

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНИТЕТА

©КОЛЛЕКТИВ

АВТОРОВ.

2010

УДК 615.276.4.012.6

М. В. Пашенков, С. Ф. Попилук, Б. И. Алхазова, В. Л. Львов, Е. С. Феденко, Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУРАМИЛПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПЕПТИДОГЛИКАНА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

ООО "Корус Фарм", Москва, Россия, 121357, ул. Ватутина, д. 18; ГНЦ "Институт иммунологии ФМБА России", Москва, 115478, Каширское ш., д. 24, к. 2

Путем обработки пептидогликана *Salmonella typhi* лизоцимом получен комплекс мурамилпептидов (КМП), состоящий из трех основных компонентов: 1) 8-М-ацетил-0-глюкозаминил-(1->4)-β-ацетил-0-мурамоил-β-аланил-0-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновой кислоты (ГМтри); 2) β-ацетил-0-глюкозаминил-(1->4)-Н-ацетил-0-мурамоил-1-аланил-0-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-Р-аланина (ГМтетра); 3) димера ГМтетра (диГМтетра), в котором мономерные остатки ГМтетра соединены путем амидной связи между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка ГМтетра и α-аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого остатка ГМтетра. КМП стимулирует бактерицидную активность лейкоцитов, защищает лабораторных мышей от летальной бактериальной инфекции, индуцирует выработку цитокинов и хемокинов макрофагами и дендритными клетками человека *in vitro*. Таким образом, КМП отличается ключевыми видами активности, присущими препаратам класса иммуностимуляторов.

Ключевые слова: иммуностимуляторы, мурамилпептиды, бактерицидность, цитокины

Pashchenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Fedenko E.S., Khaitov R.M., Pinegin B.V. IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF MURAMYLPEPTIDE FRAGMENTS OF PEPTIDOGLYCAN FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA

Treatment of *Salmonella typhi* peptidoglycan with lysozyme yielded a muramylpeptide complex (MPC) composed of three main components: (1) β-N-acetyl-D-glucosaminyl-(1-4)-N-acetyl-D-muramoyl-L-alanine-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimelic acid (GMtri), (2) β-N-acetyl-D-glucosaminyl-(1-4)-N-acetyl-D-muramoyl-L-alanine-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimeloid-D-alanine (GMtetra), (3) GMtetra dimer (di-GMtetra) in which tetrameric residues of GMtetra are held together by an amide bond between carboxyl group of terminal D-alanine of one residue and α-amino group of meso-diaminopimelic acid of the other. MPC stimulates bactericidal activity of leukocytes, protects laboratory mice from lethal bacterial infection, induces cytokine and chemokine *in vitro* production by human macrophages and dendritic cells. It is concluded that MPC possess key activities characteristic of immunostimulating drugs.

Key words: immunostimulators, muramylpeptides, bactericidal activity

Введение. Снижение резистентности человека к инфекционным агентам, наблюдаемое во многих странах мира, в сочетании с появлением новых антибиотикорезистентных штаммов ведет к повышению распространенности хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, трудно поддающихся традиционным методам лечения [13,14]. Примерами таких заболеваний служат хронический бронхит, хронический простатит, хронические рецидивирующие пиодермии. При этих заболеваниях оправдана фармакологическая стимуляция иммунной системы, направленная на усиление эффектов традиционной антимикробной терапии. Кроме того, все большее значение приобретает проблема биотерроризма. При угрозе биологической атаки могут потребоваться мероприятия, позволяющие быстро повысить резистентность населения к бактериальному заражению. В этих условиях предпочтительны не традиционные вакцины, а иммуностимуляторы, активирующие врожденную иммунную систему и дающие быструю, хотя и преходящую, защиту от широкого круга патогенных микроорганизмов. Таким образом, поиск новых, эффективных и недорогих иммуностимуляторов, оказывающих при этом минимум побочных действий, представляет актуальную задачу иммунофармакологии.

