

*На правах рукописи*

ГУРЬЯНОВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА  
БИОРЕГУЛЯТОРАМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.2.7. Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Екатеринбург – 2024

Работа выполнена в медицинском институте Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

**Научный консультант**

Доктор биологических наук, профессор

**Колесникова**

**Наталья Владиславовна**

**Официальные оппоненты**

Доктор биологических наук, доцент, заведующая Междисциплинарным научно-исследовательским центром, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России

**Плехова**

**Наталья Геннадьевна**

Доктор медицинских наук, профессор, директор «Института экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН - филиала ФГБУН Пермского федерального исследовательский центра УрО РАН

**Гейн**

**Сергей Владимирович**

Доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры микробиологии, иммунологии и общей биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»

**Филиппова**

**Юлия Юрьевна**

**Ведущая организация** – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (г. Москва).

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.063.01 на базе ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН по адресу: 620078, г. Екатеринбург, ул. Софьи Ковалевской/Академическая, 22/20 и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iir.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.063.01 на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН, кандидат биологических наук

Ю.А. Журавлёва

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы.** Появление и распространение инфекционных и аллергических заболеваний представляют угрозу современному здравоохранению. Вакцинация и антибиотики позволили победить неизлечимые ранее заболевания, но оказались неспособны предотвратить новые, не известные ранее инфекции и антибиотикорезистентность уже известных бактерий (*WHO. Antimicrobial resistance. WHO. World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Global Health Observatory (GHO) data*). За последние десятилетия возросло количество аллергических заболеваний, около 40 % населения в настоящее время страдают аллергическим ринитом, астмой или атопическим дерматитом (*WHO. White Book on Allergy 2011-2012*). Обеспечение неспецифической резистентности было провозглашено ВОЗ генеральной стратегией сохранения здоровья, которая стимулировала исследования в области врожденного иммунитета.

Врожденный иммунитет многоклеточного организма распознает микроорганизмы с помощью поверхностных и внутриклеточных рецепторов нескольких семейств (TLR, NLR, RLR, CLR и др.). Гомологичные гены (ортологи) рецепторов врожденного иммунитета появились у первых многоклеточных более 400 миллионов лет назад и сохранились у низших морских беспозвоночных до наших дней. Консервативность химической структуры ортологов рецепторов врожденного иммунитета говорит об их эффективности, универсальности и требует тщательного исследования.

Известно, что человек и микроорганизмы, населяющие его слизистые, в течение многих миллионов лет коэволюции выработали способы поддержания взаимного сосуществования. Комменсальные микроорганизмы снабжают человека короткоцепочечными жирными кислотами, витаминами, перерабатывают клетчатку, синтезируют вещества, защищающие от патогенов. Сформировалась концепция «метаорганизма» – сообщества микрофлоры и человека; определено влияние микроорганизмов на работу всех систем и органов человека (*Бурмистрова А.Л. и др., 2019; Zheng D., Liwinski T., Elinav, 2020; Qiu S., Cai, Y. Yao H. et al., 2023*). В частности, в процессе роста и деления бактерии постоянно ремоделируют свою клеточную стенку: с помощью ферментов локально разрушают её. При этом компоненты клеточных стенок и мембран бактерий – мурамилпептиды (МП), липополисахариды (ЛПС) – могут использоваться бактериями вторично, но частично попадают во внешнюю среду. Производное от МП – глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) образуется также при воздействии гидролаз микроорганизмов и хозяина, например, лизоцима, на пептидогликан бактерий. Образующиеся фрагменты клеточных стенок комменсальных бактерий взаимодействуют с рецепторами врожденного иммунитета хозяина и запускают многочисленные сигнальные пути, поддерживают сбалансированные иммунные реакции.

Если фрагменты бактериальных клеточных стенок воздействуют через специфические рецепторы врожденного иммунитета, то бактериоцины – антимикробные пептиды, производимые бактериями, – не имеют специфических рецепторов и взаимодействуют с клетками хозяина за счет электростатического взаимодействия и их амфифильности. За последние несколько лет обнаружено несколько сотен бактериальных антимикробных пептидов, которые считаются базой для создания новых эффективных антимикробных лекарственных средств (*Darbandi A, et al. 2022*).

Диссертация является актуальным исследованием, связанным с теоретическим обоснованием и практической разработкой одной из нерешенных проблем современной иммунологии – определением механизмов регуляции воспалительных процессов. Диссертационная работа посвящена выявлению иммунологических и молекулярно-биологических факторов в

регуляции иммунного гомеостаза биорегуляторами бактериального происхождения для профилактики, терапии и реабилитации аллергических и инфекционных заболеваний. Понимание сформировавшихся системных взаимосвязей между микроорганизмами и макроорганизмом на уровне слизистых, иммунокомпетентных клеток, а также органов и тканей имеет как фундаментальное (для выявления способов реагирования с целью поддержания гомеостаза), так и прикладное (для разработки способов профилактики и терапии социально значимых заболеваний) значение для решения проблемы контроля воспаления.

В связи с этим сохраняет актуальность комплексное изучение микробиома, генома, транскриптома, метаболома здоровых доноров и пациентов с различными заболеваниями и выявление особенностей влияния биорегуляторов бактериального происхождения (ББП) на иммунный гомеостаз, чему и посвящено данное исследование.

**Цель исследования:** определить механизмы регуляции иммунной системы биорегуляторами бактериального происхождения (липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептид, низин) в норме и в патогенезе воспалительных заболеваний.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать иммуотропные эффекты биорегуляторов бактериального происхождения (липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида) в экспериментальной модели аллергического воспаления.

2. Проанализировать профилактическую и клинико-иммунологическую эффективность глюкозаминилмурамилдипептида при вирусных и бактериальных инфекциях.

3. Оценить модулирующие эффекты глюкозаминилмурамилдипептида в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе.

4. Исследовать иммуотропные эффекты биорегулятора бактериального происхождения глюкозаминилмурамилдипептида при аутоиммунном воспалительном процессе.

5. Определить влияние глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида на экспрессию генов *TLR4* и *NOD2* рецепторов, транскрипционных факторов (*A20*, *ATF3*) и провоспалительного цитокина *TNF- $\alpha$*  в клетках врожденного иммунитета.

6. Исследовать влияние глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на экспрессию генов цитокинов, мембранных рецепторов и адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм в НК-клетках в условиях *in vitro*.

7. Выявить роли мурамилпептидов и липополисахарида в регуляции экспрессии оксида азота макрофагами линии RAW264.7 в системе *in vitro*, а также в продукции цитокинов, хемокинов и ростовых факторов *ex vivo*.

8. Проанализировать влияние биорегуляторов бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептида, липополисахарида и низина), катехоламинов на фенотипические изменения дендритных клеток и продукцию альфа-дефенсинов HNP1-3 нейтрофильных гранулоцитов.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой работы стал комплексный анализ провоспалительных и противовоспалительных факторов при воздействии биорегуляторов бактериального происхождения в исследованиях *in vivo*, в том числе на моделях лабораторных животных, *ex vivo* и *in vitro*. Для достижения цели исследования и решения поставленных задач на основе теоретического анализа литературы был выбран дизайн в форме проспективного и экспериментального исследования с использованием современных иммунологических, биохимических, гистологических, молекулярно-генетических, а также методов молекулярной и клеточной биологии, биоинформатики и системной биологии. Исследование одобрено Этическим комитетом медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени

Патриса Лумумбы» (РУДН) (г. Москва, Россия).

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Степень достоверности результатов основана на достаточном числе наблюдений, использовании современных методов исследования, адекватной статистической обработке полученных данных.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием прикладных программ GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) и Microsoft Office Excel 2010.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конгрессах и конференциях различного уровня: Конгресс Европейской академии аллергии и клинической иммунологии (ЕААСИ) в 2018 - 2023 гг.; «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 2022), «Иммунология – основа медицины XXI века» (Ташкент, Самарканд, Узбекистан, 2021), IX-XII конференции «Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации» (Краснодар, 2019-2022), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2018), Конференция Американской академии аллергии, астмы и иммунологии (США, 2019), 5th European Congress of Immunology (Amsterdam, Netherlands, 2018), 17th Congress of Immunology (Beijing, China, 2019), 1st Moscow Molecular Allergology Meeting; 1-й Калининградский научный иммунологический форум (2016), SBV Improver System Biology Verification Conference (Barcelona, Spain, 2015), 3d Biological Network Verification (Montreux, Switzerland, 2014).

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования: формирование основной идеи, формулировка рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, дизайн исследования, тщательный анализ современной зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме, проведение всех экспериментальных методов исследования, подготовка публикаций по теме выполненной работы, оформление текста диссертации и автореферата.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Биорегуляторы бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептид и липополисахарид) оказывают иммуотропные эффекты при аллергическом, инфекционном и аутоиммунном воспалительном процессе.

2. Глюкозаминилмурамилдипептид модулирует микробный пейзаж и увеличивает разнообразие представителей микробиологического сообщества слизистых полости рта в норме и при кариесе.

3. Механизмы иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения, исследованные в системе *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*, обусловлены их влиянием на фенотип и экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета, цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, а также регуляторных факторов внутриклеточных сигнальных путей клеток врожденного иммунитета.

#### **Научная новизна**

На модели аллергического воспаления впервые показано, что продолжительное воздействие низких доз биорегуляторов бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида) до воздействия аллергена (овальбумина - OVA) проявляет защитный эффект, а совместное воздействие аллергена с липополисахаридом или мурамилпептидом увеличивает степень тяжести аллергического воспаления.

Впервые показана возможность смещения баланса субпопуляций дендритных клеток с помощью липополисахарида, мурамилпептида и норадреналина и охарактеризованы фенотипические изменения дендритных клеток под действием липополисахарида и мурамилпептида, а также бактериоцина низина.

Впервые обнаружено влияние глюкозаминилмурамилдипептида на увеличение разнообразия представителей микробиологического сообщества слизистых полости рта в норме и при кариесе.

Впервые определен механизм эффективности глюкозаминилмурамилдипептида для профилактики обострений псориаза.

Впервые установлено, что механизм действия глюкозаминилмурамилдипептида в предотвращении тяжелого течения острого респираторного заболевания заключается в увеличении функциональной активности эффекторных клеток врожденного иммунитета.

Впервые обнаружена способность норадреналина уменьшать индуцированный липополисахаридом или мурамилпептидом повышенный уровень нейтрофильных пептидов человека.

Впервые предложен комплексный подход к контролю иммунного гомеостаза биорегуляторами бактериального происхождения посредством модулирования интенсивности экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR4* и *NOD2* с отложенной по времени негативной регуляцией на основе увеличения экспрессии генов *A20* и *ATF3*, продукты которых ограничивают воспаление.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В результате проведенных иммунологических, молекулярно-генетических, гистологических, биохимических и микробиологических исследований получены новые знания о механизмах врожденного и адаптивного иммунитета, ответственных за усиление и подавление воспалительного ответа, о способности биорегуляторов бактериального происхождения влиять на иммунный гомеостаз в норме и при патологии.

Важное фундаментальное значение работы заключается в описании и обосновании механизмов биологической активности ББП, определении механизма отрицательной обратной связи в воспалительном процессе, при котором на начальном этапе последовательно активируются транскрипционные факторы, индуцирующие воспаление, а на последующих этапах запускаются транскрипционные факторы, инициирующие каскады реакций, приводящих в норме к ограничению воспаления.

Таким образом, научно-практической ценностью работы является то, что показана способность липополисахарида, МП и норадреналина изменять фенотипические характеристики дендритных клеток и естественных киллеров, теоретически обоснована эффективность ББП в коррекции иммунопатологических состояний. Использование МП способствует повышению разнообразия представителей микробиологического сообщества в ротовой полости, а также коррекции уровня sIgA и дефенсинов НМР 1-3. Предложено объяснение механизма увеличения длительности ремиссии в случае применения ГМДП при псориазе с различной степенью тяжести.

Предложена гипотеза о возможности контроля биорегуляторами бактериального происхождения характера и интенсивности воспалительного процесса. Характер влияния ББП зависит от концентраций и длительности применения, при этом изменяется состав субпопуляций иммунокомпетентных клеток, хемокинов, ростовых факторов и цитокинов, а также экспрессия генов рецепторов врожденного иммунитета и транскрипционных факторов, участвующих в ослаблении воспалительного реагирования. Полученные знания позволили существенно приблизиться к пониманию и обоснованию механизма ряда биологических эффектов мурамилпептидов, липополисахарида и низина, в том числе противовоспалительного, что может послужить фундаментальной основой разработки способов контроля воспаления и иммунопрофилактики.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры биологии и общей генетики при подготовке студентов медико-биологических специальностей по предмету «биология» Медицинского института РУДН, кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС и Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ФГБОУ ВО «Кубанский

государственный медицинский университет» Минздрава России, а также внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры биологии и общей генетики Медицинского института РУДН.

