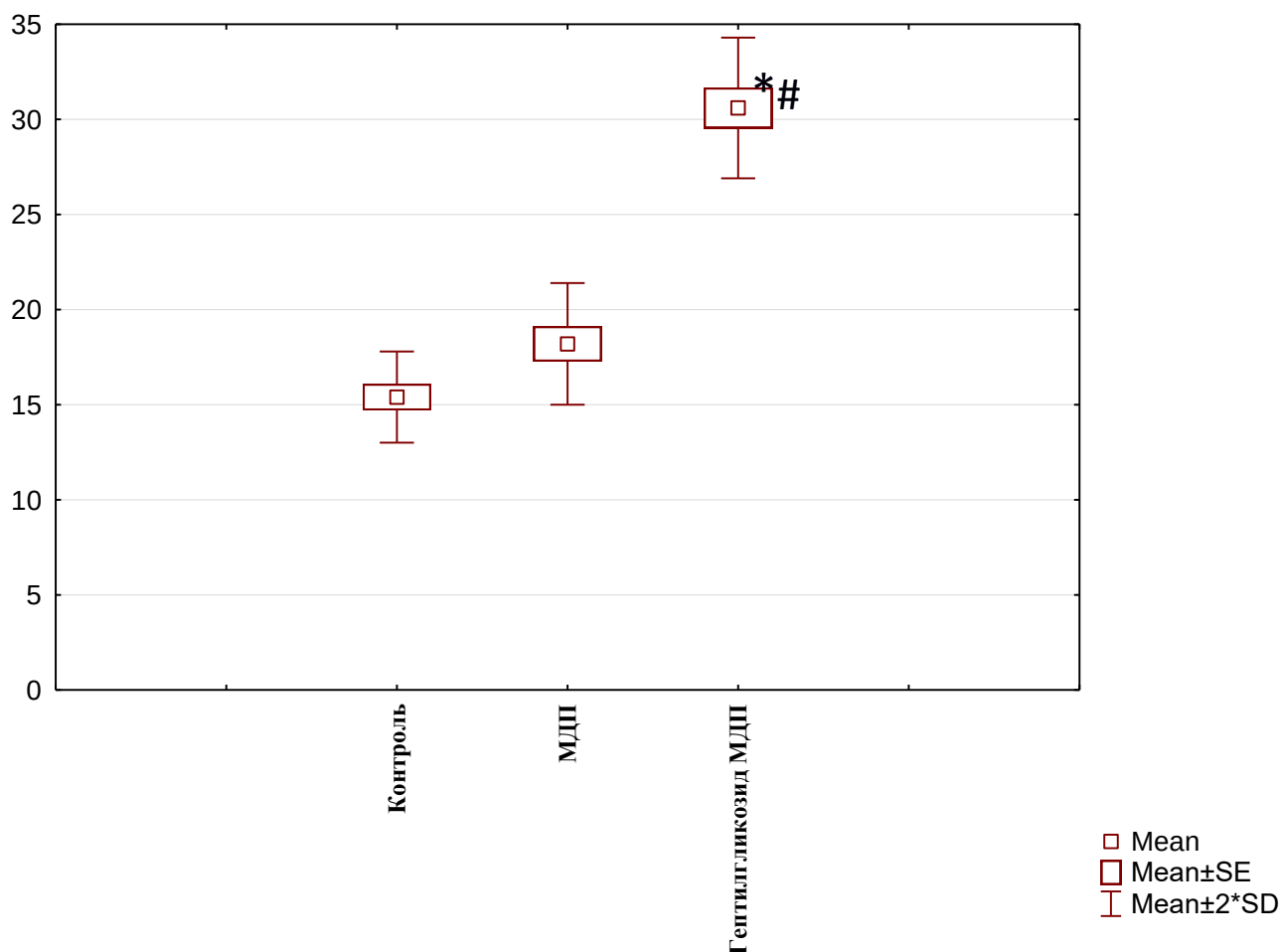


Рисунок 26. Концентрация IL-6 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,032$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,027$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,470$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов от начала эксперимента концентрация IL-6 в сыворотке крови мышей, которым вводили β -гептилгликозид МДП, была выше соответствующих показателей в других сравниваемых группах. При этом определённое повышение содержания этого цитокина в сыворотке крови отмечено и у мышей, получивших инъекцию немодифицированного МДП (Рис. 27).

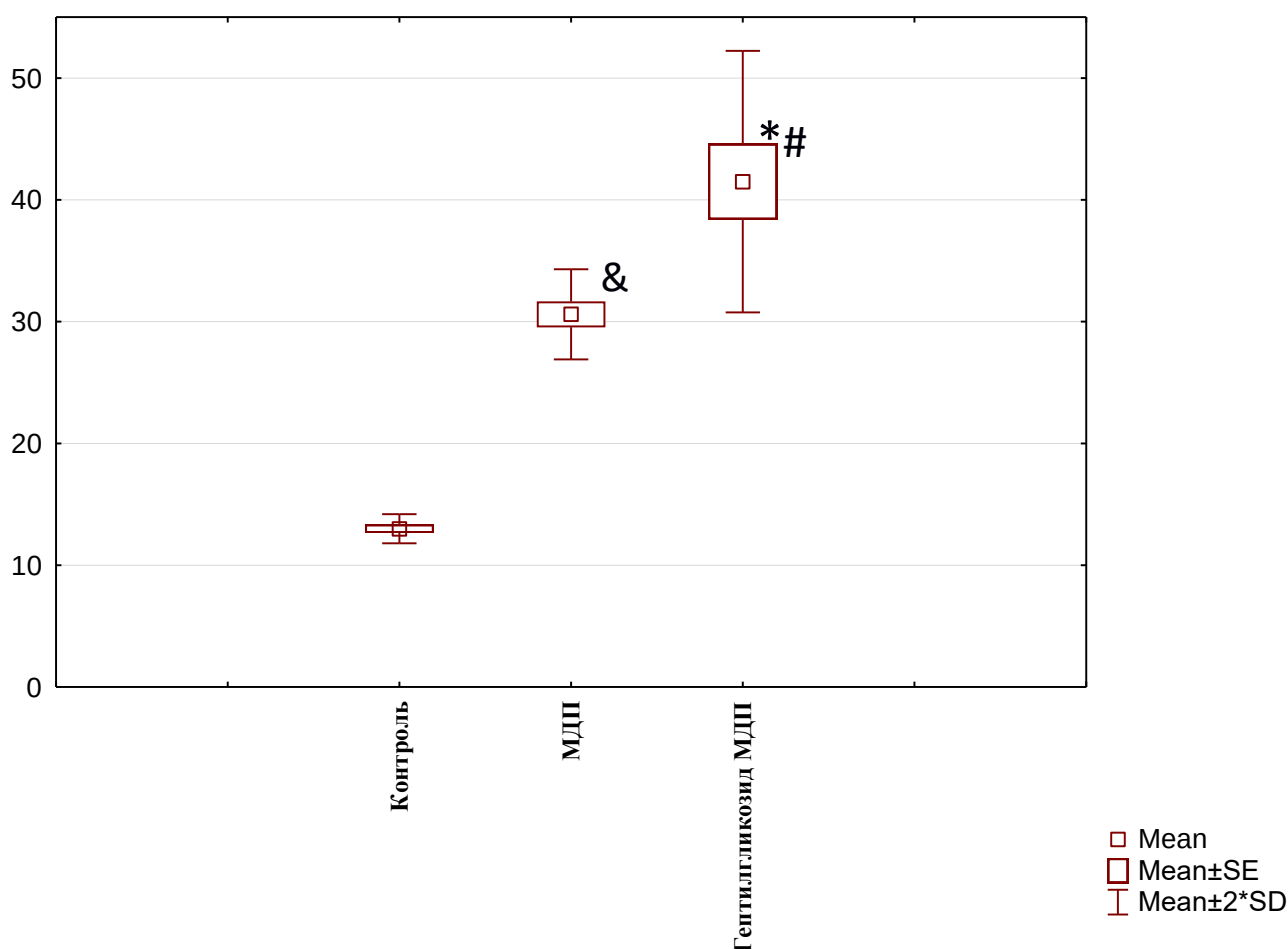


Рисунок 27. Концентрация IL-6 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Концентрация IL-6 в сыворотке животных через 24 часа после введения β -гептилгликозида МДП была выше показателей групп контроля и референс-контроля. У мышей, которым вводили МДП, в этот период содержание этого цитокина не отличалась от такового у животных, получавших инъекцию физиологического раствора (Рис. 28).

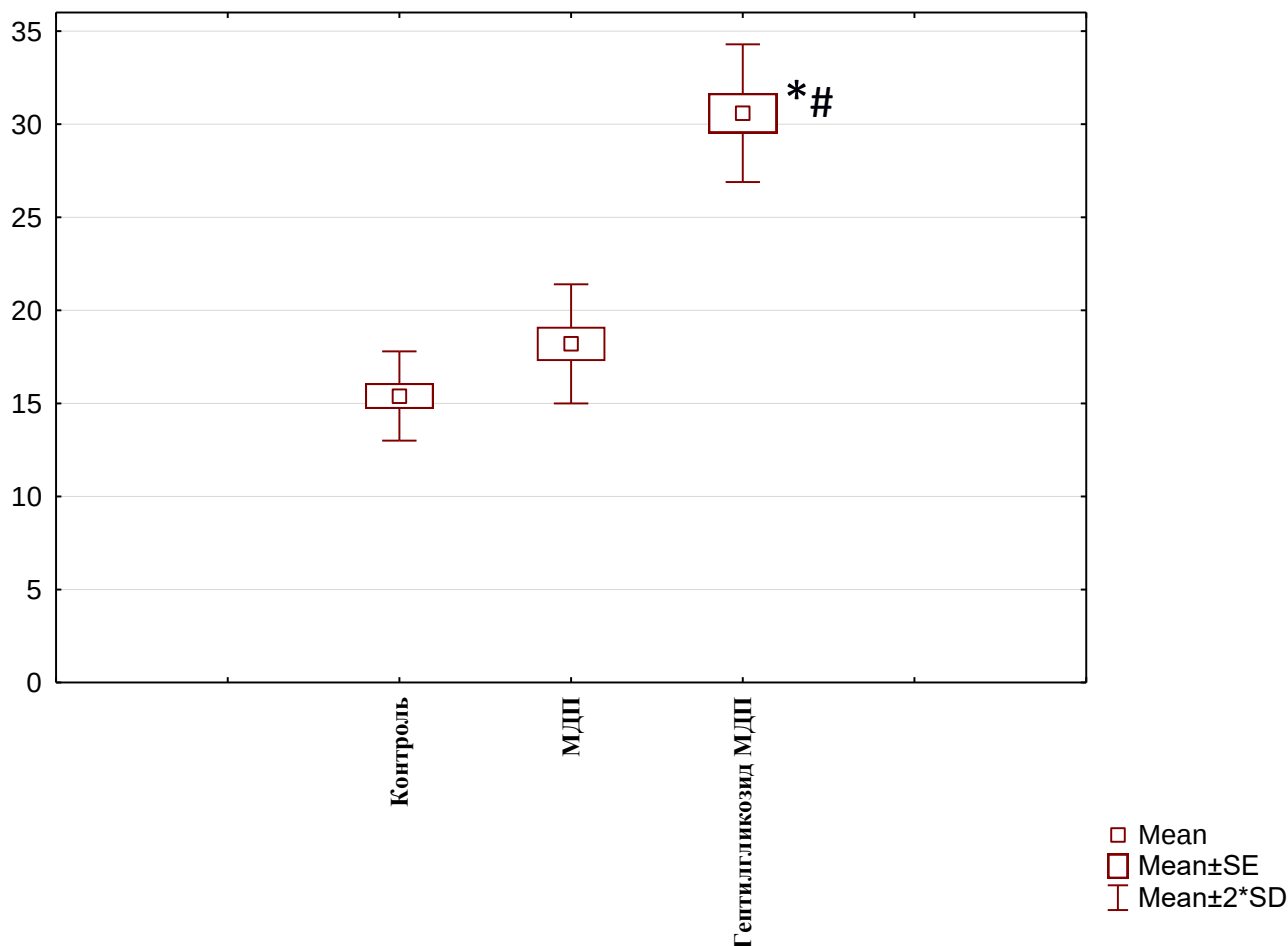


Рисунок 28. Концентрация IL-6 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,032$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,027$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,470$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 1 час после введения β -гептилгликозида МДП концентрация IL-10 в сыворотке крови мышей была выше уровня данного цитокина у животных из групп контроля и референс-контроля. В тоже время концентрация IL-10 у мышей, получавших МДП, была ниже контрольных значений (Рис. 29).

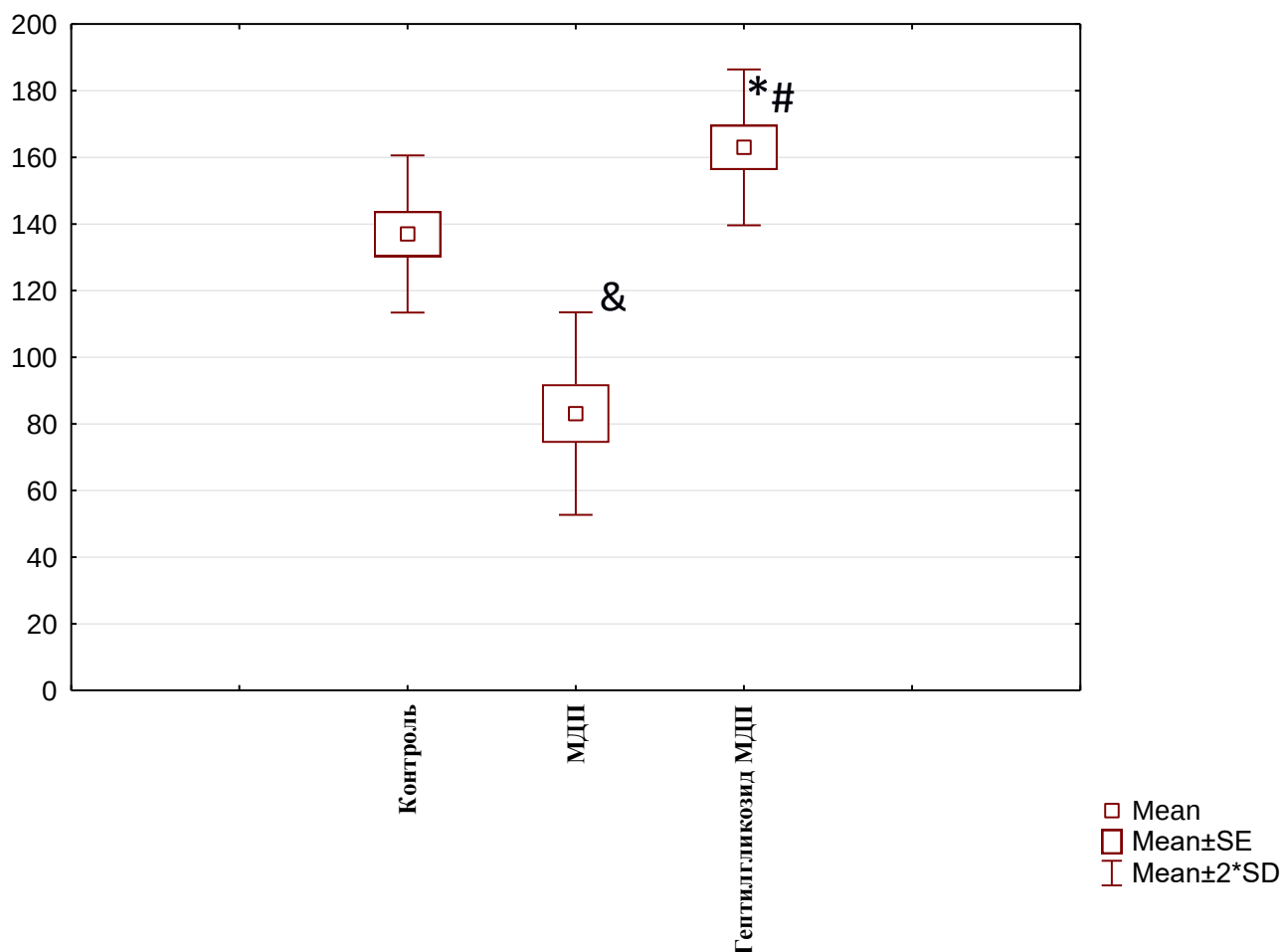


Рисунок 29. Концентрация IL-10 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов содержание IL-10 у мышей, которым вводили β -гептилгликозид МДП, по-прежнему превышало таковое в других группах. К этому времени эксперимента у животных, получавших МДП, угнетение высвобождения этого цитокина в системный кровоток сменилось на стимуляцию (Рис. 30).

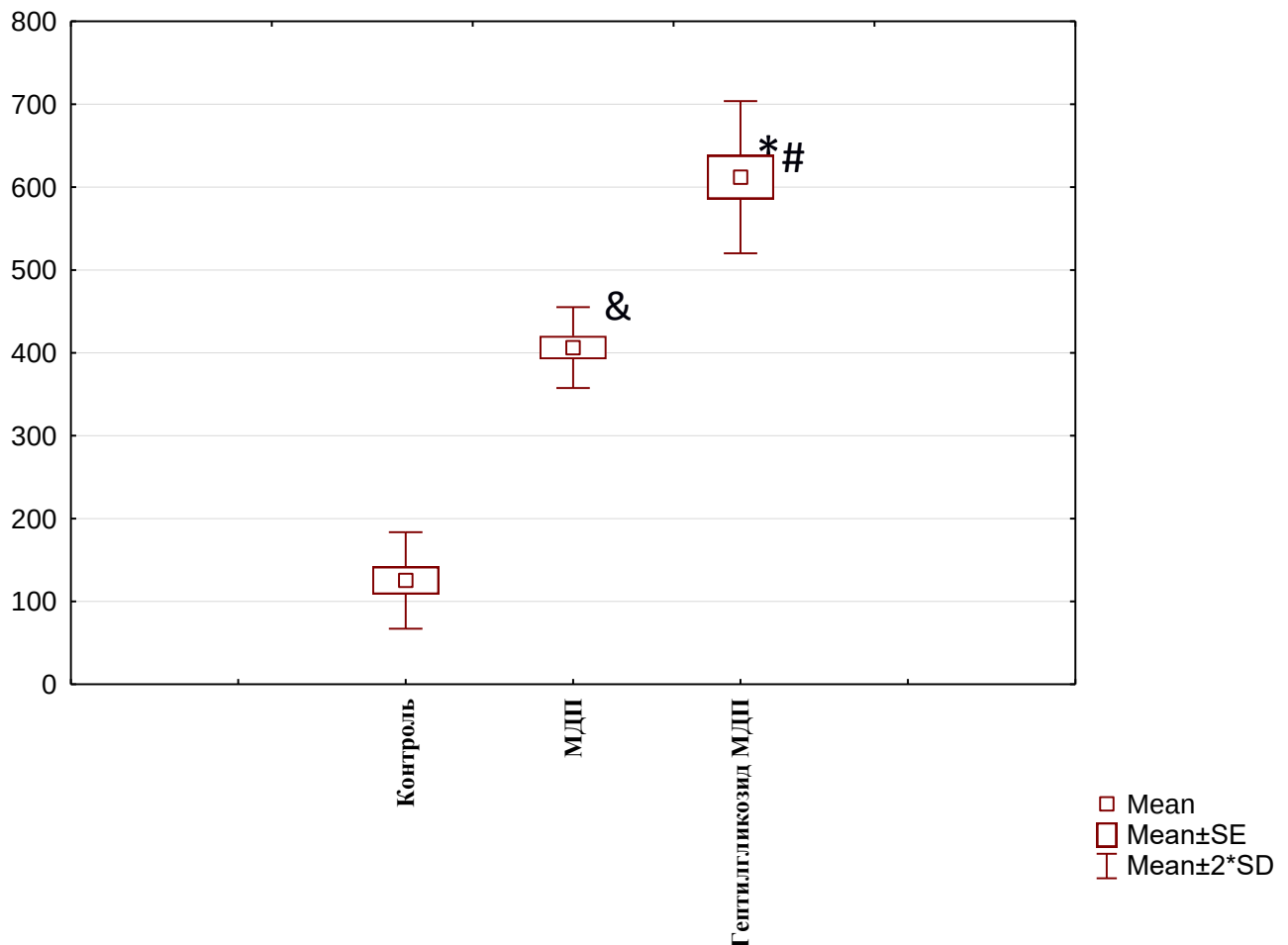


Рисунок 30. Концентрация IL-10 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа после начала эксперимента концентрация IL-10 у животных экспериментальной группы животных, получавших β -гептилгликозид МДП, не имела отличий от показателей группы контроля, в то время как содержание данного цитокина в группе референс-контроля превышало показатели остальных групп (Рис. 31).