Перспективным классом иммуностимуляторов являются производные пептидогликана (ПГ) клеточной стенки бактерий [20]. ПГ — это гетерополимер, образованный линейными полисахаридными цепочками, в которых остатки N-ацетил-0-глюкозамина (GlcNAc) чередуются с остатками N-ацетил-0-мурамовой кислоты (MurNAc) и соединены друг с

другом (3-(1 4)-гликозидными связями. С лактильными группами остатков MurNAc связаны короткие пептидные цепочки, причем пептиды, отходящие от соседних тримерной структуры ПГ. Иммуностимулирующая активность ПГ обеспечивается как макромолекулами ПГ [6], так и в основном сравнительно небольшими его фрагментами (муропеп-тидами), возникающими либо в процессе ферментативного гидролиза ИГ в организме человека, либо в ходе биосинтеза или деградации ПГ в самих бактериях [4, 10, 11]. Первым из таких фрагментов был открыт мурамилдипептид, представляющий собой К-ацетилмурамил-Ь-аланил-О-глутамино-вую кислоту [7]. Мурамилдипептид отличается мощным иммуностимулирующим и адьювантным действием, но непригоден для клинического при менения из-за выраженной пирогенности. Позже были описаны другие высокоактивные естественные муропептиды, в частности N-ацетилмурамил-Ь-аланил-О-изоглутаминил-мезо-диаминопиме-линовая кислота (мурамилтрипептид), получаемая из ПГ грамотрицательных бактерий [10]. Естественные муропептиды являются классическими па-тогенассоциированными молекулярными паттернами, поскольку присущи большим группам микроорганизмов и воздействуют в первую очередь на клетки врожденной иммунной системы.

За последние годы был разработан ряд (полу) синтетических непирогенных муропептидов, получивших разрешение на медицинское применение или проходящих клинические испытания, к которым можно отнести препараты МТР-РЕ, мурабутид, ромуртид, а также отечественный иммуномодулятор ликопад [1, 2, 15, 19, 20]. В отличие от упомянутых соединений, полностью или частично синтетических, мы поставили задачу создать муропептидный иммуностимулятор полностью естественной природы. Мы исходили из того, что иммунная система человека и млекопитающих в процессе эволюции настроилась на распознавание именно веществ естественного происхождения, потому воздействие такого рода веществ на иммунную систему будет более эффективным и сбалансированным по соотношению терапевтического и побочного действия. Кроме того, отсутствие процедур химического синтеза позволило бы удешевить получение такого иммуностимулятора. В качестве источника ПГ нами был взят классический грамотрицательный микроорганизм *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Путем обработки ПГ лизоцимом с последующим диализом и гель-фильтрацией был получен комплекс мурамилпептидных фрагментов ПГ, называемый ниже комплексом мурамилпептидов (КМП). В настоящей статье представлены данные по химическому составу и иммунобиологической активности КМП. Результаты подтверждают ожидаемую активность препарата и дают основание для проведения его клинических испытаний.

Материалы и методы. Получение и химический анализ КМП. Первичную очистку ПГ *S. typhi* от белка, нуклеиновых кислот и липидов осуществляли путем трех последовательных обработок бактериальной биомассы 45% водным фенолом (70°C, 30 мин). Осадок ПГ тщательно отмывали, 5 г осадка ресуспен-дировали в 100 мл 0,2 М триэтиламмоний-ацетатного буфера (рН 7,2) и обрабатывали 0,3% лизоцимом ("Sigma", США) в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь диализировали в течение 72 ч против того же буфера через мембрану с размером отсежки 5 кДа ("Millipore", США) с пятикратной сменой буфера. КМП выделяли из объединенного диализата путем гель-хроматографии на колонке с Sephadex G-50 ("Sigma", США) с элюцией 0,2 М хлоридом натрия и далее обессоливали на колонке с Sephadex G-15 в деионизованной воде. Полученный препарат лиофилизировали и хранили при комнатной температуре.

Препарат анализировали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке TSK ODS-120T размером 4,6 x 250 мм ("Tosoh Bioscience", Германия) с элюцией водным ацетонитрилом (градиент ацетонитрила от 3 до 18% за 15 мин) в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты при скорости потока 1 мл/мин. Детекцию проводили при 230 нм. Химическую природу отдельных компонентов КМП анализировали с помощью масс-спектро-метрии MALDI-TOF и ¹³С-ядерно-магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии. Уровень эндотоксина в препарате определяли с помощью LAL-теста ("EndoSafe KTA", "Charles River", США).