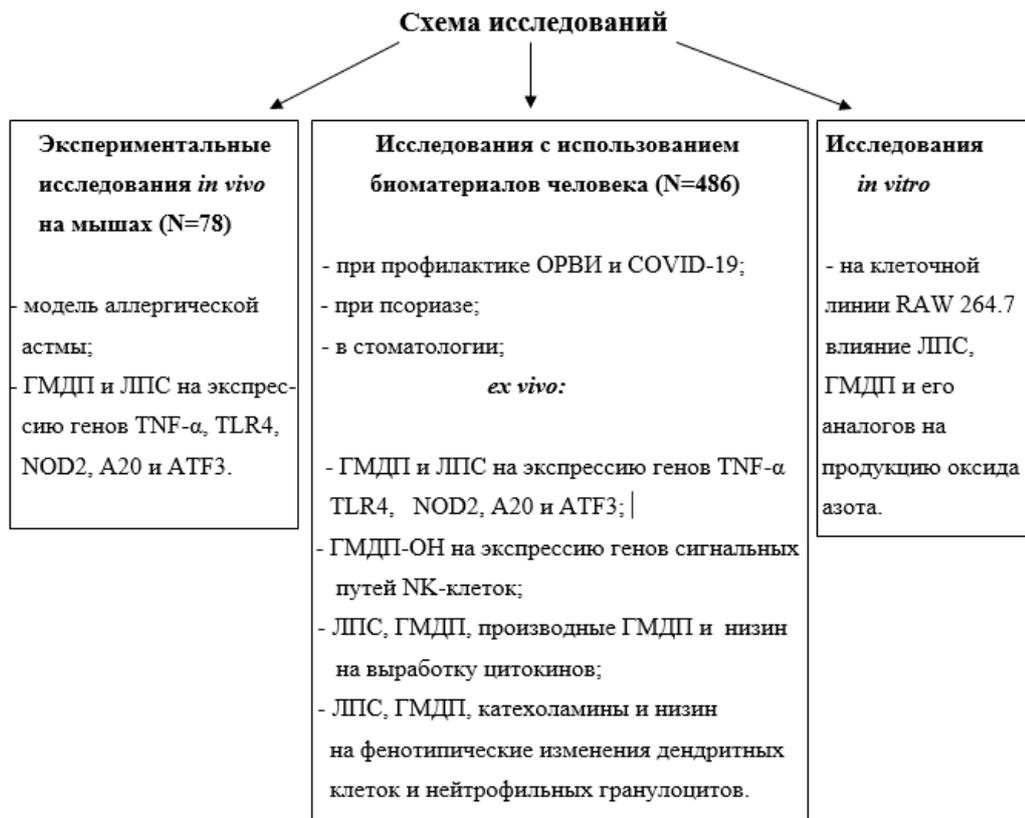
**Публикации.** По материалам диссертационного исследования опубликована 41 научная работа, в том числе 25 статей индексируются в международных базах данных Web of Science или Scopus; 3 статьи опубликованы в журналах, включенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ; 13 публикаций - в материалах научных конференций..

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 291 странице текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает 708 источников, в том числе 80 отечественный и 628 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 44 рисунками и 16 таблицами.

**Соответствие темы диссертации научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология (пп. 2, 3, 6).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на лабораторных животных, клеточных линиях, на мононуклеарных клетках и в цельной периферической крови человека и животных, а также и анализировались результаты клинических наблюдений (*рисунок 1*)



**Рисунок 1 – Общая схема исследований**

В качестве биорегуляторов бактериального происхождения (ББП) применяли лекарственное средство липид на основе N-ацетил-глюкозаминил-N-ацетил-мурамилдипептида (ГМДП) и *ex vivo* его производные, полученные согласно описанным методам (*Мещерякова Е.А. и др., 1991*), а также ЛПС *E. coli* (Ultra-pure, InvivoGen, Калифорния, США) и бактериоцин низин (Merk, Германия) (*рисунки 2 и 3*).

М Г/МОЛЬ	Мурамилпептид	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
495	МДП	NH <sub>2</sub>	OH	H
695	ГМДП	NH <sub>2</sub>	OH	GlcNAcβ1
696	ГМДП-ОН	OH	OH	GlcNAcβ1
839	ГМДП-Lys	NH <sub>2</sub>	Lys	GlcNAcβ1
695	ГМДП-LL	NH <sub>2</sub>	OH	GlcNAcβ1

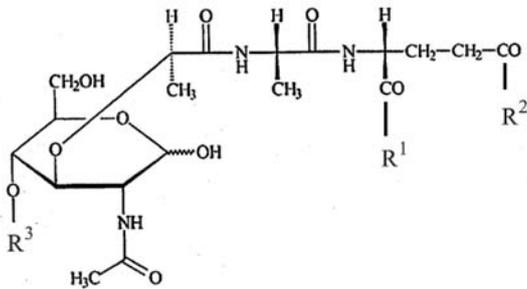
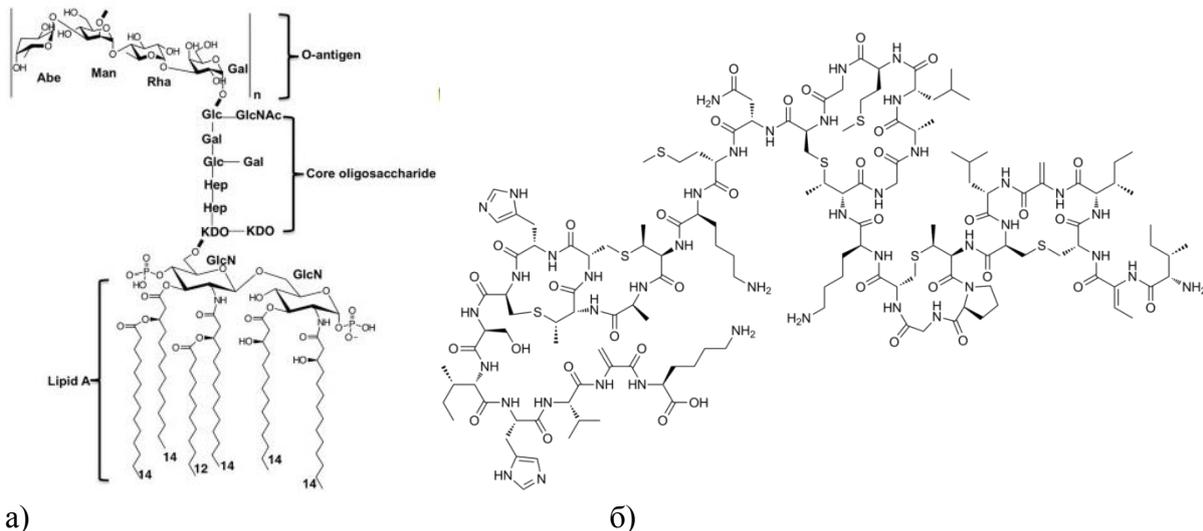


Рисунок 2 – Структура мурамилпептидов

Рисунок 3 – Структура липополисахарида *E.coli* (а); структура бактериоцина низина (б)

**Исследования с использованием лабораторных животных.** В экспериментальных исследованиях были использованы самцы мышей линии BALB/c (N=78) (г. Пущино, Россия), все работы проводились в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным и Женевской конвенцией (Geneva, 1990).

**Экспериментальная модель аллергического воспаления.** У мышей линии BALB/c индуцировали аллергическое воспаление дыхательных путей с использованием модели аллергической бронхиальной астмы (Литвин Л.С., Хаитов М.Р., Бабахин А.А., 2005). Мыши линии BALB/c были рандомизированы на 8 групп (6 животных в каждой группе). На этапе сенсibilизации в 200 мкл фосфатного буфера (PBS, Панэко, Россия) вводили внутривентриально (i/p) 20 мкг овальбумина (OVA, Merck, Германия) с 1 мг гидроксида алюминия (Merck, Германия) на 1, 14 и 21 дни, после чего на 27, 28 и 35 дни им интраназально (i/n) вводили 80 мкг OVA в 50 мкл стерильного PBS. Во 2, 3, 6 и 7 группах животным внутривентриально за 5 дней до сенсibilизации вводили ГМДП (ЗАО Пептек, г. Москва, Россия) в PBS в дозировке 5 мкг/животное или ЛПС (Ultra-pure, InvivoGen, Калифорния, США) в PBS в дозировке 1 мкг/животное. Во 2 и 3 группах затем

вводили овальбумин аналогично группе 1 (астма). В 4 и 5 группах животным внутрибрюшинно во время сенсibilизации вводили по 5 мкг/животное ГМДП в PBS или по 1 мкг/животное ЛПС в PBS совместно с 20 мкг OVA и 1 мг гидроксид алюминия в 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Контрольной группе мышей № 8 внутрибрюшинно и интраназально вводили стерильный PBS (таблица 1).

**Таблица 1 – Исследование влияния глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида в модели овальбумин-индуцированной аллергической астмы**

День	Группы животных							
	1 Астма (OVA), N=6	2 ЛПС перед OVA N=6	3 ГМДП перед OVA, N=6	4 ЛПС и OVA, N=6	5 ГМДП и OVA, N=6	6 ЛПС, N=6	7 ГМДП, N=6	8 Фосфатный буфер (PBS), N=6
-5		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-4		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-3		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-2		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-1		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
0	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ГМДП i/p			PBS i/p
1								
14	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ ГМДП i/p			PBS i/p
21	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ ГМДП i/p			PBS i/p
27	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
28	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
35	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
37	Выделение БАЛ, легких и крови							

*Примечание:* OVA - овальбумин; ГМДП - глюкозаминилмурамилдипептид; ЛПС – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; i/p - внутрибрюшинное введение; i/n – интраназальное введение; БАЛ - бронхоальвеолярный лаваж.

**Получение бронхоальвеолярного лаважа.** Через 48 ч после последнего введения OVA животных умерщвляли с помощью цервикальной дислокации, образцы жидкости бронхоальвеолярного лаважа собирали путем интратрахеальной инстилляцией 700 мкл PBS трехкратно. БАЛ центрифугировали для сбора целых клеток в осадок с 0,5 мл PBS, супернатанты осторожно удаляли и хранили при –80 °С.

**Получение сыворотки крови в модели астмы.** Кровь из сердца 30 минут содержали при 24°С, центрифугировали 15 минут при 1000 g, затем отделяли сыворотку и определяли общий IgE и OVA-специфические IgG1 и IgG2a.

**Количественный и качественный анализ клеток в бронхоальвеолярном лаваже.** Суммарное количество моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, и эозинофилов в 1 мл БАЛ определяли на гематологическом счетчике (Beckman Coulter LH 750, США). Подсчет и анализ клеток производили с помощью световой микроскопии высушенных мазков, окрашенных по Романовскому – Гимза (красители Гемстандарт, Россия; микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония).

**Анализ содержания иммуноглобулинов.** Количественное определение sIgA в БАЛ мышей, а также OVA-специфических IgG1 (IgG1 Mouse ELISA Kit, ThermoFisher, США) и IgG2a (IgG2a Mouse ELISA Kit, ThermoFisher, США) и общего IgE (IgE Mouse ELISA Kit, ThermoFisher, США) в

сыворотке крови животных измеряли с использованием наборов для ИФА мышей (ThermoFisher, США) на спектрофотометре Multiskan (ThermoFisher, США).

**Гистологические исследования легких животных.** Легкие мышей фиксировали в 10% растворе параформальдегида в течение часа при комнатной температуре и готовили срезы толщиной 4 микрометра (Микротом НМ 3250, Thermo FS, Китай). Визуализацию образцов проводили при помощи инвертированного светового микроскопа (Nikon Eclipse E200, Япония).

**Выделение крови животных для ПЦР анализа.** Образцы крови отбирали из сердца в пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster Austria) с 0.1 мл  $K_2EDTA$ . Мононуклеарные клетки выделяли с помощью Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Burlington, ON, Canada), жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего (Панэко, Россия).

**Исследование влияния глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида на экспрессию генов *TNF- $\alpha$* , рецепторов *TLR4* и *NOD2*, регуляторных факторов *A20* и *ATF3*.** Мыши линии BALB/c (N=30) были случайным образом разделены на две группы по 15 животных в каждой группе. Предварительно до инъекций ЛПС (Merck, Германия) и ГМДП (ЗАО Пептек, Россия) у 6 мышей производили отбор крови. В группе 1 в день 1, 2, 3, 4 и 5 i/p вводили ЛПС (1 мкг/на животное в 200 мкл PBS). В группе 2 в аналогичный период i/p вводили ГМДП (5 мкг/животное в 200 мкл PBS). Отбор крови производили до введения ЛПС и ГМДП (день 0), на 2, 6, 11 и 21 день (таблица 2).

**Таблица 2 – Количество животных, включенных в эксперимент по исследованию влияния глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида на экспрессию генов *TNF- $\alpha$* , *TLR4*, *NOD2*, *A20* и *ATF3***

День	Группы животных		Выделение крови
	1 ЛПС i/p N=15	2 ГМДП i/p N=15	
0	-	-	N=6
1	N=12	N=12	
2	N=12	N=12	N=6
3	N=9	N=9	
4	N=9	N=9	
5	N=9	N=9	
6			N=6
11			N=6
21			N=6

*Примечание:* ГМДП - глюкозаминилмурамилдипептид; ЛПС – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; i/p - внутрибрюшинное введение.