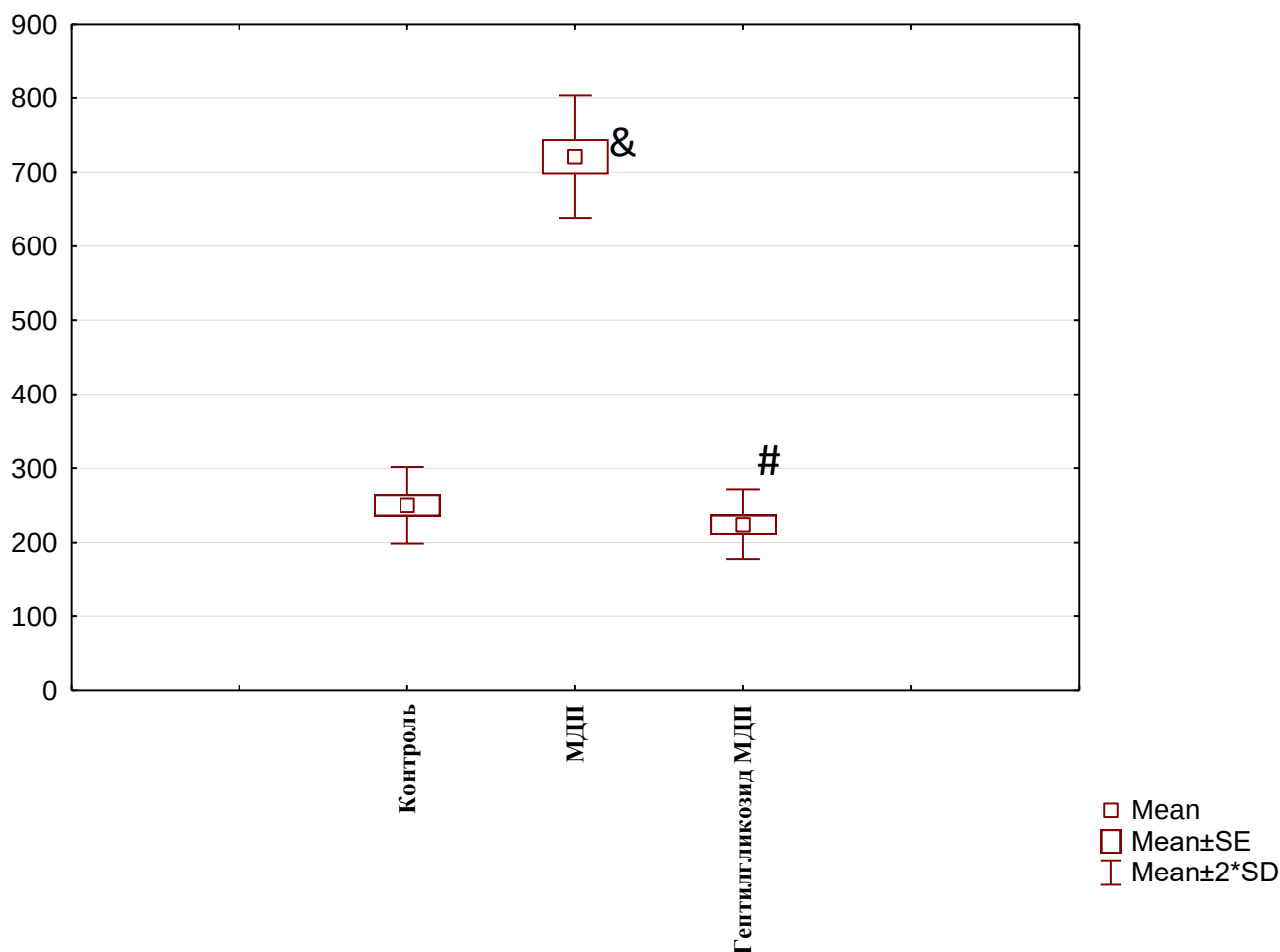


Рисунок 31. Концентрация IL-10 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,039$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: & – $p=0,408$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,034$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни).

Через час после введения исследуемых соединений концентрация IFN- γ в экспериментальной группе (β -гептилгликозид МДП) и группе референс-контроля (МДП) превышала таковую в группе контроля (физиологический раствор), причем показатель референс-контроля был достоверно выше показателя экспериментальной группы (Рис. 32).

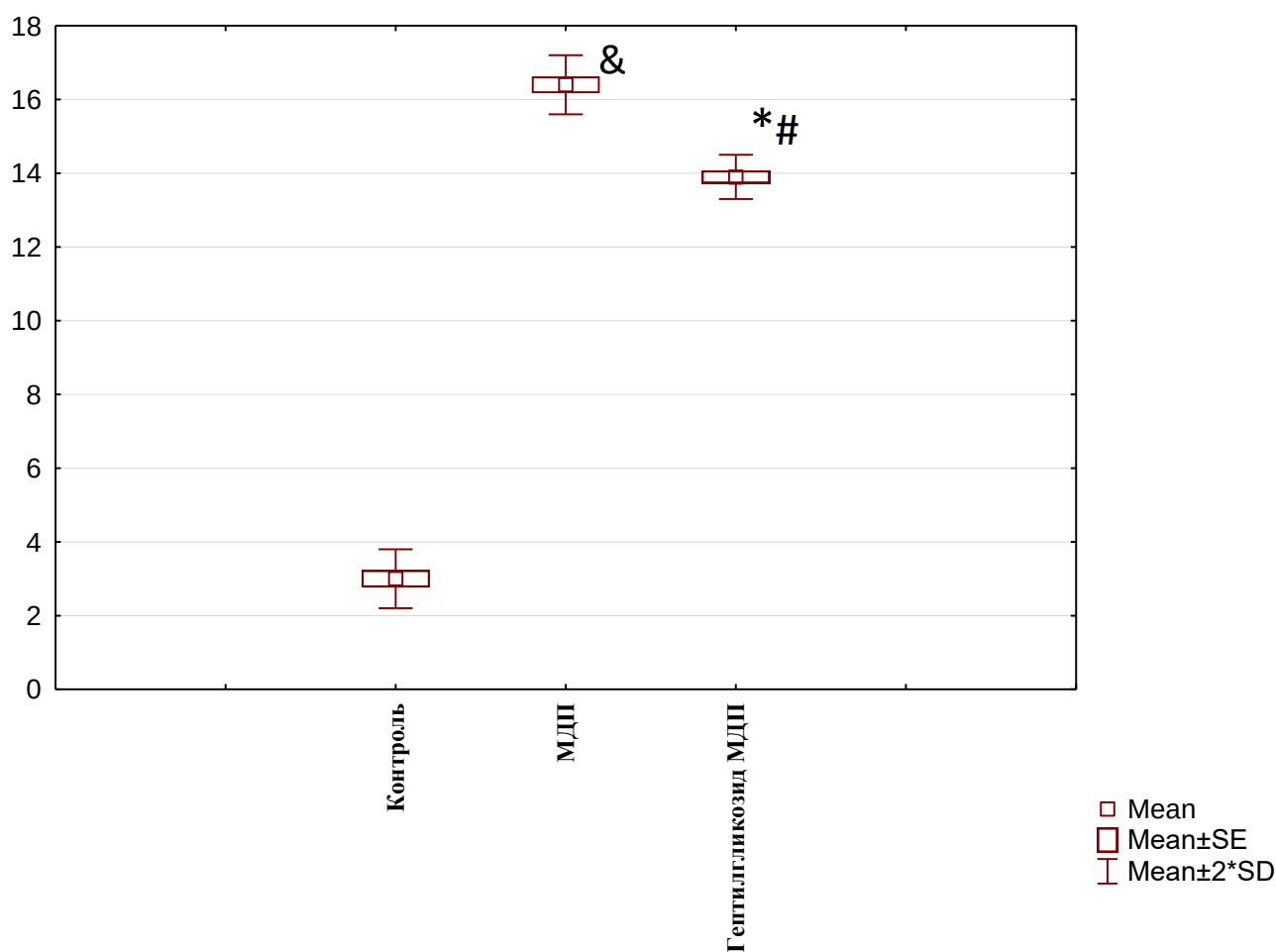


Рисунок 32. Концентрация IFN- γ (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни); & – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов от начала эксперимента математически подтвержденные отличия концентрации цитокина в группах животных, подверженных действию мурамилпептидов, от таковой в группе контроля сохранились, при этом отмечено исчезновение статистически значимых различий между показателями группы референс-контроля и экспериментальной группы (Рис. 33).

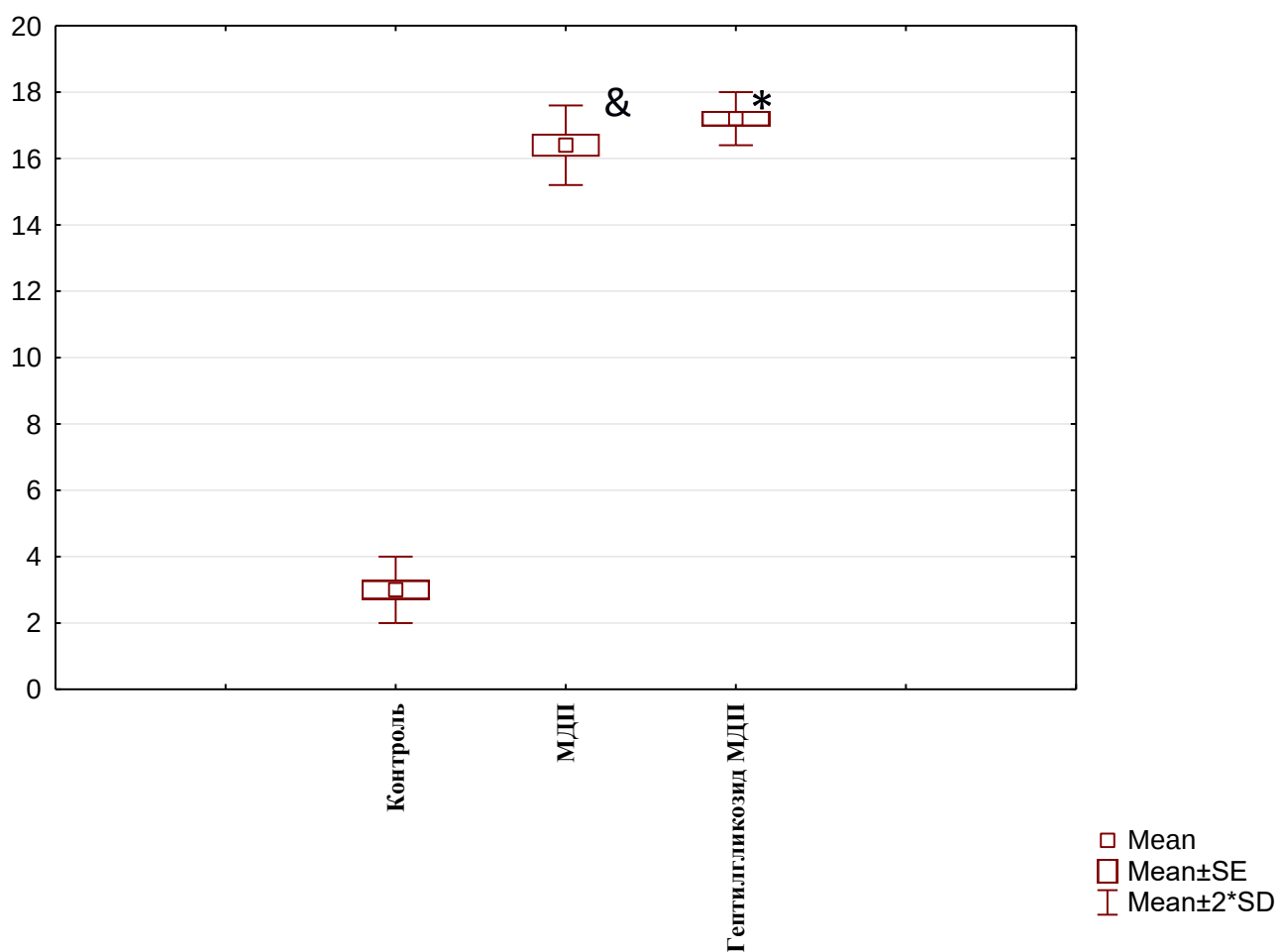


Рисунок 33. Концентрация IFN- γ (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,039$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,034$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни); & – $p=0,408$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа содержание этого цитокина в сыворотке крови мышей экспериментальной группы было выше такового в группе контроля и ниже показателей референс-контроля (Рис. 34).

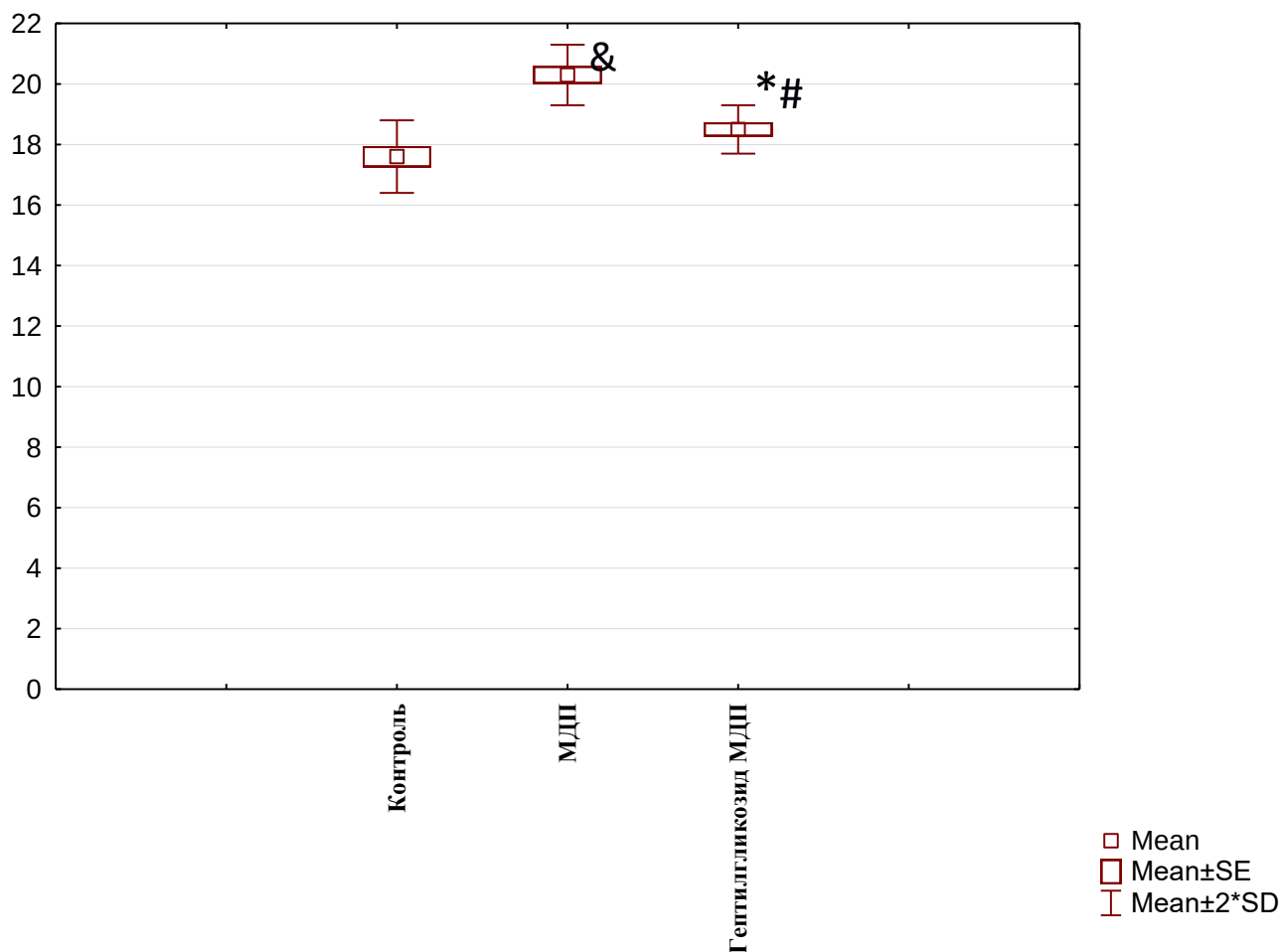


Рисунок 34. Концентрация IFN- γ (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,039$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,890$ (критерий Данна) или $p=0,127$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,034$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,408$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 1 час после введения исследуемых веществ концентрация TNF- α в экспериментальной группе была достоверно выше соответствующих показателей группы референс-контроля, которые в свою очередь были выше таковых группы контроля (Рис. 35).

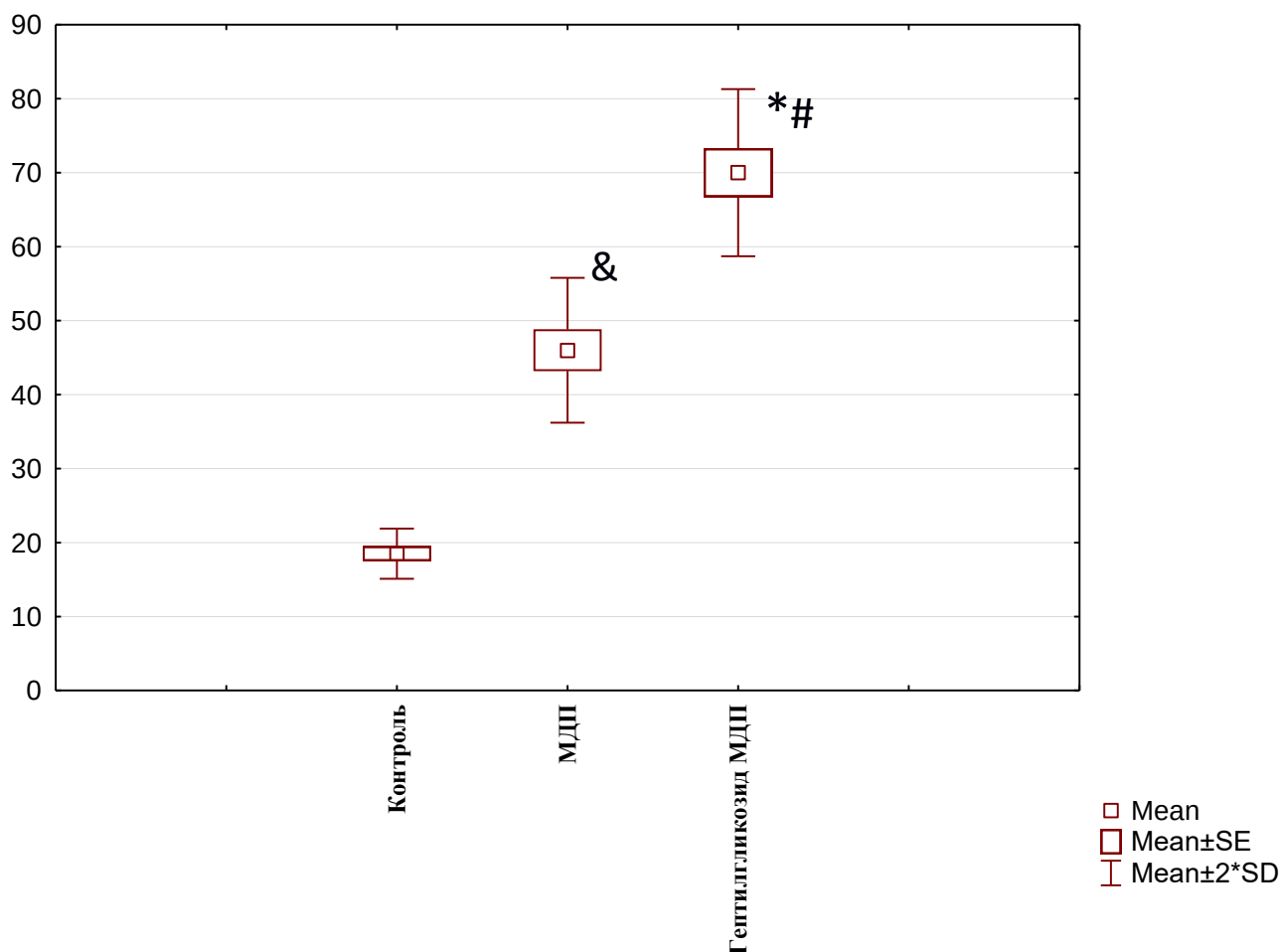


Рисунок 35. Концентрация TNF- α (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни); & – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U-критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов от начала эксперимента ситуация менялась: концентрация TNF- α в экспериментальной группе превышала таковую в группе контроля, но была ниже концентрации в группе референс-контроля (Рис.36).

