

## РОЛЬ МУРАМИЛПЕПТИДОВ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА

© 2015 г. Е.А. Мещерякова\*, Л.Г. Алексеева\*, Т.М. Андропова\*\*

\*Институт биоорганической химии им. Шенякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия;

\*\*ЗАО «ПЕПТЕК», Москва, Россия

Поступила: 24.09.2015. Принята: 05.10.2015

Методом ПЦР исследовано влияние дисахаридсодержащего мурамилпептида (ГМДП) на воспалительный ответ макрофагальной клеточной линии J774, стимулированный ЛПС двумя способами. Показано, что ГМДП синергически усиливает развитие раннего иммунного воспалительного ответа, индуцированного ЛПС. Синергизм действия ЛПС и ГМДП объясняется значительной стимуляцией под влиянием ЛПС экспрессии м-РНК рецептора ГМДП – NOD2. Предварительная инкубация клеток J774 с ГМДП значительно уменьшает активированный ЛПС воспалительный ответ, который в данной схеме эксперимента сопровождается дифференцировкой J774 клеток в сторону M2 субпопуляции. Результаты работы демонстрируют широкие возможности мурамилпептидов в коррекции иммунных реакций.

*Ключевые слова:* мурамилпептиды, полимеразная цепная реакция, воспаление

### ВВЕДЕНИЕ

Мурамилпептиды (МП) в качестве фрагментов клеточной стенки бактерий принимают участие в широком наборе иммунных реакций млекопитающих и человека [1–6]. К настоящему времени уже многое известно о механизме действия МП. Так, установлено, что рецепторами МП являются, по меньшей мере, два внутриклеточных белка из семейства NLR – NOD1 и NOD2 [7–9], которые активируют NF- $\kappa$ B сигнальный клеточный путь, что приводит к синтезу цитокинов и других иммуноактивных белков и пептидов.

**Адрес:** 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ИБХ им. Шенякина-Овчинникова РАН. Мещерякова Елена Алексеевна. Тел./факс (495) 335-08-12.

**E-mail:** meshcheryakova.elena@mail.ru

#### Авторы:

**Мещерякова Е.А.**, к.х.н., научный сотрудник лаборатории химии пептидов ИБХ им. Шенякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия;

**Алексеева Л.Г.**, к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории химии пептидов ИБХ им. Шенякина-Овчинникова РАН, Москва, Россия;

**Андропова Т.М.**, к.х.н., президент компании ЗАО «Пептек», Москва, Россия.

Способность МП влиять на иммунную систему нашла применение в медицине. МП в качестве лекарственного средства, модулирующего защитные функции организма, используются для лечения как бактериальных инфекций, так и онкологических заболеваний [10–13], и список направлений терапевтического использования МП продолжает пополняться.

В медицинской практике известно, что большинство заболеваний сопровождается тем или иным видом воспаления, которое является наиболее распространенной защитной реакцией организма на развитие патологического процесса. В связи с этим изучение особенностей влияния на воспаление на клеточном уровне представляется достаточно универсальным методом для углубленного исследования механизма действия лекарственного препарата, корректирующего иммунные реакции организма.

С этой целью нами было проведено определение влияния одного из МП – глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП), действующего вещества лекарственного препарата Ликолипид®, на экспрессию м-РНК генов ряда про- и противовоспалительных цитокинов,  $\alpha$ - и

$\beta$ -дефенсинов и нескольких белков, принимающих участие в активации NF- $\kappa$ B пути. К настоящему времени существует множество клинических данных успешного применения Ликопида в качестве иммуномодулирующего средства при инфекционных процессах [14–20], и изучение его действия на клеточном уровне в модели воспалительного иммунного ответа может оказаться полезным не только для выяснения механизма его действия, но и для практической медицины.

В качестве модели воспалительного иммунного ответа мы выбрали активацию ЛПС клеток макрофагальной линии J774. Поскольку ЛПС так же, как ГМДП, является фрагментом бактериальной стенки, то предложенная модель воспаления должна отражать реакцию макрофагального звена организма на бактериальное заражение.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клетки

Клеточная линия J774 мышинных макрофагов получена из коллекции Института цитологии, Санкт-Петербург. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (полная среда) в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$ .

Клетки вносили в лунки 6-луночного планшета из расчёта  $3 \times 10^6$  клеток/лунку в 3 мл полной среды и инкубировали в течение ночи при 37°C в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$ . На следующий день в лунки добавляли ГМДП в концентрации 10 мкг/мл и/или ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 и 48 часов. Выделение тотальной РНК из клеток проводили реагентом Trizol® (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием фермента Mint («Евроген», Россия) по стандартному протоколу фирмы-производителя с использованием поли(Т) праймера.

### ПЦР

Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в термоциклере СХ96 (BioRad, США). Реакционная смесь объёмом 12,5 мкл содержала: 1 мкг кДНК, 2,5 мкл готовой

5-кратной реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), в которую входят Taq ДНК-полимеразы со специфическими моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, смесь нуклеотидтрифосфатов,  $\text{MgCl}_2$ , ПЦР буфер и по 10 пМ каждого из двух специфичных олигонуклеотидов.

Протокол амплификации включал: 1 цикл продолжительностью 4 мин. денатурации при 94°C, 40 циклов: по 20 сек при 94°C для денатурации цепей ДНК, 20 сек. при 50–72°C для отжига праймеров с матрицей и 40 сек. при 72°C для синтеза комплементарных цепей ДНК, и 1 цикл завершающего синтеза в течение 3 мин. при 72°C. Качество полученных продуктов ДНК контролировалось с помощью кривой плавления.

Расчёт относительного уровня мРНК фрагментов генов был выполнен с использованием deltaCT-метода [27]. Относительная концентрация субстрата была нормализована данными амплификации эндогенного гена сравнения HPRT1:  $\text{deltaCT} = \text{CT}(\text{targetgene}) - \text{CT}(\text{referencegene})$ , где CT – количество циклов, требуемых для достижения порогового значения флуоресценции. Все реакции проводили в двух повторах и включали негативный контроль без ДНК-полимеразы. Данные **табл. 1–5** представляют средние значения, полученные из результатов не менее двух независимых опытов, и максимальное отклонение от среднего составило не более 10%. Уровень значимости P при сравнении экспериментальных и расчетных данных определяли с помощью критерия Стьюдента.

Специфичные олигонуклеотиды, используемые для амплификации фрагментов генов, и условия ПЦР указаны в **табл. 6**.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Анализ экспрессии м-РНК генов при действии ЛПС на клетки J774.

Предварительно было установлено, что количество синтезированной м-РНК сильно варьируется от времени, в течение которого культивируются клетки с ЛПС, причем может наблюдаться не только активация синтеза отдельных молекул, но и его ингибирование. Учитывая эти особенности, экспрессию м-РНК измеряли по часам в интервале 1–8 часов (ранний ответ) а также через 24 и 48 часов (поздний ответ). Полученные результаты представлены в **табл. 1**.

Таблица 1. м-РНК экспрессия (превышение контроля) при действии ЛПС на клетки J774

| Ген           | Время инкубации (ч) |        |       |        |        |        |                |         |
|---------------|---------------------|--------|-------|--------|--------|--------|----------------|---------|
|               | Ранний период       |        |       |        |        |        | Поздний период |         |
|               | 1                   | 2      | 3     | 4      | 6      | 8      | 24             | 48      |
| IL-1          | 18,2                | 1511,8 | 948,8 | 1586,1 | 1303,2 | 2210,2 | 1663,5         | 10960,3 |
| IL-4          | 0,65                | 4,76   | 0,5   | 1,66   | 0,426  | 0,53   | 1,46           | 1,20    |
| IL-6          | 1,27                | 17,63  | 24,25 | 178,20 | 143,45 | 56,49  | 1287,2         | 3956,5  |
| IL-10         | 1,84                | 9,38   | 27,47 | 1,57   | 1,90   | 3,25   | 18,51          | 0,11    |
| IL-12         | 0,68                | 67,70  | nd    | 8,92   | 412,18 | 53,82  | 79,34          | 4,26    |
| TNF- $\alpha$ | 685                 | 19,62  | 34,54 | 38,31  | 6,09   | 11,79  | 5,70           | 1,36    |
| IFN- $\gamma$ | 2,81                | 27,14  | 1,21  | 0,24   | 91,06  | 1,91   | 0,77           | 1,23    |
| CSF           | 0,89                | 29,05  | 2,28  | 1,72   | 196,37 | 5,03   | 11,31          | 2,93    |
| TGF- $\beta$  | 2,06                | 1,91   | 0,9   | 0,38   | 0,65   | 1,88   | 0,46           | 0,9     |
| iNOS          | 2,01                | 7,67   | 1,44  | 5,78   | 2,66   | 1,41   | 1,62           | 0,44    |
| BD3           | 0,81                | 39,12  | 0,96  | 0,41   | 350,49 | 3,27   | 0,94           | 1,78    |
| BD4           | 11,6                | 15,24  | 0,28  | 1,21   | 70,09  | 0,82   | 0,77           | 1,66    |
| Cryp4         | 0,49                | 41,88  | 1,25  | 0,08   | 2,60   | 5,78   | 1,36           | 1,19    |
| NOD2          | 2,07                | 34,64  | 3,58  | 1,98   | 121,63 | 7,69   | 6,10           | 8,51    |
| TLR4          | 0,77                | 9,42   | 0,46  | 0,18   | 136,22 | —      | 0,5            | 1,76    |
| MyD88         | nd                  | 1,56   | 2,64  | 0,93   | 4,11   | 1,79   | 0,16           | 1,90    |
| RIP2          | 0,48                | 16,58  | 0,032 | 5,19   | 2,57   | 2,48   | 2,08           | 4,69    |

Оказалось, что ЛПС в наибольшей степени стимулирует продукцию IL-1 $\alpha$  на протяжении как раннего, так и позднего ответа. На втором месте находится IL-6, продукция которого постепенно увеличивается, достигая наибольшей величины к 48 часам. Синтез м-РНК фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$  также заметно стимулируется, однако в самом начале раннего ответа. Стимуляция продукции перечисленных цитокинов характерна для развития воспалительного ответа. Интересна динамика синтеза еще одного провоспалительного цитокина IL-12: она меняется, начинаясь с ингибирования, и, переходя к стимуляции, достигает максимума ближе к концу раннего ответа. Поскольку известно, что IL-12 индуцирует продукцию IFN- $\gamma$ , мы проследили, как изменяется количество его м-РНК, и обнаружили, что также имеются периоды ингибирования синтеза м-РНК IFN- $\gamma$ , а синтез его максимальных количеств совпадает по времени с IL-12.