Иммунизация и инфицирование мышей. Использовали самок F1 (C57/BL6 x CBA₃с) массой 18—20 г. Лиофилизированный КМП разводили в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) и стерильно фильтровали. При внутрибрюшинном введении необходимую дозу препарата вводили на 500 мкл физиологического раствора, при подкожном — на 50 мкл физиологического раствора. При необходимости инъекции повторяли ежедневно. Контрольные группы мышей получали равные объемы физиологического раствора без препарата. Сыворотку крови для анализа уровня фактора некроза опухоли α (TNFα) и интерлейкина (IL)-6 получали через 2 ч после последней инъекции (время пиковой концентрации обоих цитокинов после однократной инъекции КМП, определенное в предварительных опытах). Пери-тонеальные лейкоциты получали через 24 ч после последней инъекции.

Инфицирование мышей золотистым стафилококком (*St. aureus*, штамм Wood 46) в дозе 1 DCL производили через 24 ч после последней инъекции КМП или физиологического

раствора. В предварительных опытах 1 DCL была определена эквивалентной 10^9 микробных клеток. Для повышения вирулентности стафилококк вводили в полужидком агаре. Мышей наблюдали в течение 10 суток после заражения, учитывали количество погибших мышей в группе и сроки их гибели.

Получение перитонеальных лейкоцитов. Мышей забивали путем цервикальной дислокации и вводили внутривентриально 10 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 20 Ед/мл гепарина. Переднюю брюшную стенку интенсивно массируют, кожу надрезают и отсепааровывают, после чего иглой отсасывают содержимое брюшной полости. Клетки отмывают в ФСБ дважды, ресуспендируют в полной культуральной среде (ПКС) и подсчитывают. В качестве ПКС использовали RPMI (РАА, Австрия) с 2 мМ L-глутамином ("Sigma", США) и 10% фе-тальной телячьей сывороткой (РАА, Австрия).

Исследование поглощения и внутриклеточного киллинга St. aureus. Поглощение и внутриклеточный киллинг St. aureus исследовали, как описано S. Dambaeva и соавт. [5]. Использовали St. aureus, меченный флюоресцеина изотиоцианатом (FITC). Для того, чтобы оценить поглощение, 90 мкл суспензии лейкоцитов концентрацией $2 \cdot 10^6$ клеток/мл смешивали с 90 мкл суспензии FITC-меченного St. aureus концентрацией 10^8 /мл и инкубировали 30 мин при 37°C . Клетки осаждали при 200 g (3 мин), отмывали 1 раз охлажденным ФСБ с 0,02% ЭДТА для удаления несвязавшихся бактерий и ресуспендируют в 0,5 мл того же раствора с добавлением 1% параформальдегида. Пробы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur в программе CellQuest (оба "BD Bioscience"). Оценивали процент клеток с высокой флюоресценцией в канале FL1 (клетки, поглотившие меченный стафилококк).

При оценке внутриклеточного киллинга давали клеткам поглотить FITC-меченный стафилококк, как описано выше, отмывали, ресуспендируют клетки в 200 мкл ФСБ и инкубировали при 37°C еще 2,5 ч. Затем клетки осаждали (200 g, 1 мин, 4°C) и разрушали в 200 мкл 0,2% сапонина на 0,01 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,5) в течение 5 мин. Высвободившиеся бактерии осаждали при 2000 g в течение 10 мин. Для выявления убитого стафилококка в пробы добавляли пропидиум-йодид (PI, 2,5 мкг/мл). Пробы анализировали на проточном цитометре FACSCalibur в программе CellQuest. Оценивали процент FITC-событий (погибшие микробные клетки) по отношению к общему числу PI⁺-событий (все микробные клетки).

Культивирование и стимуляция дендритных клеток (ДК) и макрофагов. ДК и макрофаги получали по общепринятой методике из моноцитов крови [16]. Венозная кровь была получена от 4 здоровых доноров. Мононуклеарные клетки выделяли из крови на градиенте плотности фиколл-урографина ("Панэко", Россия). Моноциты выделяли из суспензий мононуклеарных клеток путем адгезии к пластику. Для получения ДК моноциты культивировали 6 сут в среде RPMI (РАА, Австрия) с добавлением 2 мМ L-глутамин ("Sigma", США), 10% фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия), 80 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и 50 нг/мл (IL-4) (оба "Invitrogen", Великобритания). На 6-е сутки собирали незрелые ДК (плавающие или слабоприлипающие клетки). Макрофаги получали так же, как ДК, но в среду не добавляли IL-4. На 6-е сутки культуры макрофаги отделяли от пластика путем трипсинизации. При иммунофенотипировании поверхностный фенотип ДК был CD11c⁺CD14⁺CD80^{dim}CD83⁺CD86^{Uim}CD206⁺HLA-DR⁺, макрофагов - CD11c⁺CD14⁺CD80^{dim}CD83⁺CD86^{dim}CD206⁺HLA-DR⁺. Контаминация лимфоцитами составила < 5% для культур ДК, < 1% для культур макрофагов. Полученные ДК и макрофаги отмывали и вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты по $8 \cdot 10^4$ клеток на лунку, после чего культивировали 24 ч при 37°C и 5% CO₂ либо в отсутствие стимуляции, либо в присутствии КМП (10 мкг/мл). LPS E. coli 0111:B4 ("Sigma", США) в концентрации 0,1-мкг/мл служил положительным контролем. По окончании 24 ч собирали супернатант и замораживали его при -70°C .