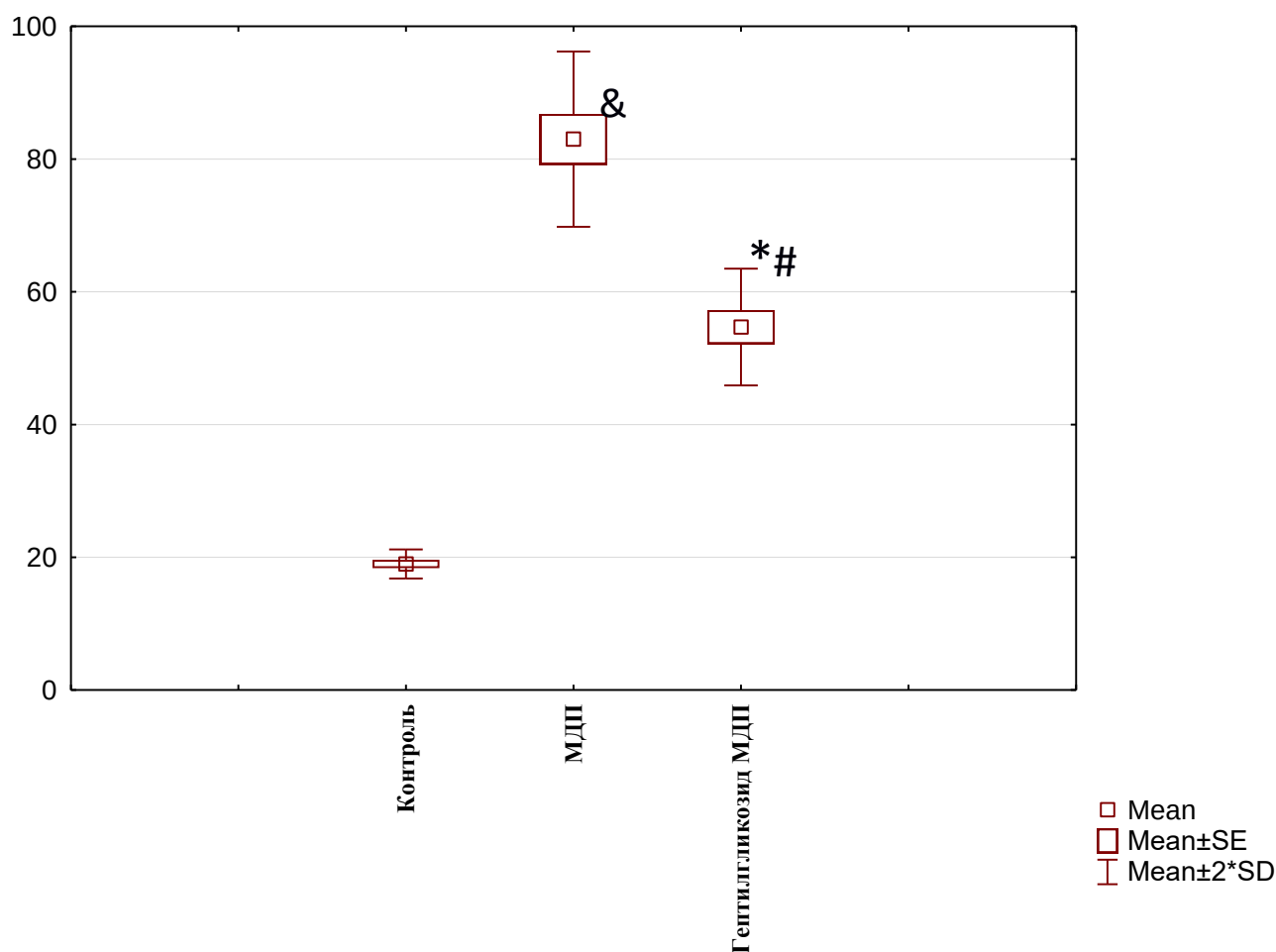


Рисунок 36. Концентрация TNF- α (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа после внутрибрюшинного введения иммуностимуляторов отличий по содержанию TNF- α в сыворотке крови между экспериментальной группой и группой контроля не выявлено, в то время как этот показатель в группе референс-контроля были достоверно выше, чем в остальных группах (Рис. 37).

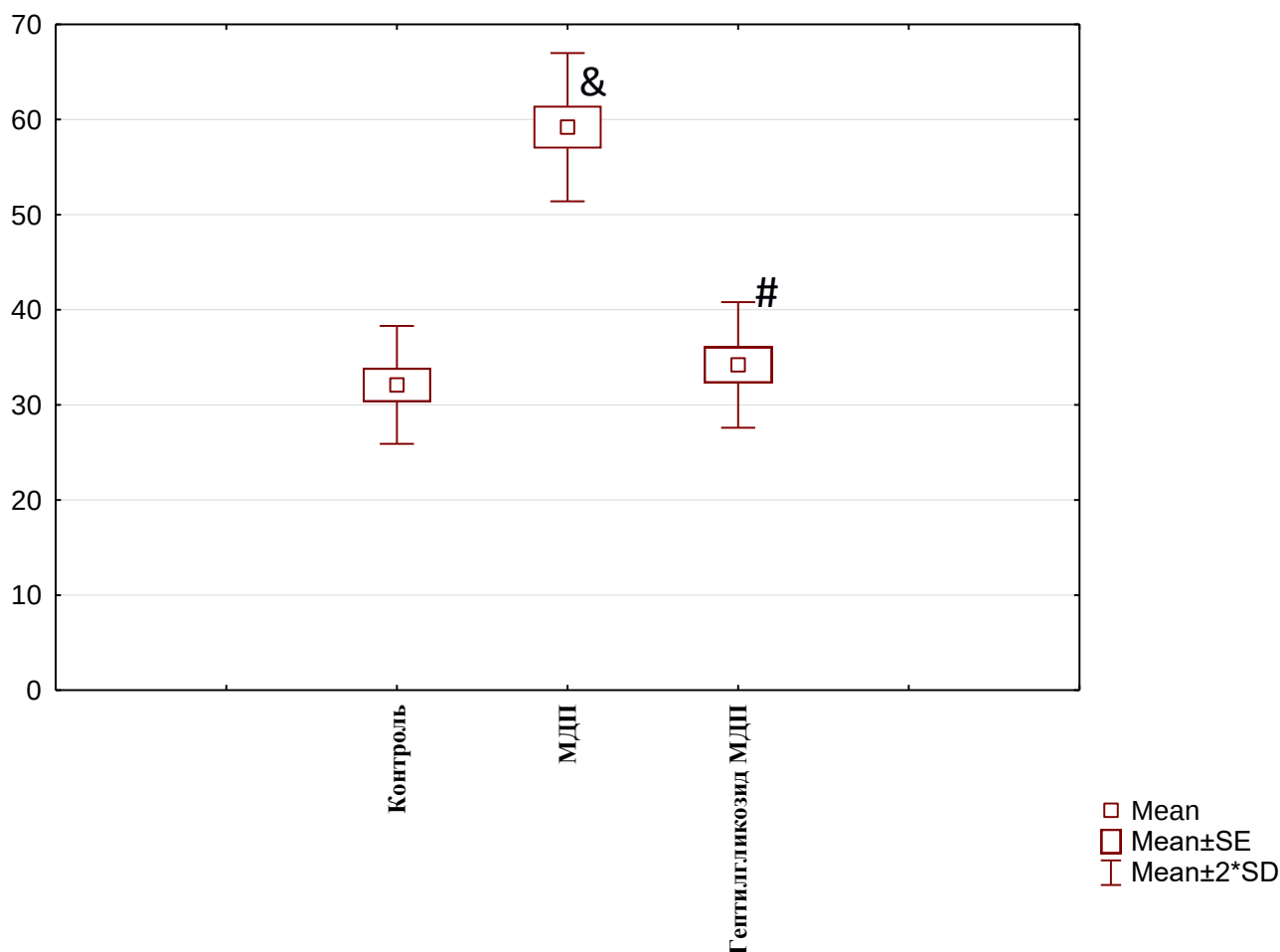


Рисунок 37. Концентрация TNF- α (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилглюкозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,061$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: & – $p=0,076$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,221$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 1 час от начала эксперимента было выявлено повышение концентрации GM-CSF в сыворотке крови животных экспериментальной группы и группы референс-контроля по сравнению с контрольной группой. Содержание этого цитокина у животных, получавших β -гептилгликозид МДП, была существенно выше, чем таковая у мышей группы референс-контроля (Рис. 38).

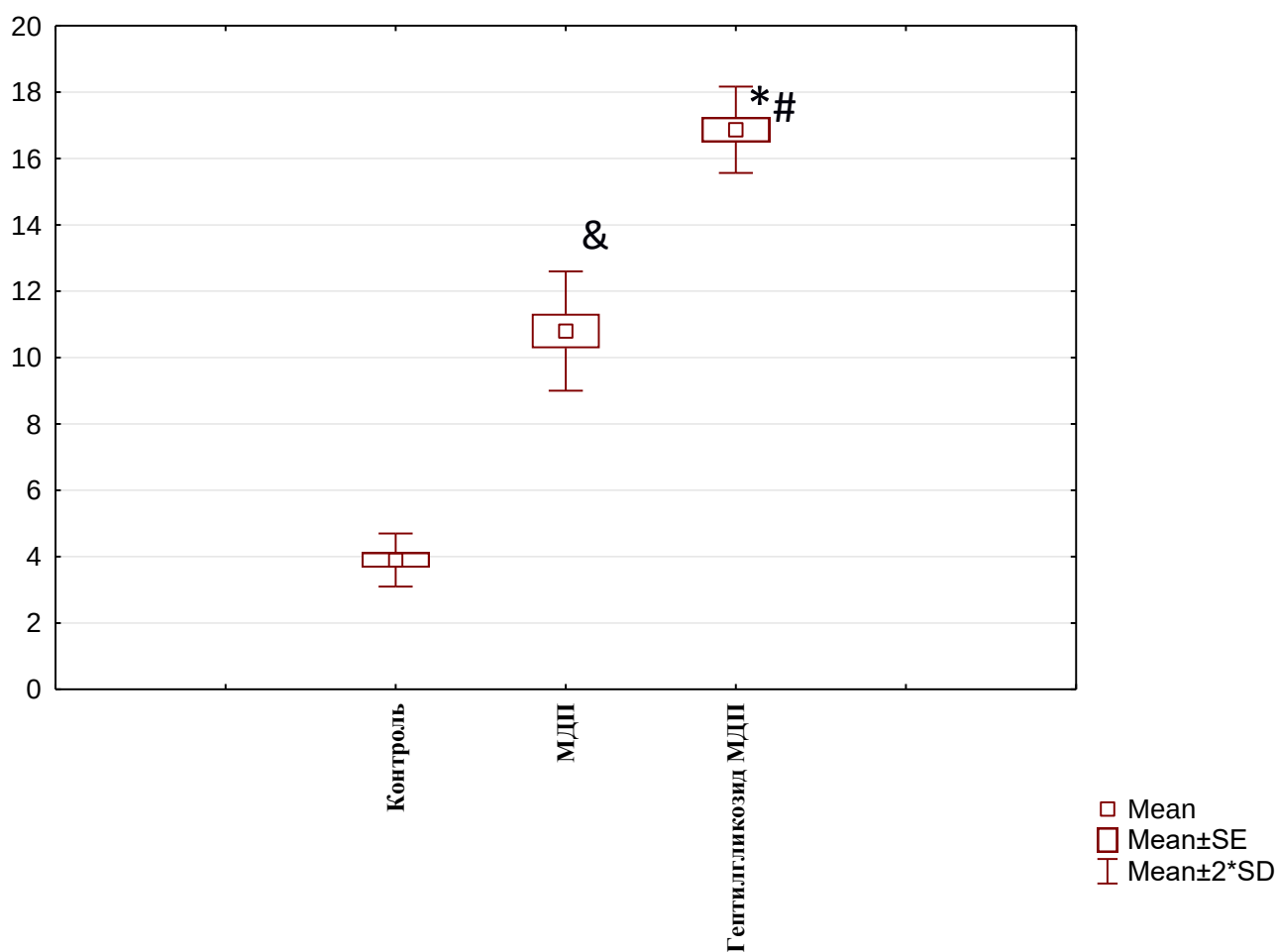


Рисунок 38. Концентрация GM-CSF (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 8 часов отмечено повышение концентрации GM-CSF в сыворотке крови контрольных животных с отсутствием значимых изменений в других группах. В результате уровень GM-CSF в группах мышей, получавших мурамилпептиды, становился ниже такового в контрольной группе (Рис. 39).

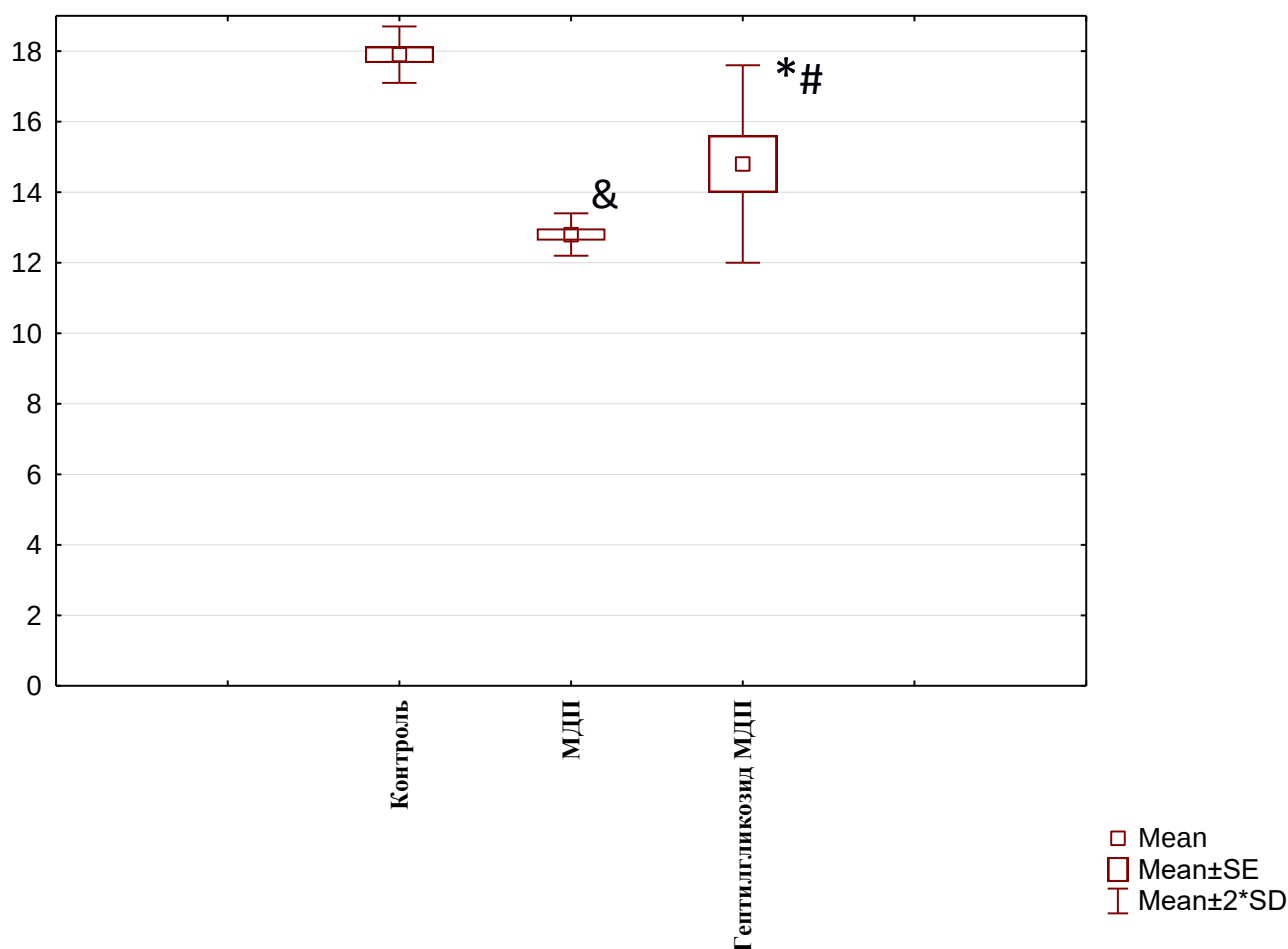


Рисунок 39. Концентрация GM-CSF (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилглюкозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа от начала эксперимента выявлено исчезновение значимых отличий между группами по концентрации GM-CSF в сыворотке крови (Рис. 40).

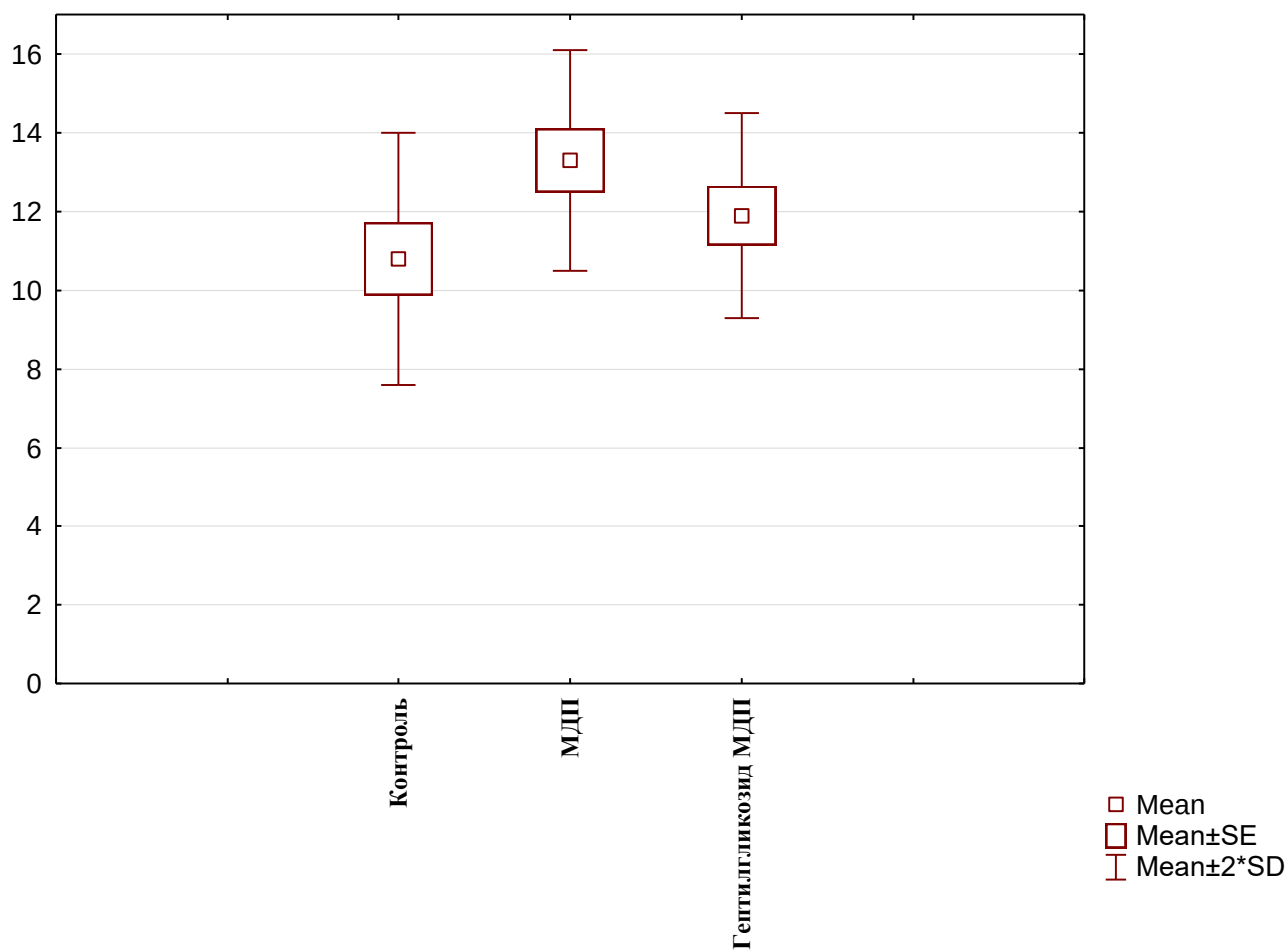


Рисунок 40. Концентрация GM-CSF (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β-гептилглюкозида МДП

Через 1 час после внутрибрюшинного введения β -гептилгликозида МДП концентрация IL-4 в сыворотке крови мышей превышала таковую в других группах (Рис. 41).