Следующими по величине стимуляции экспрессии м-РНК были дефенсины Стур4, BD3 и в меньшей степени BD4. Хотя содержание этих пептидов в клетках J774 мало, существенное изменение в продукции их м-РНК удалось обнаружить в конце раннего ответа. В этот же период наблюдается заметная стимуляция экспрессии м-РНК колонийстимулирующего макрофагального фактора — CSF. Для проти-

вовоспалительного цитокина IL-10 увеличение продукции м-РНК происходит в середине раннего ответа, а также в начале позднего. Для остальных исследованных цитокинов: IL-4, TGF- $\beta$  и для фермента i-NOS, катализирующего синтез сигнальной молекулы NO, увеличение или ингибирование экспрессии м-РНК было очень незначительным.

Важную информацию при действии ЛПС на клетки J774 удалось получить при исследовании экспрессии м-РНК рецепторов TLR4 и NOD2. Удивительно, что ЛПС часто или слабо ингибировал или не стимулировал экспрессию м-РНК своего рецептора TLR4, эффект стимуляции зафиксирован только в конце раннего ответа. В то же время ЛПС всегда стимулировал экспрессию м-РНК NOD2, причем размер максимальной стимуляции практически совпадал в оба периода. Для белка-адаптера TLR4 — MyD88 экспрессия м-РНК или не наблюдалась или имела незначительную величину, а в некоторых случаях ингибировалась. Сходные результаты получены и для белка-адаптера NOD2 — RIP2, однако при раннем ответе обнаружена единичная заметная стимуляция экспрессии. В целом можно отметить, что действие ЛПС на клетки J774 в выбранной нами дозе индуцирует развитие ответа воспалительного типа.

**Таблица 2.** м-РНК экспрессия (превышение контроля) при действии ГМДП на клетки J774

| Ген           | Время инкубации (ч) |       |       |       |      |       |                |       |
|---------------|---------------------|-------|-------|-------|------|-------|----------------|-------|
|               | Ранний период       |       |       |       |      |       | Поздний период |       |
|               | 1                   | 2     | 3     | 4     | 6    | 8     | 24             | 48    |
| IL-1          | 0,64                | 7,21  | 0,795 | 27,67 | 0,62 | 12,04 | 2,39           | 23,35 |
| IL-4          | 0,1                 | 7,16  |       | 1,19  | 0,72 | 4,79  | 1,73           | 1,59  |
| IL-6          | 0,04                | 1,80  | 0,12  | 3,86  | 5,32 | 7,8   | 0,7            | 2,31  |
| IL-10         | 0,3                 | 8,28  | 0,25  | 0,6   | 0,86 | 5,03  | 1,97           | 0,26  |
| IL-12         | 0,12                | 19,85 | 0,19  | 0,15  | 0,24 | 5,74  | 5,74           | 2,50  |
| TNF- $\alpha$ | 1,18                | 1,96  | 8,34  | 3,08  | 0,75 | 5,5   | 1,45           | 1,05  |
| IFN- $\gamma$ | 0,14                | 12,07 | 0,09  | 0,01  | 0,64 | 0,64  | 2,43           | 0,91  |
| CSF           | 0,20                | 7,26  | 1,34  | 1,34  | 1,97 | 3,58  | 1,30           | 2,01  |
| TGF- $\beta$  | 1,55                | 0,90  | 36,00 | 2,01  | 0,06 | nd    | 1,01           | 1,07  |
| iNOS          | 0,19                | 19,03 | 0,88  | 1,06  | 2,26 | 2,48  | 1,97           | 0,21  |
| BD3           | 0,13                | 6,35  | 0,05  | 0,08  | 0,3  | 6,38  | 2,36           | 1,26  |
| BD4           | 0,22                | 8,82  | 0,1   | 2,57  | 0,18 | 7,21  | 0,97           | 1,70  |
| Cryp4         | 0,05                | 7,52  | nd    | 0,05  | 0,02 | 5,98  | 1,85           | 1,40  |
| NOD2          | 0,19                | 10,20 | 0,14  | 1,73  | 2,71 | 7,16  | 2,23           | 2,60  |
| TLR4          | 0,46                | 0     | 0,07  | 1,05  | 1,01 | 7,89  | 1,46           | 1,13  |
| MyD88         | 0,57                | 1,04  | 0,43  | 1,05  | 1,04 | 56,89 | 0,16           | 1,30  |
| RIP2          | 0,29                | 3,24  | 1,16  | 2,68  | 2,22 | 1,44  | 1,09           | 1,38  |

## 2. Анализ экспрессии м-РНК генов клетками J774 под действием ГМДП

Действие ГМДП на экспрессию м-РНК изучалось по методу, разработанному для ЛПС. Полученные результаты представлены в **табл. 2**. Обращает на себя внимание тот факт, что стимуляция экспрессии про- и противовоспалительных факторов наблюдается только для раннего ответа, за исключением IL-1 и IL-12. Кроме того, максимальная величина стимуляции — 36, обнаруженная для TGF- $\beta$ , находится ближе к минимальным значениям **табл. 1**. Величина стимуляции экспрессии для IL-1 занимает второе место в **табл. 2** и сохраняется для позднего ответа, хотя может сильно уменьшаться в зависимости от времени тестирования, причем в отдельные периоды наблюдается даже слабое ингибирование синтеза м-РНК.

Большую вариабельность характера синтеза м-РНК демонстрируют данные для IL-12 и i-NOS, для которых ингибирование синтеза сменяется стимуляцией, причем его максимальная величина занимает позицию вслед за IL-1. Хотя результаты тестирования для IFN- $\gamma$  соответствуют в основном ингибированию синтеза м-РНК и даже значительному, в одном случае начального ответа зафиксирована стимуляция экспрессии. Для остальных ис-

следованных генов величина стимуляции не превышает 10 единиц и может быть расположена в порядке убывания: BD4  $\geq$  TNF- $\alpha$   $\geq$  IL-10  $\geq$  IL-6  $>$  Cryp4  $\geq$  CSF  $\geq$  IL-4  $>$  BD3.

Сложный характер экспрессии м-РНК обнаружен для белков, участвующих в активации NF- $\kappa$ B пути. В случае NOD2 наблюдается волнообразная зависимость полученных данных от времени тестирования: ингибирование экспрессии сменяется стимуляцией два раза за период раннего ответа. Для TLR4 ингибирование в начале раннего ответа плавно переходит в стимуляцию в самом конце, причем аналогичную зависимость демонстрируют данные для белка-адаптера TLR4 — MyD88. Для белка-адаптера NOD2 — RIP2 наблюдаются как небольшое ингибирование, так и очень слабая стимуляция экспрессии.

При сравнении данных **табл. 1** и **2** можно сделать следующие заключения:

- 1) Для большинства исследованных генов непосредственное действие ГМДП ограничено периодом раннего ответа, за исключением 2-х генов провоспалительных цитокинов IL-1 и IL-12.
- 2) Величина стимуляции или ингибирования экспрессии под действием ГМДП значительно меньше действия ЛПС и часто характеризуется волнообразной зависимостью от времени.

**Таблица 3.** м-РНК экспрессия (превышение контроля) клетками J774 при совместной инкубации ЛПС и ГМДП после предварительного действия ЛПС в течение 2 ч.

| Ген           | Время совместной инкубации J774 с ЛПС и ГМДП (ч) |          |          |         |                |          |
|---------------|--|----------|----------|---------|----------------|----------|
|               | Ранний период                                    |          |          |         | Поздний период |          |
|               | 1  | 2        | 4        | 6       | 24             | 48       |
| IL-1          | 471,14   | 14462,21 | 13587,57 | 4451,27 | 3396,89        | 22381,20 |
| IL-4          | 0,12   | 3,18     | 2,93     | 2,75    | 3,20           | 0,28     |
| IL-6          | 9,51   | 199,47   | 313      | 62,25   | 1833,01        | 7967,99  |
| IL-10         | 9,92   | 3,34     | 3,68     | 0,52    | 17,88          | 0,31     |
| IL-12         | 11,00  | 35,75    | 62,08    | 11,39   | 128,89         | 4,53     |
| TNF- $\alpha$ | 35,75  | 120,26   | 23,59    | 10,34   | 5,58           | 2,36     |
| IFN- $\gamma$ | 0,37   | 1,61     | 27,86    | 0,14    | 3,34           | 0,54     |
| CSF           | 5,39   | 15,67    | 3,84     | 7,67    | 7,06           | 3,27     |
| TGF- $\beta$  | 0,56   | 1,05     | 0,77     | 0,43    | 0,54           | 0,90     |
| iNOS          | 0,69   | 1,16     | 17,63    | 1,05    | 3,20           | 0,28     |
| BD3           | 0,18   | 1,50     | 14,03    | 0,30    | 3,41           | 0,75     |
| BD4           | 1,16   | 1,59     | 1,98     | 1,20    | 0,77           | 1,00     |
| Ступ4         | 0,58   | 2,85     | 340,14   | 0,14    | 7,36           | 0,34     |
| NOD2          | 3,84   | 14,42    | 7,52     | 5,58    | 5,70           | 8,17     |
| TLR4          | 0,44   | 0,23     | 0,33     | 0,38    | 1,22           | 2,14     |
| MyD88         | 3,68   | 2,39     | 0,82     | 2,11    | 0,14           | 2,33     |
| RIP2          | 12,91  | 13,74    | 18,77    | 4,53    | 1,93           | 6,41     |