Исследование уровня цитокинов. Содержание TNFα и IL-6 в сыворотках мышей исследовали путем иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью наборов фирмы

"Biosource International" (Бельгия). Уровень IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, интерферона (IFN)-γ, TNFα, FGFβ, G-CSF, GM-CSF, PDGFβ, VEGF, Eotaxin, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β и RANTES в супернатантах человеческих ДК и макрофагов изучали с помощью набора 27-plex Human Cytokine Panel и прибора Biorad 2000 (оба "Biorad", США) согласно инструкции производителя. Содержание IFN-α и трансформирующего фактора роста В (TGFβ₃) в супернатантах исследовали методом ИФА с помощью наборов фирм "Цитокин" (Санкт-Петербург, Россия) и "Biosource International" (Бельгия) соответственно. Для каждого анализа рассчитывали среднее значение по 4 донорам при каждой условии стимуляции, а также индекс стимуляции (отношение средней стимулированной продукции к средней спонтанной).

Статистическая обработка данных. Независимые группы сравнивали с помощью непараметрического U-теста Манна—Уитни. Для сравнения парных измерений использовали тест Уилкоксона. Пропорции сравнивали методом χ^2 -квadrat. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Химический состав КМП. По данным масс-спектрометрии (MALDI-TOF) КМП содержит три основных компонента молекулярной массой 868,4, 939,4 и 1860,8. Эти массы соответствуют трем муру-пептидам: 1) p-T4-ацетил-O-глю-козаминил-

(1 -> 4)-N-ауерНJi-D-мурамоил-Ь-аланил-О-изоглю-таминил-мезо-диаминопимели-новой кислоте (ГМтри); 2) (3-N-ацетил-0-глюкозаминил-(1 -> 4) - N-ацетил-D - мурамоил - L-аланил-О-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-D-аланину (ГМтетра); 3) димеру ГМтетра (диГ-Мтетра), в котором мономерные остатки ГМтетра соединены путем амидной связи между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка ГМтетра и со-аминогруппой мезо-диамино-пимелиновой кислоты другого остатка ГМтетра (рис. 1, а). Рассчитанная молекулярная масса ГМтри, ГМтетра и диГМтетра составляет 868,8, 939,8 и 1861,7. Результаты ¹³C-ЯМР-спектроскопии позволили подтвердить строение компонентов. Исходя из строения нативного ПГ, можно предположить, что две дисахаридные группировки в диГМтетра исходно принадлежали к двум соседним цепям ПГ, тогда как ГМтри и ГМтетра образовались соответственно, из тех повторяющихся звеньев ПГ, в которых пептидные цепочки либо не были построены, либо не образовали связи с другой такой же цепочкой, отходящей от соседней полисахаридной цепи. Характерная ВЭЖХ-хроматограмма КМП представлена на рис.1,б. По данным ВЭЖХ и массспектрометрии изолированных пиков ГМтри (а- и b- аномеры) представлен пиками 5 и 6, тогда как минорный пик 4 представляет собой диГМтетра, лишённый бокового остатка D-аланина в пептидной цепочке.

По данным LAL-теста содержание эндотоксина составило 0,4 эндотоксиновые единицы (ЭЕ) на 1 мкг препарата. Контрольный LPS содержал 16 000ЭЕ/мкг.

КМП усиливает бактерицидную активность перитонеальных лейкоцитов у мышей. Применение иммуностимуляторов во многом основано на принципе лечения подобного подобным. В нашем случае это означало, что КМП как иммуностимулятор строго бактериального происхождения будет эффективен в первую очередь для профилактики и лечения бактериальных инфекций. Для проверки этой гипотезы были поставлены опыты на лабораторных мышах. В первой серии опытов КМП в дозе 1,10 или 100 мкг вводили мышам внутривентриально и через 24 часа оценивали способность перитонеальных лейкоцитов поглощать и убивать *St.aureus*.