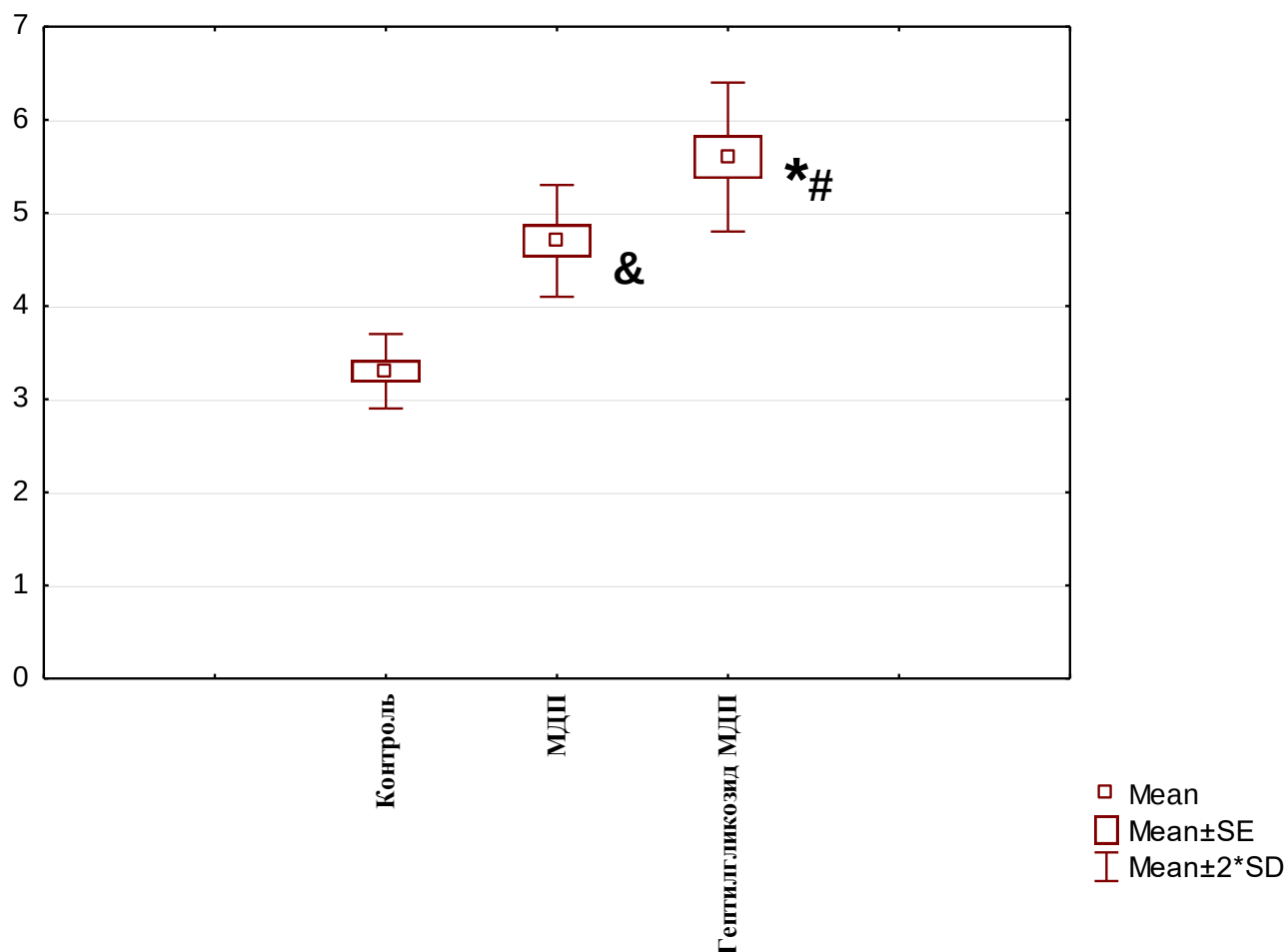


Рисунок 41. Концентрация IL-4 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 1 час после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,027$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни); & – $p=0,022$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,539$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

К 8-му часу после введения соединений концентрации IL-4 в группах референс-контроля и контроля не имели статистически значимых отличий, в то же время содержание исследуемого цитокина в сыворотке крови животных экспериментальной группы снизилось и было достоверно ниже такового в других группах (Рис.42).

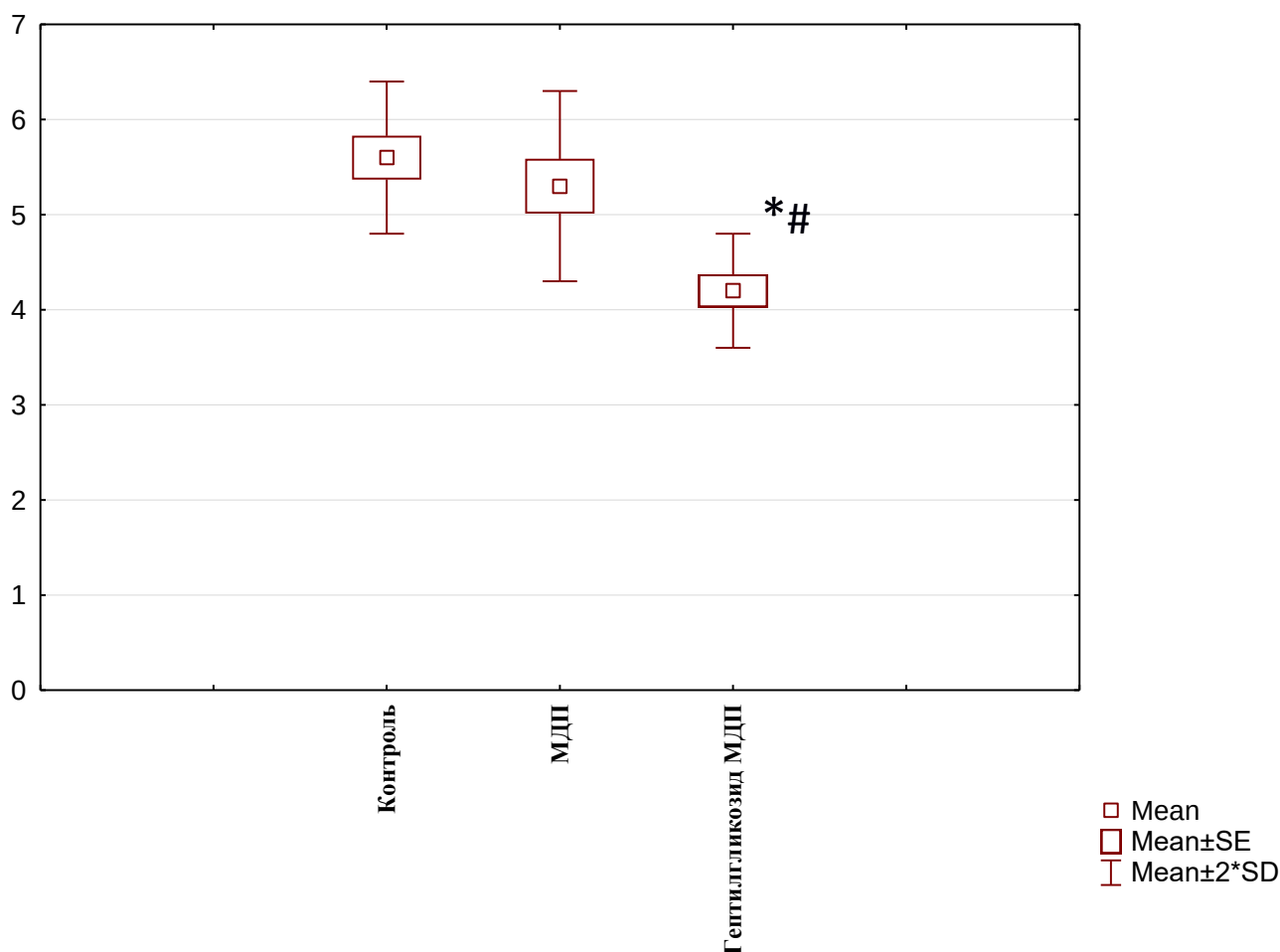


Рисунок 42. Концентрация IL-4 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 8 часов после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,061$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: * – $p=0,076$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни). В сравнении с МДП: # – $p=0,221$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни).

Через 24 часа после введения соединений показатели группы референс-контроля были достоверно выше показателей других групп (Рис.43).

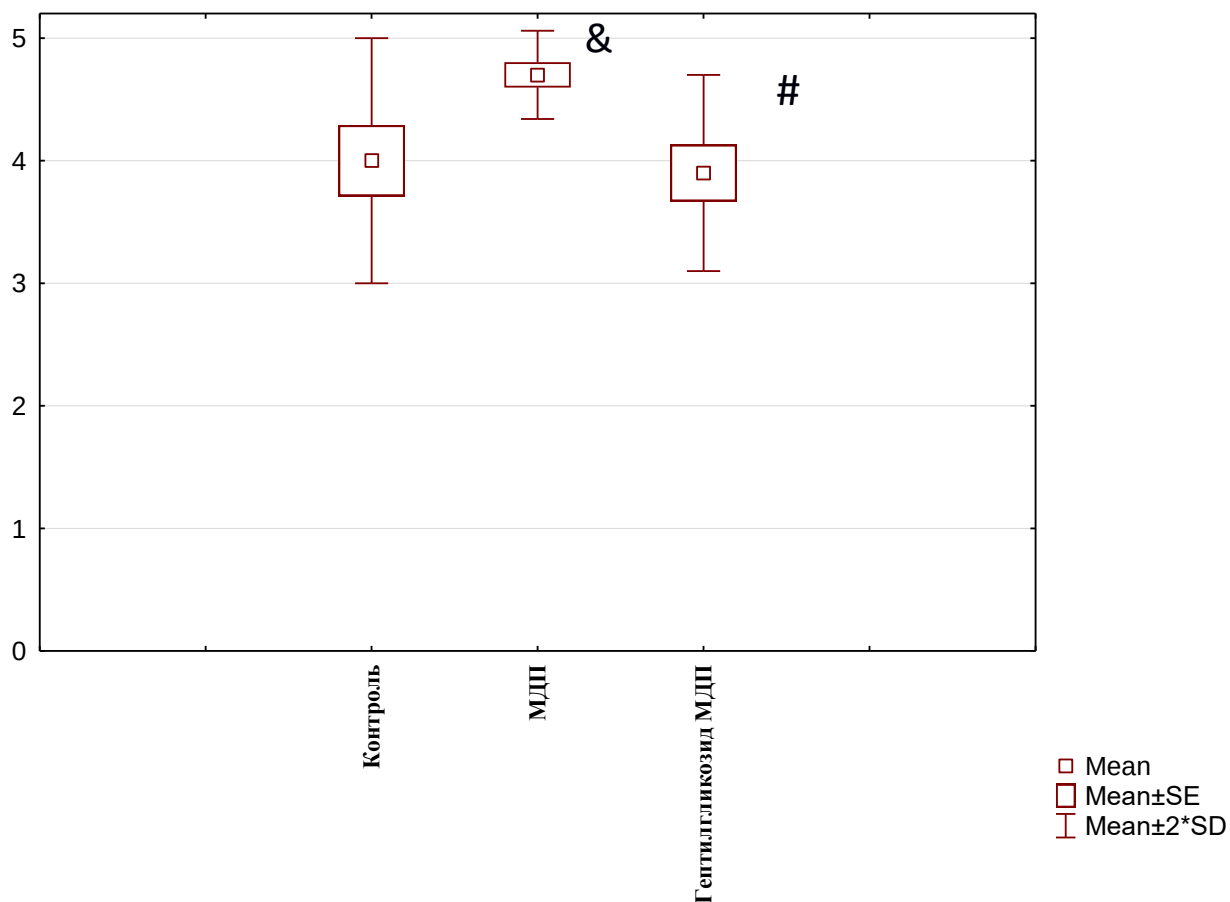


Рисунок 43. Концентрация IL-4 (пг/мл) в сыворотке крови мышей через 24 часа после внутрибрюшинного введения МДП или β -гептилгликозида МДП

Значимость различия при множественном сравнении: $p=0,063$ (критерий Краскела-Уоллиса). В сравнении с контролем: & – $p=0,092$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни) или $p=0,085$ (t -критерий Стьюдента). В сравнении с МДП: # – $p=0,221$ (критерий Данна) или $p=0,0495$ (U -критерий Манна-Уитни) или $p=0,034$ (t -критерий Стьюдента).

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

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 была выше, чем в группе референс-контроля.

2.2. Действие β -гептилгликозида МДП на рост меланомы B16 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 B16 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 B16, получавших β -гептилгликозид МДП в дозе 5 мкг/животное в терапевтическом режиме.

В других дозах исследуемый гликопептид не влиял на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей (табл. 4).

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 (рис. 44, 45, 46).

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		
	1 мкг/мышь (50 мкг/кг)	27,8± 1,3	+1
	5 мкг/мышь (250 мкг/кг)	26,9 ± 0,9	−1,4
	25 мкг/мышь (1,25 мг/кг)	28,0± 1,7	+2
	Терапевтический режим		
	1 мкг/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

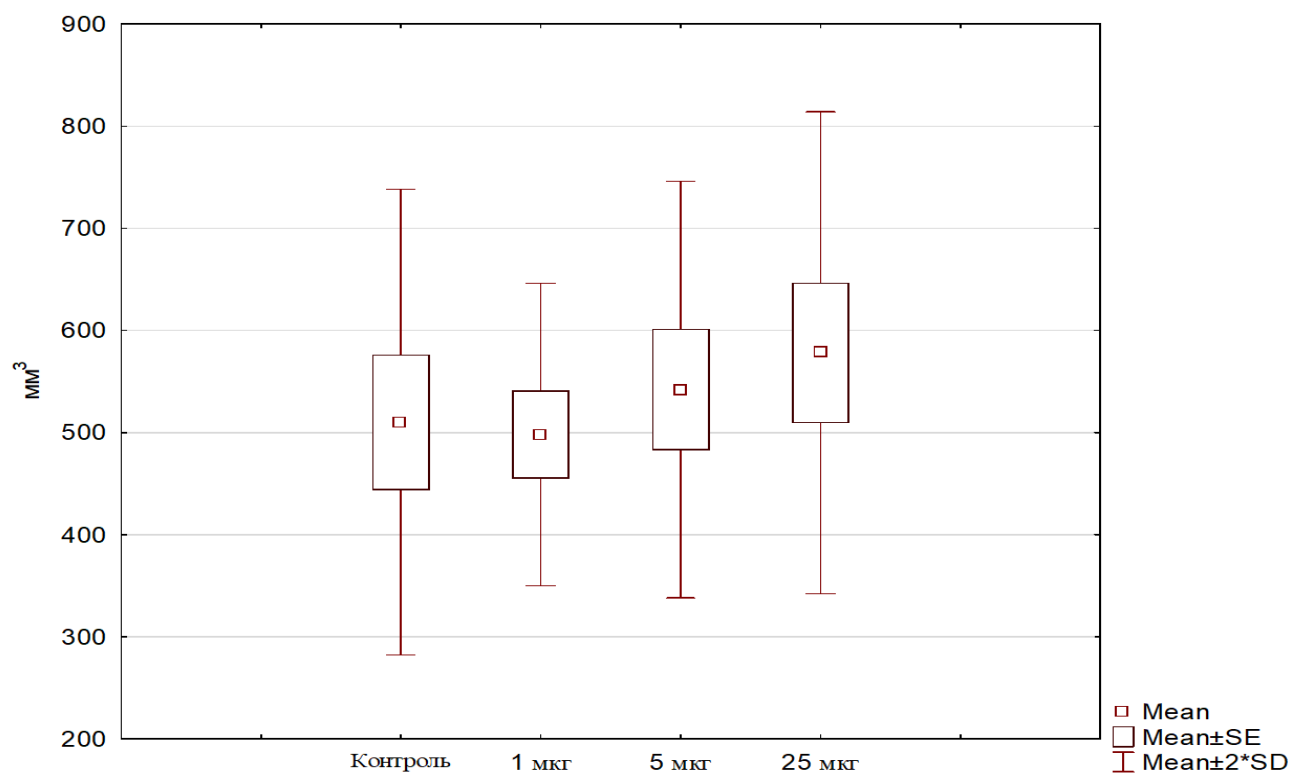


Рисунок 44. Влияние профилактического введения β -гептилгликозида МДП на объем опухолевого узла на 10-е сутки после прививки меланомы B16

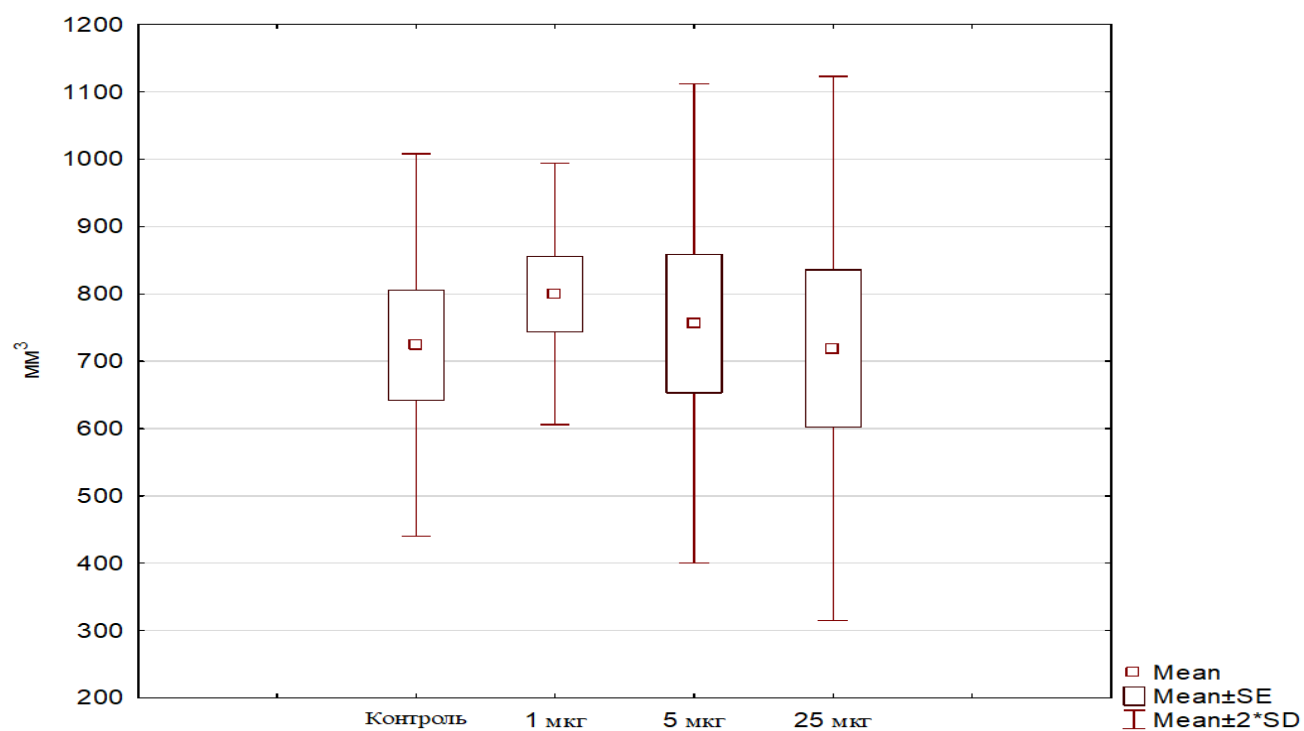


Рисунок 45 Влияние профилактического введения β -гептилгликозида МДП на объем опухолевого узла на 15-е сутки после прививки меланомы В16

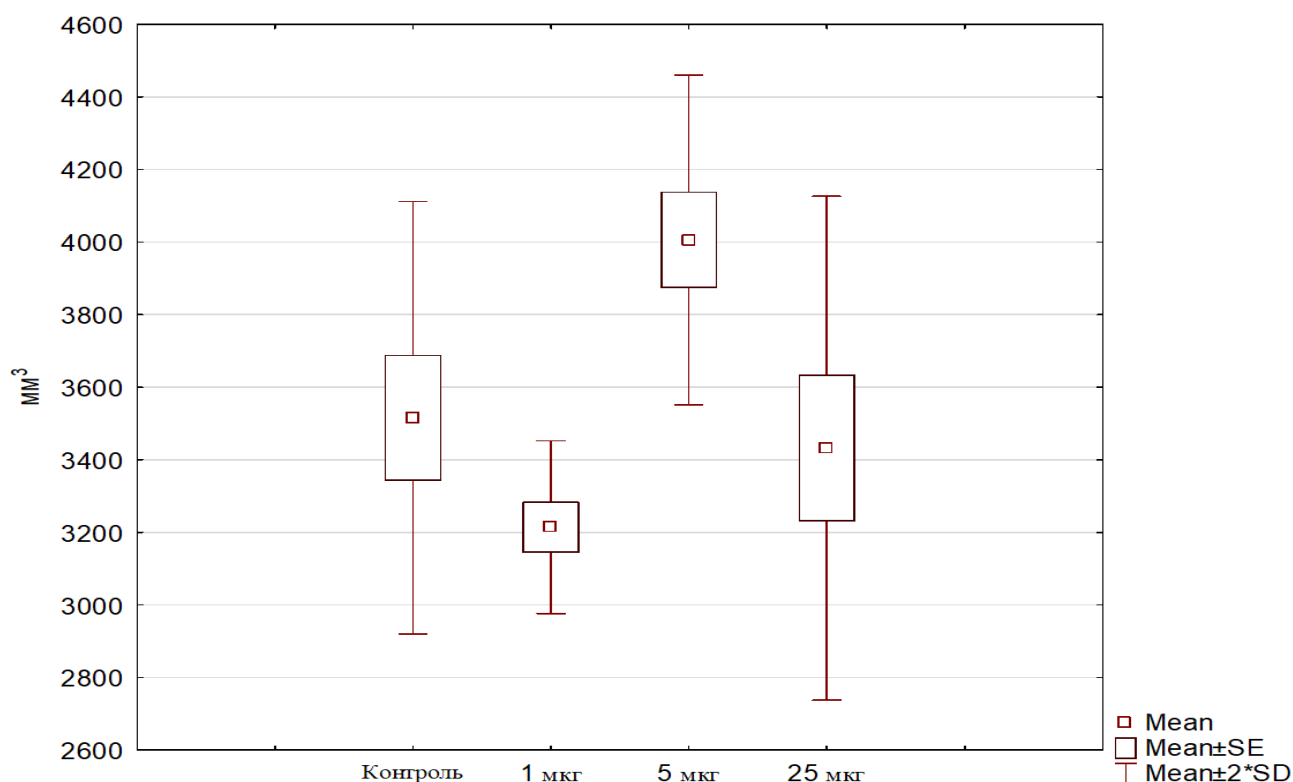
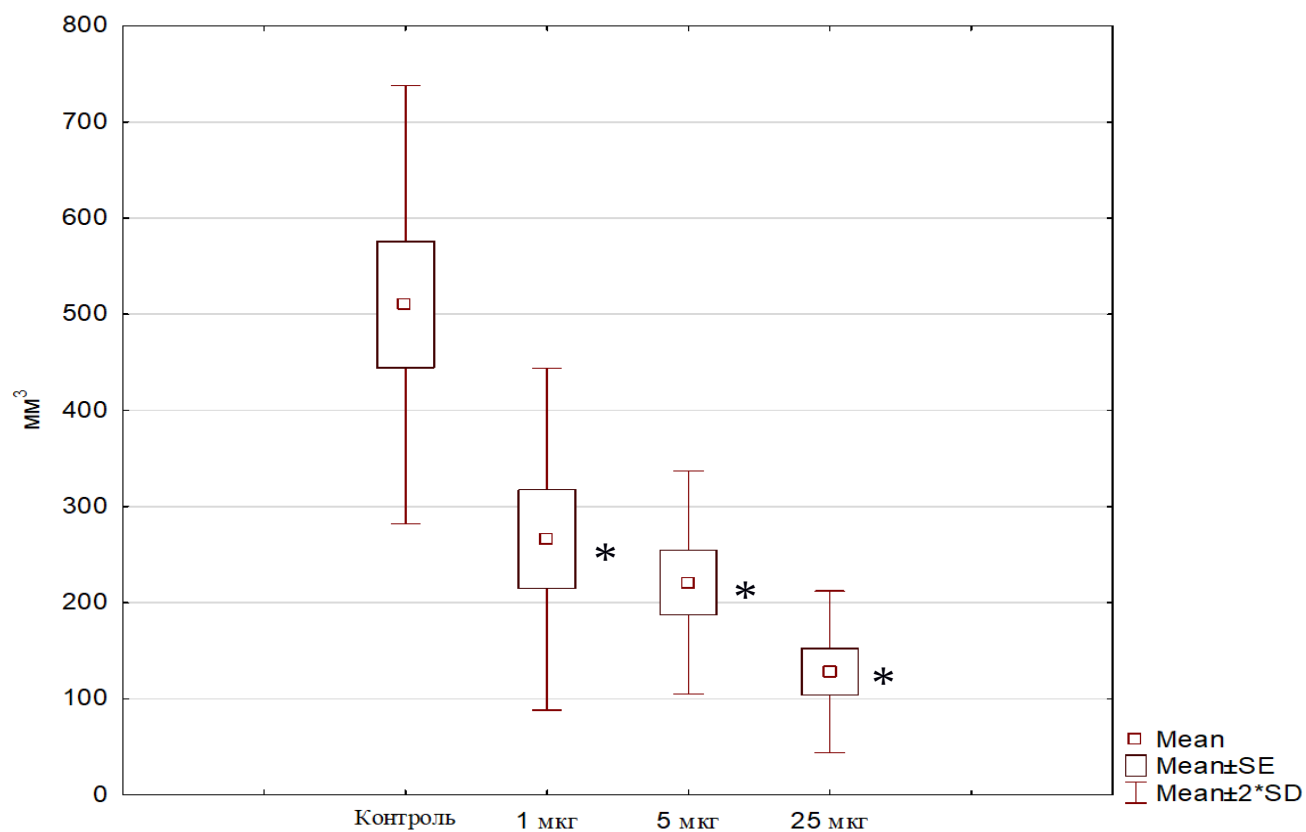