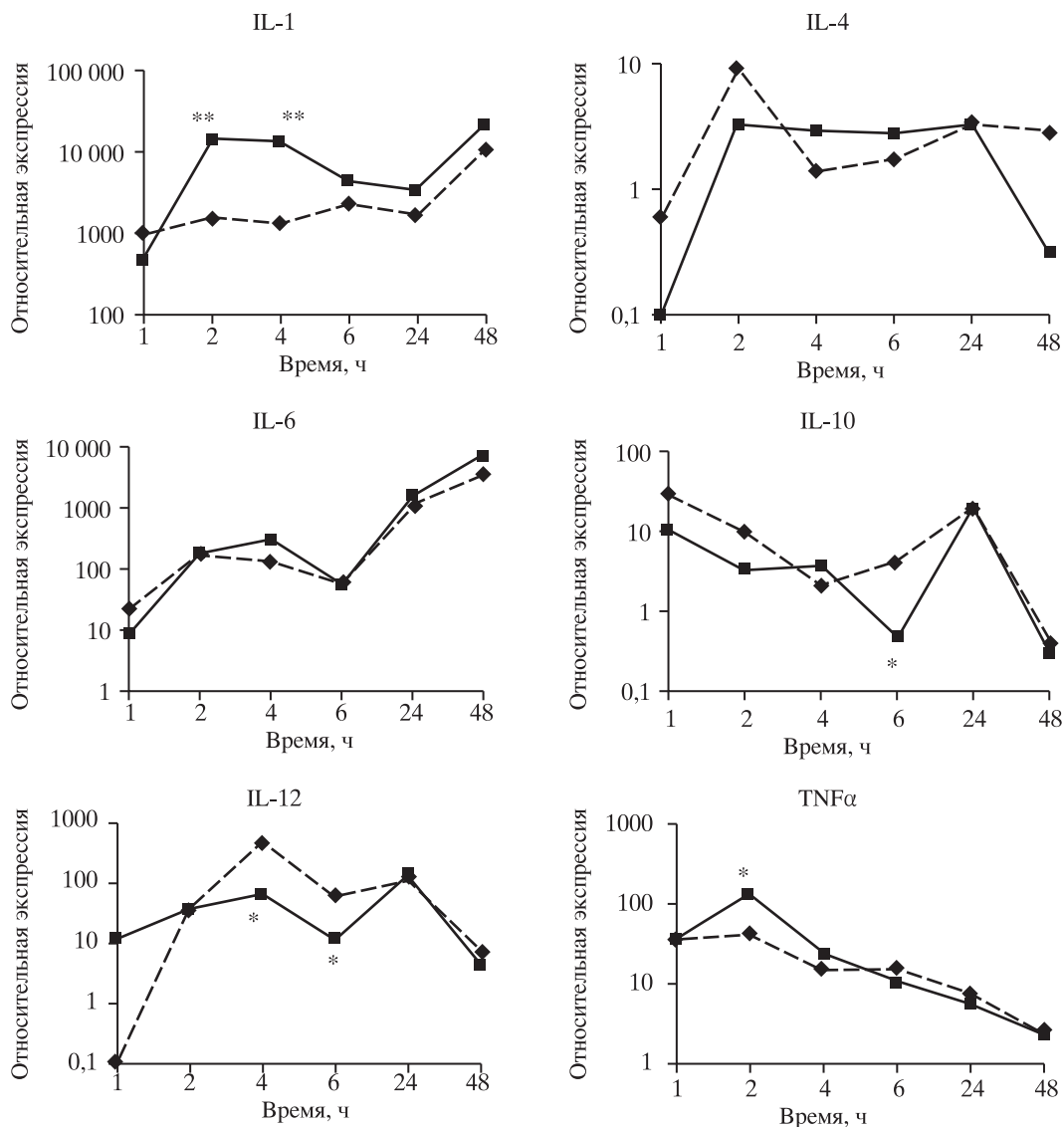
- 3) На первом месте по величине стимуляции экспрессии под влиянием ГМДП находится TGF- $\beta$ , а ЛПС практически не влияет на его экспрессию.
- 4) Воспалительный ответ, индуцированный ГМДП, характеризуется стимуляцией экспрессии в основном IL-1 и IL-12, а IL-6 и TNF- $\alpha$  находятся, в отличие от ЛПС, ближе к средним значениям величин стимуляции экспрессии.
- 5) ГМДП в начале раннего ответа примерно в три раза больше, чем ЛПС, стимулирует экспрессию i-NOS – фермента, который катализирует синтез важной в иммунной системе сигнальной молекулы NO.
- 6) ЛПС и ГМДП взаимно влияют на экспрессию своих рецепторов и их белков-адаптеров, стимулируя ее в определенные промежутки времени, причем особенно значителен эффект стимуляции ЛПС на экспрессию NOD2, а ГМДП на экспрессию белка-адаптера TLR4 – MyD88.

Таким образом, можно сделать вывод о значительной разнице в ответах макрофагальных клеток на ЛПС и ГМДП, несмотря на единый источник их происхождения и взаимное влияние их рецепторных белков.

### 3. Анализ экспрессии м-РНК генов клетками J774 при одновременном действии ЛПС и ГМДП

Для углубленного понимания механизма иммуномодулирующего действия ГМДП при инфекционных процессах нами были выбраны две схемы эксперимента. В первой ГМДП использовался в модели развивающегося воспаления, через 2 часа после начала действия ЛПС на клетки; во второй ГМДП имитировал профилактическое и последующее лечебное применение лекарственного средства и добавлялся к клеткам за 2 часа до начала действия ЛПС. Полученные результаты представлены в **табл. 3** и **4**.

Из данных **табл. 3** следует, что стимуляция экспрессии м-РНК провоспалительных факторов сохраняется при действии ГМДП на клетки, активированные ЛПС. Это видно, если расположить величины экспрессии генов по убыванию независимо от времени тестирования: на первом месте сохраняется IL-1 и далее IL-6 > Ступ4 > TNF- $\alpha$  = IL-12. Интересно отметить, что в этой последовательности появляется Ступ4, который считается наиболее бактерицидным пептидом среди дефензинов [23].



**Рис. 1.** Сравнение экспериментальных данных м-РНК экспрессии из табл. 3 (сплошная линия) и расчетных данных, полученных из табл. 1 и 2 (пунктирная линия).

Наиболее наглядно влияние совместного действия ЛПС и ГМДП в этой схеме эксперимента можно оценить, если сравнить экспериментальные данные экспрессии м-РНК из табл. 3 с рассчитанными значениями. Каждое рассчитанное значение является суммой отдельных значений для ЛПС и ГМДП, соответствующих по времени тестирования и полученных из данных табл. 1 и 2.

На рис. 1 сравниваются экспериментальные и рассчитанные кривые зависимости экспрессии от времени совместного действия ЛПС и ГМДП. Для IL-1, TNFα и Стур4 наблюдаются значительное превышение экспериментальных данных над рассчитанными в ранний период ответа и совпадение в более

поздний период за исключением IL-1, для которого в конце позднего ответа экспериментальные значения в два раза больше рассчитанных. Для IL-6 также наблюдается превышение экспериментальных значений над рассчитанными, но в период позднего ответа. Экспериментальная кривая для IL-12 имеет два максимума, которые немного больше рассчитанных, причем ее первый максимум сдвинут к большему времени. Таким образом, в данной схеме эксперимента все перечисленные выше цитокины формируют значительный воспалительный ответ и определяют синергизм действия ЛПС и ГМДП.