КМП не влиял на поглотительную способность перитонеальных лейкоцитов (данные не показаны), однако значимо и дозозависимо усиливал их внутриклеточную бактерицидность, которую измеряли по способности убивать поглощенный стафилококк (рис. 2, а).

Во второй серии опытов КМП вводили мышам подкожно ежедневно в дозе 100 мкг/мышь/сут в течение 1, 3, 5, 7 или 10 сут. Подкожный путь введения более приближен к клинической ситуации. Однократная подкожная инъекция КМП не влияла на бактерицидную активность перитонеальных лейкоцитов, однако начиная с 3-й инъекции препарата отмечали достоверное нарастание этого показателя по сравнению с таковым в контрольной группе, получавшей 0,9% хлорид натрия (рис. 2, б). Начиная с 7-й инъекции бактерицидная активность достигала верхнего плато.

КМП индуцирует выработку TNFα и IL-6 у мышей. Одним из механизмов, с помощью которых иммуностимуляторы могут временно повышать резистентность организма к микробам, является индукция выработки провоспалительных цитокинов. В то же время гиперпродукция цитокинов может привести к нежелательным побочным эффектам. Для того чтобы изучить этот аспект активности КМП, препарат вводили мышам подкожно по 100 мкг/мышь/сут в течение 1, 3, 5, 7 или 10 сут; через 2 ч после последней инъекции исследовали уровень TNFα и IL-6 в сыворотке. Однократная инъекция КМП приводила к появлению обоих цитокинов в сыворотке (рис. 2, в, г). Однако при последующих инъекциях содержание цитокинов не только не повышалось, но снижалось в несколько раз, хотя и не возвращалось к исходному (неопределяемому) уровню. Таким образом, можно говорить о наступлении частичной толерантности к провоспалительному действию КМП при повторных инъекциях препарата.

КМП защищает мышей от летальной бактериальной инфекции. Интегральным показателем активности иммуностимулятора является его способность повышать резистентность макроорганизма к летальным инфекциям. Для того чтобы оценить влияние КМП на немедленную резистентность к стафилококковой инфекции, группам по 10 мышей вводили подкожно либо препарат по 10 или 100 мкг/мышь/сут, либо эквивалентный объем физиологического раствора. Ежесуточные инъекции КМП или физиологического раствора продолжали в течение 1, 3, 5, 7 или 10 сут и через 24 ч после последней инъекции заражали животных 1 летальной дозой *St. aureus*, штамм Wood 46. Результаты репрезентативного опыта приведены в табл. 1. Однократная инъекция КМП не влияла на резистентность мышей к золотистому стафилококку. Начиная с 3-й инъекции препарата наблюдали повышение процента выживших мышей, которое было дозозависимым и достигало максимума после 7-й инъекции. Как нетрудно заметить, повышение резистентности мышей к *St. aureus* имеет ту же кинетику, что и повышение бактерицидности перитонеальных лейкоцитов при подкожном введении КМП (см. рис. 2, б), что позволяет сделать предположение об одном из механизмов действия препарата. Резистентность к стафилококку, вызываемая КМП, носила временный характер, так как мыши, зараженные через 2 нед после последней инъекции, погибли независимо от дозы и количества инъекций (данные не показаны).

КМП индуцирует выработку цитокинов, хемо-кинов и ростовых факторов макрофагами и ДК человека *in vitro*. Получив обнадеживающие данные на мышинной модели, мы исследовали способность КМП индуцировать выработку цитокинов и хемокинов клетками врожденной иммунной системы человека. В качестве мишеней были выбраны два типа миелоидных клеток — макрофаги и ДК. Макрофаги являются важнейшими эффекторными клетками местного иммунитета, тогда как ДК необходимы для индукции адаптивного иммунного ответа против микроорганизмов; оба типа клеток участвуют в воспалительной реакции. Уровень цитокинов, хемокинов и ростовых факторов в супернатантах оценивали после 24-часовой стимуляции КМП в концентрации 10 мкг/мл (см. Материалы и методы); в качестве контрольного препарата использовали LPS в концентрации 100 нг/мл. Данные по анализам, значимо индуцированным в присутствии КМП, приведены в табл. 2. Как следует из табл. 2, при воздействии на макрофаги препарат индуцировал выработку ряда провоспалительных цитокинов (IL-6, IFN- γ , TNF α) и ростовых факторов G-CSF и GM-CSF, усиливающих миелопоэз, но практически не влиял на продукцию провоспалительных хемокинов. Напротив, ДК отвечали на стимуляцию КМП в основном именно выработкой хемокинов (IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES), необходимых для привлечения различных популяций лейкоцитов в очаг воспаления. Таким образом, и макрофаги, и ДК являются потенциальными мишенями КМП у человека *in vivo* и продуцируют наборы цитокинов и хемокинов, которые могут взаимно дополнять друг друга при индукции защитного ответа. КМП не вызывал значимую выработку IL-1 β , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IFN- α , TGF β , FGF β , PDGF β , VEGF, зотаксина и MCP-1 ни ДК, ни макрофагами.