Рисунок 46. Влияние профилактического введения β -гептилгликозида МДП на объем опухолевого узла на 20-е сутки после прививки меланомы B16

При использовании β -гептилгликозида МДП в терапевтическом режиме обнаружено статистически значимое и при этом дозозависимое торможение опухолевого роста на 10-е (рис. 47) и 20-е сутки (рис. 49) 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% и -48%, соответственно). Любопытно, что при промежуточном измерении объема опухолевого узла (15-е сутки) не обнаружено противоопухолевого действия, исследуемого гликопептида (рис. 48).



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

Рисунок 47. Влияние введения β -гептилгликозида МДП в терапевтическом режиме на объем опухолевого узла на 10-е сутки после прививки меланомы B16

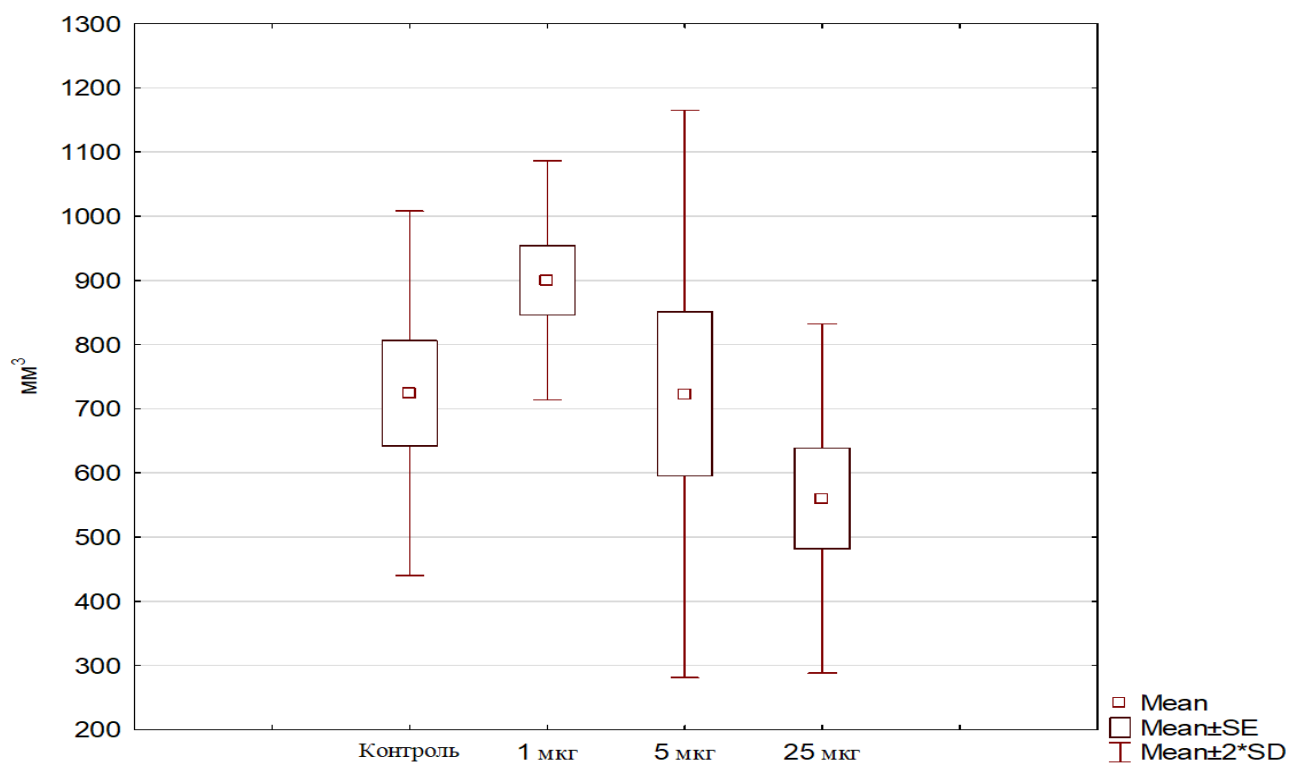
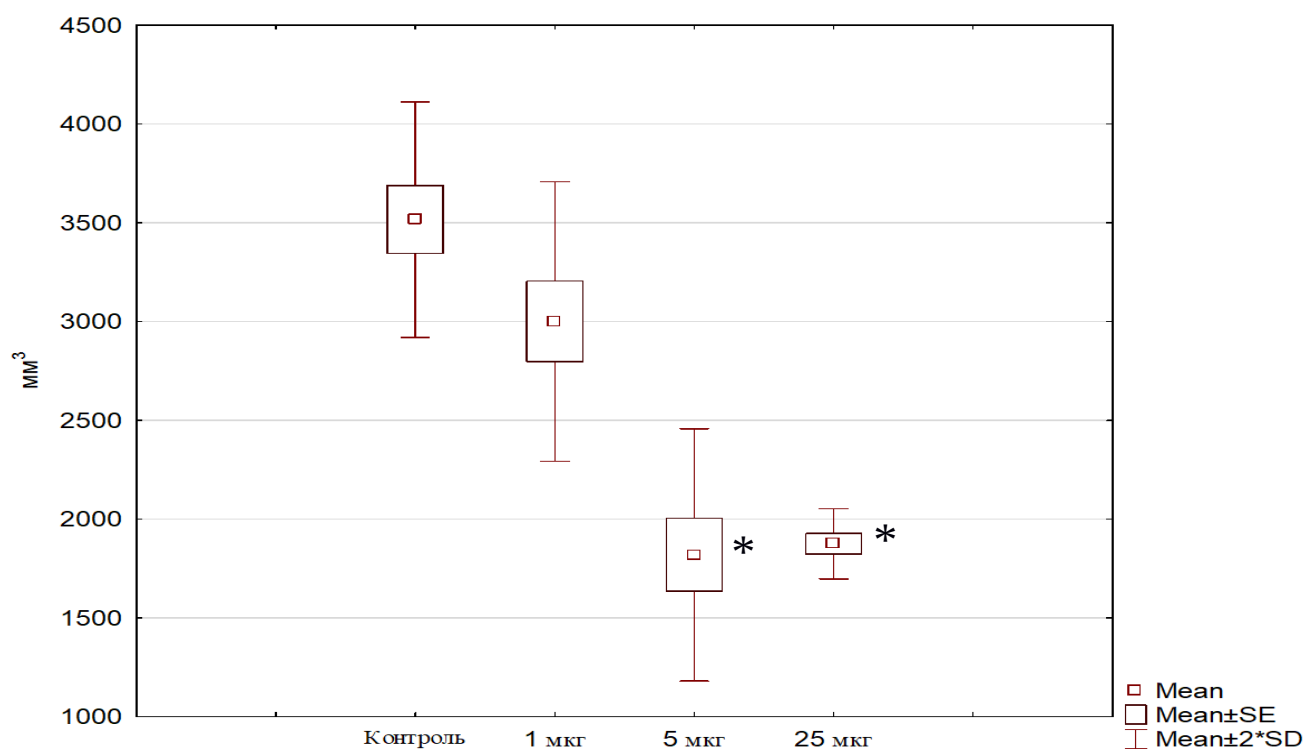


Рисунок 48. Влияние введения β -гептилгликозида МДП в терапевтическом режиме на объем опухолевого узла на 15-е сутки после прививки меланомы B16



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

Рисунок 49. Влияние введения β -гептилгликозида МДП в терапевтическом режиме на объем опухолевого узла на 20-е сутки после прививки меланомы B16

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

2.3. Влияние β -гептилгликозида МДП на динамику поискового и норкового рефлексов у мышей C57BL/6 с привитой меланомой B16

Поисковый и норковый рефлекс отражают функциональную активности ЦНС лабораторных животных. Подавление или усиление этих рефлексов может свидетельствовать, с одной стороны, о прямом или опосредованном нейротропном действии испытуемых соединений на животных с привитой опухолью, а с другой – критерием клинического состояния животных и эффективности экспериментальной профилактики или лечения.

Известно, что мурамилпептиды обладают непосредственной нейрофармакологической активностью. Более того, некоторые иммунные медиаторы, выработку которых стимулируют мурамилпептиды, обладают в той или иной степени нейротропными эффектами.

Введение гептигликозида МДП не оказало влияния на динамику норкового и поискового рефлексов у животных экспериментальных групп по сравнению с животными контрольной группы (табл.16).

Таблица 5

Динамика норкового и поискового рефлексов у животных-опухоленосителей

Группа	1-е сутки		10-е сутки		20-е сутки	
	Норковый рефлекс	Поисковый рефлекс	Норковый рефлекс	Поисковый рефлекс	Норковый рефлекс	Поисковый рефлекс
Интактные животные	19 ± 3	8 ± 4	17 ± 3	8 ± 2	17 ± 3	9 ± 2
Мыши-опухоленосители	18 ± 4	6 ± 2	8 ± 1	3 ± 1	4 ± 2	1 ± 2
β-гептилгликозид МДП – профилактический режим						
1 мкг/животное	17 ± 2	9 ± 1	6 ± 2	4 ± 3	3 ± 1	2 ± 2
5 мкг/животное	18 ± 1	8 ± 2	7 ± 3	3 ± 1	2 ± 2	1 ± 2
25 мкг/животное	18 ± 2	7 ± 1	5 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	1 ± 1
β-гептилгликозид МДП – терапевтический режим						
1 мкг/животное	16 ± 2	7 ± 2	7 ± 1	2 ± 1	4 ± 2	1 ± 1
5 мкг/животное	18 ± 3	8 ± 1	6 ± 2	2 ± 2	5 ± 1	1 ± 1
25 мкг/животное	19 ± 1	6 ± 2	9 ± 1	5 ± 2	6 ± 1	3 ± 3

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основным механизмом иммуотропного действия производных МДП, не содержащих в своем составе остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, является стимуляция цитоплазматических рецепторов NOD2 с дальнейшей активацией RIP2-зависимого сигнального пути [59]. До конца не ясно, какие структурные, стереохимические и физико-химические свойства мурамилпептидов обеспечивают оптимальную комплементарность к этому внутриклеточному рецептору.

Вместе с тем существенное значение для контактов с цитозольными сенсорами имеет непосредственное проникновение соответствующих лигандов внутрь клетки через плазмалемму, а в случае первичного попадания в клетку в результате эндоцитоза – выход из эндосом в цитоплазму. Известно, что присоединение липофильных модифицирующих компонентов к определенным участкам МДП придавало молекуле способность лучше проникать через биологические мембраны, длительное задерживаться в организме и, в конечном итоге, оказывать более выраженные иммуотропные эффекты, в том числе усиление противоопухолевого иммунного ответа [171, 226].

Целесообразность использования гликозидного центра молекулы МДП для введения липофильного «хвоста», или «якоря», принципиально доказана [3, 4]. Известно, что β -гликозилирование приводит к повышению биологической активности молекулы МДП в различных моделях *in vitro* [11, 13, 15]. Однако в большинстве случаев при сравнении биологической активности МДП и его гликозидов использовались мышинные иммунокомпетентные клетки, что оставляло открытым вопрос об обоснованности экстраполяции этих данных на иммунциты человека.

В этой связи, полученные нами результаты представляют большой интерес, так как они уточняют зависимость иммуномодулирующей

активности гликозидов МДП от структуры агликона в отношении нейтрофилов, НК-клеток и ДК человека.

В качестве агликонов исследуемые мурамилпептиды содержали алифатические (линейные) цепи, циклические структуры и трициклический радикал, обладающий максимальной гидрофобностью при сходном числе атомов углерода.

Циклические и трициклический радикалы, присоединенные с помощью О-гликозидной связи к остатку N-ацетилмурамовой кислоты в положении C1, по данным настоящего исследования снижали биологическую активность МДП в отношении мононуклеаров и нейтрофилов периферической крови человека. При этом адамантильный радикал, имеющий наиболее жесткую пространственную структуру, вероятно, в большей степени снижал комплементарность молекулы к внутриклеточным рецепторам.

Стойкость гликозидной связи гликозидов МДП в биологических средах и внутри клеток не изучалась. Нельзя исключить, что липофильные агликоны лишь облегчают проникновение содержащих их мурамилпептидов внутрь клетки-мишени, но вслед за этим гликозидная связь в этих молекулах подвергается разрушению как результат активности внутриклеточных гликозидаз. Возможно участие в гидролизе гликозидной связи и внеклеточных ферментных систем. В результате с NOD2 могут взаимодействовать мурамилпептиды, уже лишенные агликонов. Это по крайней мере отчасти может объяснить то, что по данным ранее опубликованных исследований *in vivo* некоторые β -гликозиды МДП с циклическими и трициклическими структурами обладали более высокой биологической активностью, чем немодифицированный МДП [15]. Вместе с тем наибольшей способностью стимулировать противoinфекционный [16] и противоопухолевый [7] ответ *in vivo* обладал все-таки β -гликозид с алифатическим агликоном.

Снижение числа атомов углерода в алифатическом агликоне от 12 до 7 коррелировало с увеличением биологической активности β -гликозидов МДП. Эти данные согласуются с результатами исследований О.В. Калюжина и

соавторов, продемонстрировавших превосходство β -гептилгликозида МДП над β -гексадецилгликозидом МДП в иммуномодулирующей эффективности разных тест-системах [124]. Предстоит ответить на вопрос, связано ли это с большим сродством гликозида МДП, обладающего коротким алифатическим агликоном, к рецептору NOD2, или является следствием преимуществ амфифильного мурамилпептида над более липофильными гомологами в проникновении через биомембраны.

Выбор тест-систем для сравнения биологической активности гликозидов МДП и немодифицированного МДП не случаен.

Влияние исследуемых веществ на NK-зависимую цитотоксическую активность мононуклеаров периферической крови интересно не только потому, что NK-клетки являются важнейшим звеном врожденного иммунного ответа на вирусную инфекцию и опухолевую трансформацию клеток. Доказано, что, во-первых, NK-клетки экспрессируют рецепторы NOD2 [227], а, во-вторых, некоторые микробные паттерны, в том числе лиганды NOD2, индуцируют эпигенетическое репрограммирование этих клеток, приводящее к генерации и экспансии самоподдерживающейся популяции NK-клеток памяти [197]. Последнее событие имеет ключевое значение в формировании длительного состояния повышенной сопротивляемости различным инфекционным агентам, получившего название «тренированный иммунитет» [163]. В рамках этого феномена обсуждается стойкость иммуотропного действия иммуностимуляторов бактериального происхождения, в том числе мурамилпептидов, а также синтетических препаратов, усиливающих экспрессию рецепторов врожденного иммунитета к микробным паттернам [17].

Нейтрофильные гранулоциты являются доминирующей популяцией лейкоцитов. Фагоцитарная функция нейтрофилов лежит в основе врожденного иммунного ответа не только на патогенные бактерии, но и на грибы, вирусы и простейшие. Разнообразие функций нейтрофилов посвящено много оригинальных исследований и обзоров [27]. Эти клетки являются

привлекательными мишенями фармакологического действия вновь создаваемых иммуностимуляторов/иммуномодуляторов. Добавим, что нейтрофильные гранулоциты также относятся к NOD2-экспрессирующим клеткам [121].

Скрининг семи производных МДП показал наличие значимой иммуотропной активности по отношению к NK-клеткам и нейтрофилам только у одного препарата – β -гептилгликозида МДП – и поставил вопрос о влиянии трансмембранной транспортировки и сродства к рецепторам NOD2 на эффективность производных МДП как иммуномодулирующих средств.

ДК являются одним из наиболее важных звеньев иммунной системы, обеспечивающих взаимосвязь ее врождённой и адаптивной составляющих. ДК осуществляют захват, транспортировку и презентацию антигенов другим иммунокомпетентным клеткам. Непосредственный контакт с ДК приводит к активации незрелых Т-клеток и их дифференцировки в направлении эффекторов/хелперов или регуляторов клеточных и гуморальных звеньев иммунного ответа. Таким образом, ДК играют основополагающую роль в развитии адаптивной иммунной реакции. Стимуляция созревания ДК может способствовать разрешению хронических инфекционных процессов и усилению противоопухолевого клеточного иммунитета.

В этой связи представляло интерес изучить влияние наиболее биологически активного гликозида на экспрессию ДК человека маркеров, ассоциированных с их созреванием. В рамках использованной тест-системы *in vitro* β -гептилгликозид МДП усиливал экспрессию CD14. Это было вполне ожидаемым, так как феномен костимулирующего действия мурамилпептидов и ЛПС, рецептором которого является CD14, на клетки врожденного иммунитета описан достаточно давно. Этот феномен обсуждался главным образом в контексте сочетанного влияния бактериальных паттернов на функцию моноцитов/макрофагов [205], однако относительно недавно был доказан синергизм TLR4/CD14- и NOD2-агонистов в отношении активации ДК [90].

Экспрессия других маркеров активности и зрелости ДК под влиянием β -гептилгликозида МДП и немодифицированного МДП статистически значимо не изменялась. Возможно, это связано с ограничениями условий модельной тест-системы, в которой не хватало следовых количеств ЛПС – фактора, постоянно присутствующего в биологических средах организма и потенцирующего биологические эффекты мурамилпептидов. Вместе с тем требует дальнейшей проверки и анализа выявленные оппозитные тенденции: тренд к увеличению экспрессии HLA-DR под действием β -гептилгликозида МДП и обратная тенденция под влиянием МДП. Это говорит о том, что предпринятая модификация МДП придало молекуле некоторые качественно новые биологические свойства.

Цитокины являются ключевыми медиаторами, обеспечивающими взаимодействие различных звеньев иммунной системы. Эти молекулы могут опосредовать как активирующие, так и регуляторные сигналы. Изучение концентрации цитокинов в крови позволяет судить о функции систем адаптивного и врожденного иммунитета в процессе иммунного ответа и, кроме того, об эффективности проводимой иммунотерапии.

Выбранные мишени для изучения цитокин-индуцирующей активности β -гептилгликозида МДП не случайны.

IL-1 β является важнейшим активатором Т- и В-клеток, а также ключевым медиатором ранних фаз иммунного ответа и воспаления. Данный цитокин стимулирует лимфоциты, усиливает их адгезию к эндотелию и индуцирует синтез белков острой фазы.

IL-2 функционально ассоциирован с Т-клетками, в первую очередь с их Th1-субпопуляцией. Этот цитокин играет ключевую роль в аутостимуляции Т-лимфоцитов, при этом усиливая пролиферацию и дифференцировку Т-клеток. Кроме того, IL-2 активирует цитотоксические лимфоциты и макрофаги.