В то же время развитие воспаления при участии ГМДП должно сопровождаться уси-

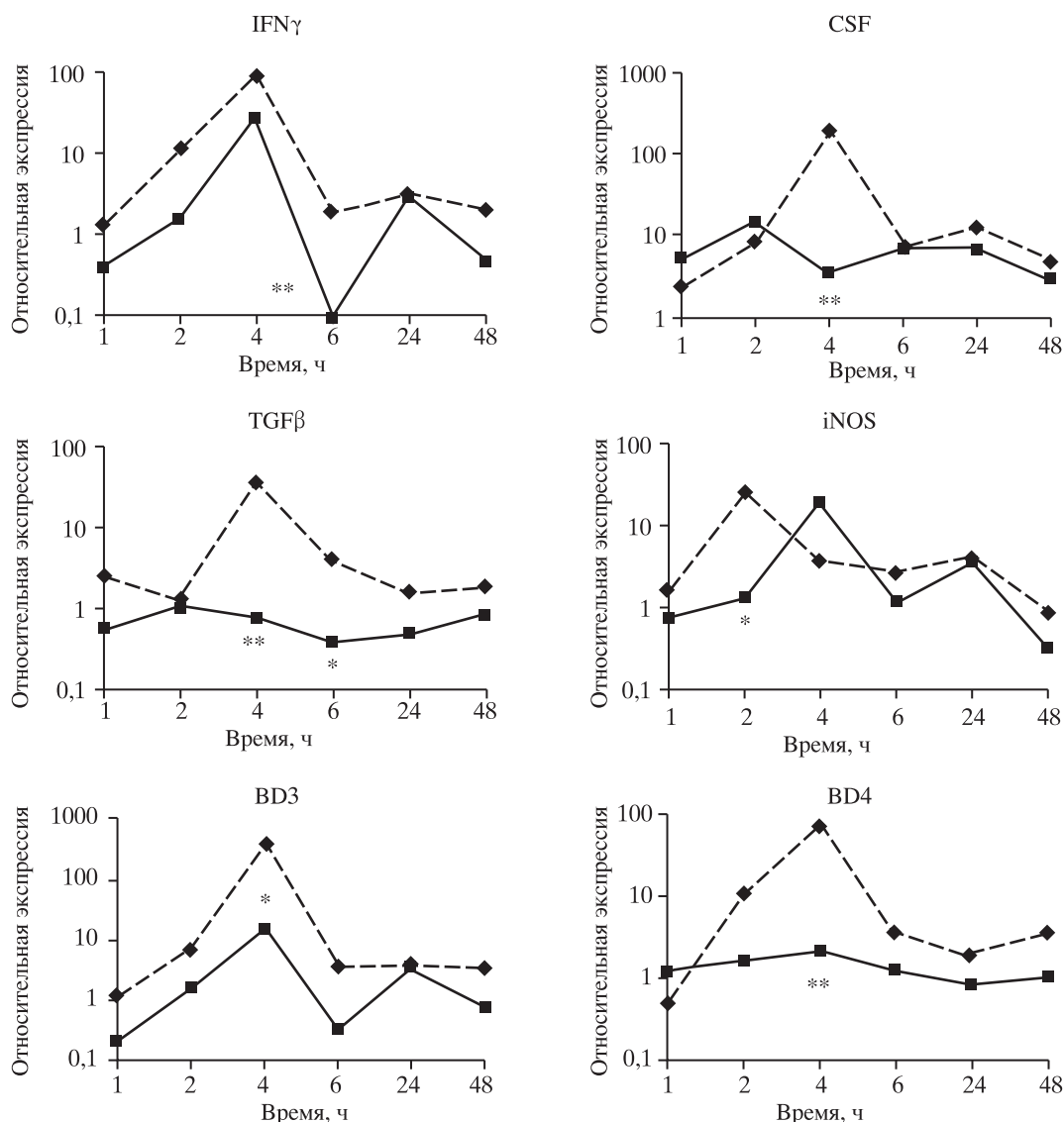


Рис. 1 (продолжение).

лением антимикробного действия за счет значительного роста экспрессии *Стур4*. Также следует отметить, что для IFN- $\gamma$ , обладающего противовирусной активностью, рассчитанное ингибирование экспрессии заменяется в эксперименте заметным стимулированием в середине раннего ответа. Для CSF и BD3 сохраняется стимулирование экспрессии их м-РНК, однако исчезают значительные максимумы на рассчитанных кривых, возникающих за счет действия ЛПС. Экспериментальные кривые BD4, TGF- $\beta$  весьма близки к нулевой линии.

Для рецептора ЛПС TLR4 и его белка-адаптера MyD88 под действием ГМДП в эксперименте наблюдается небольшое ингибирование

экспрессии м-РНК, в то время как рассчитанные данные соответствуют ее стимуляции, особенно значительной для TLR4. Для рецептора ГМДП, NOD2 экспериментальная кривая сохраняет положительные значения от 5 до 14 единиц, однако максимум, характерный для рассчитанной кривой, исчезает. Экспериментальная кривая RIP2 также соответствует значительной экспрессии м-РНК этого фермента, в то время как рассчитанная кривая демонстрирует сильное ингибирование в раннем ответе. Продолжительная экспрессия пары белков NOD2 RIP2 может поддерживать направление развития ответа, характерного для действия ГМДП.

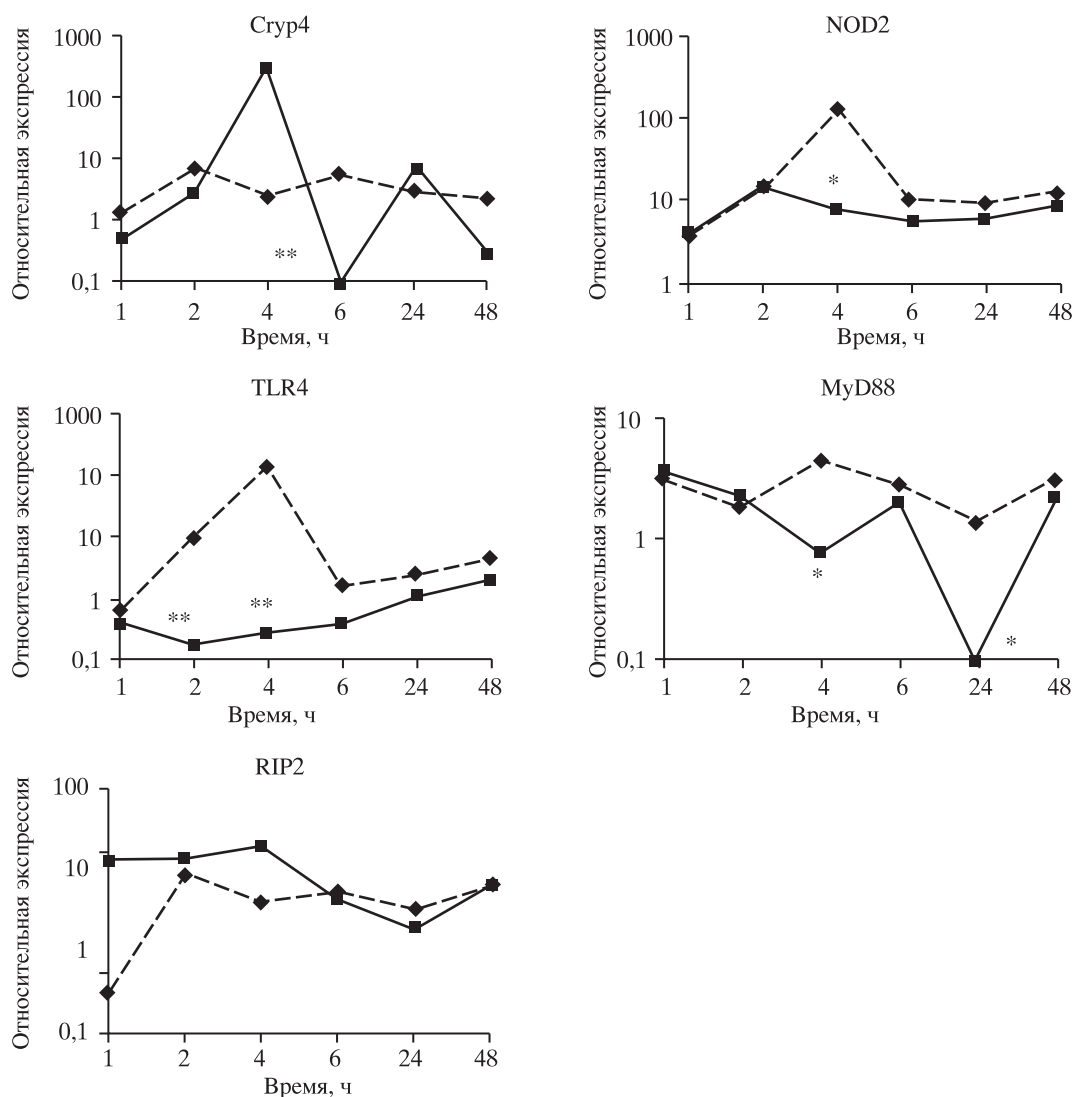


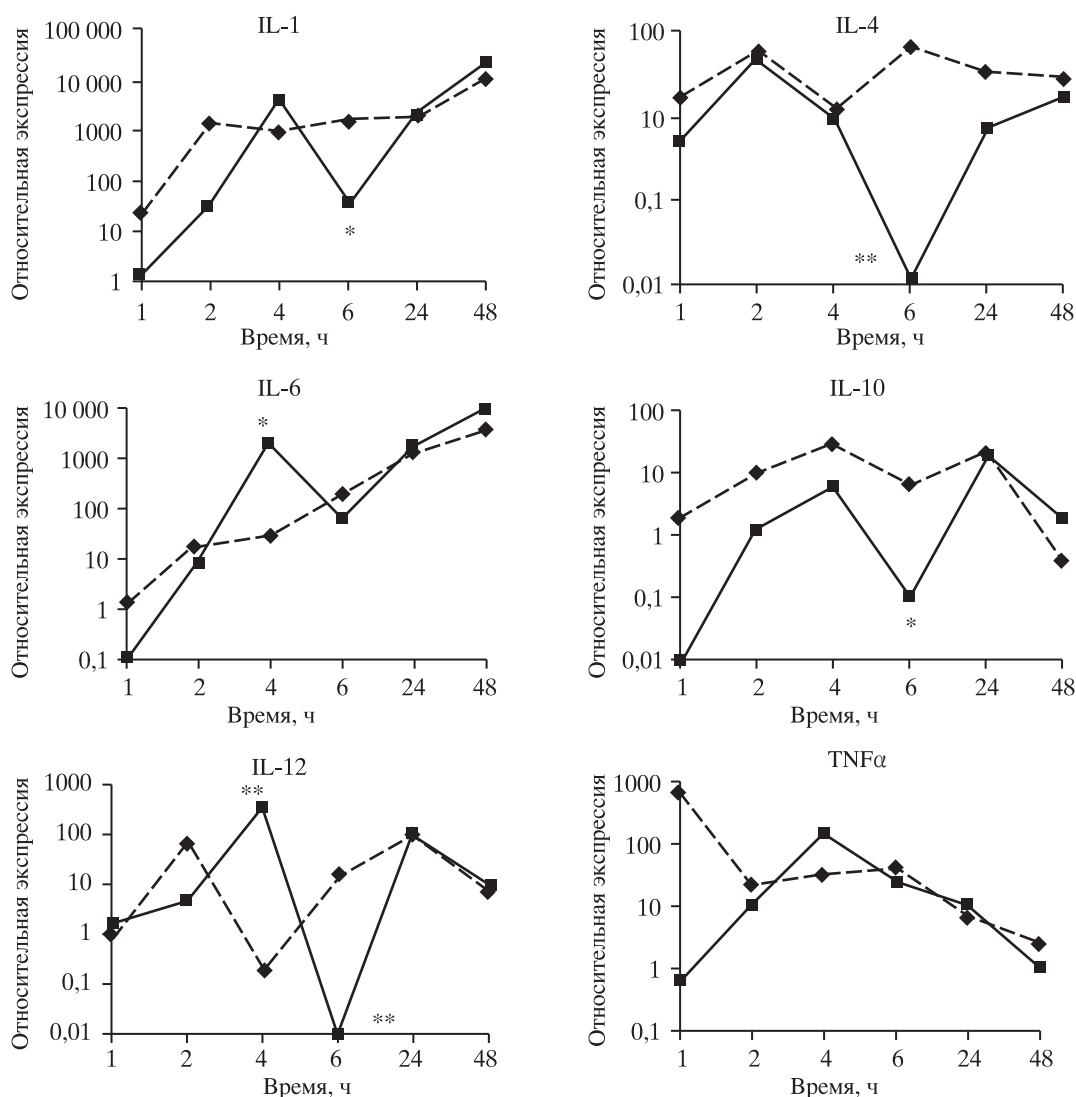
Рис. 1 (продолжение).