Обсуждение. Данные, приведенные в настоящей статье, иллюстрируют несколько видов активности КМП, которые являются ключевыми для препаратов класса иммуностимуляторов. КМП усиливает бактерицидную активность лейкоцитов и вызывает выработку провоспалительных цитокинов у лабораторных мышей; повышает резистентность животных к летальной инфекции; индуцирует выработку ряда цитокинов и хемокинов клетками врожденной иммунной системы человека (макрофаги и ДК) *in vitro*. Молекулярные механизмы действия КМП находятся в процессе изучения. Данные литературы [4, 10] и наших собственных предварительных экспериментов позволяют предположить, что препарат преимущественно воздействует на рецептор NOD1 из группы NOD-подобных рецепторов. NOD1 является основным рецептором для муропептидов, содержащих остаток мезодиаминопимелиновой кислоты [12]. Потенциальными клеточными мишенями КМП *in vivo* являются, таким образом, все клетки, экспрессирующие NOD1, в том числе миелоидные ДК и макрофаги. Мы показали, что человеческие ДК и макрофаги, стимулированные КМП, вырабатывают широкий спектр цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, чем могут объясняться некоторые виды активности препарата. Так, TNF α и GM-CSF могут праймировать фагоциты, G-CSF и GM-CSF могут способствовать усилению миелопоэза, а провоспалительные хемокины могут привлекать различные популяции лейкоцитов к месту введения препарата при его местном применении [3, 8]. Интересно, что КМП вызывает продукцию хемокинов MIP-1 α , MIP-1 β и RANTES, которые взаимодействуют с хемокиновым рецептором CCR5 и являются естественными антагонистами вируса иммунодефицита человека [18]. Способность КМП предотвращать заражение клеток ВИЧ нуждается в изучении. КМП не индуцирует выработку ростовых факторов FGF, TGF β и VEGF, в связи с чем влияние КМП на функции соединительной ткани и ангиогенез представляется маловероятным.

В опытах на мышинной модели мы показали, что пролонгированное введение КМП сопровождается постепенным нарастанием эффекторной (бактерицидной) функции лейкоцитов и коррелирует с повышением резистентности животных к стафилококковой инфекции. Напротив, к провоспалительному действию препарата быстро развивается толерантность: уровень провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6 достигает пика после 1-й инъекции, но в дальнейшем падают, несмотря на повторные инъекции препарата. Эти данные весьма сходны с результатами, опубликованными недавно группой R. Medzhitov и соавт. [9], которые показали, что при повторной стимуляции макрофагов LPS экспрессия генов с прямой защитной функцией нарастает, тогда как экспрессия провоспалительных факторов снижается (последнее известно как LPS-толерантность). Различную динамику экспрессии генов эти авторы связали с различиями в ремоделировании хроматина в соответствующих промоте-рах. Наши данные показывают, что закономерности, описанные R. Medzhitov и соавт. для LPS, применимы и к другим патогенассоциированным молекулярным паттернам. Самоограничение провоспалительного действия КМП позволяет рассчитывать на отсутствие выраженных побочных эффектов препарата при длительном применении. На основании данных по бактерицидной активности лейкоцитов (см. рис. 1, б) можно предположить, что в клинических условиях КМП целесообразно давать курсом длительностью 3—5 сут.