IL-4 является фактором роста и дифференцировки В-клеток, обеспечивая выработку в первую очередь IgE и IgG₄. Основными клетками,

продуцирующими этот цитокин, являются Th2-клетки, а также лимфоидные клетки врожденного иммунитета 2-го типа (ILC-2).

IL-5, основным продуцентом которого также являются Th2 и ILC-2, усиливает рост и созревание В-клеток, выработку IgA, пролиферацию и дифференцировку костномозговых предшественников эозинофилов.

IL-6 оказывает влияние на дифференцировку В-клеток и индуцирует синтез белков острой фазы. Основными клетками, синтезирующими IL-6, являются активированные макрофаги и Т-клетки.

IL-10 – важнейший регуляторный цитокин, синтезируемый Tr1-субпопуляцией Treg, Breg-клетками, M2-макрофагами и, возможно, одной из субпопуляций ILC. Он подавляет синтез провоспалительных цитокинов Th1-клетками и M1-макрофагами; его действие на гуморальный иммунный ответ неоднозначно.

IFN- γ , синтезируемый главным образом Th1-клетками и ILC-1, в меньшей степени эпителиоцитами и фибробластами, является цитокином широкого спектра действия. IFN- γ индуцирует экспрессию молекул МНС классов I и II, активирует макрофаги и усиливает адгезию лимфоцитов к клеткам эпителия, повышает противовирусное и противоопухолевое действие Th1-клеток.

TNF- α , продуцируемый ДК, макрофагами, лимфоцитами и тучными клетками, воздействует на макрофаги и гранулоциты. Данный цитокин активирует макрофаги, гранулоциты, различные цитотоксические клетки, усиливает адгезию лейкоцитов к эндотелию, усиливает хемотаксис, выработку белков острой фазы, стимулирует ангиогенез и синтез молекул МНС I класса.

GM-CSF, синтезируемый Т-клетками и макрофагами, вызывает активацию пролиферации предшественников гранулоцитов и макрофагов, мобилизует эти клетки из костного мозга, а также участвует в регуляции созревания дендритных клеток.

Срыв своевременной продукции провоспалительных цитокинов часто приводит к развитию хронических инфекционных процессов, в ходе которых

недостаточная активация иммунокомпетентных клеток приводит к персистенции возбудителей заболеваний. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и 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*.

В этом же контексте примечательно повышение концентрации IL-10 через 8 часов после введения препарата, указывающее на активацию и компенсаторного противовоспалительного каскада.

Таким образом, β -гептилгликозид МДП вызывал самоконтролируемый воспалительный процесс. Можно предположить, что применение этого гликозида МДП в качестве иммуностимулятора способно во многих клинических ситуациях предотвратить хронизацию инфекционного процесса и придать ему циклический характер.

Отмеченное повышение концентрации IFN- γ через 1 час в сыворотке животных экспериментальной группы указывало на раннюю активацию механизмов противовирусной защиты. Уровень IFN- γ снизился до значений равных показателям контрольной группы через 8 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-5 отражает потенцирование гуморального иммунного ответа. В то же время отсутствие статистически значимых изменений уровня IL-2 указывает на неполную стимуляцию В-клеточных реакций.

Повышение содержания IL-4 и IL-17 после введения β -гептилгликозида МДП указывает на стимуляцию компонентов антительного ответа, зависимых

от Th2- и ILC-2-клеток, и Th17/ILC-17-ассоциированные мобилизацию и активацию нейтрофильных гранулоцитов.

Несмотря на множество исследований, направленных на изучение противоопухолевого иммунитета, точные механизмы взаимодействия иммуноцитов и опухолевых клеток остаются во многих аспектах нераскрытыми. Опухолевые клетки способны оказывать влияние как на эффекторные популяции иммунных клеток, так и на регуляторные популяции. Это достигается как синтезом цитокинов и хемокинов, так и непосредственным взаимодействием клеток. Опухолевые клетки способны не только подавлять популяции, ответственные за клеточный компонент иммунитета, но и использовать различные подвижные иммуноциты для диссеминации и индукции ангиогенеза в опухоли.

НК-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты являются основными элементами непосредственной борьбы с опухолевыми клетками. Как показали предыдущие исследования, гликозиды МДП вызывают повышение активности НК-клеток и аллоспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов по отношению к клеткам-мишеням [18].

Прививка мышам линии C57/Bl6 меланомы B16 воспроизводит общепризнанную модель для оценки прямого и иммуноопосредованного противоопухолевого действия фармакологических веществ в условиях целого организма. При этом торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни являются интегральными показателями совокупного противоопухолевого действия исследуемых веществ, в том числе стимуляции ими противоопухолевого иммунитета.

Для определения противоопухолевого потенциала β -гептилгликозида МДП его вводили в профилактическом и терапевтическом режимах. Отсутствие статистически значимого ТРО и УПЖ у животных после профилактического введения препарата указывает на то, что транзиторный иммуномодулирующий эффект β -гептилгликозида после однократного применения не способен оказывать значимое влияние на имплантацию

опухоли и дальнейшее течение опухолевого процесса. Вместе с тем многократное введение препарата в терапевтическом режиме вызывало дозозависимый и стойкий эффект торможения роста опухоли, а также увеличение продолжительности жизни мышей-опухоленосителей, получавших β -гептилгликозид МДП в дозе 5 мкг/животное.

В тоже время у животных, получавших максимальную терапевтическую дозу препарата, при значимом ТРО не отмечалось увеличения продолжительности жизни. Это может быть проявлением токсичности высоких доз β -гептилгликозида МДП или индуцированных им эндогенных веществ.

Доказана релевантность оценки норкового и поискового рефлексов у лабораторных животных для суждения о функции ЦНС. Известно, что развитие опухолевого процесса сопровождается подавлением активности ЦНС, в том числе снижением рефлексов. Кроме того, на функцию ЦНС могут оказывать некоторые иммунные медиаторы, такие как провоспалительные цитокины, выработку которых модулируют мурамилпептиды. Отсутствие отличий рефлексов у животных-опухоленосителей, которым вводили β -гептилгликозид МДП или такой же объем физиологического раствора, указывает на отсутствие прямой или опосредованной нейротоксичности у этого препарата.

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 иммуностропного 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 моноклеарных лейкоцитов крови человека; среди гликозидов с циклическими агликонами только β -циклооктилгликозид МДП повышал НК-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 НК-активность моноклеарных 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-1 β , 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-1 β 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 иммуотропного лекарственного средства.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВГС – вирус гепатита С

ДК – дендритные клетки

ДМСО – диметилсульфоксид

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 – интерферон- γ

IL – интерлейкин

ILC – лимфоидные клетки врожденного иммунитета

NLR – NOD-подобные рецепторы

MCH II – главный комплекс гистосовместимости

TCR – T-клеточный рецептор

TLR – Toll-подобные рецепторы

Th – Т-хелперы

TNF α – фактор некроза опухоли α

PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

PRR – образ-распознающие рецепторы

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андропова Т.М. Ликопид (ГМДП) – современные представления. / Т.М. Андропова, Б.В. Пинегин, И.Г. Козлов // 5-е изд. доп. и перераб. М – 2009.
2. Болтовская М.Н. Модель спонтанных абортс у мышей / М.Н. Болтовская, К.А. Артемьева, О.В. Калюжин, И.И. Степанова, Н.А. Старосветская. // Клиническая и экспериментальная морфология – 2014. – №3 (11) – С.59-63.
3. Земляков А.Е. Гликозиды N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина. Влияние конфигурации гликозидного центра и природы агликона на биологическую активность. / А.Е. Земляков, В.В. Цикалов, О.В. Калюжин и др. // Биоорган. Хим. – 2003. – №3 – С. 316–322.
4. Земляков А.Е. Синтез гликозидных аналогов N-ацетил-мурамоил-L-аланил-D-изоглутамина. / А.Е. Земляков, В.Я. Чирва. // Химия природных соединений. – 1987. – N 5. – С. 714–718.
5. Иванов В.Т. Механизм действия и клиническая эффективность иммуномодулятора глюкозаминилмурамил дипептида(ликопида). / В.Т. Иванов, Т.М. Андропова, В.А. Несмеянов и др // Клин. Мед. – 1997. – № 3 – С. 11-15.
6. Калюжина М.И. Способ реабилитации больных хроническим описторхозом после дегельминтизации. / М.И. Калюжина, О.В. Павленко, О.В. Калюжин, И.В. Савченко. // Свидетельство о государственной регистрации ПрЭВМ, рег. 2162336 от 26.01.2000. – М.: Роспатент, 2001.
7. Калюжин О.В Амфифильный дериват мурамилдипептида в терапии мышинной лимфомы EL-4. / О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов, Ф.Н. Кузовлев, М.И. Калюжина, А.Е. Земляков, М.В. Шкалев, Е.Л. Мулик, А.В. Караулов // Вопросы биологической, медицинский и фармацевтической химии – 2001. – №1 – С. 4546.
8. Калюжин О.В. Влияние гидро-липофильного баланса производных мурамилдипептида на их взаимодействие с биомембранами и включение в

клетки. / О.В. Калюжин, Б.Б. Фукс // Бюл. Экспер. Биол. Мед. – 1996. – №. 12 – С. 658-661.

9. Калюжин О.В. Стимуляция неспецифической резистентности мышей β -гептилглизид-мурамилдипептидом. / О.В. Калюжин, В.В. Калюжин, А.Е. Земляков, С.И. Елкина, М.В. Шкалев, В.В.Сергеев. // Бюл. exper. biol. – 1999. – Т. 127. – N 5. – С. 543–545.

10. Калюжин О.В. Производные мурамилдипептида в эксперименте и клинике. // Журн микробиол – 1998. – № 1 – С. 104–108.

11. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность новых производных мурамилдипептида *in vitro*. / О.В. Калюжин, Фукс Б.Б.// Бюл. Экспер. Биол. мед –1994– №5 – С. 510–513.

12. Калюжин О.В. Возможности использования пробиотиков для укрепления противомикробной защиты в свете иммуногомеостатической роли микробиоты. Эффективная фармакотерапия /Аллергология и иммунология – 2013.

13. Калюжин О.В. Иммуномодулирующая активность гликозидных производных N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина // Вестн нов мед технол – 2003 – № 1–2 – С. 28–32.

14. Калюжин О.В. Пробиотики как современные средства укрепления противомикробной защиты: миф или реальность? // Русс мед журн – 2012. – № 28 – С. 1395–1401.

15. Калюжин О.В., Калина Н.Г., Баштаненко А.Ф. и др. Стимуляция резистентности мышей к бактериальной инфекции гликозидами мурамилдипептида / О.В. Калюжин, Н.Г. Калина, А.Ф. Баштаненко // Бюл. exper. biol. – 2003. – Т. 135. - № 5. – С. 531-535

16. Калюжин О.В., Мулик Е.Л., Сергеев В.В., Калина Н.Г., Елкина С.И., Калюжина М.И., Кузовлев Ф.Н., Караулов А.В. Применение β -гептилглизид-мурамилдипептида в экспериментальной терапии генерализованных бактериальных инфекций / О.В Калюжин, Е.Л. Мулик, В.В. Сергеев, Н.Г. Калина, С.И. Елкина, М.И. Калюжина, Ф.Н. Кузовлев, А.В.

Караулов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2000. – № 4. – С. 73-77

17. Калюжин О.В. Феномен тренированного иммунитета и механизмы действия неспецифических иммуномодуляторов // Российский аллергологический журнал – 2015 – № 4 – 45-51

18. Караулов А.В. Биологическая активность гликозидных производных N–ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина. / А.В. Караулов, О.В. Калюжин, А.Е.Земляков. // Росс биотер журн – 2002. – № 1 – С. 14–24.

19. Караулов А.В. Иммуномодуляторы: от прошлого к будущему // А.В. Караулов. // Эффективная фармакопея – 2013. – № 288 – С.4–5.

20. Караулов А.В. Иммуностропные препараты: принципы применения и клиническая эффективность. / А.В. Караулов, О.В. Калюжин. // – МЦФЭР – 2007.

21. Караулов А.В. Иммунотерапия инфекционных болезней: проблемы и перспективы / А.В. Караулов, О.В. Калюжин. // Терапевтический архив. – 2013. – Т. 85. – № 11. – С. 100–108.

22. Караулов А.В. Направленная регуляция иммунных реакций в профилактике и лечении заболеваний человека. / А.В. Караулов, С.И. Сокурено, О.В. Калюжин, И.В. Евсегнеева // Иммунопатология, аллергология, инфектология – 2000. – №1 – С. 7–13.

23. Киселевский М.В. Адоптивная иммунотерапия при злокачественных новообразованиях / Киселевский М.В., Шубина И.Ж., Бгюменберг А.Г., Волков С.М., Демидов Л.В. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2007. – № 11. – С. 9-15.

24. Козлов И.Г., Тимаков М.А. Иммунотерапия: вчера, сегодня, завтра // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2009. – Т. 87. № 4. – С. 140 - 149.

25. Матвеев Д.А. Коррекция иммунных расстройств и профилактика инфекционных осложнений у больных, оперированных по поводу колоректального рака / Д.А. Матвеев, Д.П. Ананьев, К.А. Бунатян, Е.В.

Инвияева, Л.И. Винницкий, С.Д. Митрохин, О.В. Калюжин // Курский научно-практический вестник человек и его здоровье – 2014. – №3 – С. 55–59.

26. Михайлова Л.П. Влияние глимурида на продукцию цитокинов спленоцитами мышей C57BL/6 и BALB/c. / Л.П. Михайлова, О.В. Макарова, О.В. Калюжин и др. // Иммунология –2004. – №3: – С. 152–154.

27. Нестерова И.В. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» на иммунологическом поле / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, Л.В. Ломтатидзе, С.В. Ковалева, А.А. Евглевский // Иммунология. – 2015. – Т. 36. – № 4. – С. 257-265.

28. Нечаева О.Б.Смертность от инфекционных социально значимых заболеваний в России. / О.Б. Нечаева // Медицинский алфавит –2016. –№32 (295) – С. 31–36.

29. Нуриев Р.И. Новые стратегии лечения пациентов с онкологическими заболеваниями: иммунотерапевтический подход. /. Р.И. Нуриев, А.В. Караулов. М.В. Киселевский. // Иммунология. – 2017. – Т. 38. – № 1. – С. 39-48.

30. Пащенко М. В. Результаты I фазы клинических испытаний иммуномодулятора "Полимурамил" / М. В. Пащенко, А. С. Будихина, Н. М. Голубева и др.// Иммунология. –2011. –Т. 32, № 6. –С. 315– 321.

31. Пащенко М.В. Результаты II/III фазы клинических испытаний иммуномодулятора полимурамил при гнойной инфекции. / М.В. Пащенко, А.С. Будихина, Н.М. Голубева // Иммунология –2012. – № 4 –С. 199–203.

32. Пащенко М.В. Влияние муропептидов, содержащих остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, на макрофаги и дендритные клетки человека. / М.В. Пащенко, С.Ф. Попилук, Б.И. Алхазова и др. // Цитокины и воспаление – 2012 – №1 – С. 33– 41

33. Пащенко М.В. Иммунобиологические свойства мурамилпептидных фрагментов пептидогликана грамотрицательных бактерий. / М. В. Пащенко, С.Ф. Попилук, Б.И. Алхазова и др. // Иммунология. – 2010. – Т. 31, № 3. – С. 119–125

34. Пащенко М.В. Особенности индукции провоспалительных генов в дендритных клетках и макрофагах под действием глюкозаминилмурамилтрипептида грамотрицательных бактерий / М.В. Пащенко, Б.И. Алхазова, В.Л. Львов, Б.В. Пинегин. // Иммунология. – 2013. – Т.34, № 1. – С. 315–321.
35. Пинегин Б.В. Препараты мурамилдипептидового ряда – иммуностимулирующие лекарственные средства нового поколения. / Б.В. Пинегин, Т.М. Андропова, М.И. Карсонова. // Int J Immunorehabilitation –1997. – №6 –С. 27–34.
36. Половина В.С. Иммуноадьювантные свойства мурамилдипептида. / В.С. Половина, Е.Ю. Марков. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2012. – № 1 (83) – С. 149–153.
37. Понжева Ж.Б. Динамика морфологических и иммунологических проявлений Кон А-индуцированного гепатита у мышей Balb/c при профилактическом и лечебном введении глимурида. / Ж.Б. Понжева, С.С. Обернихин, И.Г. Данилова, О.В. Калюжин. // Вестн урал мед академ науки – 2010. – №2 (30) – С. 108–109.
38. Понжева Ж.Б. Влияние β -гептилгликозида мурамилдипептида на альтеративные изменения печени и пролиферацию спленоцитов и тимоцитов мышей с гепатитом, индуцированным конканавалином А. / Ж.Б. Понжева, С.С. Обернихин, О.В. Калюжин, А.В. Караулов. // Росс иммунол журн – 2010. – №3 – С. 243–247.
39. Сильвестров В.П. Антибактериальная и иммуномодулирующая терапия заболеваний органов дыхания. / В.П. Сильвестров, А.В. Караулов // Тер арх – 1983. – № 3 С. 3–9.
40. Турьянов М.Х. Комплексная противовирусная терапия гепатита С. / М.Х. Турьянов, О.В. Калюжин, М.В. Нелюбов и др // Учебно-методическая разработка. М.: РМАПО – 2004.

41. Adam A. Muramyl peptides. Chemical structure, biological activity and mechanism of action /A. Adam, JF. Petit, P. Lefrancier, E. Lederer //Mol. Cell. Biochem. – 1981. – № 41 – P. 27–47.
42. Adam ALE. Muramyl peptides as immunomodulators /ALE. Adam // Immunology. – 1988. – № 1 – P. 205–244.
43. Ahmad, T. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease / T. Ahmad, A. Armuzzi, M. Bunce, K. Mulcahy-Hawes, SE. Marshall, TR. Orchard, J. Crawshaw, O. Large, A. de Silva, JT. Cook, M. Barnardo, S. Cullen, KI. Welsh, DP. Jewell //Gastroenterology. – 2002. – № 122(4) – P. 854–66.
44. Andersson, D. I. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. / D.I. Andersson, D. Hughes. // Nat. Rev. Microbiol. – 2014. –№12. –P. 465–478
45. Andre C. Spatio-temporal differences in the profile of murine brain expression of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in response to peripheral lipopolysaccharide administration. / C. Andre C. J.C. O'connor, K.W. Kelley, J. Lestage, R. Dantzer, N. Castanon. // J. Neuroimmunol. – 2008. – №200(1–2) – P. 90–99.
46. Azuma IOH. Adjuvant activity of carbohydrate analogs of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine on the induction of delayed- type hypersensitivity to azobenzeneasonate-N-Acetyl-L-tyrosine in guinea pigs / IOH. Azuma, I. Saiki, M. Kiso, A. Hasegawa, Y. Tanio, Y. Yamamura //Infect Immun. – 1981. – № 33 – P. 834–39.
47. Babič APS. An improved total synthesis of UDP-N-acetyl-muramic acid /APS. Babič // Tetrahedron Lett. –2007. – № 48 – P. 4403–05.
48. Bagarazzi M.L. Immunotherapy against HPV16/18 generates potent TH1 and cytotoxic cellular immune responses / M.L. Bagarazzi, J. Yan, M.P. Morrow et al. / Sci. Transl. Med. – 2012. – №4 (155) – Art 155ra138.
49. Bahr GM, Synergistic effects between recombinant interleukin-2 and the synthetic immunomodulator murabutide: selective enhancement of cytokine

release and potentiation of antitumor activity / GM Bahr, E, Darcissac PR, Pouillart LA. Chedid // J Interferon Cytokine Res. – 1996. – № 16(2). – P. 169–78.

50. Bahr, GM. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide / GM Bahr, E. Darcissac, D. Bevec, P. Dukor, L. Chedid / Int J Immunopharmacol. – 1995. – № 17(2). – P. 117–31.

51. Barnich N. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition / N. Barnich, JE. Aguirre, HC. Reinecker, R. Xavier, DK. Podolsky // J. Cell Biol. – 2005. – № 170(1) P. 21–6.

52. Barton DHRCJ. Synthesis of biologically active carbocyclic analogs of N-acetylmuramyl- γ -L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) / DHRCJ. Barton, P. Dalco, SD. Géro, B. Quiclet-Sire, P. Stütz // J. Org. Chem. – 1989. – № 54 – P. 3764–66.

53. Baschang G. Muramyl peptides and lipopeptides: studies towards immunostimulants / G. Baschang // Tetrahedron. – 1989. – № 45(20) – P. 6331–60.

54. Bevins, CL. Decreased Paneth cell defensin expression in ileal Crohn's disease is independent of inflammation, but linked to the NOD2 1007fs genotype / CL. Bevins, EF. Stange, J. Wehkamp // Gut. – 2009 – № 58(6) – P. 882– 3. discussion 883–4.

55. Bertin J. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF- κ B / J. Bertin, WJ. Nir, CM. Fischer, OV. Tayber, PR. Errada, JR. Grant, JJ. Keilty, ML. Gosselin, KE. Robison, GH. Wong, MA. Glucksmann, PS. DiStefano. //J. Biol. Chem. – 1999. – № 274(19) – P. 12955–8.