**Выделение РНК и реакция обратной транскрипции.** РНК выделяли с помощью тризола (Trizol Reagent, Invitrogen, США). Обратную транскрипцию осуществляли с помощью наборов компании «Евроген» (Москва, Россия).

**Исследование экспрессии генов.** Экспрессию генов исследовали методом RT-PCR с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в термоциклере СХ96 (BioRad, США). Протокол амплификации: 1 цикл 10 мин при 94°C, далее 38 циклов: 20 с при 94°C, 20 с при 60°C для отжига праймеров с матрицей и 40 с при 72°C. Расчет относительного уровня мРНК генов-мишеней проводили методом 2- $\Delta\Delta Ct$  (Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001). Относительную концентрацию субстрата нормировали по средним данным амплификации GAPDH

и экспрессии этого гена в контрольном образце (нестимулированные клетки). Все реакции проводили в трех повторах и включали отрицательный контроль. Относительные различия в экспрессии генов более чем в 2 раза считались достоверными. В НК-клетках уровни экспрессии генов определяли на приборе Illumina iScan (Illumina, США) с использованием Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip.

**Исследования с использованием биоматериалов человека.** Исследования проводили с использованием биоматериалов (периферическая кровь, ротовая жидкость) условно здоровых добровольцев (357 человек), пациентов с хроническим псориазом (86 человек), с кариесом (43 человека) в системе *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* на различных клинических базах при участии врача-дерматолога д.м.н. В.Ю. Уджуху в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии департамента здравоохранения г. Москвы, врача-стоматолога медицинского центра Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы Н.Л. Лежава, врача-терапевта медицинского центра Кыргызской государственной академии физической культуры и спорта Б.Т. Орозбековой (г. Бишкек, Кыргызстан). Все участники дали добровольное согласие на обработку персональных данных и участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (таблица 3).

**Таблица 3 – Исследования с использованием биоматериалов человека**

<i>Исследование профилактической и иммунологической эффективности ГМДП при вирусных и бактериальных инфекциях</i>	<i>Исследование модулирующих эффектов ГМДП в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе</i>	<i>Исследование иммуотропных эффектов ГМДП и ЛПС при аутоиммунном воспалительном процессе</i>
1. Оценка эффективности ГМДП в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период (N=309) 2. Исследование влияния ГМДП на иммунологические показатели ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов (N=48)	1. Исследование влияния ГМДП на количественные показатели и разнообразие микрофлоры в ротовой жидкости здоровых добровольцев и пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей боковых зубов (N=91)	1. Исследование эффектов ГМДП в монотерапии псориаза (N=86)

**Выделение мононуклеарных клеток (МНК) человека и подготовка их к культивированию.** Для исследования использовали венозную кровь, которую собирали в пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Austria) с антикоагулянтом (0,1 мл раствора 2,7% соли К2ЭДТА; pH 7,2-7,4 на 1 мл крови). Цельную кровь разводили в соотношении 1:3 раствором фосфатно-солевого буфера PBS (Панэко, Россия), наслаивали на Cell separation media Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Канада) и центрифугировали 40 минут при 400 G. МНК дважды отмывали в полной среде RPMI 1640 (Merk, Германия), содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки (Merk, Германия), 100 ед/мл пенициллина (Merk, Германия), 100 мкг/мл стрептомицина (Merk, Германия) и 10 mM Хепес-буфера (Merk, Германия). Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием трипановым синим (Панэко, Россия).

**Определение цитокинов в МНК человека.** Культивировали МНК человека в присутствии мурамилпептидов, ЛПС, и бактериоцина низина в 96-луночных планшетах из расчета  $2 \times 10^5$  клеток на лунку. МП добавляли в конечной концентрации 5 мкг/мл, ЛПС - 1 мкг/мл, бактериоцин низин - 1 нг/мл (Меццержакова Е.А. и др., 1991), Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (Инкубатор CellXpert® C170i Eppendorf, Германия), отбирали супернатант и тестировали цитокины с использованием магнитных шариков с антителами для определения цитокинов/хемокинов человека с использованием оборудования и программного обеспечения Luminex 200, Merck (Millipore) (г. Берлингтон, Массачусетс, США).

**Выделение НК-клеток из мононуклеарных клеток человека методом магнитной сепарации.** НК-клетки выделяли с помощью стандартного комплекта реактивов NK Cell Isolation Kit (Human, Miltenyi Biotec, Германия), центрифугировали при 200g в течение 8 минут, переносили  $5 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды RPMI-1640 в 24-луночный стерильный планшет (Corning-Costar, США). Чистоту (95%) выделенной популяции НК-клеток (CD3-CD19-CD56+) оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии (CytoFLEX, Beckman Coulter LS, США).

**Оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на НК-клетки.** ГМДП-ОН в концентрации 10 мкг/мл вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Corning-Costar, США), клетки инкубировали в течение 6 и 16 ч (экспериментальная группа) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В контрольную группу ГМДП-ОН не вносили. Оценка влияния ГМДП-ОН на НК-клетки осуществлялась с участием д.м.н. Козлова И.Г. и к.м.н. Гапонова А.М.

**Регистрация выделения оксида азота под действием мурамилпептидов и липополисахарида.** Для количественного определения оксида азота использовали стабильную клеточную культуру линии RAW264.7 (Институт цитологии РАН, Россия) и наборы Griess Reagent System (Promega, г. Мадисон, США). В 96-луночном планшете к 100 тыс клеток линии RAW264.7 в шести повторностях добавляли мурамилпептиды (0,144 мМ) и ЛПС (2,5 мкг/мл), инкубировали 24 ч, затем на спектрофотометре MicroScan (Beckman Coulter, США) при 540 нм измеряли в супернатанте количество выделившегося оксида азота в мкМ, согласно инструкции производителя.

**Фенотипирование дендритных клеток человека.** Регистрацию степени активации дендритных клеток (ДК) осуществляли с помощью проточной цитометрии, определяя процент клеток, экспрессирующих маркеры дифференцировки ДК CD80, CD83, CCR7 с использованием реагентов «BD Biosciences» (США) на приборе NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences Inc., США). Использовалась комбинация нескольких маркеров. Фенотипирование производили по маркерам HLA-DR PE-Cy5, CD11c APC, CD123 APC-eFluor780, CCR7 PE-Cy7. Популяции миелоидных дендритных клеток определяли по фенотипу HLA-DR+CD14-CD3-CD20-CD123-CD11c+; плазматоцитоподобные дендритные клетки определяли маркерами HLA-DR+CD14-CD3-CD20-CD11c+CD123+ («BD Biosciences», США).

**Исследование влияния адреналина и норадреналина на изменение фенотипа дендритных клеток.** Для выявления вклада адреналина и норадреналина в изменение фенотипа ДК было изучено их влияние на изменение маркеров ДК. Для этого образцы цельной крови добровольцев инкубировали 1ч с катехоламином норадреналином (2 мг/мл) и адреналином (1 мг/мл) отдельно и совместно с ГМДП в конечной концентрации 5 мкг/мл, ЛПС (1 мкг/мл), бактериоцином низином (1 нг/мл) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В контрольные лунки добавляли PBS в адекватном объеме.

**Характеристика пациентов с псориазом.** Обследовали 86 пациентов с псориазом (50 женщин и 36 мужчин, возраст 19-63 года), наблюдавшихся в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии департамента здравоохранения г. Москвы у врачей-дерматологов д.м.н. Уджуху В.Ю. и Кубылинского А.А. Длительность заболевания на момент

начала исследования варьировала от 6 месяцев до 45 лет. Критерии включения в исследование: вульгарный псориаз, добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании и обработку персональных данных. Критерии исключения: онкологические заболевания, аллергические заболевания, хроническая сердечная недостаточность, острая и хроническая почечная и печеночная недостаточность. В группе сравнения обследованы 50 практически здоровых лиц аналогичного пола и возраста. Для оценки тяжести течения патологического процесса и эффективности проводимых лечебных мероприятий использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index). Период наблюдения составил четыре года. При оценке клинической эффективности лечения псориаза ГМДП 10 мг критерием излечения являлось отсутствие клинических проявлений заболевания в течение четырех лет.

**Определение цитокиновых биомаркеров в сыворотке крови пациентов с псориазом.** Уровни растворимых антигенов CD54 (sCD54, sICAM-1), IL-4, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  и фактора торможения миграции макрофагов (MIF) определяли иммуноферментным методом с использованием соответствующих наборов, в том числе набора Human sICAM-1/CD54 ELISA для определения уровня sICAM-1 в сыворотке крови (R&D Systems, Миннеаполис, США). В качестве контроля использовали результаты лабораторных исследований сыворотки крови 50 доноров в возрасте 19–60 лет. Кровь отбирали в утренние часы натощак.

**Характеристика пациентов, принимавших участие в исследовании ротовой жидкости.** В исследовании принимали участие 91 человек в возрасте 19 - 22 года. Из них у 43 пациентов (26 женщин и 17 мужчин) диагностирован при осмотре кариес окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов, 48 человек (28 женщин и 20 мужчин) составляли группу здоровых добровольцев. Исследование проходило в Медицинском центре РУДН на кафедре биологии и общей генетики и кафедре челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Медицинского института РУДН при участии врача-стоматолога к.м.н. Н.Л. Лежава. Все участники исследования дали добровольное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и обработку персональных данных в соответствии с протоколом (Протокол № 11 от 31.10.2019), одобренным решением Комитета по этике Медицинского института РУДН, так как в инструкции к препарату ликолипид нет показаний к применению в стоматологической практике. В терапию кариеса входило пломбирование кариозных полостей боковых поверхностей зубов с использованием светоотверждаемых композитных материалов, рекомендации по кратности приема пищи. Участники исследования в течение срока наблюдения применяли одинаковые методы ухода за полостью рта. Группа здоровых добровольцев (48 человек - 28 женщин и 20 мужчин) и 21 пациент (12 женщин и 9 мужчин) с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов принимали препарат на основе ГМДП 1 мг в течение 10 дней. Группу сравнения составляли 22 человека (14 женщин, 8 мужчин), прошедшие лечение кариозных полостей и не принимающие ликолипид. Отбор ротовой жидкости осуществляли в Медицинском центре РУДН, тестирование осуществлялось на кафедре биологии и общей генетики Медицинского института РУДН.

**Лабораторные исследования ротовой жидкости.** Ротовую жидкость (1 мл) отбирали стерильными одноразовыми шприцами из подъязычной области и помещали в стерильные одноразовые пробирки 1,5 мл (Диа-М, Россия) в утренние часы через 2-3 часа после еды у 43 пациентов в возрасте 19 - 22 года (26 женщин и 17 мужчин) с кариесом боковых поверхностей зубов до применения препарата ликолипид 1 мг (ГМДП, АО Пептек, Москва, Россия) и через 4 дня после 10-дневного курса препарата. Препарат применяли согласно инструкции для профилактики и снижения сезонной заболеваемости ОРЗ сублингвально 1 раз в день за 30 мин до еды в течение 10

дней. Основным исходом исследования была оценка количества в ротовой жидкости дефенсинов и sIgA, а также состава микрофлоры и сопоставление указанных показателей с таковыми группы пациентов, прошедших терапию кариеса и не принимавших препарат ликопад. Микробиологическое исследование ротовой жидкости выполняли с помощью стандартного метода газовой хромато-масс-спектрометрии и набора реагентов «Канд-ген» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Дентофлор («ДНК-технология», Москва). Идентификацию микроорганизмов - с помощью программы Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=MicrobialGenome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenome)) по базе данных NCBI GenBank. Для NGS-секвенирования ДНК на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) использовали праймеры V6 16S рДНК (Евроген, Россия). Анализ дефенсинов HNP1-3 и содержание sIgA в сублингвальной слюне проводили методом иммуноферментного анализа с помощью реагентов «Hycult Biotech» (США) и «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

**Выделение ДНК, РНК и реакция обратной транскрипции.** Бактериальную ДНК из ротовой жидкости выделяли с использованием наборов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Выделение РНК из клеток осуществляли с помощью Trizol Reagent (Invitrogen), либо с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Для обратной транскрипции использовали комплекты реагентов Ambion Total-Prep cRNA Amplification Kit (Invitrogen), «Синтол» (Россия) и «Евроген» (Россия) согласно инструкциям производителей.