КМП предполагается использовать в первую очередь в парентеральной форме. При этом мы исходим из того, что желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) уже содержит значительное количество му-ропептидных соединений, являющихся продуктом

жизнедеятельности естественной микрофлоры [17], поэтому поступление муропептидов *per os* может не оказать существенного влияния на их общее содержание, в ЖКТ и, следовательно, их эффект на иммунную систему будет слабым. Парентеральное введение препарата помимо повышения биодоступности позволит воздействовать системно на клетки иммунной системы, которые в норме не контактируют с муропептидами, что позволяет ожидать более выраженного иммуностимулирующего эффекта препарата. КМП получен из грамотрицательной бактерии (*S. typhi*), однако он способен защищать против инфекции грамположительным микроорганизмом — золотистым стафилококком (см. табл. 1). Эти результаты свидетельствуют об относительной неспецифичности действия КМП и потенциально широкой антибактериальной активности препарата. Неспецифичность действия КМП можно объяснить, исходя из преимущественного воздействия препарата на врожденную иммунную систему. В целом полученные результаты свидетельствуют о выраженной иммуностимулирующей активности КМП и служат основанием для клинических испытаний КМП при хронических инфекциях, ассоциированных с вторичными иммунодефицитами, а также при профилактике острых бактериальных инфекций, например гнойных осложнений хирургических операций.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО "Корус Фарм".

ЛИТЕРАТУРА

1. Azuma I. Development of the cytokine inducer romurtide: experimental studies and clinical application // *Trends Pharmacol. Sci.* - 1992. - Vol. 13. - P. 425-428.
2. Bahr G. M. Non-specific immunotherapy of HIV-1 infection: potential use of the synthetic immunomodulator murabutide // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2003. — Vol. 51. — P. 5—8.
3. Berkow R. L., Wang D., Larrick J. W. et al. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor // *J. Immunol.* — 1987. — Vol. 139. - P. 3783-3791.
4. Chamaillard M., Hashimoto M., Hone Y. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4. - P. 702-707.
5. Dambaeva S. V., Mazurov D. V., Golubeva N. M. et al. Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes // *Rus. J. Immunol.* — 2003. — Vol. 8. — P. 53-60.
6. Dziarski R., Gupta D. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation // *Infect. and Immun.* - 2005. - Vol. 73. - P. 5212-5216.
7. Ellouz F., Adam A., Ciorbaru R., Lederer E. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1974. — Vol. 59. - P. 1317-1325.
8. Fleischmann I., Golde D. W., Weisbart R. H., Gasson J. C. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils // *Blood.* — 1986. — Vol. 68. - P. 708-711.
9. Foster S. L., Haigreaves D. C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications // *Nature.* - 2007. - Vol. 447. - P. 972-978.
10. Girardin S. E., Boneca I. G., Carneiro L. A. et al. Nodi detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan // *Science.* — 2003. — Vol. 300. - P. 1584-1587.
11. Girardin S. F., Bonecal G., Viala J. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — P. 8869-8872.
12. Girardin S. E., Fravassos L. H., Herve M. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nodi 1 and Nod2 // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278. - P. 41702-41708.
13. Kriegerl N., Lee S. W., Jeon I. et al. Epidemiology of prostatitis // *Int. J. Antimicrob. Agents.* - 2008. - Vol. 31, Suppl. 1. - P. S85-S90.
14. Mannino D. M. Epidemiology and global impact of chronic obstructive pulmonary disease // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* — 2005. — Vol. 26. - P. 204-210.
15. Nardin A., Leftbvre M. L., Labroquere K. et al. Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma // *Curr. Cancer Drug Targets.* — 2006. — Vol. 6. — P. 123—133.
16. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha // *J. Exp. Med.* - 1994. - Vol. 179. - P. 1109-1118.
17. Vavricka S. R., Musch M. W., Chang I. E. et al. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human-colonic Caco2/bbe cells // *Gastroenterology.* - 2004. - Vol. 127. — P. 1401—1409.

18. Verani A., Lusso P. Chemokines as natural HIV antagonists // *Curr Mol. Med.* - 2002. - Vol. 2. - P. 691-702.
19. Vinnitskii L. I., Bunialian K. A., Pinegin B. V. et al. Domestic immunomodulator of a new generation, Licopid, in the comprehensive therapy and prevention of infectious complications in surgery // *Vestn. Ros. Akad. Med. Nauk.* - 1997. — P. 46-49.
20. Werner G. H., Jolles P. Immunostimulating agents: what next? A review of their present and potential medical applications // *Eur. J. Biochem.* - 1996. — Vol. 242. - P. 1-19.

Поступила 17.12.09