56. Beutler B.A. TLRs and innate immunity. / Blood – 2009. – № 113 – P. 1399–1407.

57. Biberstine K.J. Peptidoglycan fragments decrease food intake and body weight gain in rats. / K.J. Biberstine, R.S. Rosenthal. // Infect. Immun. –1994. – № 62(8) – P. 3276–3281

58. Biswas A. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity / A. Biswas, T. Petnicki-Ocwieja, K.S. Kobayashi. // *J. Mol. Med. (Berl)* – 2012. – № 90 (1) – P. 15–24.
59. Boyle JP. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway / JP. Boyle, R. Parkhouse, TP. Monie. // *Open Biology*. – 2014 – № 4 (12) – P. 140-178.
60. Bouma, G. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease / G. Bouma, W. Strober // *Nat Rev Immunol* – 2003. – № 3(7) – P. 521–33.
61. Bush, K. Tackling antibiotic resistance. // *Nat Rev Microbiol* – 2011 – №9. – P. 894–896
62. Cai YLC-C. Facile approach to 2-acetoamido-2-deoxy-b-D-pyranoside via a furanosyl oxazoline / YLC-C. Cai, D. Bundle // *Org. Lett.* – 2005. – № 7 – P. 4021–24.
63. Cai YLC-C. Concise and efficient synthesis of 2-acetoamido-2-deoxy-b-D- hexopyranosides of diverse aminosugars from 2-acetoamido-2-deoxy-b-D-glucose / HBR. Cai, D. Bundle // *J. Org. Chem.* – 2009. – № 74 – P. 580–89.
64. Casadevall A. A new synthesis for antibody-mediated immunity / A. Casadevall, L.A. Pirofski. // *Nat. Immunol.* – 2012. – № 13 (1): – P. 21–28.
65. Cduk RGG. Synthesis of cyclopropanoid analogues of N-acylmuramyl dipeptides as potential immunostimulants / RGG. Cduk // *Tetrahedron* – 2004. – № – P. 60 2201–11.
66. Chedid, LA. Biological activity of a new synthetic muramyl peptide adjuvant devoid of pyrogenicity / LA. Chedid, MA. Parant, FM, Audibert, GJ, Riveau, FJ. Parant, E. Lederer, JP. Choay, PL. Lefrancier // *Infect Immun.* –1982. – № 35(2). – P. 417–24.
67. Chen CM. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways / CM. Chen, Y. Gong, M. Zhang, JJ. Chen // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 279(24) – P. 25876–82.

68. Chuai X. Poly(I:C)/Alum mixed adjuvant priming enhances HBV subunit vaccine-induced immunity in mice when combined with recombinant adenoviral-based HBV vaccine boosting. / X. Chuai, H. Chen, W. Wang et al. // PLoS ONE – 2013. – № 8 (1) – Art e54126.
69. Correa R.G. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. / R.G. Correa, S. Milutinovic, J.C. Reed. // Biosci Rep – 2012. – №32 – P. 597–608.
70. Cong Y. A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. / Y. Cong, T. Feng, K. Fujihashi et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009. – №106 (46) – P. 19256–19261.
71. Couturier-Maillard A. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. / A. Couturier-Maillard, T. Secher, A. Rehman. // J. Clin. Invest. – 2013 – №123 (2) – P. 700–711
72. Daemen, T. In vitro activation of rat liver macrophages to tumoricidal activity by free or liposome-encapsulated muramyl dipeptide / T. Daemen, A. Veninga, FH. Roerdink, GL. Scherphof // Cancer Res. – 1986. – № 46(9) – P. 4330–5.
73. Danklmaier JHH. Synthesis of acyclic analog of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) / JHH.Danklmaier // Liebigs. Ann. Chem. – 1990. – P. 145–50.
74. Darcissac, EC. The synthetic immunomodulator murabutide controls human immunodeficiency virus type 1 replication at multiple levels in macrophages and dendritic cells / EC. Darcissac, MJ. Truong, J. Dewulf, Y. Mouton, A. Capron, GM. Bahr // J. Virol. – 2000. – № 74(17). – P. 7794–802.
75. Darcissac, EC. Selective induction of CD11a, b, c // CD18 and CD54 expression at the cell surface of human leukocytes by muramyl peptides / EC. Darcissac, GM. Bahr, MA. Parant, LA. Chedid, GJ Riveau // Cell. Immunol. – 1996. – № 169(2). – P.294–301.
76. Dreesman, GR. Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides / GR. Dreesman, Y. Sanchez, I.

Ionescu-Matiu, JT. Sparrow, HR. Six, DL. Peterson, FB. Hollinger, JL. Melnick // Nature. – 1982. – № 295(5845). – P. 158–60.

77. Dormitzer P.R. Structural vaccinology starts to deliver. / P.R. Dormitzer, G. Grandi, R. Rappuoli. // Nat. Rev. Microbiol. – 2012 – № 10 – P. 807–813

78. Dukor PTL, Baschang G. Immunostimulants /PTL. Dukor, G. Baschang // Ann. Rep. Med. Chem. – 1979. – № 14 – P. 146–67.

79. Dzierzbicka KKAM. Muramyl peptid-synthesis and biological activity / KKAM. Dzierzbicka. // Polish. J. Chem. – 2003 – № 77 – P. 373–95.

80. Dzierzbicka KKAM. Synthesis of muramyl dipeptide conjugated with acridine derivatives, showing anti-HIV-1 and anticancer activity / KKAM. Dzierzbicka, B. Wysocka-Skrzela, AS. Kolodziejczyk // Pol J Chem. – 1994. – № 68 – P. 37–45.

81. Dzierzbicka KKAM. Synthesis and antitumor activity of conjugates of muramyl dipeptide, normuramyl dipeptide, and desmuramyl peptides with acridine /acridone derivatives / KKAM. Dzierzbicka // J Med Chem. – 2001. – № 44 – P. 3606-15.

82. Ellouz, F. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives / F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, E. Lederer // Biochem Biophys Res Commun. – 1974. – № 59(4). – P. 1317–25.

83. Fairbrother WJ. The PYRIN domain: a member of the death domain-fold superfamily / WJ. Fairbrother, NC. Gordon, EW. Humke, KM. O'Rourke, MA. Starovasnik, JP. Yin, VM. Dixit. // Protein Sci. – 2001. – № 10(9) – P. 1911–8.

84. Ferraro B. Clinical applications of DNA vaccines: current progress / B. Ferraro, M.P. Morrow, N.A. Hutnick N.A. et al. // Clin. Infect. Dis. – 2011. – № 53(3) – P. 296–302.

85. Ferrier R. Unsaturated carbohydrates. Part 21. A carbocyclic ring closure of a hex-5- enopyranoside derivative /R. Ferrier. // J. Chem. Soc, Perkin Trans. – 1979. – № 1 – P. 1455–58.

86. Farzi A. Synergistic effects of NOD1 or NOD2 and TLR4 activation on mouse sickness behavior in relation to immune and brain activity markers / A. Farzi, F. Reichmann, A. Meinitzer, R. Mayerhofer et al. // *Brain. Behav. Immun.* – 2015. – № 44 – P. 106–120.
87. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis / C. Fiocchi // *Gastroenterology.* – 1998. – № 115(1) – P. 182–205.
88. Flowers HMJRW. The synthesis of 2-acetamido-3-O-(D-1-carboxymethyl)-2-deoxy- α -D-glucose (N-acetylmuramic acid) and of benzyl glycoside derivatives of 2-amino-2-O-(D-)-1-carboxymethyl)-2-deoxy-D-glucose (muramic acid) / HMJRW. Flowers // *J. Org. Chem.* – 1963/ – № 28 – P. 2983–86.
89. Freund, J. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil / J. Freund, J. Casals, EP Hismar // *Proc Soc Exp Bioi Med.* – 1937. – P. 37–509.
90. Fritz JH. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. / JH. Fritz, SE. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, JM. Cavaillon, DJ Philpott, M. Adib-Conquy // *Eur J Immunol.* – 2005 – Aug – № 35(8) – P. 2459–70.
91. Fukuda TKS. Synthesis of immunologically active muramyl dipeptide derivatives containing a quinonyl moiety via aminoacyl intermediates / TKS. Fukuda, H. Yukimasa, I. Imada, M. Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura // *Chem Pharm Bull.* – 1981. – № 29 – P. 2215–21.
92. Fukuyama Y. Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity / Y. Fujukuyama, D. Tokuhara, K. Kataoka et al. // *Expert Rev. Vaccines* – 2012 – № 11 (3) – P. 367–379.
93. Gee M.L. Imaging the action of antimicrobial peptides on living bacterial cells / M.L. Gee, M. Burton, A. Grevis-James. // *Sci. Rep.* – 2013. – № 3 – Art 1557.
94. Gero SSB. Dipeptide und deren Herstellung German / SSB. Gero, P. Dalko, M. Philippe // *Pat Appl, DE.* – 1986.

95. Gigg RCPM. A synthesis of muramic acid / RCPM. Gigg, CD. Warren // J. Chem. Soc. – 1965. – № 46 – P. 2975–77.
96. Girardin, SE. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan / SE. Girardin, IG. Boneca, LA. Carneiro, A. Antignac, Jehanno, M. Viala, J. Tedin, K. Taha, MK. Labigne, A. Zathringer, U. Coyle, AJ. DiStefano, PS. Bertin, J. Sansonetti, PJ. Philpott // Science. – 2003. – № 300(5625). – P. 1584–7.
97. Girardin SE. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2 / SE. Girardin, LH. Travassos, M Herve, D. Blanot, IG. Boneca, DJ. Philpott, PJ. Sansonetti, D. Mengin- Lecureulx // J Biol Chem. – 2003
98. Goasduff, T. The transcriptional response of human macrophages to murabutide reflects a spectrum of biological effects for the synthetic immunomodulator / T. Goasduff, EC. Darcissac, V. Vidal, A. Capron, GM. Bahr / Clin Exp Immunol. – 2002. – № 128(3). – P. 474–82.
99. Gobec, SUU. Synthesis of new phosphonoamidate and phosphinamide desmuramyldipeptide analogs / SUU. Gobec // Lett Pept Sci. – 1998. – № 5 – P. 109–14.
100. Gobec S. Synthesis and biochemical evaluation of some novel N- acyl phosphono- and phosphinoalanine derivatives as potential inhibitors of the D-glutamic acid- adding enzyme / S. Gobec, U. Urleb, G. Auger, D. Blanot // Pharmazie. – 2001. – № 56(4) – P. 295–7.
101. Gobec S. Synthesis of new lipophilic phosphonate and phosphonamidate analogues of N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine related to LK423 Molecules / S. Gobec, U. Urleb //– 2002. – №7 – P. 394–404.
102. Goto S. Combined immunocell therapy using activated lymphocytes and monocyte-derived dendritic cells for malignant melanoma / T. Kaneko, Y. Miyamoto, M. Eriguchi, A. Kato A Et al. Anticancer Res – 2005– № 25 – P. 3741–5.
103. Gregory A.E. Vaccine delivery using nanoparticles. / A.E. Gregory, R. Titball, D. Williamson. // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2013 – № 3 – Art 13.

104. Gross PHRM. Stereochemically pure derivatives of muramic and isomuramic Acids / PHRM. Gross // *Liebigs. Ann. Chem.* – 1986 – P. 37–45.
105. Gutierrez O. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation / O. Gutierrez, C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper F, G. Nunez, JL. Fernandez-Luna // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277(44) – P. 41701–5.
106. Han K.P. IL-15 receptor alpha superagonist complex: high-level coexpression in recombinant mammalian cells, purification and characterization / X. Zhu, B. Liu, E. Jeng, L. Kong, J.L. Yovandich J.L. et al // *Cytokine.* – 2011– №56(3) – P. 804–10.
107. Hasegawa ASE. Synthesis and immunoadjuvant activity of N-[2-O- (2-acetamido-2,3,di-deoxy-6-thio-D-glucopyranose-3-yl)-D-lactoyl]-L-alanyl-D-isoglutamine derivatives. / ASE. Hasegawa, Y. Hioki, M. Kiso, I. Azuma // *Carbohydr Res* – 1984. – № 129 – P. 271–77.
108. Hasegawa ASE. Studies on immunoadjuvant active compounds. Part XXX. Synthesis and immunoadjuvant activity of N-[2-O-(1,5-anhydro-2,3-dideoxy-2- octadecanoylamino-D-lactoyl)-L-alanyl-D-isoglutamine and its derivatives / ASE. Hasegawa, K. Kigawa, M. Kiso, I. Azuma // *Agric. Biol. Chem.* – 1986 – № 50– P. 2133–35.
109. Hasegawa AHY. Synthesis and biological activities of N-acetyl-1-thiomuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine and some of its lipophilic derivatives / AHY. Hasegawa, M. Kiso, H. Okumura, I. Azuma // *Carbohydr Res.* – 1983. – № 123 – P. 183–99.
110. Hasegawa AOH. Studies on immunoadjuvant active compounds. Part XIV. The chemical modification of the C-2 substituent in the sugar moiety of N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine, and the immunoadjuvant activities / AOH. Hasegawa, K. Nishibori, Y. Kaneda, M. Kiso, I. Azuma // *Carbohydr Res.* – 1981. – № 97(2) – P. 337–45.
111. Hasegawa AKY. Studies on immunoadjuvant active compounds. Part II. A facile synthesis of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and its

carbohydrate analogs, and their immunoadjuvant activities / AKY. Hasegawa, M. Amano, M. Kiso, I. Azuma // *Agric Biol Chem.* – 1978. – № 42 – P. 2187–89.

112. Hemmi KTH. Total synthesis of FK-156 isolated from a *Streptomyces* as an immnostimulating peptide: application of a novel copper chelate amino protection / KTH. Hemmi, S. Okada, O. Nakaguchi, Y. Kitamura, M. Hashimoto // *J. Am. Chem Soc.* – 1981. – № 103– P. 7026–28.

113. Heinzelmann, M. Endotoxin and muramyl dipeptide modulate surface receptor expression on human mononuclear cells / M. Heinzelmann, HC. Polk, A. Chernobelsky J, TP. Stites, LE. Gordon. // *Immunopharmacology.* – 2000. – № 48(2). – P. 117–28.

114. Hirota S.A. The NLRP3 inflammasome plays key role in the regulation of intestinal homeostasis / S.A. Hirota, J. Ng, A. Lueng. // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2011 – № 17 (6) – P. 1359–1372.

115. Hugot JP. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease / JP. Hugot, M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, JP. Cezard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, CA. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, JF. Colombel, M. Sahbatou, G. Thomas // *Nature.* – 2001. – № 411(6837) – P. 599–603.

116. Inohara N. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa B / N. Inohara, T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, G. Nunez // *J. Biol. Chem.* – 1999. – № 274(21) – P. 14560–7.

117. Inohara N. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2 Implications for Crohn's disease / N. Inohara, Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, SJ. Foster, AP. Moran, JL. Fernandez-Luna, G. Nunez // *J Biol Chem.* – 2003. – № 278(8). – P. 5509–12.

118. Inohara N. The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens / N. Inohara, G. Nunez // *Oncogene*. – 2001. – № 20(44) – P. 6473–81.
119. Inohara N. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis / N. Inohara, G. Nunez // *Nat. Rev. Immunol.* – 2003. – № 3(5) – P. 371–82.
120. Izumi SNK. Antitumor effects of novel immunoactive peptides, FK-156 and its synthetic derivatives / SNK. Izumi, T. Gotoh, S. Hashimoto, T. Kino, M. Okuhara // *J. Antibiotics*. – 1983. – № 36 – P. 566–74.
121. Jeong Y-J. Nod2 and Rip2 contribute to innate immune responses in mouse neutrophils / Y.-J. Jeong, M.-J. Kang, S.-J. Lee et al. // *Immunology*. – 2014 – № 143(2) – P. 269-276.
122. Jiang J., Cytokine-induced killer cells promote antitumor immunity / C. Wu, B. Lu // *J. Transl. Med.* – 2013 – № 11 – P. 83.
123. Jorgensen, PF. Peptidoglycan and lipoteichoic acid modify monocyte phenotype in human whole blood / PF. Jorgensen, JE. Wang, M. Almlof, C. Thiemermann, SJ. Foster, R. Solberg, AO. Aasen // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 2001. – № 8(3). – P. 515–21.
124. Kalyuzhin O.V. Distinctive immunomodulating properties and interactivity with model membranes and cells of two homologous muramyl dipeptide derivatives / O.V. Kalyuzhin, A.E. Zemlyakov, B.B. Fuchs // *Int. J. Immunopharmacol.* – 1996. – Vol. 18. – №. 11. – P. 651-659.
125. Kamisango KSI. Chemical synthesis and adjuvant activity of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) analogs / KSI Kamisango, Y. Tanio, S. Kobayashi, T. Fukuda, I. Sekikawa, I. Azuma, Y. Yamamura // *Chem Pharm Bull.* – 1981. – № 29 – P. 1644–54.
126. Kamphuis T. Immunogenicity and protective capacity of a virosomal respiratory syncytial virus vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A in mice / T. Kamphuis, T. Meijerhof, T. Stegmann et al. // *I. PLoS. One.* – 2012. – № 7 (5) – Art e36812.

127. Kang S.J. Antimicrobial peptides: their physicochemical properties and therapeutic application / S.J. Kang, D.H. Kim., T. Mishig-Ochir, B.J. Lee. // Arch Pharm Res – 2012. – №35 (3) – P. 409–413.
128. Kelsall, B. Getting to the guts of NOD2 / B. Kelsall. // Nat. Med. – 2005. – № 11(4) – P. 383–4.
129. Killion, JJ. Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators / JJ. Killion, IJ. Fidler // Pharmacol Ther. – 1998. – № 78(3). – P. 141–54.
130. Kikelj D. N-[trans-2-[[2'-(acetylamino)cyclohexyl]oxy]acetyl]-L-alanyl-D-glutamic acid: a novel immunologically active carbocyclic muramyl dipeptide analogue / D. Kikelj, S. Pecar, V. Kotnik, A. Stalc, B. Wraber-Herzog, S. Simcic, A. Ihan, L. Klamfer, L. Povsic, R. Grahek, E. Suhadolc, M. Hocevar, H. Honig, R. Rogi-Kohlenprath // J. Med. Chem. – 1998. – № 41(4) – P. 530-9.
131. Kobayashi K. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling / K. Kobayashi, LD. Hernandez, JE. Galan, CA. Janeway Jr, R. Medzhitov, RA. Flavell // Cell. – 2002. – №110(2) – P. 191–202.
132. Kobayashi, KS. Nod2- dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract / KS. Kobayashi, M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, RA. Flavell // Science. – 2005. – № 307(5710). – P. 731–4.
133. Kobayashi K. RICK /Rip2 /CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems / K. Kobayashi, N. Inohara, LD. Hernandez, JE. Galan, G. Nunez, CA. Janeway, R. Medzhitov, RA. Flavell // Nature. – 2002. – № 416(6877) – P. 194–9.
134. Kobayashi SFT. Synthesis of muramyl dipeptide analogs with enhanced adjuvant activity / SFT. Kobayashi, H. Yukimasa, M. Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura // Bull Chem Soc Jpn. – 1980. – №53 – P. 2570–77.
135. Kobayashi SFT. Synthesis, and the adjuvant and tumor-suppressive activities of quinonyl muramyl dipeptides /SFT. Kobayashi, F. Yukimasa, M.

Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura // Bull Chem Soc Jpn. – 1984. – №57 – P. 3182–96.

136. Kochenderfer J.N. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. W.H. Wilson, J.E. Janik, M.E. Dudley, M. Stetler-Stevenson, S.A. Feldman et al. // Blood. –2010 –№ 116(20) – P. 4099–102.

137. Kotani S. Immunoadjuvant activities of synthetic N-acetyl-muramyl-peptides or -amino acids / S. Kotani, Y. Watanabe, F. Kinoshita, T. Shimono, I. Morisaki // Biken J. – 1975. – № 18(2). – P. 105–11.

138. Kufer TA. Role for erbin in bacterial activation of Nod2 / TA. Kufer, E. Kremmer, DJ. Banks, DJ. Philpott // Infect. Immun. – 2006 – № 74(6) – P. 3115–24

139. Kubasch NSRR. Synthesis of muramyl peptides containing meso-diaminopimelic acid Eur / NSRR. Kubasch //J. Org. Chem. – 2002. – P. 2710–26.

140. Kusumoto SIM. Synthesis of long chain fatty acid esters of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in relation to antitumor activity / SIM. Kusumoto, T Shiba // Tetrahedron Lett. – 1978. – № 49 – P. 4899–902.

141. Lala S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells / S. Lala, Y. Ogura, C. Osborne, SY. Hor, A. Bromfield, S. Davies, O. Ogunbiyi, G. Nunez, S. Keshav // Gastroenterology. – 2003. – № 125(1) – P. 47–57.

142. Langhans W. Differential feeding responses to bacterial lipopolysaccharide and muramyl dipeptide Am / W. Langhans, G. Balkowski, D. Savoldelli //J Physiol. –1991. – № 261(3 Pt 2). – P. 659–64.

143. Lecine, P. The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane / P. Lecine, S. Esmiol, JY. Metais, C. Nicoletti, C. Nourry, C. McDonald, G. Nunez, JP. Hugot, JP. Borg, V. Ollendorff // J. Biol. Chem. – 2007. – № 282(20) – P.15197–207.

144. Lee K-H. A novel aminosaccharide compound blocks immune responses by Toll-like receptors and nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat

proteins / K-H. Lee, Y-J. Liu, A. Biswas, C. Ogawa, KS. Kobayashi // J Biol Chem. – 2011. – № 286(7) – P. 5727–35.