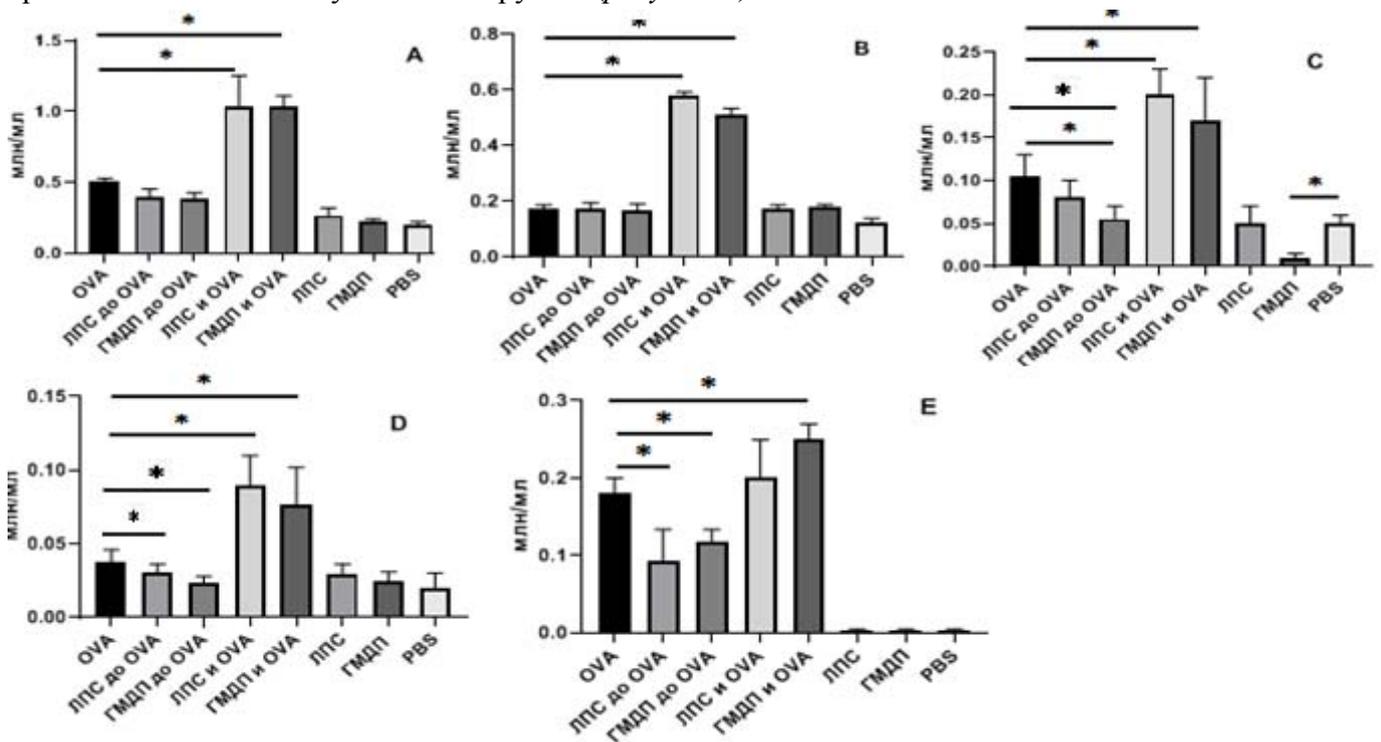
**Оценка эффективности ГМДП в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период.** На первом этапе открытого контролируемого исследования 42 условно здоровых участника (22 девушки и 20 юношей) с целью профилактики респираторных инфекций сублингвально принимали лекарственное средство на основе ГМДП (ликопад) 1 мг в течение 10 дней по 1 таблетке 3 раза в день в соответствии с инструкцией. На втором этапе исследования оценивалась эффективность использования препарата на основе ГМДП для профилактики респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период с января 2020 года у 267 человек (возраст 20-22 года), занимавшихся физической культурой, из которых 124 добровольца основной группы принимали препарат на основе ГМДП 1 мг, а 143 участника (группа сравнения) не принимали препарат ликопад. Диагностика COVID-19 осуществлялась на основании ПЦР анализа материала, полученного при проведении назофарингеального мазка в лаборатории «Гемотест» г. Бишкек (Набор реагентов Вектор-Бест, Россия). Количество и тяжесть эпизодов ОРВИ и COVID-19 оценивались в течение 12 месяцев и сравнивались с количеством эпизодов ОРВИ за предшествующие 12 месяцев.

**Статистическую обработку** полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Критерий Шапиро-Уилка использовали при  $n < 50$  для определения нормальности распределения значений. Для оценки статистически значимых различий между группами использовали непарный t-критерий Стьюдента. При нормальном распределении разности между значениями в зависимых группах использовали парный t-критерий Стьюдента. Числовые данные выражали как среднее арифметическое с указанием стандартной ошибки. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0,05$ . Данные ПЦР анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста множественного сравнения Ньюмана-Кеулса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## 1 – Исследование иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения в экспериментальной модели аллергического воспаления

Исследование влияния ББП на содержание в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов, лимфоцитов и секреторного IgA, а также IgG1 и IgG2 - в сыворотке крови - проводили с использованием половозрелых самцов мышей линии BALB/C в модели аллергической астмы. Выявлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение мышам ГМДП или ЛПС за 5 дней до сенсibilизации OVA (группа 2 и группа 3 соответственно) статистически значимо уменьшало число нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов в БАЛ по сравнению с таковыми у мышей 1 группы (рисунок 4).

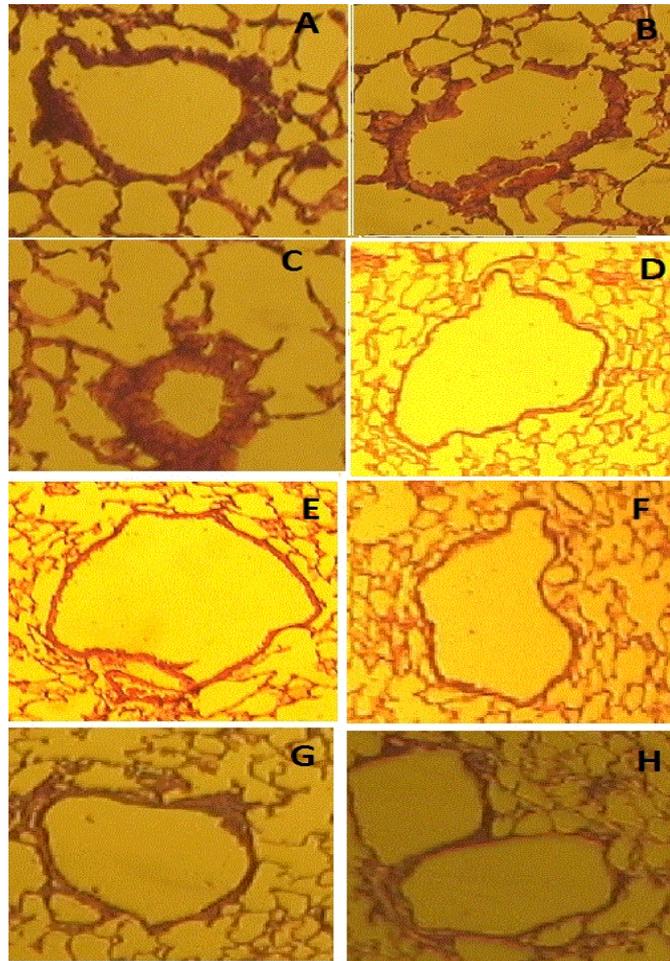


**Рисунок 4 - Клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа мышей с индуцированной астмой при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А - общее количество клеток; В – количество макрофагов; С – количество нейтрофилов; D – количество лимфоцитов; Е – количество эозинофилов; \* -  $p < 0,05$ .

Обнаруженное снижение выраженности локальной нейтрофилии и эозинофилии в БАЛ при внутрибрюшинном введении мышам ЛПС и ГМДП до сенсibilизации OVA (группы 2,3) сочеталось с гистологически установленным снижением содержания бокаловидных клеток в легочной ткани (рисунок 5), что в случае аллергического воспаления уменьшает степень его выраженности. Между тем при сочетанном внутрибрюшинном введении OVA с ГМДП или ЛПС (группа 4, группа 5) наблюдалось значительное увеличение общего количества клеток БАЛ за счет статистически значимого ( $p < 0,05$ ) увеличения числа клеток всех исследуемых типов по отношению к таковым в группе 1. Сравнительная оценка результатов введения в течение 5 дней ГМДП или ЛПС (группы 6 и 7) интактным мышам (без экспериментального аллергического воспаления) относительно животных контрольной группы (группа 8), получавших PBS, показала отсутствие статистически значимого влияния ББП на число клеток БАЛ за исключением содержания нейтрофилов, содержание которых было достоверно ( $p < 0,05$ ) снижено под влиянием ГМДП. В то время как у интактных мышей в БАЛ обнаруживаются лишь следовые количества sIgA (группа 8), при экспериментальной OVA-индуцированной астме выявлено значительное возрастание его

концентрации. Кроме того, внутрибрюшинное введение ГМДП intactным мышам привело к статистически значимому ( $p < 0,05$ ) увеличению содержания sIgA (группа 7), тогда как инъекции ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA способствуют достоверному снижению повышенного при аллергическом воспалении в БАЛ IgA (в 2,6 раза и 2,1 раза соответственно,  $p < 0,05$ ).



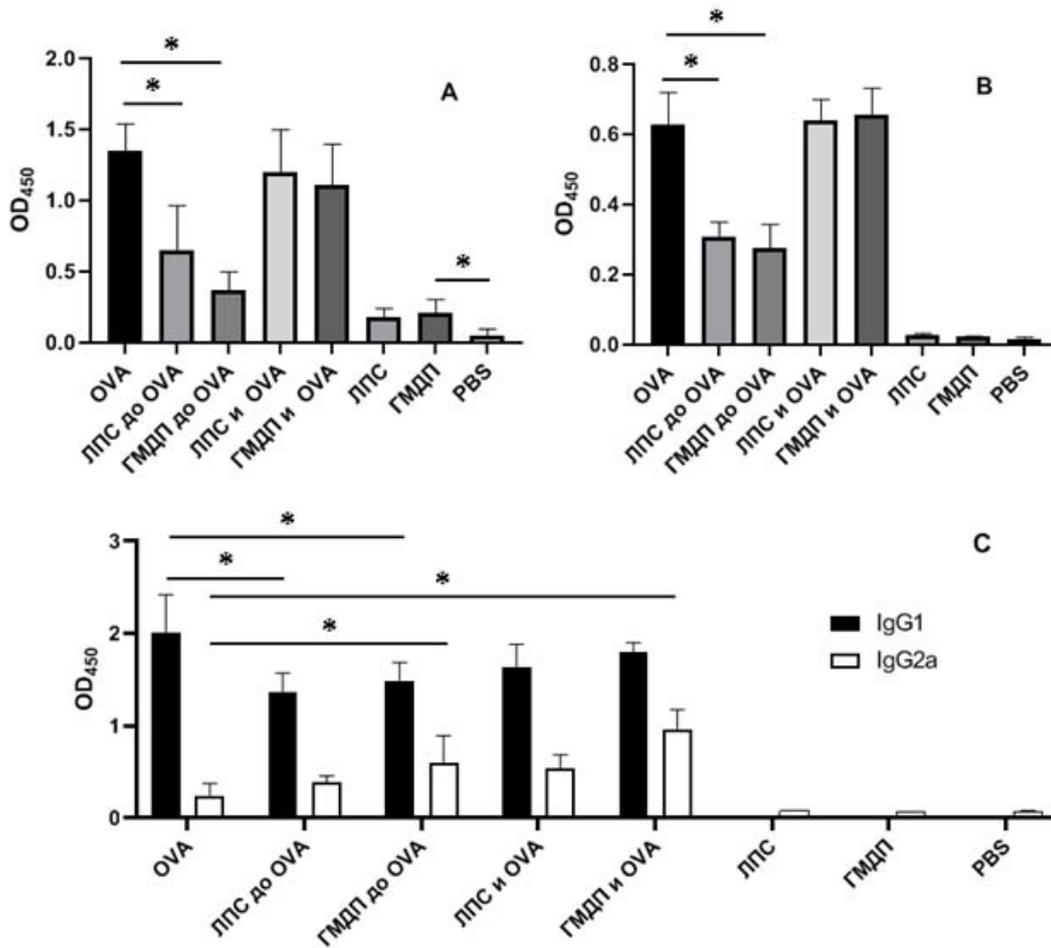
**Рисунок 5 – Изменения в легких мышей с овальбумин-индуцированной астмой при интраперитонеальном введении липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А - OVA-индуцированная астма; В - OVA и ЛПС; С - OVA и ГМДП; D – контроль; E - введение ЛПС до сенсibilизации; F - введение ГМДП до сенсibilизации; G - только ЛПС; H - только ГМДП.

Отмечено также, что в условиях OVA-индуцированной аллергической астмы уровень сывороточного IgE существенно возрастал, однако внутрибрюшинное введение ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA (группы 2,3) сопровождалось статистически значимым снижением содержания в сыворотке крови IgE в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (*рисунок 6*). При этом важно, что ГМДП более эффективно снижал уровень иммуноглобулина класса IgE, в то время как ЛПС более выражено снижал содержание эозинофилов в БАЛ (*рисунок 4*), что указывает на различные способы воздействия ЛПС и ГМДП на клеточный и гуморальный иммунитет в экспериментальной модели аллергической астмы.