Таким образом, особенности действия ГМДП на развитие воспалительного ответа характеризуются большой степенью синергизма эффекта ГМДП и ЛПС в стимуляции провоспалительных цитокинов, дефенсина Стр4, а также уменьшением стимуляции экспрессии м-РНК CSF и BD3 в раннем ответе и практически отсутствием ее для TGF- $\beta$  и BD4. В отношении белков, формирующих развитие NF- $\kappa$ B пути, ГМДП действует разнонаправленно — поддерживает стимуляцию экспрессии своего рецептора NOD2 и его адаптера RIP2 как в раннем, так и в позднем ответе и отменяет стимуляцию экспрессии TLR4 и MyD88.

Табл. 4 и рис. 2 содержат результаты предварительного действия ГМДП на экспрессию

м-РНК исследованных генов в ходе развития воспалительного ответа. При сравнении данных табл. 3 и 4 видно, что максимум величины экспрессии IL-1 в середине раннего ответа в 3,5 раза меньше соответствующей величины, полученной в предыдущем опыте совместного действия ГМДП и ЛПС. Особенно сильно эффект уменьшения экспрессии IL-1 наблюдается в начале и конце раннего ответа, а для позднего ответа стимуляция экспрессии начинает сильно увеличиваться и сравнивается по величине в конце позднего ответа с результатом табл. 3. Похожую зависимость экспрессии демонстрирует IL-6: в начале ответа ингибирование экспрессии переходит в ее стимуляцию и в период позднего ответа она приближается по величине к соответствующей





**Рис. 2.** Сравнение экспериментальных данных м-РНК экспрессии из табл. 4 (сплошная линия) и расчетных данных, полученных из табл. 1 и 2 (пунктирная линия).

щим данным табл. 3. Однако оказалось, что в этой схеме опыта ГМДП в середине раннего ответа приблизительно в 8 раз сильнее стимулирует продукцию IL-6, чем в предыдущем опыте.

Большое изменение происходит после предварительного культивирования клеток с ГМДП в продукции TNF-α, особенно в самом начале раннего ответа, когда вместо сильной стимуляции экспрессии, индуцированной в основном ЛПС (рассчитанная кривая рис. 2), обнаружено незначительное ингибирование, но в середине раннего ответа все же наблюдается синергический рост экспрессии. Экспрессия м-РНК IL-12 также в начале раннего ответа стимулируется очень слабо, потом стремительно увеличивается, почти сравнива-

ясь по величине с данными предыдущего опыта. При сопоставлении экспериментальных и рассчитанных кривых IL-10 на рис. 2 хорошо видно достаточно сильное ингибирование экспрессии в опыте вместо рассчитанной слабой стимуляции в конце раннего ответа, а также совпадение кривых в начале позднего ответа. Если для IFN-γ предыдущая схема опыта обеспечила существенное увеличение экспрессии его м-РНК в середине раннего ответа, то последний вариант совместного культивирования ГМДП и ЛПС привел к почти полному ее ингибированию, за исключением одного случая в начале раннего ответа. Для CSF данные табл. 3 и 4 весьма похожи, но в конце раннего ответа ингибирование экспрессии вызвано предварительным культивированием клеток

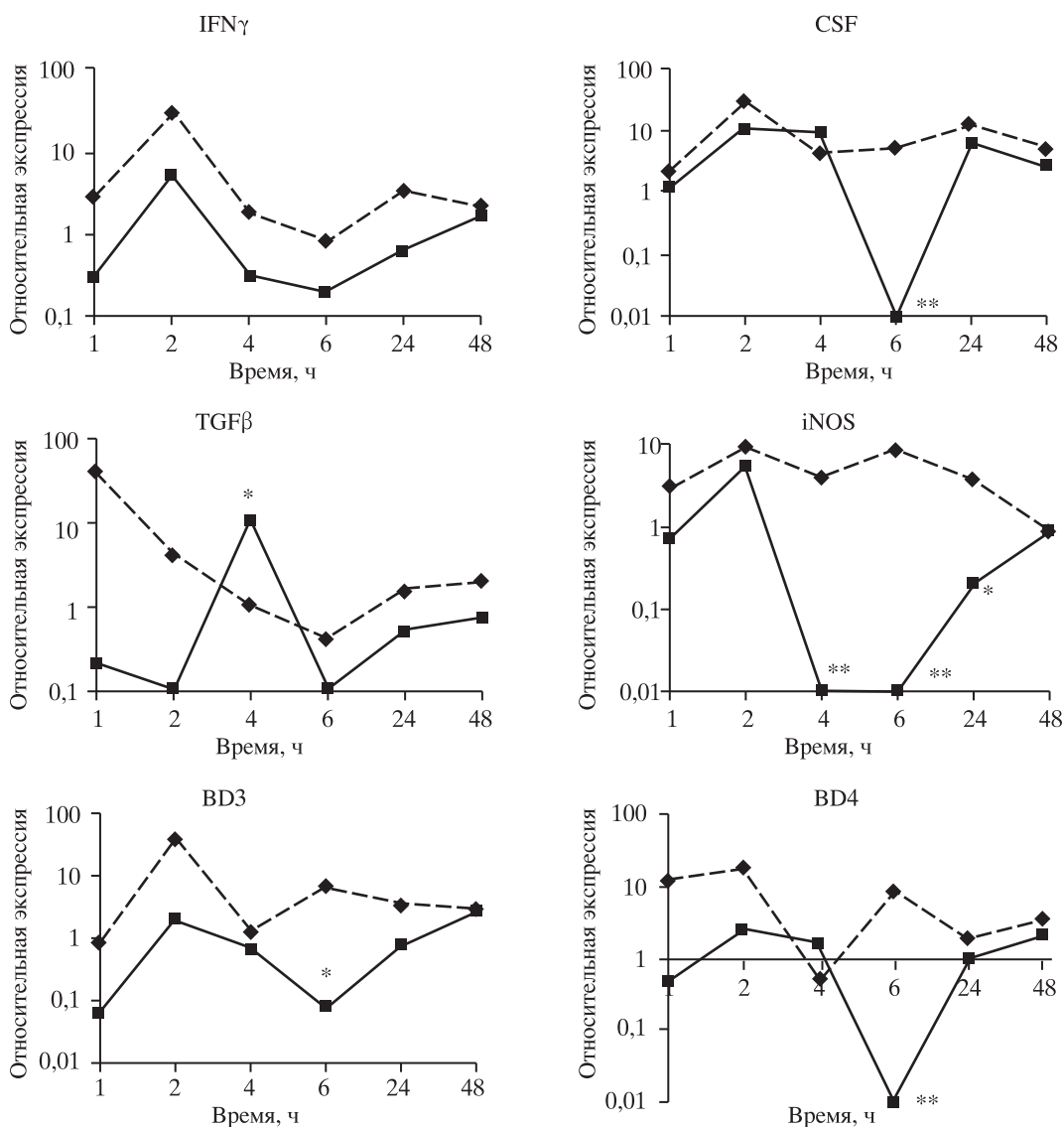


Рис. 2 (продолжение)

с ГМДП. Преобладание ингибирования над экспрессией отмечается также для TGF- $\beta$  и i-NOS (табл. 4), причем для последнего гена наблюдается эффект синергизма в действии ГМДП и ЛПС (рис. 2) в период раннего ответа. Для дефенсинов также присутствует ингибирование продукции м-РНК.

Экспрессия NOD2 рецептора по данным табл. 4 слабо стимулирована в середине раннего и в конце позднего ответа, а ее значительное ингибирование присутствует в конце раннего ответа. Для TLR4 можно отметить или отсутствие влияния предварительного введения ГМДП на экспрессию его м-РНК или ее ингибирование. Сравнение рассчитанных и экспериментальных кривых на рис. 2 для RIP2

указывает на почти двукратное понижение стимуляции экспрессии в середине раннего ответа и даже ее ингибирование в его конце. В то же время для MyD88 присутствует синергическое увеличение стимуляции экспрессии в середине раннего ответа, однако, учитывая ингибирование экспрессии TLR4, вряд ли обнаруженный эффект оказывает активирующее влияние на развитие NF- $\kappa$ B пути.

Перечисленные факты влияния на воспалительный процесс предварительного культивирования клеток с ГМДП указывают на преобладание ингибирования экспрессии м-РНК для большинства исследованных цитокинов, дефенсинов и белков, участвующих в развитии NF- $\kappa$ B пути.