145. Lefrancier P. Muramyl-peptides Pure /P. Lefrancier, E. Lederer //Appl. Chem. – 1987. – № 59(3) – P. 449–54.

146. Li, X. Chemical conjugation of muramyl dipeptide and paclitaxel to explore the combination of immunotherapy and chemotherapy for cancer / X. Li, J. Yu, S. Xu, N. Wang, H. Yang, Z. Yan, G. Cheng, G. Liu. // Glycoconj J. – 2008. – № 25(5). – P. 415–25.

147. Li J. Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2 /CARD15 mutations / J. Li, T. Moran, E. Swanson, C. Julian, J. Harris, DK. Bonen, M. Hedl, DL. Nicolae, C. Abraham, JH. Cho // Hum. Mol. Genet. – 2004. – №13 (16) – P. 1715–25.

148. Liu GZS-D. Solid-phase synthesis of muramyl dipeptide (MDP) derivatives using a multipin method / GZS-D. Liu, S-Q. Xia, Z-K. Ding // Bioorg Med Chem. – 2000. – №10 – P. 1361–63.

149. Lozano R. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. // Lancet. – 2012. –№380(9859) –P. 2095–128

150. Lynch T.J. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. / I. Bondarenko, A. Luft, P. Serwatowski, F. Barlesi, R. Chacko et al. // J. Clin. Oncol – 2012 – № 30(17) – P. 2046–54.

151. MacDonald, TT. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease Scand / TT. MacDonald, G. Monteleone, SL. Pender // J. Immunol. – 2000. – № 51(1) – P. 2–9.

152. Macdonald TT. Immunity, inflammation, and allergy in the gut / TT. Macdonald, G. Monteleone // Science. – 2005. – № 307(5717) – P. 1920–5.

153. Mahvi D.A. Ctla-4 blockade plus adoptive T-cell transfer promotes optimal melanoma immunity in mice. //J.V. Meyers, A.J. Tatar, A. Contreras, M. Suresh, G.E. Levenson et al. // J. Immunother. – 2015 – № 38(2) – P. 54–61.
154. Maio M. Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial / J.J. Grob, S. Aamdal, I. Bondarenko, C. Robert C, L. Thomas L. et al. / J. Clin. Oncol. – 2015 – №33(10) – P. 1191–6.
155. Mangoni M.L. Host-defense peptides: from biology to therapeutic strategies. // Cell. Mol. Life. Sci. – 2011 – №68 (13) – P. 2157–9.
156. Martinon F. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation / F. Martinon, K. Hofmann, J. Tschopp // Curr. Biol. – 2001. – № 11(4) – P. 118–20.
157. Merse, C. Total synthesis and adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives / C. Merse, P. Sinay, A. Adam // Biochem Biophys Res Commun. – 1975. – № 66(4). – P. 1316–22.
158. Merten HBR. A facile two-steps synthesis of N-acetylmuramic acid by selective functionalization of HO-3 of 2-acetoamido-2-deoxyglucose / HBR. Merten // Carbohydr. Res. – 1989. – № 191 – P. 144–49.
159. Moriguchi MUK. Therapeutic Effects of LK 423, a Phthalimido-desmuramyldipeptide compound, on dextran sulfate sodium induced colitis in rodents through restoring their interleukin-10 producing capacity / MUK. Moriguchi, N. Norisada, C. Ochi, A. Stalc, U. Urleb, S. Murooka // Arzneim Forsch. – 1999 – № 49 – P. 184–92.
160. Morisaki, I. Effective immunity to dental caries: enhancement of salivary anti-Streptococcus mutans antibody responses with oral adjuvants / I. Morisaki, SM. Michalek, CC. Harmon, M. Torii, S. Hamada, JR. McGhee// Infect Immun. – 1983. – № 40(2). – P. 577–91.
161. Nagai YAK. Structural specificity of synthetic peptide adjuvant for induction of experimental allergic encephalomyelitis / YAK. Nagai, S. Kotani, Y.

Watanabe, T. Shimonono, T. Shiba, S. Kusumoto // *Cell. Immunol.* –1989. – № 35 – P. 168–72.

162. Netea, MG. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release / MG. Netea, G. Ferwerda, DJ. de Jong, T. Jansen, L. Jacobs, M. Kramer, TH. Naber, JP. Drenth, SE. Girardin, BJ. Kullberg, GJ. Adema, JW. Van der Meer // *J Immunol.* – 2005. – № 174(10). – P. 6518–23.

163. Netea MG. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease / MG. Netea, LAB. Joosten, E. Latz E, et al. // *Science (New York, NY).* – № 2016 – P.352(6284).

164. Newick K. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for solid tumors// *Mol. Ther. Oncolytics* –2016. – №3: P. 160

165. Ochi CNN. Interleukin-10 inducing activity of LK 423, a Phthalimido-desmuramyldipeptide compound / CNN. Ochi, N. Norisada, M. Moriguchi, A. Stalc, U. Urleb, S. Murooka // *Arzneim Forsch.* – 1999. – № 49 – P. 72–79.

166. Ogura Y. Nod2, a Nod1 /Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappa B / Y. Ogura, N. Inohara, A. Benito, FF. Chen, S. Yamaoka, G. Nunez // *J. Biol. Chem.* – 2001. – № 276(7) – P. 4812–8.

167. Ogura Y. Genetic variation and activity of mouse Nod2, a susceptibility gene for Crohn's disease / Y. Ogura, L. Saab, FF. Chen, A. Benito, N. Inohara, G. Nunez // *Genomics.* –2003. – № 81(4) – P. 369–77.

168. O'Reilly, T. Enhancement of the effectiveness of antimicrobial therapy by muramyl peptide immunomodulators / T. O'Reilly, O. Zak // *Clin Infect Dis.* – 1992. –№ 14 (5). – P. 1100–9.

169. Pan Q. MDP-induced interleukin-1 beta processing requires Nod2 and CIAS1 /NALP3 /Q. Pan, J. Mathison, C. Fearn, VV. Kravchenko, J. Da Silva Correia, HM. Hoffman, KS. Kobayashi, J. Bertin, EP. Grant, AJ. Coyle, FS. Sutterwala, Y. Ogura, RA. Flavell, RJ. Ulevitch // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – № 82(1) – P. 177–83.

170. Parant MDC. In vivo and in vitro stimulation of nonspecific immunity by the b-D-p-aminophenyl glycoside of N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine and an oligomer prepared by cross-linking with glutaraldehyde / MDC. Parant, F. Audibert, F. Parant, L. Chedid, E. Sache, P. Lefrancier, J. Choay, E. Lederer // J. Infect. Dis. – 1978 – №138. – P. 378–86.
171. Parant MA. Immunostimulant activities of a lipophilic muramyl dipeptide derivative and of desmuramyl peptidolipid analogs. MA. Parant, FM Audibert, LA Chedid et al // Infection and Immunity. – 1980 – № 27(3) – P.826-831
172. Parant M. Stimulation of non-specific resistance to infections by synthetic immunoregulatory agents / M, Parant, L. Chedid // Infection. –1984 – № 12(3) – P. 230–4.
173. Parant, MA. Selective modulation of lipopolysaccharide-induced death and cytokine production by various muramyl peptides / MA Parant, P. Pouillart, C. Le Contel, FJ Parant, LA Chedid, GM Bahr // Infect. Immun. – 1995. – № 63(1). – P. 110–5.
174. Pauleau AL. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists / AL. Pauleau, PJ. Murray // Mol. Cell. Biol. – 2003. – № 23(21) – P. 7531–9.
175. Petnicki-Ocwieja T. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine / T. Petnicki-Ocwieja, T. Hrn timer, YJ. Liu, A. Biswas, T. Hudcovic, H. Tlaskalova-Hogenova, KS. Kobayashi // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2009. – № 106(37) – P. 15813–8.
176. Pillet A.H. A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells / F. Bugault, J. Thuze, L.A. Chakrabarti, T. Rose. // J. Immunol. – 2009 – № 182(10) – P. 62–77.
177. Porter D.L. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia / B.L. Levine, M. Kalos, A. Bagg, C.H. June// N.Engl. J. Med. 2011. – №365(8) P –725–33.
178. Pouillart, PR. Enhancement by muramyl peptides of the protective response of interferon-alpha/beta against encephalomyocarditis virus infection / PR

Pouillart, FM Audibert, LA. Chedid, PL Lefrancier, GM Bahr // *Int J Immunopharmacol.* – 1996. – № 18(3). – P. 183–92.

179. Pule M.A. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma / B. Savoldo, G.D. Myers, C. Rossig, H.V. Russell, G. Dotti et al. // *Natuew Med.* – 2008 – №14(11) – P. 1264–70.

180. Qin J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / R. Li, J. Raes et al. // *Nature* – 2010 – № 464 (7285) – P. 59–65.

181. Reck M. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. / I. Bondarenko, A. Luft, P. Serwatowski, F. Barlesi, R. Chacko R. et al. // *Ann. Oncol.* –2013 –№24(1) – P. 75–83.

182. Reichert J.M. Marketed therapeutic antibodies compendium. // *MAbs.*– 2012. – № 4 – P. 413–415

183. Robert C. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. / L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe.et al. // *N. Engl. J. Med* –2011–№ 364(26) – P. 2517–26.

184. Robinson J.A. Max Bergmann lecture Protein epitope mimetics in the age of structural vaccinology // *J. Pept. Sci.* – 2013 – № 19 – P. 127–140.

185. Rosenberg S.A. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy / J.C. Yang, R.M. Sherry, U.S. Kammula, M.S. Hughes, G.Q. Phan et al. // *Clin. Cancer Res.* – 2011 –№ 17(13) –P. 4550–7.

186. Rueckert C. Vaccines: from empirical development to rational design / C. Rueckert, C.A. Guzmá'n. // *PLoS Pathog.* – 2012. – № 8 (11) – Art e1003001.

187. Sangiolo D. Cytokine induced killer cells as promising immunotherapy for solid tumors. // *J Cancer.* –2011. – № 2– P. 363–8.

188. Saiki, I. Synergistic activation by recombinant mouse interferon-gamma and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in mouse macrophages / I. Saiki, I.J. Fidler // *J Immunol.* – 1985. – № 135(1). – P. 684–8.
189. Scorciapino M.A. Antimicrobial peptidomimetics: reinterpreting nature to deliver innovative therapeutics / M.A. Scorciapino, A.C. Rinaldi. // *Front Immunol.* –2012. –№ 3 – Art 171.
190. Shafique M. Induction of mucosal and systemic immunity against respiratory syncytial virus by inactivated virus supplemented with TLR9 and NOD2 ligands / M. Shafique, J. Wilschut, A. de Haan. // *Vaccine* – 2012. – №30: – P. 597–606.
191. Shafique M. Evaluation of an intranasal virosomal vaccine against respiratory syncytial virus in mice: effect of TLR2 and NOD2 ligands on induction of systemic and mucosal immune responses. / M. Shafique, T. Meijerhof, J. Wilschut, A. de Haan. // *PLoS One* – 2013. – №8 (4) – Art e61287.
192. Shiba TOS. Synthesis of 6-O-mycoloyl- N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine with antitumor activity /TOS. Shiba, S. Kusumoto // *Bull Chem Soc Jpn* – 1978. – № 51 – P. 3307–11.
193. Shinkai K. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation / K. Shinkai, T.H. McCalmont, K.S. Leslie. // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2008. – №33 –P.19.
194. Simcic SWB. Modulation of tumor necrosis factor production with desmuramyldipeptide analogs / SWB. Simcic, M. Sollner, U. Urleb, S. Gobec // *Pflug Arch Eur J Phy.* – 2000. – № 440 – P. 64–66.
195. Smith P.M. The gut microbiota and mucosal T cells/ P.M. Smith W.S. Garrett. // *Front Microbiol* –2011. – № 2 – Art. 111. doi: 10.3389/fmicb.2011.00111
196. Stegmann T. Lipopeptide-adjuvanted respiratory syncytial virus virosomes: A safe and immunogenic non-replicating vaccine formulation. / T. Stegmann, T. Kamphuis, T. Meijerhof et al. // *Vaccine.* – 2010. – № 28 – P. 5543–5550.

197. Sun JC. NK cells and immune “memory.” / J.C. Sun, S. Lopez-Verges, CC. Kim, JL. DeRisi, LL. Lanier LL // *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. – 2011 – № 186(4) – P. 1891-1897.
198. Steinhagen F. TLR-based immune adjuvants / F. Steinhagen, T. Kinjo, C. Bode, D.M.Klinman. // *Vaccine* –2010. – № 29 – P. 3341–3355
199. Gobec SUU. Synthesis of Phosphonophthalimido-desmuramyl dipeptide analogs Phosphorous, Sulfur and Silicon / SUU. Gobec // *Relat Elem.* – 2000. – №156 – P. 125–33.
200. Siriwardena AJMR. Synthesis and proinflammatory effect of peptidoglycan-derived neoglycopeptide polymers / AJMR.Siriwardena, MA. Wolfert, ML. Vandenplas, JN. Moore, G-J. Boons // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – № 123 – P. 8145–46.
201. Souvannavong, V. Muramyl dipeptide (MDP) synergizes with interleukin 2 and interleukin 4 to stimulate, respectively, the differentiation and proliferation of B cells / V. Souvannavong, S. Brown, A. Adam // *Cell Immunol.* – 1990. – № 126(1). – P. 106–16.
202. Srividya, S. Selective activation of antitumor activity of macrophages by the delivery of muramyl dipeptide using a novel polynucleotide-based carrier recognized by scavenger receptors / S. Srividya, RP. Roy, SK. Basu, A. Mukhopadhyay // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – № 268(3). – P. 772–7.
203. Szilagyi LPP. Structural aspects of peptides with immunomodulating activity / LPP. Szilagyi // *Mini Rev. Med. Chem.* –2007. – № 7 – P. 861–70.
204. Takada, H. Structural characteristics of peptidoglycan fragments required to prime mice for induction of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides / H. Takada, Y. Kawabata, S. Kawata, S. Kusumoto// *Infect Immun.* – 1996. – № 64(2). – P. 657–9.
205. Takada, H. Enhancement of endotoxin activity by muramyl dipeptide / H. Takada, S. Yokoyama, S. Yang // *J Endotoxin Res.* – 2002. – № 8(5). – P. 337–342.

206. Taverniti V. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept) / V. Taverniti, S. Guglielmetti // *Genes. Nutr.* – 2011– № 6 (3): – P.261–274
207. Treating infectious diseases in a microbial world: Report of two workshops on novel antimicrobial therapeutics // Washington National Academies Press –2006.
208. Torre L.A. Global cancer statistics. / L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, Ferlay J. Lortet-Tieulent, A. Jemal // 2012. *CA Cancer J Clin.* – 2015.–№65(2) – P. 87–108
209. Tsuchida, K. Detection of peptidoglycan and endotoxin in dialysate, using silkworm larvae plasma and limulus amebocyte lysate methods / K. Tsuchida, Y. Takemoto, S. Yamagami, H. Edney, M. Niwa, M. Tsuchiya, T. Kishimoto, S. Shaldon // *Nephron.* – 1997. – № 75(4). – P. 438–43.
210. Traub, S. MDP and other muropeptides-direct and synergistic effects on the immune system / S. Traub, S. von Aulock, T. Hartung, C. Hermann // *J Endotoxin Res.* – 2006. – № 12(2). – P. 69–85.
211. Traub, S. Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction / S. Traub, N. Kubasch, S. Morath, M. Kresse, T. Hartung, R.R. Schmidt, C. Hermann // *J Biol Chem.* – 2004. – № 279(10). – P. 8694–700.
212. Urleb UGS. Synthesis and activity of phosphono desmuramyl dipeptide analogs / UGS. Urleb, D. Prelog. // *Lett Pept Sci.* – 1995. – № 2 – P. 193–97.
213. Urleb UGS. Synthesis of new adamantane substituted acyclic MDP analogs related to LK415 / UGS. Urleb // *Acta Pharm.* – 2000. – № 50 – P. 173–84.
214. Vermeulen, MW. Differential mRNA responses in human macrophages activated by interferon-gamma and muramyl dipeptide / MW. Vermeulen // *J. Immunol.* – 1987. – № 139(1). – P. 7–9.
215. Vogel, FR. Improving vaccine perform D1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid / FR. Vogel, M.

Chamaillard, M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, MA. Valvano, SJ. Foster, TW. Mak, G. Nunez, N. Inohara, et al. // *Nat Immunol.* – 2003. – № 4(7). / *Clin Infect Dis.* – 2000. – № 30(Suppl 3) – P. 266–70.

216. Vollmer, W. Peptidoglycan structure and architecture / W. Vollmer, D. Blanot, MA. de Pedro // *FEMS Microbiol Rev.* – 2008. – № 32(2). – P. 149–67.

217. Wang Z-FXJ-C. Synthesis of fluoro-containing muramyl dipeptide analogs / Z-FXJ-C. Wang // *Tetrahedron.* – 1998. – № 54 – P. 12597–608.

218. Watanabe, T. NOD2 negative regulator of Toll-like receptor 2 is a-mediated T helper type 1 responses / T. Watanabe, A. Kitani, PJ. Murray, W. Strober // *Nat. Immunol.* – 2004. – № 5(8) – P. 800–8.

219. Watanabe, T. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis / T. Watanabe, A. Kitani, PJ. Murray, Y. Wakatsuki, IJ. Fuss, W. Strober // *Immunity.* – 2006. – № 25(3) – P. 473–85.

220. Wang, JE. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood / JE. Wang, PF. Jorgensen, EA. Ellingsen, M. Almiof, C. Thiemermann, SJ. Foster, AO. Aasen, R. Solberg // *Shock.* – 2001. – № 16(3). – P. 178–82.

221. Warren, HS. Current status of immunological adjuvants // HS Warren, FR Vogel, LA Chedid // *Annu Rev Immunol.* – 1986. – № 4. – P. 369–88.

222. Weng D.S., Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas / J. Zhou, Q.M. Zhou, M. Zhao, Q.J. Wang, L.X. Huang et al. // *J. Immunother.* – 2008 – № 31(1) – P. 63–71.

223. Wehkamp, J. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease / J. Wehkamp, NH. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, RE. Petras, B. Shen, E. Schaeffeler, M. Schwab, R. Linzmeier, RW. Feathers, H. Chu, H. Lima Jr, K. Fellermann, T. Ganz, EF. Stange, CL. Bevins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2005. – № 102(50) – P. 18129–34.

224. Wilmanski JM. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases / JM. Wilmanski, T. Petnicki-Ocwieja, KS. Kobayashi. // *J. Leukoc. Biol.* – 2008. – № 83(1) – P. 13–30.
225. World Health Organization. Antimicrobial resistance // Global report on surveillance –2014.
226. Worth L.L. ImmTher, a lipophilic disaccharide derivative of muramyl dipeptide, up-regulates specific monocyte cytokine genes and activates monocyte-mediated tumoricidal activity. / L.L. Worth, S.F. Jia, T. An, E.S. Kleinerman // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1999. – Vol. 48 (6). – P. 312-320
227. Qiu F. Activation of cytokine-producing and antitumor activities of natural killer cells and macrophages by engagement of Toll-like and NOD-like receptors / F. Qiu, A. Maniar, MQ Diaz, AI Chapoval, AE. Medvedev. // *Innate immunity.* –2011 – № 1 – P. 375–87.
228. Yamamoto-Furusho JK. Centaurin beta 1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation / JK. Yamamoto-Furusho, N. Barnich, R. Xavier, T. T. Hisamatsu, DK. Podolsky // *J. Biol. Chem.* – 2006. – № 281(47) – P. 360–70.
229. Yang H-ZXS. A novel immunostimulator, N2-[α -O-benzyl-N-(acetylmuramyl)-L-alanyl-D-isoglutamyl]- N6-trans-(m-nitrocinnamoyl)-L-lysine, and its adjuvancy on the hepatitis B surface antigen / H-ZXS. Yang, X-Y. Liao, S-D. Zhang, Z-L. Liang, B-H. Liu, J-Y. Bai, C. Jiang, J. Ding, G-F. Cheng, G. Liu // *J. Med. Chem.* – 2005. – № 48 – P. 512–22.
230. Yang, S. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture / S. Yang // *Infect Immun.* – 2001. – № 69(4). – P. 2045-53.
231. Yoo Y.C. Adjuvant activity of muramyl dipeptide derivatives to enhance immunogenicity of a hantavirus-inactivated vaccine. / Y. C. Yoo, K. Yoshimatsu, Y. Koike et al. // *Vaccine* – 1998. – № 16 (2-3) –P. 216–24.

232. Zaman M. Strategies for intranasal delivery of vaccines. / M. Zaman, S. Chandrudu, I. Toth. // Drug Deliv. Transl. Res. – 2013. – №3: – P. 100–109.
233. Zhang MZXJC. Synthesis of F-alkylated MDP analogs / MZXJC. Zhang // Chin. Chem. Lett. – 1996. – № 7 – P. 993–94.
234. Zhang S-DLG. “Meshes-bag gathered-bunch” method for solid-phase synthesis of small molecular diverse compounds / S-DLG. Zhang, S-Q. Xia, P. Wu, L. Zhang // J. Comb. Chem. – 2002. – № 4 – P. 131–37.