Оценка содержания сывороточных IgG1 и IgG2a в модели аллергического воспаления показала значительное увеличение концентрации IgG1, но в случае введения ЛПС и ГМДП перед введением аллергена отмечалось незначительное снижение концентрации IgG1 на 33% ( $p < 0,05$ ) и 29% ( $p < 0,05$ ) соответственно и значительное увеличение уровня IgG2a, обеспечивающего основной гуморальный иммунный ответ на антигены у мышей, на 60% ( $p < 0,05$ ) и 110% ( $p < 0,05$ )

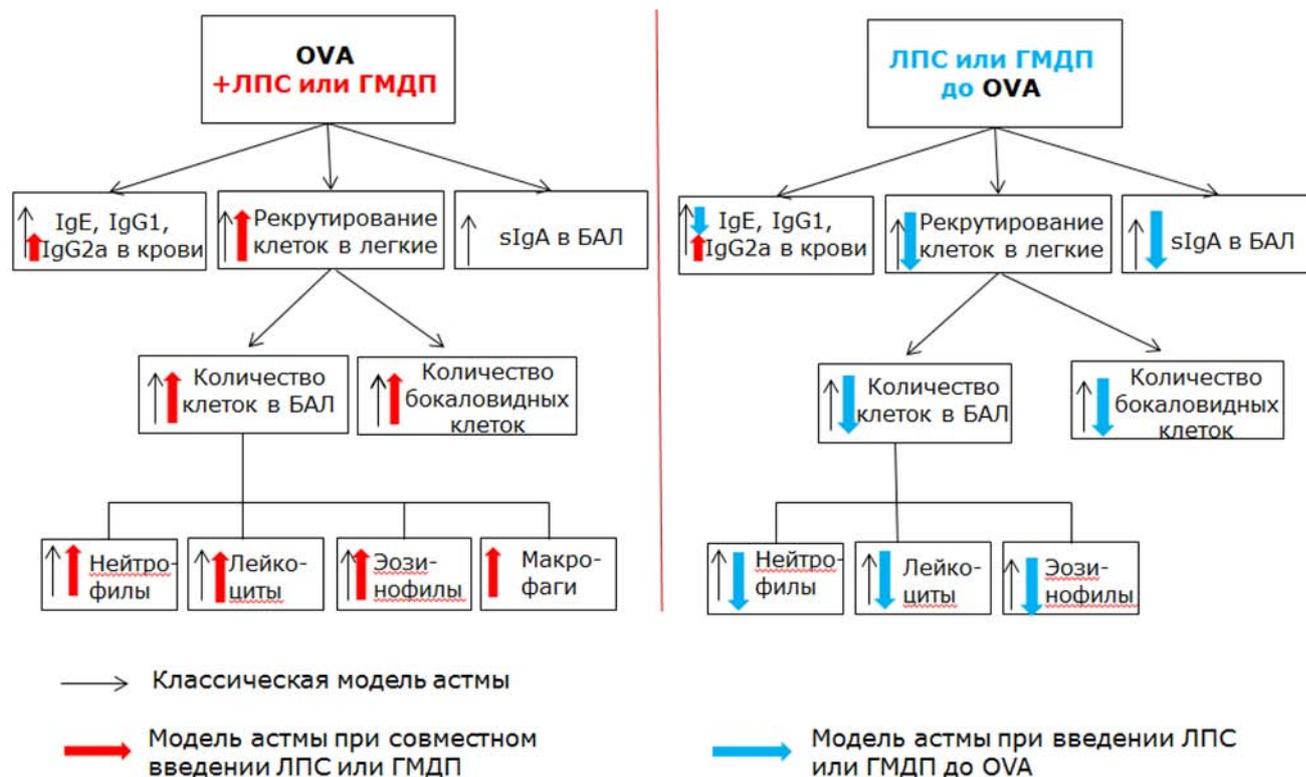
соответственно. Кроме того, сочетанное введение мышам аллергена и ГМДП способствовало максимальному увеличению содержания IgG2a по сравнению со всеми группами ( $p < 0,05$ ) (рисунок 6).



**Рисунок 6 – Изменение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже мышей с аллергической астмой при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А – содержание IgA в БАЛ; В – содержание IgE в сыворотке крови; С – содержание IgG1 и IgG2a в сыворотке крови; \* -  $p < 0,05$ .

Таким образом, в модели аллергического воспаления (OVA-индуцированная астма у мышей) установлена способность ЛПС и ГМДП влиять как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет; продемонстрировано ключевое значение предварительного многократного воздействия биорегуляторов бактериального происхождения в защите от аллергического воспаления, выразившейся в снижении локальной нейтрофилии, эозинофилии и лимфоцитоза в бронхоальвеолярном лаваже при внутрибрюшинном введении мышам ЛПС и ГМДП до сенсibilизации OVA. При гистологическом исследовании легочной ткани установлено снижение содержания числа бокаловидных клеток при предварительном введении ББП, что в случае аллергического воспаления уменьшало степень его выраженности. В то же время при совместном введении ББП и OVA наблюдалось увеличение числа бокаловидных клеток в гистологических срезах легких, а также содержания IgG2a в сыворотке крови (рисунок 7).



**Рисунок 7 – Схема регуляции глюкозаминилмурамилдипептидом или липополисахаридом аллергического воспаления в овальбумин-индуцированной экспериментальной астме**

*Примечание:* OVA-овальбумин; ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептидом; ЛПС – липополисахарид; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж.

## 2 – Исследование клинико-иммунологической эффективности глюкозаминилмурамилдипептида при вирусных и бактериальных инфекциях

### 2.1 – Оценка эффективности глюкозаминилмурамилдипептида в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период

При анализе эффективности препарата на основе ГМДП в профилактике респираторных заболеваний в неблагоприятный эпидемиологический период с января 2020 года у 267 человек (возраст 20-22 года), занимавшихся физической культурой, сравнивали результаты основной группы, в которых 124 добровольца принимали препарат на основе ГМДП, и группы сравнения, в которой 143 участника не принимали препарат ликолипид. Количество и тяжесть эпизодов ОРВИ и COVID-19 оценивались в течение 12 месяцев и сравнивались с количеством эпизодов ОРВИ за предшествующие 12 месяцев. Обнаружено, что применение препарата ГМДП (ликолипид 1 мг) способствовало снижению в 3,7 раза ( $p < 0,05$ ) количества эпизодов ОРВИ в основной группе, участники которой принимали препарат на основе ГМДП. Особо следует отметить, что за весь период наблюдения случаи заболевания COVID-19 в обеих группах были легкими, среднетяжелыми и тяжелыми, и без смертельных исходов (таблица 4). При этом в группе студентов, принимавших ГМДП, 48,4 % участников контактировали с больными COVID-19, и при этом у подавляющего большинства (98,4%) участников исследования не было выявлено заболевания COVID-19.

В группе студентов-спортсменов, принимавших ГМДП, лишь у 2 человек (1,6 %) в анамнезе был подтвержденный COVID-19 легкого течения (степень установлена на основе Методических рекомендаций Минздрава России, версия 7 от 03.06.2020), тогда как у лиц, не получавших ГМДП,

этот показатель в 6 раз выше – 9,8 % (14 человек, 4-м из которых потребовалась медицинская помощь и лечение в стационаре).

**Таблица 4 – Количество эпизодов острой респираторной вирусной инфекции в год в основной группе (N=124)**

Вид спорта	За 12 месяцев до приема ликопида			В течение 12 месяцев после приема ликопида			Всего
	1-2 раза в год	Более 3 раз в год	Не болели за год	1 раз в год	2 раза в год	Не болели за год	
Легкая атлетика	9	5	2	1	1	14	16
Бокс	7	2	9	1	1	16	18
Волейбол	6	4	14	2	0	22	24
Баскетбол	5	5	18	3	1	24	28
Фехтование	2	1	16	0	2	17	19
Единоборцы	6	1	12	1	1	17	19
Всего (n)	35	18	71	8	6	110	124
% от общего числа (N=124)	28,2	14,5	57,3	6,6	4,8	88,6	100

## 2.2 – Исследование эффектов глюкозаминилмурамилдипептида на локальный иммунитет у пациентов с кариесом

Проведено исследование изменения альфа-дефенсинов (HNP1-3) и секреторного IgA (sIgA) у 43 пациентов (возраст 20 - 22 года) с боковым кариесом зубов при использовании препарата ликопид (21 человек) после традиционного лечения, тогда как участники группы сравнения (22 человека) получали только традиционную терапию. Анализ содержания sIgA и нейтрофильных пептидов человека HNP1-3 в ротовой жидкости (РЖ) изучали методом ИФА до приема препарата ликопид и через 14 дней после начала приема (таблица 5).

**Таблица 5 – Концентрация нейтрофильных пептидов человека HNP1-3 в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида (M±m)**

Показатель	Традиционная терапия (N=22)	Традиционная терапия +ГМДП, (N= 21)	p
HNP1-3, пг/мл, 1-й день	249, 91± 42,78	252,12± 43,14	>0,05
HNP1-3, пг/мл, 14-й день	210,14± 24,32	152,29± 18,84	<0,05

Установлено, что прием препарата ГМДП (ликопид 1 мг) после проведения традиционной терапии привел к достоверным изменениям параметров локального иммунитета. Так, при оценке содержания альфа-дефенсинов (HNP1-3) в РЖ у пациентов с боковым кариесом зубов до лечения фиксировалось значительное возрастание концентрации HNP1-3 относительно нормы, а через 14 дней после традиционной терапии снижение было на 16 % (p>0,05) относительно первоначальных значений в этой группе. Между тем, при применении препарата ГМДП в течение 10 дней в составе комплексной терапии имело место более существенное снижение уровня дефенсинов HNP1-3 на 40 % (p<0,05) относительно первоначальных значений в этой группе (таблица 5).

Известно, что при адаптации организма к стрессу и к неблагоприятным условиям концентрация секреторного IgA (sIgA) в биологических жидкостях может в значительной степени изменяться и компенсаторно повышаться (Castro-Quintas A., 2023). В результате проведенных исследований у пациентов с кариесом исходно установлен повышенный уровень sIgA в РЖ,

который после традиционной терапии снижался лишь на 12%, а после применения препарата ГМДП – на 37 % (таблица 6).

**Таблица 6 – Концентрация sIgA в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида (M±m)**

Показатель	Группа сравнения (N= 22)	Основная группа (N= 21)	p
sIgA, мг/мл; 1 день	247,18±48,65	258,81±47,81	>0,05
sIgA, мг/мл; 14 день	208,55± 29,42	165,51±21,19	<0,05

Таким образом, обнаружены позитивные иммуностропные эффекты препарата ГМДП в составе комплексной терапии пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов в виде нормализации содержания в РЖ антимикробных факторов врожденного иммунитета и локального содержания sIgA.

### 2.3 – Исследование модулирующих эффектов глюкозаминилмурамилдипептида в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе

При исследовании влияния препарата ГМДП на состав микробного пейзажа РЖ 48 здоровых добровольцев изменения были зарегистрированы у 30 человек (62,5%). Наблюдалось значительное снижение встречаемости грамотрицательной микрофлоры, *Firmicutes* и *Candida albicans* и увеличение встречаемости лактобактерий и бифидобактерий (таблица 7).

**Таблица 7 – Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости здорового человека**

Вид микроорганизма	До приема ГМДП (N = 48)		После приема ГМДП (N = 48)	
	абс.	% от группы	абс.	% от группы
<i>Streptococcus spp.</i>	48	100	48	100
<i>Streptococcus mutans</i>	47	97,92	48	100
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	44	91,66	47	97,92
<i>Veillonella spp.</i>	40	83,33	43	89,58
<i>Candida albicans</i>	28	58,33	5	10,41*
<i>Neisseria spp.</i>	18	37,5	16	33,33
<i>Bifidobacterium spp.</i>	29	60,41	35	72,92*
<i>Eubacterium spp.</i>	5	10,41	7	14,58
<i>Lactobacterium spp.</i>	27	56,25	41	85,42*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6	12,5	2	4,17*
<i>Clostridium spp.</i>	39	81,25	21	43,75*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	64,58	25	58,14*
<i>Actinomyces spp.</i>	19	39,58	26	54,17*

Примечание: ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид; \* p<0,05.

Поскольку увеличение разнообразия микробиоты способствует формированию нормобиоценоза, препятствуя заселению ротовой полости патогенной микрофлорой, следует отметить повышение разнообразия микрофлоры у 73% добровольцев, у которых основная доля микроорганизмов ротовой жидкости была представлена бактериями *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacterium*, *Bifidobacterium*. В то же время анализ состава микробного пейзажа РЖ 43 пациентов с кариесом показал, что через 14 дней после традиционного лечения он изменился у девяти человек, и статистически значимым оказалось лишь уменьшение частоты встречаемости *Porphyromonas gingivalis* (таблица 8).