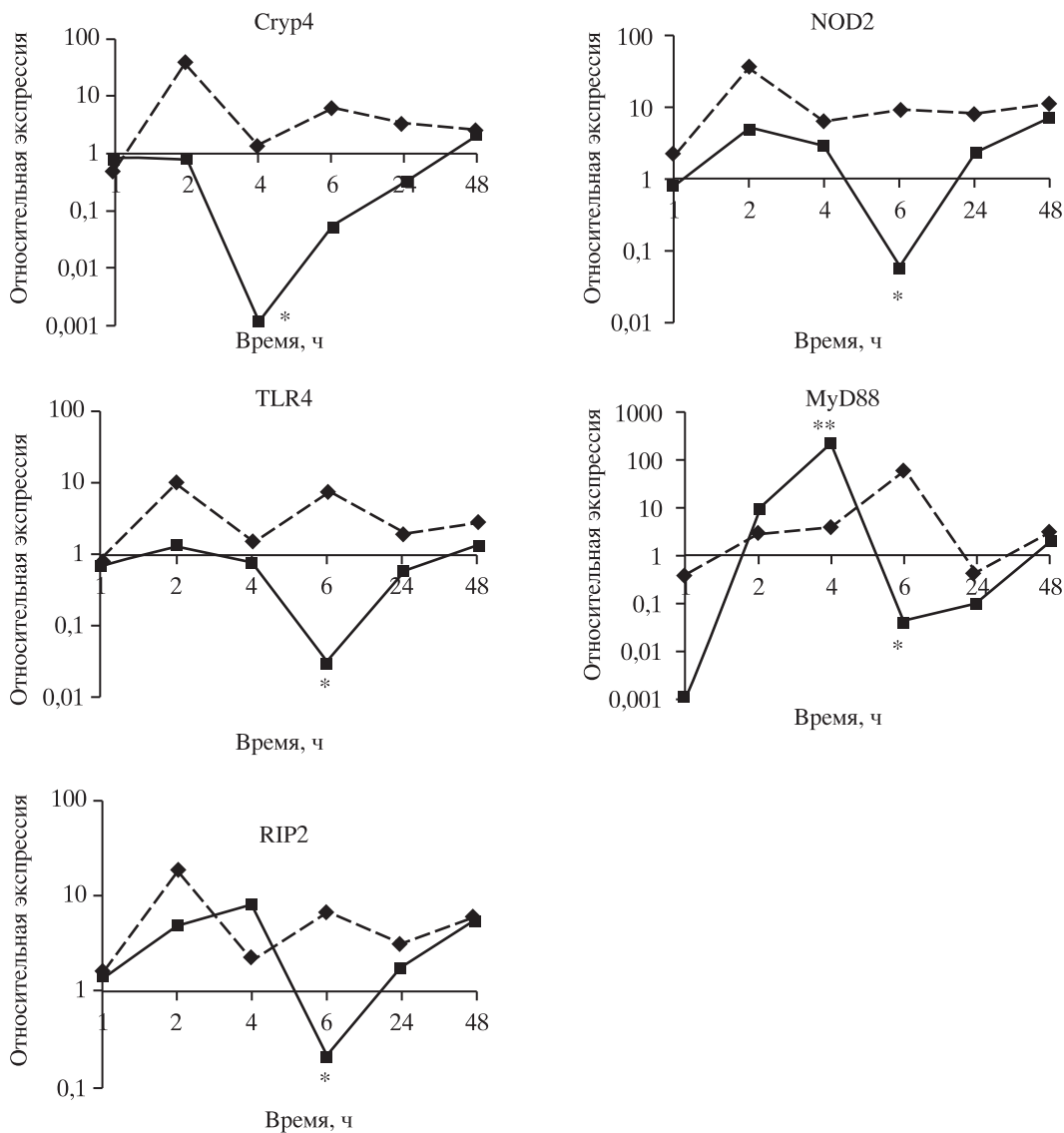


Рис. 2 (окончание).

**4. Влияние ГМДП, ЛПС и их комбинации на M1 и M2 дифференцировку J774 клеток**

По современным представлениям, активация макрофагов приводит к поляризации их функции и разделению на две субпопуляции – M1 и M2 [24, 25]. M1 или классические макрофаги отвечают за продукцию провоспалительных цитокинов и развитие воспалительного иммунного ответа. M2 или альтернативные макрофаги – это обобщенное название различных макрофагальных клеток, отличных от классических. M2 макрофаги могут продуцировать в основном противовоспалительные цитокины, выполнять иммунорегуляторную функцию, участвовать в процес-

сах восстановления ткани и поддержании роста опухолей.

В наших экспериментальных моделях воспаления ГМДП стимулировал развитие ответа как с усилением воспалительной реакции клеток (первая схема опыта), так и с преимущественным ингибированием (вторая схема опыта). В связи с этим представляло интерес определить: есть ли изменения в дифференцировке M1 и M2 клеток J774. С этой целью было проведено определение экспрессии мРНК маннозного рецептора (CD206), который считается маркером M2 макрофагов [26]. Результаты представлены в табл. 5. Мы исходили из того, что ингибирование экспрессии м-РНК CD206 должно соответствовать уменьшению субпопуляции M2 макрофагов и, сле-

**Таблица 4.** м-РНК экспрессия (превышение контроля) клетками J774 при совместной инкубации ГМДП и ЛПС после предварительного действия ГМДП в течение 2 ч.

| Ген           | Время совместной инкубации J774 с ГМДП и ЛПС (ч) |       |         |       |                |          |
|---------------|--|-------|---------|-------|----------------|----------|
|               | Ранний период                                    |       |         |       | Поздний период |          |
|               | 1  | 2     | 4       | 6     | 24             | 48       |
| IL-1          | 1,39   | 33,13 | 3956,48 | 40,50 | 2256,70        | 24322,43 |
| IL-4          | 0,50   | 4,60  | 0,86    | 0,04  | 0,65           | 1,59     |
| IL-6          | 0,12   | 9,00  | 2033,85 | 68,59 | 1758,34        | 9674,69  |
| IL-10         | nd   | 1,21  | 6,28    | 0,11  | 16,91          | 1,92     |
| IL-12         | 1,65   | 4,66  | 302,33  | 0,04  | 107,63         | 10,06    |
| TNF- $\alpha$ | 0,70   | 11,00 | 163,1   | 26,17 | 11,00          | 2,16     |
| IFN- $\gamma$ | 0,33   | 4,79  | 0,29    | 0,19  | 0,56           | 1,62     |
| CSF           | 1,20   | 10,48 | 9,58    | 0,04  | 6,36           | 2,89     |
| TGF- $\beta$  | 0,18   | 0,13  | 10,56   | 0,07  | 0,51           | 0,68     |
| iNOS          | 0,69   | 5,54  | 0,01    | 0,02  | 0,18           | 0,88     |
| BD3           | 0,06   | 2,06  | 0,65    | 0,08  | 0,81           | 2,69     |
| BD4           | 0,46   | 2,50  | 1,55    | 0     | 0,97           | 2,17     |
| Ccrp4         | 0,83   | 0,81  | nd      | 0,05  | 0,32           | 1,85     |
| NOD2          | 0,8  | 4,99  | 2,75    | 0,06  | 2,30           | 6,87     |
| TLR4          | 0,66   | 1,26  | 0,80    | 0,03  | 0,57           | 1,29     |
| MyD88         | nd   | 8,06  | 213,78  | 0,04  | 0,12           | 1,93     |
| RIP2          | 1,47   | 4,96  | 8,11    | 0,15  | 1,76           | 5,24     |

**Таблица 5.** м-РНК экспрессия (превышение контроля) гена CD206 клетками J774

| Стимулы         | Время инкубации (ч) |       |      |      |      |       |                |      |
|-----------------|---------------------|-------|------|------|------|-------|----------------|------|
|                 | Ранний период       |       |      |      |      |       | Поздний период |      |
|                 | 1                   | 2     | 3    | 4    | 6    | 8     | 24             | 48   |
| ЛПС             | 0,09                | 2,11  | 0,32 | 0,17 | 1,24 | 0,51  | 1,33           | 0,62 |
| ГМДП            | 0,15                | 0,77  | 0,53 | 1,07 | 0,15 | 19,20 | 3,61           | 1,64 |
| ЛПС (2) и ГМДП* | 0,53                | 0,49  |      | 4,32 | 0,17 |       | 2,79           | 0,75 |
| ГМДП(2ч) и ЛПС* | 0,29                | 12,38 |      | 0,26 | 0,03 |       | 0,37           | 2,22 |

\* Время совместной инкубации клеток J774 с ЛПС и ГМДП.

довательно, увеличению содержания их M1 популяции. Такая зависимость наблюдается при действии ЛПС на клетки J774, что подтверждает преобладание M1 макрофагов в развитии данного типа воспалительного ответа. Стимуляция клеток ГМДП в ранний период ответа также ингибирует экспрессию CD206, однако в конце раннего периода наблюдается заметный рост его экспрессии, который сохраняется и в начале позднего периода, то есть происходит рост содержания M2 макрофагов.

Совместная стимуляция ЛПС и ГМДП клеток J774 приводит к достаточно быстрой во времени смене дифференцировки M1 → M2. Так, для первой схемы эксперимента перво-

начальное преобладание клеток M1 в середине раннего ответа меняется на M2, в конце раннего ответа вновь растет популяция M1, которая в начале позднего ответа вновь сменяется на рост M2. Интересно отметить, что рассчитанная кривая зависимости экспрессии от времени в ранний период ответа демонстрирует значительное преобладание M1 макрофагов по сравнению с экспериментальной кривой (**рис. 3А**). Этот же эффект, но в меньшей степени наблюдается и в конце раннего периода. В целом совместная стимуляция ЛПС и ГМДП клеток по этой схеме опыта поддерживает определенное равновесие в соотношении M1 и M2 макрофагов и исключает значительный рост M1 субпопу-