**Таблица 8 – Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных поверхностей зубов до и после приема препарата глюкозаминилмурамилдипептида**

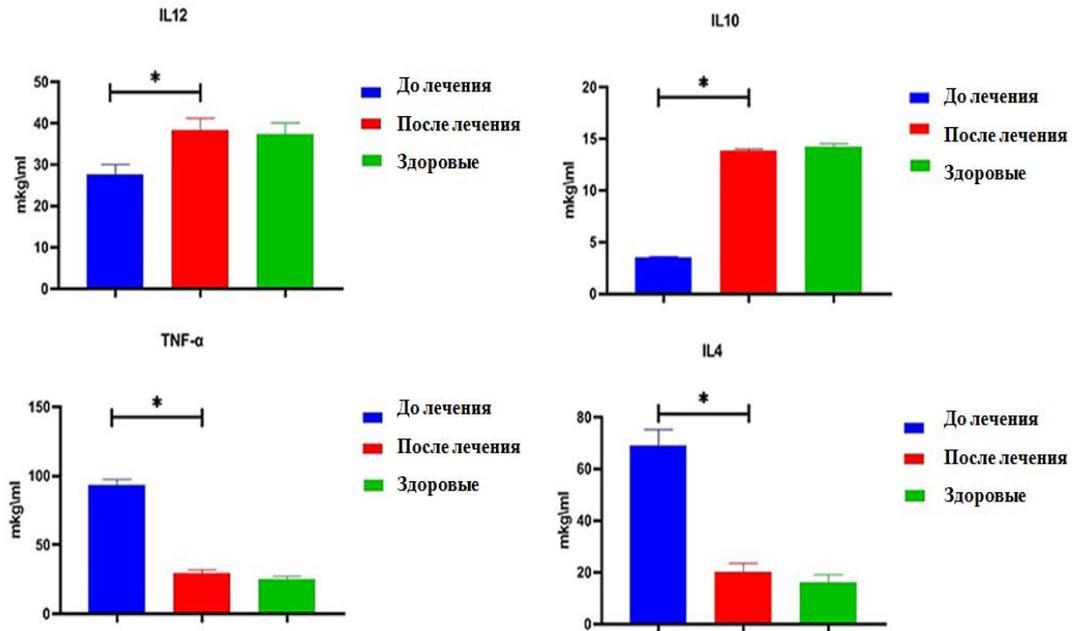
Виды микроорганизмов	Традиционная терапия (N= 22)		Традиционная терапия + ГМДП (N=21)	
	До терапии абс. (% от группы)	После терапии абс. (% от группы)	До терапии абс. (% от группы)	После терапии абс. (% от группы)
<i>Streptococcus spp.</i>	22 (100)	22 (100)	21 (100)	21 (100)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	19 (86,3)	20 (90,8)	18 (85,7)	18 (85,7)
<i>Veillonella spp.</i>	22(100)	21 (95,5)	21 (100)	21 (100)
<i>Neisseria spp.</i>	12 (54,5)	12 (54,5)	10 (47,6)	8 (38,8)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	14 (63,6)	18 (81,7)	14 (66,6)	18 (85,7) *
<i>Eubacterium spp.</i>	12 (54,5)	12 (54,5)	12 (57,2)	12 (57,2)
<i>Lactobacterium spp.</i>	9 (40,9)	11 (50)	9 (42,3)	18 (85,7)*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	18 (81,7)	12 (54,5) *	17 (80,9)	2 (9,5)*
<i>Clostridium spp.</i>	21 (95,5)	21 (95,5)	21 (100)	8 (38,8)*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13 (59)	13 (59)	15 (71,4)	10 (47,6)*
<i>Actinomyces spp.</i>	19 (86,3)	18 (81,7)	18 (85,7)	20 (95,2)

Примечание: ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид; \* p<0,05.

Между тем в группе пациентов, получавших наряду с традиционной терапией ГМДП, состав микрофлоры РЖ изменился у всех участников исследования (100%), у 85,7 % пациентов разнообразие микрофлоры повысилось за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*. Наряду с этим, на фоне приема ГМДП более чем в 8 раз уменьшилась обсемененность ротоглотки *P. gingivalis* (p<0,05), а также достоверно уменьшилось содержание в ротовой жидкости *St. epidermidis* (p<0,05). Поскольку таксоны *Proteobacteria* (род *Neisseria*, *Haemophilus*), *Firmicutes* (род *Streptococcus*; семейство *Veillonellaceae*, род *Granulicatella*), *Actinobacteria* (род *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*) и *Bacteroidetes* формируют основу здорового микробиоценоза ротовой жидкости, полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии ГМДП на микрофлору слизистой полости рта.

#### **2.4 – Клинико-иммунологическая эффективность глюкозаминилмурамилдипептида при псориазе**

Исследования клинико-иммунологической эффективности ГМДП при псориазе проведены у 86 пациентов с псориазом, характеризующимся длительно существующими бляшками со значительной папулезной инфильтрацией. Анализ полученных результатов выявил наличие дисбаланса в цитокиновой системе относительно таковой у 50 доноров в возрасте 18–60 лет. В частности, сывороточные концентрации ИЛ-12 (27,6±2,4 пг/мл) были значительно ниже значений доноров (37,4±2,6 пг/мл). Сходное снижение наблюдалось в отношении уровня ИЛ-10 (3,5±0,1 пг/мл) при значениях доноров 14,1±0,2 пг/мл, в то время как уровень TNF-α и ИЛ-4 в сосудистом русле достоверно повышался до 93,4±3,7 пг/мл и до 69,1±2,8 пг/мл, соответственно, при значениях цитокинов у доноров 25,0±2,0 пг/мл и 16,1±1,3 пг/мл (рисунок 8). Применение ГМДП достоверно повышало содержание противовоспалительного ИЛ-10 в периферической крови до 13,8±0,9 пг/мл (p<0,05), что может быть причиной наблюдаемого снижения продукции провоспалительных цитокинов. В частности, уровень сывороточного TNF-α снизился до 29,6±2,1 пг/мл (p<0,05), ИЛ-4 — до 17,5±1,4 пг/мл (p<0,05). Наряду с этим, после использования ГМДП содержание ИЛ-12 в крови достоверно увеличилось до 38,4±2,8 пг/мл (p<0,05), приближаясь к значениям доноров.



**Рисунок 8 – Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови пациентов с псориазом при использовании глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM; \* –  $p < 0,05$ .

Учитывая, что фактор торможения миграции макрофагов (MIF) является ключевым регулятором начальных этапов развития иммунного ответа, представлялось целесообразным изучение влияния препарата ГМДП на его концентрацию в сыворотке крови. Проведенные исследования показали, что исходная концентрация MIF в крови пациентов с псориазом была достоверно выше ( $31,5 \pm 3,6$  нг/мл,  $p \leq 0,01$ ) значений доноров (таблица 9).

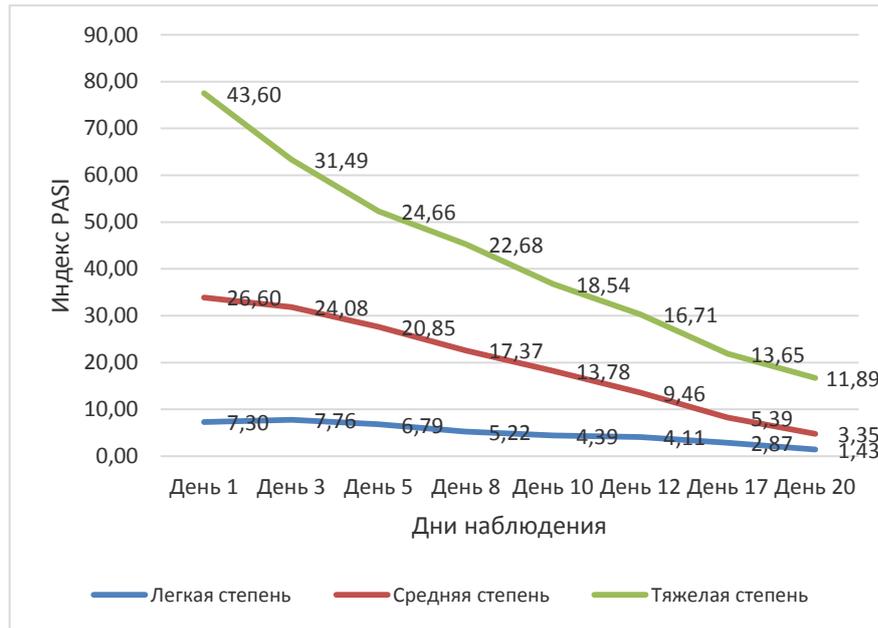
**Таблица 9 – Изменение медиаторов воспаления в сыворотке крови больных псориазом на фоне проводимой терапии глюкозаминилмурамилдипептидом**

Группы (количество пациентов)	MIF (ng/ml) (M $\pm$ m)	CD54 <sup>+</sup> cells (%) (M $\pm$ m)	sCD54 (ng/ml) (M $\pm$ m)	NO ( $\mu$ mol/L) (M $\pm$ m)
До лечения (N=86)	$31,5 \pm 3,6^*$	$75,1 \pm 8,4^*$	$266,1 \pm 16,0^*$	$34,1 \pm 1,5^*$
После лечения (N=86)	$5,9 \pm 0,7^*$	$62,5 \pm 7,2^*$	$186,1 \pm 14,3^*$	$19,9 \pm 1,3^*$
Здоровые доноры (N=50)	$5,5 \pm 0,6$	$60,6 \pm 4,1$	$162,1 \pm 10,4$	$19,4 \pm 1,4$

*Примечание:* \* – сравнение значений показателей между группами до и после лечения с использованием парного t-критерия Стьюдента,  $p < 0,01$ .

Использование ГМДП в терапии пациентов с псориазом приводило к снижению концентрации MIF до уровня такового у доноров ( $5,9 \pm 0,7$  нг/мл). При псориазе в периферической крови зарегистрировано повышение количества CD54<sup>+</sup> клеток, а также растворимых форм молекул адгезии sCD54. Применение ГМДП позволило уменьшить количество CD54<sup>+</sup> клеток, а также растворимую форму молекулы клеточной адгезии. Кроме того, при псориазе обнаружено также увеличение продукции оксида азота, однако после терапии с ГМДП уровень оксида азота в периферической крови снизился, что может свидетельствовать о стабилизации иммунных метаболических процессов.

Важно отметить, что у пациентов с псориазом тяжелой степени индекс PASI снизился с  $43,6 \pm 3,1$  до  $11,89 \pm 1,5$  ( $p < 0,01$ ), при псориазе средней степени - с  $26,6 \pm 2,2$  до  $3,35 \pm 2,4$  ( $p < 0,01$ ), при псориазе легкой степени – от  $7,3 \pm 2,49$  до  $1,43 \pm 0,6$  ( $p = 0,037$ ) (рисунок 9).



**Рисунок 9 – Изменение индекса PASI у пациентов с псориазом различной степени тяжести при использовании глюкозаминилмурамилдипептида**

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Наряду с этим при лечении пациентов с псориазом лекарственным средством на основе ГМДП в период ремиссии значительное улучшение отмечено у 50 (58,1%) человек, улучшение всех клинических признаков и симптомов по сравнению с исходным состоянием было характерно для 9 (10,4%) пациентов, у 5 (5,9%) пациентов результаты терапии были определены как удовлетворительные; ухудшение состояния наблюдалось у 1 (1,2%) пациента, ранее получавшего системное лечение метотрексатом.

Таким образом, впервые проведенное исследование влияния мурамилпептида на изменение относительного количества CD54+клеток, содержания sCD54, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  и оксида азота в сыворотке крови пациентов с псориазом показало, что монотерапия мурамилпептидом в период ремиссии купирует клинические проявления псориаза, нормализует синтез цитокинов IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , уменьшает количество клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы и сывороточные антигены sCD54 до контрольных значений. Клиническое улучшение было обнаружено у 98,2% пациентов в виде статистически значимого увеличения безрецидивного периода, при этом у 24,4% имело место отсутствие клинических проявлений псориаза в течение четырех лет наблюдений.