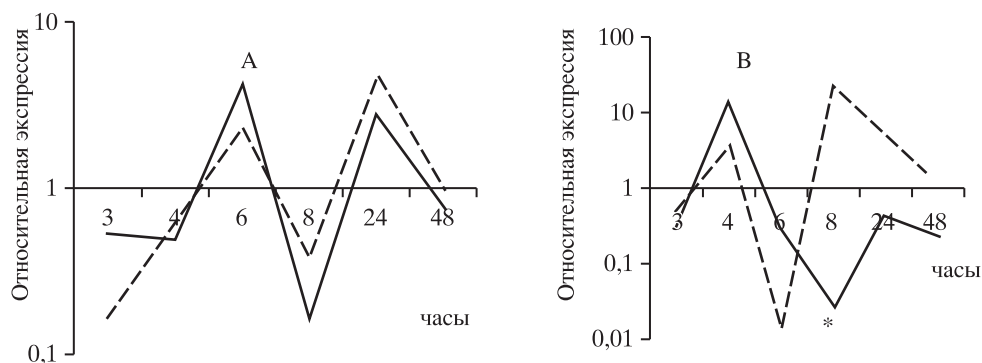
Таблица 6. Нуклеотидные последовательности праймеров и условия ПЦР

| Ген           | Праймеры (прямой – f, обратный – r) | Температура отжига | Ссылки |
|---------------|-------------------------------------|--------------------|--------|
| HPRT1         | f 5'-gaggagtctctgtgatgtgccag-3'     | 59°C               | 28     |
| Ген сравнения | r 5'-ggctggcctataggctcatagtgc-3'    |                    |        |
| IL-1 $\beta$  | F5'-caaccaacaagtgatattctccatg-3'    | 65°C               | 29     |
|               | r 5'-gatccacactctccagctgca-3'       |                    |        |
| IL-4          | f 5'-acaggagaagggacgcat-3'          | 60°C               | 29     |
|               | r 5'-gaagccctacagacgagctca-3'       |                    |        |
| IL-6          | f 5'-atgaacaacgatgatgacttg-3'       | 59°C               | 36     |
|               | r 5'-tatccagtttgtagcatccat-3'       |                    |        |
| IL-10         | f 5'-ggttgccaagccttatcgga-3'        | 60°C               | 29     |
|               | r 5'-acctgctccactgccttgct-3'        |                    |        |
| IL-12         | f 5'-ggaagcagggcagcagaata-3'        | 60°C               | 29     |
|               | r 5'-aacttgaggagaagtaggaatgg-3'     |                    |        |
| TNF- $\alpha$ | f 5'-gggacagtgcactggactgt-3'        | 68°C               | 38     |
|               | r 5'-ctccttgacagaactcaagg-3'        |                    |        |
| IFN- $\gamma$ | f 5'-tcaagtggcatagatgtggaaga-3'     | 60°C               | 29     |
|               | r 5'-tggtctgcaggatttcatg-3'         |                    |        |
| CSF           | f 5'-catccaggcagagactgaca-3'        | 55°C               | 30     |
|               | r 5'-cttgctgatcctcctccag-3'         |                    |        |
| TGF- $\beta$  | f 5'-tgacgtcactggagtgtacgg-3'       | 68°C               | 29     |
|               | r 5'-ggttcatgtcatggatgggtgc-3'      |                    |        |
| i-NOS         | f 5'-cagctgggtgtacaacctt-3'         | 60°C               | 29     |
|               | r 5'-cattggaagtgaagcgtttcc-3'       |                    |        |
| BD3           | f 5'-atccattaccttctgtttgcattc-3'    | 60°C               | 35     |
|               | r 5'-tgtaggtggagacagcagc-3'         |                    |        |
| BD4           | f 5'-cacatttctcctgtgtctct-3'        | 60°C               | 35     |
|               | r 5'-tgataattgggtaaggctgca-3'       |                    |        |
| Сгуп4         | f 5'-gtccaggctgatcctatcca-3'        | 60°C               | 34     |
|               | r 5'-ggggcagcagtacaaaaatc-3'        |                    |        |
| NOD2          | f 5'-caacatctcccacagattgtaatcc-3'   | 65°C               | 31     |
|               | r 5'-ggcacctgaagttgacatttgc-3'      |                    |        |
| RIP2          | f 5'-atgccacctgagaactatgagcca-3'    | 60°C               | 39     |
|               | r 5'-gcaaaggattggtagctcttc-3'       |                    |        |
| TLR4          | f 5'-agaaattcctgcagtggtca-3'        | 60°C               | 40     |
|               | r 5'-tctctacaggtgttcacatgtca-3'     |                    |        |
| MyD88         | f 5'-cactcgcagttgttgatg-3'          | 60°C               | 41     |
|               | r 5'-tctggaagtcacattcctgc-3'        |                    |        |
| CD206         | f 5'-tctttgccttcccagttcc-3'         | 60°C               | 33     |
|               | r 5'-tgacaccagcggaaatttc-3'         |                    |        |

ляции, причем особенно заметная коррекция наблюдается в начале и середине раннего ответа. Последний факт вновь подтверждает вывод, сделанный ранее, о заметном влиянии ГМДП на развитие воспалительных реакций в ранний период ответа.

Стимуляция клеток J774 по второй схеме приводит к значительному росту содержания M2 субпопуляции в середине раннего ответа, что хорошо согласуется с обнаруженным в нашей работе уменьшением продукции м-РНК провоспалительных цитокинов (рис. 3В). В конце раннего ответа вновь наблюдается преимущественное содержание M1 макро-

фагов, которое исчезает в поздний период ответа. Резкий переход к преимущественному содержанию M1 макрофагов в конце раннего ответа в эксперименте контрастирует с рассчитанными данными для этого периода совместной ЛПС и ГМДП стимуляции клеток. Таким образом, профилактическое введение ГМДП, приводящее к увеличению содержания M2 субпопуляции клеток, прекращает смещать дифференцировку макрофагов в сторону противоспалительных цитокинов в конце раннего ответа, и вновь начинают преобладать макрофаги классического типа M1.



**Рис. 3.** Сравнение экспериментальных (сплошная линия) и расчетных (пунктирная линия) данных м-РНК экспрессии CD206, полученных из табл. 5. **А** и **В** представляют результаты для первой и второй схем эксперимента 3 соответственно.

Полученные результаты позволяют заключить, что действие на культуру макрофагальных клеток даже одним стимулом вызывает зависимость от времени M1 и M2 дифференцировку клеток. Совместная костимуляция двумя стимулами значительно усложняет дифференцировку клеток, однако позволяет более гибко влиять на нее с помощью различных схем введения стимулов и получать желаемое изменение в соотношении M1 и M2 макрофагов.

Результаты настоящей работы демонстрируют на примере ГМДП широкие возможности корректирующего влияния мурамилпептидов на ход развития воспалительного процесса. Решающим фактором становится схема применения этого класса гликопептидов, в которой следует принимать во внимание как время, так и периодичность их введения, поскольку их действие ограничено в основном ранним иммунным ответом.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из результатов представленной работы следуют определенные выводы о природе биологического действия ГМДП. Так, пирогенный эффект пептида можно объяснить значительной стимуляцией синтеза таких сильных пирогенов, как IL-1 и IL-6, а способность увеличивать продукцию антител — продолжительным по времени ростом содержания цитокина с адьювантными свойствами IL-12. Защитные свойства ГМДП против патогенов согласуются с обнаруженным нами увеличением продукции  $\alpha$ -дефенсина с сильным антибактериальным свойством — Стрп4. Противоопухолевая активность ГМДП вполне возможно зависит от его способности влиять

на синтез CSF и TGF- $\beta$ , хотя роль последнего в развитии опухоли двойственна [42]. Обширный перечень биологических активностей ГМДП, несомненно, также является следствием функционирования сигнальной молекулы NO, на продукцию которой он оказывает воздействие. Синергизм действия ЛПС и ГМДП, обнаруженный также ранее во многих исследованиях [43–46], возможно объяснить взаимным влиянием их рецепторов, которое ярко выражено в виде обнаруженной нами стимуляции продукции м-РНК рецептора ГМДП — NOD2 при действии ЛПС.

ГМДП в двух моделях воспалительного ответа продемонстрировал способность вызывать прямо противоположное действие. В модели быстро развивающегося воспаления ГМДП усиливал воспалительный ответ, а в качестве профилактического средства отменял развитие воспаления. Таким образом, ГМДП так же, как и другие мурамилпептиды, является ценным инструментом в руках исследователей и медиков для поиска новых способов и приемов лечения заболеваний различных этиологий.

## БЛАГОДАРНОСТИ

*Работа выполнена при финансовой поддержке ЗАО «ПЕПТЕК». Авторы выражают благодарность г.м.н. профессору Козлову И.Г. за обсуждение результатов и ценные замечания.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lederer E. Synthetic immunostimulants derived from bacterial cell. Wall. J. Med. Chem. 1980, 8, 819–825.