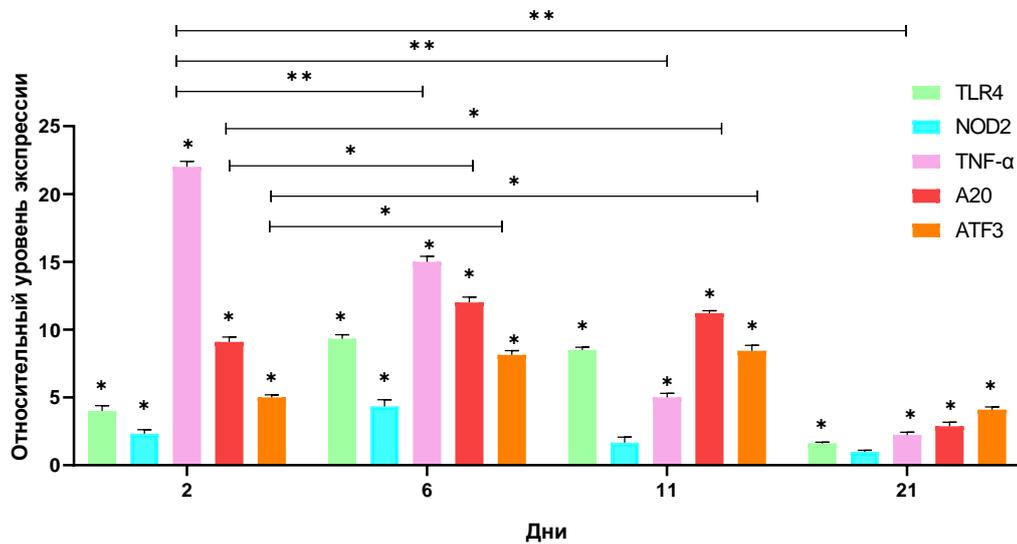
### **3 – Исследование механизмов иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения**

#### **3.1 – Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на экспрессию генов регуляторных факторов на уровне сигнальных путей**

С целью объяснения механизма выявленного двойного эффекта биорегуляторов бактериального происхождения (ЛПС и ГМДП), усиливающих и ограничивающих аллергическое воспаление, был проведен анализ экспрессии генов регуляторных элементов на трех уровнях сигнальных путей: а) на уровне рецепторов (TLR4, NOD2); б) на уровне транскрипционных

факторов (*A20*, *ATF3*); в) на уровне экспрессии провоспалительного цитокина *TNF-α* в системе *in vivo* и *in vitro*.

При анализе экспрессии генов учитывали, что разница относительной их экспрессии более чем в 2 раза считалась значительной, а данные представлены как среднее значение трех независимых тестов. Исследованиями показано, что уже через 24 часа после внутрибрюшинного введения мышам ЛПС в мононуклеарах мышей заметно увеличивалась экспрессия всех изученных генов: максимальный уровень экспрессии гена *TNF-α* ( $21,9 \pm 0,9$ ;  $p \leq 0,001$ ) был отмечен через 24 часа после введения ЛПС, а гена *A20* - на 6-е сутки ( $12,1 \pm 0,4$ ;  $p \leq 0,01$ ) с сохранением высоких значений ( $11,0 \pm 0,35$ ;  $p \leq 0,01$ ) на 11-е сутки. В то же время, высокие уровни экспрессии гена *TLR4* сохранялись на 6 и 11 дни наблюдения:  $9,1 \pm 0,3$ ;  $p \leq 0,01$  и  $8,7 \pm 0,25$ ;  $p \leq 0,01$  соответственно. Высокий уровень экспрессии *TLR4* и *TNF-α* сохранялся на протяжении последующих пяти дней, но к 21 дню уровень *TLR4* снижался до исходных значений, а уровень *TNF* уменьшался в 9 раз в сравнении с максимальным (рисунок 10).

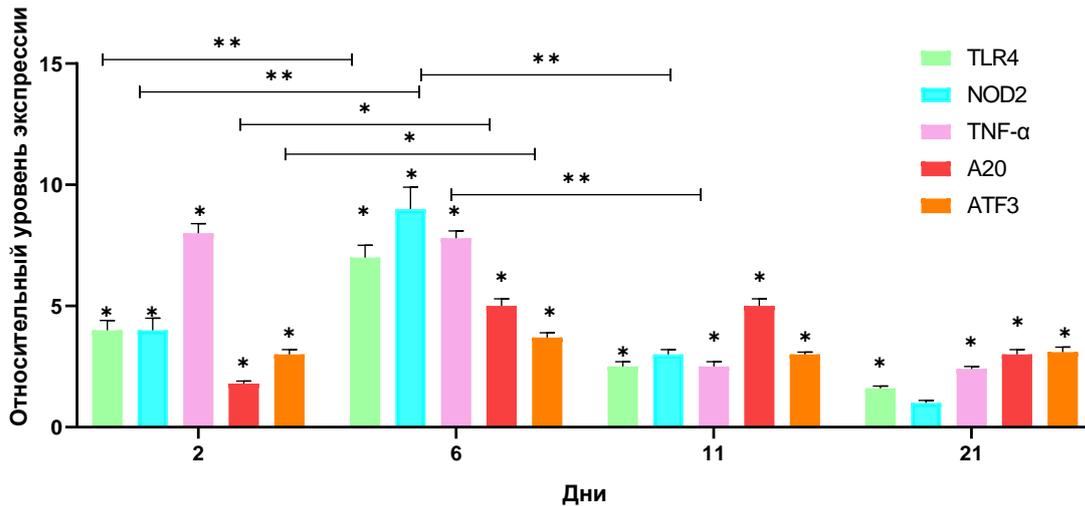


**Рисунок 10 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* в мононуклеарах мышей на 2, 6, 11, 21 дни при внутрибрюшинном введении липополисахарида**

Примечание: \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

В результате воздействия ЛПС наблюдалось также увеличение экспрессии *NOD2*, максимальное значение которого ( $4,4 \pm 0,2$ ;  $p \leq 0,01$ ) было отмечено на 6-й день, но к 11 дню значения экспрессии гена *NOD2* снизились ( $1,5 \pm 0,15$ ;  $p > 0,05$ ). Таким образом, ЛПС, являющийся фрагментом клеточных стенок грамотрицательных бактерий, стимулирует экспрессию генов не только собственного рецептора *TLR4*, но и рецептора *NOD2*, который детектирует фрагменты пептидогликана грамположительных бактерий. Активирующий фактор транскрипции (*ATF3*) за 24 ч достоверно увеличился в 4,9 раза ( $4,9 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), а на 11-е сутки значения достигли максимума в 8,4 раза ( $8,4 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), а повышенные в 4,1 раза значения ( $4,1 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) сохранялись до 21-го дня. Анализ полученных данных показал, что введение ЛПС мышам значительно увеличивало экспрессию генов как рецепторов *TLR4*, так и *NOD2*, а также *TNF-α*. Кроме того, сразу возрастала и экспрессия деубиквитиназы *A20*. Экспрессия *ATF3* задерживалась, но сохраняла высокие значения в течение 11 дней после инъекции.

Введение ГМДП мышам в гораздо меньшей степени, чем ЛПС, стимулировало экспрессию генов, но уровень *NOD2* повышался в 4,3 раза ( $4,3 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) уже на первые сутки, также как и *TLR4*, уровень которого повышался в 4,2 раза ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), и их максимальные значения также наблюдались к 6 дню: повышение в 8,7 раза ( $8,7 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) для *TLR4* и в 9,5 раз ( $9,5 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) для *NOD2*. Достоверные изменения экспрессии *A20* в 5,1 раз ( $5,1 \pm 0,15$ ;  $p < 0,01$ ) наблюдались лишь к 6 дню и сохранялись повышенными в течение 15 дней после последней инъекции. Примечательно, что ГМДП стимулировал экспрессию генов не только собственного рецептора (*NOD2*), но и *TLR4* (рисунок 11).



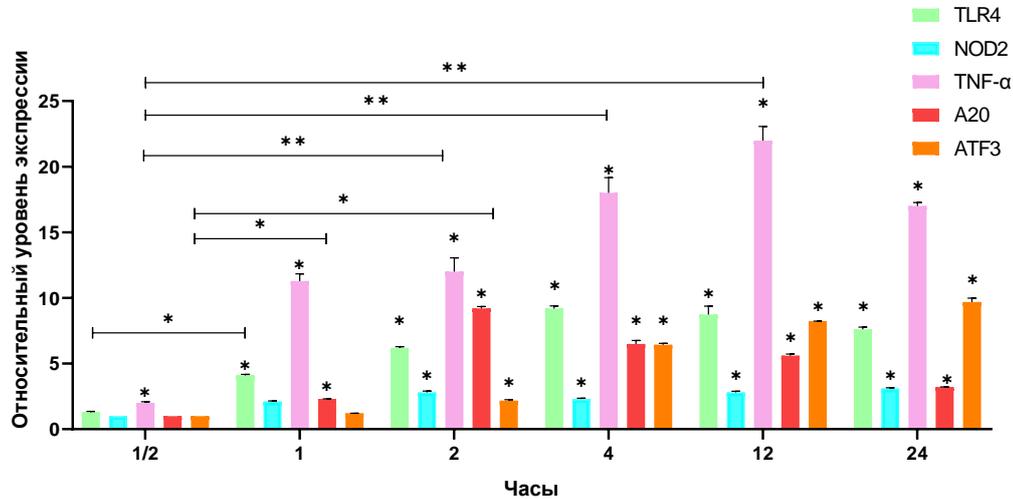
**Рисунок 11 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* в мононуклеарах мышей на 2, 6, 11, 21 дни при внутрибрюшинном введении глюкозаминилмурамидипептида**

Примечание: \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

При внутрибрюшинном введении животным ГМДП максимальный уровень экспрессии гена *TNF-α* был отмечен на 2-е и 6-е сутки наблюдения, а в последующие сроки (11-й и 21-й день) выраженность экспрессии была заметно сниженной. Относительная экспрессия гена *NOD2* и *TLR4* была максимальной к 6-му дню наблюдения, генов *A20* и *ATF3* – на 6-е и 11-е сутки наблюдения. При этом обращает на себя внимание факт наиболее выраженного стимулирующего влияния ГМДП в отношении экспрессии генов *NOD2*, *TNF-α*. Эти данные показывают, что максимальные значения и экспрессия рецепторов (*TLR4*, *NOD2*) и *TNF-α*, а также фактора транскрипции *ATF3* и деубиквитиназы *A20* достигают максимальных значений к 6-м суткам, после чего экспрессия *TLR4*, *NOD2* и *TNF-α* заметно снижается, а экспрессия *A20* и *ATF3* все еще повышена.

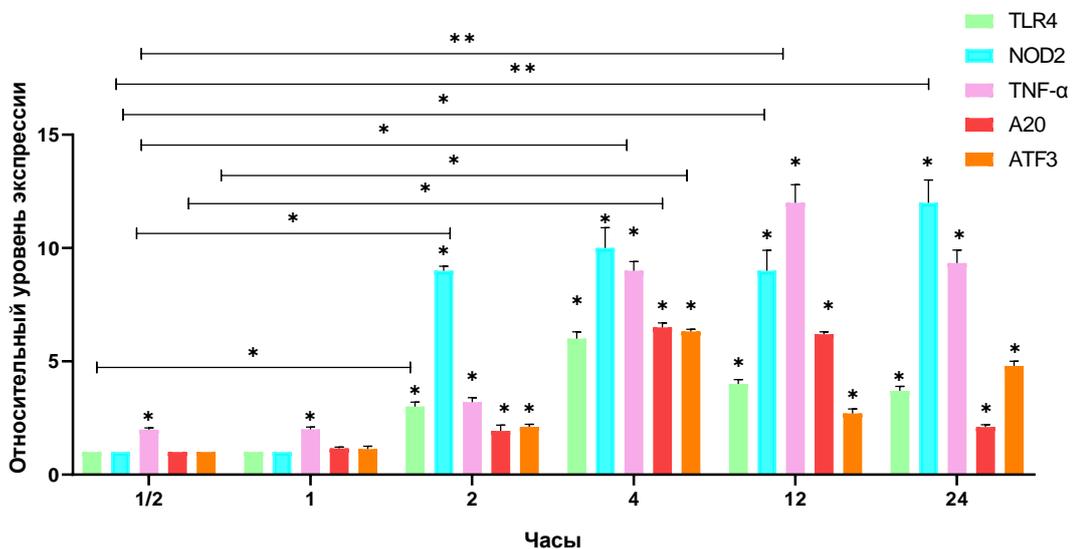
Оценка экспрессии генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* в мононуклеарах человека проводилась и в самые ранние сроки наблюдения после введения ЛПС и ГМДП в системе *in vitro* (рисунки 12, 13). Исследования *in vitro* показали, что стимуляция мононуклеаров человека ЛПС в течение 30 минут приводит к увеличению *TNF-α* в 2 раза ( $2,0 \pm 0,06$ ;  $p < 0,01$ ), через час — в 11 раз ( $11,1 \pm 0,3$ ;  $p < 0,001$ ), через 2 часа — в 12 раз ( $12,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ), а к 12 часам достигает максимума в 22 раза ( $22,1 \pm 0,5$ ;  $p < 0,001$ ), а затем уменьшается (рисунок 12). Экспрессия генов *TLR4* увеличивается в 4 раза ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) через час, достигает максимума в 9 раз ( $9,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,01$ ) через 4 часа и сохраняется на этом уровне до 12 ч и остается повышенным в 7,5 раза ( $7,5 \pm 0,25$ ;  $p < 0,01$ ) до 24 часов. Экспрессия генов *NOD2* увеличивается через час, достигает через 2 часа максимальных значений – увеличение в 3,1 раза ( $3,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ) и сохраняется повышенной в

течение 24 часов. Экспрессия регуляторных факторов — *A20* и *ATF3* к 30 минутам остается неизменной и увеличивается значительно медленнее, чем *TNF- $\alpha$* . Максимальное значение  $9,2 (9,2 \pm 0,45; p < 0,01)$  *A20* достигает через 2 часа, а *ATF3* —  $9,7$  раза ( $9,7 \pm 0,25; p < 0,01$ ) через 24 часа после стимуляции. Таким образом, гены *A20* и *ATF3* экспрессируются позже, чем *TNF- $\alpha$*  и *TLR4*, после стимуляции ЛПС *in vitro*.