2. Adam A., Petit J.-F., Lefrancier P., Lederer E. Muramyl peptides. *Developments in Molecular and Cellular Biochemistry* 1981, 2, 27–47.
3. Warrant H.S., Vogel F.R., Chedid L.A. Current status of immunological adjuvants. *Ann Rev Immunol.* 1986, 4, 1584–1587.
4. Andronova T.M., Ivanov V.T. The structure and immunomodulating function of glucosaminylmuramyl peptides. *Sov. Medical Review D. Immunology* 1991, 4, 1–63.
5. Traub S., von Aulock S., Hartung T., Hermann C. MDP and other muropeptides – direct and synergistic effects on the immune system. *J. Endotoxin. Res.* 2006, 12, 69–85.
6. Ogawa C., Liu Y.-J., Kobayashi K.S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant and immunological disorders and cancer therapy. *Curr Bioact Compd.* 2011, 7, 180–197.
7. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.J., Philpott D.J., Sansonetti P.J., Mengin-Lecreulx D. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by NOD1 and NOD2. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 41702–41708.
8. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP). *J. Biol. Chem.* 278, 8869–8872.
9. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukas K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implication for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 5509–5512.
10. O'Reilly T., Zak O. Enhancement of the effectiveness of antimicrobial therapy by muramyl peptide immunomodulators. *Clin Infect Dis.* 1992, 14, 1100–1109.
11. Yanagawa H., Haku T., Takeuchi E., Suzuki Y., Nokihara H., Sone S. Intrapleural therapy with MDP-Lys(L18), a synthetic derivative of muramyl dipeptide, against malignant pleurisy associated with lung cancer. *LUNG cancer* 2000 27, 67073.
12. Ueda H., Yamazaki M. Induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  in solid tumor region by the orally administrated synthetic muramyl dipeptide analog, romurtide. *Int. Immunopharmacol.* 2001, 1, 97–104.
13. Fujimura T., Yamasaki K., Hidaka T., Ito Y., Aiba S. A synthetic NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys(L18) and IFN- $\beta$  synergistically induce dendritic cell maturation with augmented IL-12 production and suppress melanoma growth. *J. Dermatol. Sci.* 2011, 62, 107–115.
14. Андронова Т.М. Опыт применения иммуномодулятора Ликопида у больных с бактериальным вагинозом. *Иммунология* 1998, 5, 63–64. [Andronova T.M. The experience of immunomodulator Licopid application for patients with bacterial vaginosis. *Immunology (Russian)* 1998, 5, 63–64.]
15. Андропова Н.В. Применение нового иммуномодулятора в комплексном лечении больных с трофическими язвами. Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии 1998, 261. [Andropova N.V. The application of new immunomodulator in complex treatment of patients with trophic ulser. *Morden problems of allergology, clinical immunology and immunopharmacology* 1998, 261.]
16. Артемьев М.Е. Клинико-иммунологическая эффективность ликопида при консервативном лечении больных хроническим тонзиллитом и хроническим синуситом. Вестник оториноларингологии 2001, 5, 26–28. [Artemyev M.E. Clinico-immunological effectivity of licopid in conserved treatment of patients with chronical tonsillitis and chronical sinusitis. *Vestnik of otolaryngology* 2001, 5, 26–28.]
17. Андронова Т.М. Применение иммуномодулятора Ликопида в комплексном лечении туберкулеза легких. Проблемы туберкулеза 2002, 3, 21–25. [Andronova T.M. The application of immunomodulator Licopid in complex treatment of lung tuberculosis. *Problems of tuberculosis* 2002, 3, 21–25.]
18. Смирнова И.В. Профилактика гнойных воспалительных заболеваний придатков матки с помощью иммуномодулятора «Ликопид». Иммунопатология, аллергология, инфектология 2004, 2, 25–28. [Smirnova I.V. Prophylaxis of festering inflammation diseases of uterine appendages by immunomodulator «Licopid». *Immunopathology, Allergology, and Infectology* 2004, 2, 25–28.]
19. Астон Р. Возможности использования препарата ГМДП для профилактики и лечения гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде. *Terra Medica* 2004, 32, 2–3. [Aston R. The possibility of GMDP compound using for prophylaxis and treatment of festering and septic complications in post operation period. *Terra Medica* 2004, 32, 2–3.]
20. Винницкий Л.И., Бунятин К.А., Инвьяева Е.В. Профилактика и лечение инфекционных осложнений в хирургической клинике. Аллергология и иммунология 2008, 9, 464–465. [Vinnitzkiy L.I., Bunyatin K.A., Inviyayeva E.V. The prophylaxis and treatment of complications in surgical practice. *Allergology and immunology* 2008, 9, 464–465.]
21. Boyaka P.N., Lillard J.W. Jr., McGhee J. Interleukin 12 and innate molecules for enhanced mucosal immunity. *Immunol Res.* 1999, 20, 207–217.
22. Савинов Г.В., Шепеляковская А.О., Бозиев Х.М., Бровко Ф.А., Ламан А.Г. Поиск лиганда ГМДП с использованием его пептидного миметика. *Биохимия* 2014, 79, 178–186. [Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Brovko F.A.,

- Laman A.G. Searching for GMDP's ligand using its peptide mimetic. *Biochemistry (Russian)* 2014, 79, 178–186.]
23. Ouelelette A.J., Darmoul D., Tran D., Huttner K.M. Peptide localization and gene structure of Cryptdin 4, a differentially expressed mouse paneth cell  $\alpha$ -defensin. *Infect Immun.* 1999, 66, 43–51.
  24. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 2012, 122, 787–795.
  25. Benoit M., Desnues B., Mege J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* 2008, 181, 3733–3739.
  26. Madsen D.H., Leonard D., Masedunskas A., Moyer A., Jurgensen H.J., Peters D.E., Amorphimoltham P., Selvaraj A., Yamada S.S., Brenner D.A., Burgdorf S., Engelholm L.H., Behrendt N., Holmbeck K., Weigert R., Bugge T.H. M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway. *J. Cell. Biol.* 2013, 202, 951–966.
  27. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2<sup>(-Delta Delta C)</sup> method. *Methods* 2001, 25, 402–408.
  28. Stephens A.S., Stephens S.R., Morrison N.A. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res. Notes* 2011 Oct. 14, 4, 410.
  29. Overbergh L., Valckx D., Waer M., Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 1999 Apr. 11(4), 305–312.
  30. Wittrant Y., Gorin Y., Mohan S., Wagner B., Abbot-Werner S.L. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) expression by osteoblasts. *Endocrinology* 2009, 150, 4977–4988.
  31. Petnicki-Ocwiega T., Hrcir T., Liu Y.J., Biswas F., Hudcovic T., Tlaskalova-Hogenova H., Kobayashi K.S. NOD2 is required for regulation of commensal microbiota in the intestine. *PNAS* 2009, 106, 15813–15818.
  32. Tao Y., Chen Y.J., Shen C., Luo Z., Bates C.R., Lee D., Marchetto S., Gao T.M., Borg J.P., Xiong W.C., Mei L. Erbin interacts with TARP gamma-2 for surface expression of AMPA receptors in cortical interneurons. *Nat. Neurosci.* 2013, 16, 290–299.
  33. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly DJ and Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. of Neuroscience* 2009, 29, 13435–13444.
  34. Com E., Bourgeon F., Evrard B., Ganz T., Collet D., Jegou B., Pineau C. Expression of antimicrobial defensins in male reproductive tract of rats, mice and humans. *Biology of reproduction* 2003, 68, 95–104.
  35. Kolar S.S., Baidouri V., Hanlon S., McDermott. Protective role of murine beta defensins 3 and 4 and cathelin-related antimicrobial peptide in *Fusariumsolani* keratitis. *Infect. Immunity* 2013, 81, 2669–2677.
  36. van Neerven S., Nemes A., Imholz P., Regen T., Denecke B., Johann S., Beyer C., Hanish U.K., Mey J. Inflammatory cytokine release of astrocytes in vitro is reduced by all-trans retinoic acid. *J. Neuroimmunol.* 2010, 229, 169–179.
  37. Lu Z.H., Books J.T., Ley T.J. Cold shock domain family members YB-1 and MSY4 share essential functions during murine embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 8410–8417.
  38. Horiuchi T., Mitoma H., Harashima S., Tsukamoto H., Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 2010, 49, 1215–1228.
  39. Kobayashi K., Inohara N., Hernandez L.D., Galan J.E., Nunez G., Janeway C.A., Medzhitov R., Flavell R.A. RICK/RIP2/CARDIAK mediates signaling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* 2002, 416, 68877.
  40. Paul-Clark M.J., Mc Master S.C., Belcher E., Sorrentino R., Anandarajah J., Fleet M., Sriskandan S., Mitchel J. Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNF alfa in macrophages: role of TLRs in synergy between two. *Br. J. Pharmacol.* 2006, 148, 1067–1075.
  41. Vickers T.A., Zhang H., Graham M.J., Lemonidis K.M., Zhao C., Dean N.M. Modification of MyD88 mRNA splicing and inhibition of Il-1 $\beta$  signaling in cell culture and in mice with 2'-O-methoxyethyl-modified oligonucleotide. *J. Immunol.* 2006, 176, 3652–3661.
  42. Lebrun J.J. The dual role of TGF- $\beta$  in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. *Review Int. Schol. Res. Net. Mol. Biol.*, v. 2012, art. 381428.
  43. Galelli A., Chedid L. Induction of colony-stimulating activity (CSA) by a synthetic muramyl peptide (MDP): synergism with LPS and activity in C3H/HeJ mice and endotoxin-tolerized mice. *J. Immunol.* 1986, 13, 3211–3215.
  44. Ikebe T., Hirata M., Yanaga F., Koga T. Synergism between muramyl dipeptide and lipopolysaccharide in the inhibition of glucosaminoglycansynthesis in cultured rat costal chondrocytes. *Ann Rheum Dis.* 1993, 52, 32–36.
  45. Meshcheryakova E., Gurianova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacology* 2001, 1, 1857–1865.
  46. Van der Meer J.H.M., Netear M.G., Dinarello C.A. Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. *Clin. Exp. Immunol.* 2009, 156, 428–433.



## THE ROLE OF MURAMYLPEPTIDES IN CELLULAR MODEL OF INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE

© 2015 г. E.A. Meshcheryakova\*, L.G. Alekseeva\*, T.M. Andronova\*\*

\*M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia;

\*\*Joint-Stock Company «PEPTEK», Moscow, Russia

Received: 24.09.2015. Accepted: 05.10.2015

The influence of disaccharide muramylpeptide (GMDP) on inflammation stimulated by two methods with LPS of cellular line J774 investigated by PCR method. It was revealed that GMDP synergizing enhanced earlier immune inflammation response, caused by LPS. Synergism of GMDP and LPS action could be explained by essential LPS stimulation of m-RNA expression of GMDP receptor – NOD2. Preliminary incubation J774 cells with GMDP significantly reduced inflammation response induced by LPS, which was accompanied by differentiation of cells towards more content of M2 subpopulation. The results of this study demonstrate of abundant resources of muramylpeptides in correction of immune reactions.

*Key words:* muramyl peptides, polymerase chain reaction, inflammation

### Authors

**Meshcheryakova E.A.**, ✉ Ph.D., research officer, Moscow, Russian Federation. 117997, Russian Federation, Moscow, GSP-7, Ulitsa Miklukho-Maklaya, 16/10, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences. Tel/Fax: 7 (495) 335-08-12. **E-mail:** meshcheryakova.elena@mail.ru;

**Alekseeva L.G.**, Ph.D., senior research officer of the Department of Peptide chemistry Moscow, Russian Federation;

**Andronova T.M.**, Ph.D., president of Closed Stock Joint Company «Peptek», Moscow, Russian Federation.