**Рисунок 12 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF- $\alpha$* , *A20* и *ATF3* при стимуляции липополисахаридом *in vitro* в мононуклеарных клетках человека через 30 мин, 1, 2, 4, 12 и 24 часа**

Примечание: \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .



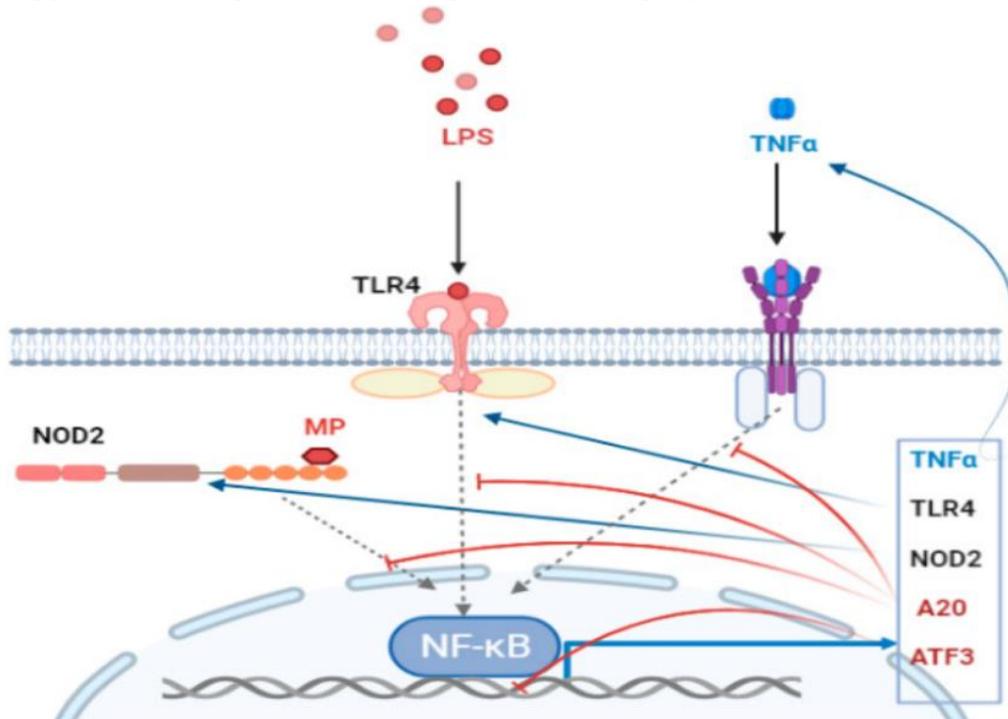
**Рисунок 13 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF- $\alpha$* , *A20* и *ATF3* при стимуляции глюкозаминилмурамиддипептидом *in vitro* в мононуклеарных клетках человека через 30 мин, 1, 2, 4, 12 и 24 часа**

Примечание: \* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,001$ .

При стимуляции мононуклеарных клеток человека ГМДП через 30 минут экспрессия только *TNF- $\alpha$*  достоверно возрастает в 2,2 раза ( $2,1 \pm 0,1; p < 0,01$ ), экспрессия *TLR4* увеличивается в 3,2 раза ( $3,2 \pm 0,15; p < 0,01$ ), через 2 часа достигает максимального значения в 6,1 раза ( $6,1 \pm 0,3; p < 0,01$ ) к 4

часам, затем снижается в течение 24 часов и достигает значений 3,7 ( $3,7 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ). Экспрессия гена рецептора *NOD2* остается неизменной в течение часа, увеличивается в 9 раз ( $9,05 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) через 2 часа и остается повышенной в течение 24 часов. *TNF- $\alpha$*  увеличивается с первых минут после стимуляции, достигая максимального значения увеличения в 12,1 раза ( $12,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) через 12 часов и сохраняя высокие значения в течение 24 часов. *A20* начинает увеличиваться через 2 часа после стимуляции и достигает максимальных значений увеличения в 6,5 раза ( $6,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) через 4 часа, а высокие значения увеличения в 6,2 раза ( $6,2 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) сохраняются в течение 12 часов. и уменьшаются в 2,2 раза ( $2,2 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ) через 24 часа. Экспрессия *ATF3* увеличивается гораздо медленнее; только через 2 часа повышается в 2,1 раза ( $2,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ), максимальные значения повышения в 6,3 раза ( $6,3 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) имеют место через 4 часа, а повышенный уровень экспрессии сохраняется в течение 24 часов.

В целом изучение динамических изменений экспрессии генов деубиквитиназы *A20* и фактора транскрипции *ATF3*, ограничивающих воспаление, и генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR4* и *NOD2*) показало, что на начальном этапе воздействия ББП увеличивается экспрессия *TLR4*, *NOD2* и *TNF- $\alpha$* , что способствует появлению петли положительной обратной связи и поддержанию воспаления, тогда как гены *ATF3* и *A20* - регуляторов воспаления - экспрессируются с задержкой по времени и формируют петлю отрицательной обратной связи (рисунк 14).



**Рисунок 14 – Положительная и отрицательная обратная связь при воспалении, индуцированном липополисахаридом и мурамилпептидом, обнаруженные в эксперименте**

*Примечание:* Синие стрелки — активация воспаления — на начальном этапе воздействия ЛПС и ГМДП увеличивается экспрессия *TNF- $\alpha$* , *TLR4* и *NOD2*, способствующая появлению петли положительной обратной связи; красные линии — подавление воспаления — гены цитозольных белков, контролирующих воспаление *A20* и *ATF3*, экспрессируются в клетках с задержкой по времени; LPS –липополисахарид; MP - мурамилпептид.

### **3.2 – Влияние глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты (ГМДП-ОН) на внутриклеточные сигнальные пути НК-клеток *in vitro***

Для определения механизмов цитотоксического и цитостатического действия производного мурамилдипептида ГМДП-ОН на линии опухолевых клеток, обнаруженного ранее (Гапонов А.М. и

др., 2018), проведена сравнительная оценка экспрессии генов, мембранных рецепторов, цитокинов и белков, контролирующей проявление функциональной активности НК-клеток. НК-клетки выделяли из суспензии мононуклеаров 5 доноров, инкубировали с ГМДП-ОН (10 мкг/мл) (экспериментальная группа) и без ГМДП-ОН (контрольная группа) в течение 6 и 16 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Исследованиями выявлено, что экспрессия под действием ГМДП-ОН гена *CRKL*, продукт которого активирует киназы RAS и JUNK, а также трансформирует фибробласты, достоверно повышается на 48-70% в первые 6 часов, сохраняя повышенные значения на протяжении 16 часов, тогда как экспрессии гена *FYN*, кодирующего тирозинкиназу семейства CRK, которая участвует в перфорин-зависимом киллинге инфицированных клеток, остается на прежнем уровне под действием ГМДП-ОН.

Известно, что внутриклеточные киназы, ZAP70 и SYK, обладающие большой степенью гомологии и часто конкурирующие между собой, запускают активацию НК-клеток после связывания их мембранных рецепторов с трансформированными или инфицированными клетками. Активация ZAP70 в НК-клетках приводит к высвобождению гранзима В, посредством которого реализуется противоопухолевая активность НК-клеток, в частности, при множественной миеломе (Hideshima T, et al, 2021). ГМДП-ОН в условиях *in vitro* на 50% увеличивал экспрессию на позднем этапе гена *ZAP70*, при этом на раннем этапе почти в 2 раза снижалась экспрессия *SYK*. Снижение экспрессии *SYK* может также способствовать увеличению киназной активности *ZAP70* в связи с отсутствием конкурента за связывание с мишенью, а также может быть объяснено необходимостью запуска в клетке других сигнальных путей.

Наблюдалось усиление экспрессии более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ) изоформ фосфоинозитид-3-киназы PI3K (*PIK3R1* и *PIK3R3*) на ранних (6 часов) и поздних (16 часов) этапах, а также увеличение через 16 часов экспрессии гена *FCGR3A*, который кодирует рецептор Fc-фрагмента IgG (CD16a). Отмечено также, более чем двукратное снижение *PLCG2* как на раннем, так и на позднем этапе воздействия ГМДП-ОН ( $p < 0,05$ ).

Наряду с этим ГМДП-ОН вызывал существенное увеличение экспрессии генов интерферонов 1-го типа и их рецепторов на протяжении всего периода наблюдения, демонстрируя таким образом влияние на основные эффекторные функции НК-клеток.

Активируемый внеклеточными стимулами сигнальный путь митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) выполняет в клетке множество функций: контроль транскрипции генов, участвующих в метаболизме, пролиферации и апоптозе. Возрастающее экспрессии адаптерных белков сигнального пути МАРК на раннем этапе и более чем в два раза на позднем этапе является основанием для утверждения, что вызванное ГМДП-ОН увеличение экспрессии генов МАРК пути ускоряет пролиферацию и усиливает функциональную активность НК-клеток. Известно, что MAP2K7 и MAP2K4 фосфорилируют С-Jun, который активируется под действием стрессорных факторов, поддерживает активность циклина D1, участвуя таким образом в регуляции клеточного цикла (Li C., et al 2008). Обнаруженное в настоящем исследовании продолжительное увеличение экспрессии генов адаптерных белков МАРК пути при воздействии ГМДП-ОН выявляет способность мурамилпептида инициировать МАРК-зависимый сигнальный путь, приводящий в итоге к высвобождению цитотоксических гранул и реализации цитотоксических функций.

Известно, что для созревания НК-клеток необходима активация сигнальных путей генов *VAV1* и *VAV2* (Zheng P., et al, 2014). Между тем под влиянием ГМДП-ОН увеличивалась экспрессия гена *VAV2* ( $p < 0,05$ ) и уменьшалась экспрессия *VAV1* ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об

избирательности индуцированной экспрессии и дифференцировки активации сигнальных путей VAV под действием мурамилпептида.

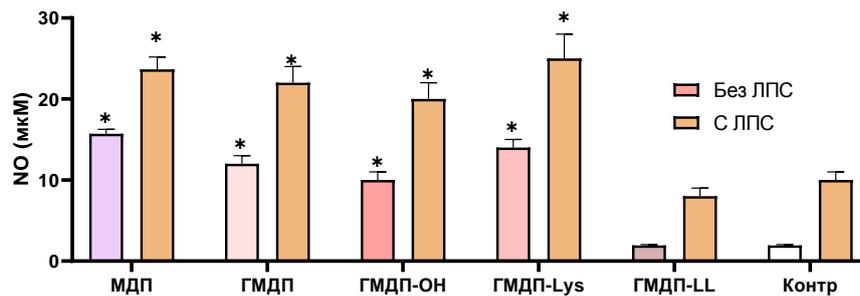
ГМДП-ОН в значительной степени уменьшал экспрессию генов С $\beta$ -фосфолипазы *PLCG1* ( $p > 0,05$ ) и С $\gamma$ -фосфолипазы *PLCG2* ( $p < 0,05$ ), участвующих в метаболизме фосфолипидов.

Поскольку продукты генов *STAT* способствуют активации и сохранению жизнеспособности НК-клеток в условиях окислительного стресса, выявленные нами эффекты ГМДП-ОН по усилению экспрессии генов *STAT* на более позднем этапе свидетельствуют об увеличении потенциала выживаемости и активности НК-клеток, имеющего первостепенное значение в период развития патологических процессов.

Таким образом, изучение транскриптома НК-клеток при воздействии ГМДП-ОН выявило способность данного ББП влиять на экспрессию генов НК-клеток человека, регулирующих сигнальные пути, ответственные за реализацию эффекторной активности НК-клеток.

### 3.3 – Роль мурамилпептидов и липополисахарида в регуляции экспрессии оксида азота

Структурно-функциональные исследования мурамилпептидов *in vitro* продемонстрировали значимость D-конфигурации изоглутамина: мурамилпептид ГМДП-LL не проявлял активности. Наряду с этим среди мурамилпептидов с L- аланилом и D-изоглутамином замена гидроксильного радикала в положении R<sub>2</sub> на Lys увеличивает биологическую активность, способствуя максимальному освобождению оксида азота (рисунк 15). Полученные данные важно учитывать при разработке лекарственных средств на основе мурамилпептидов.



**Рисунок 15 – Выделения оксида азота в клеточной культуре RAW264.7 при воздействии мурамилпептидов и липополисахарида**

*Примечание:* МДП, ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys, ГМДП-LL – мурамилпептиды; ЛПС – липополисахарид; \* –  $p < 0,05$  – при сравнении с контрольными значениями без мурамилпептидов.

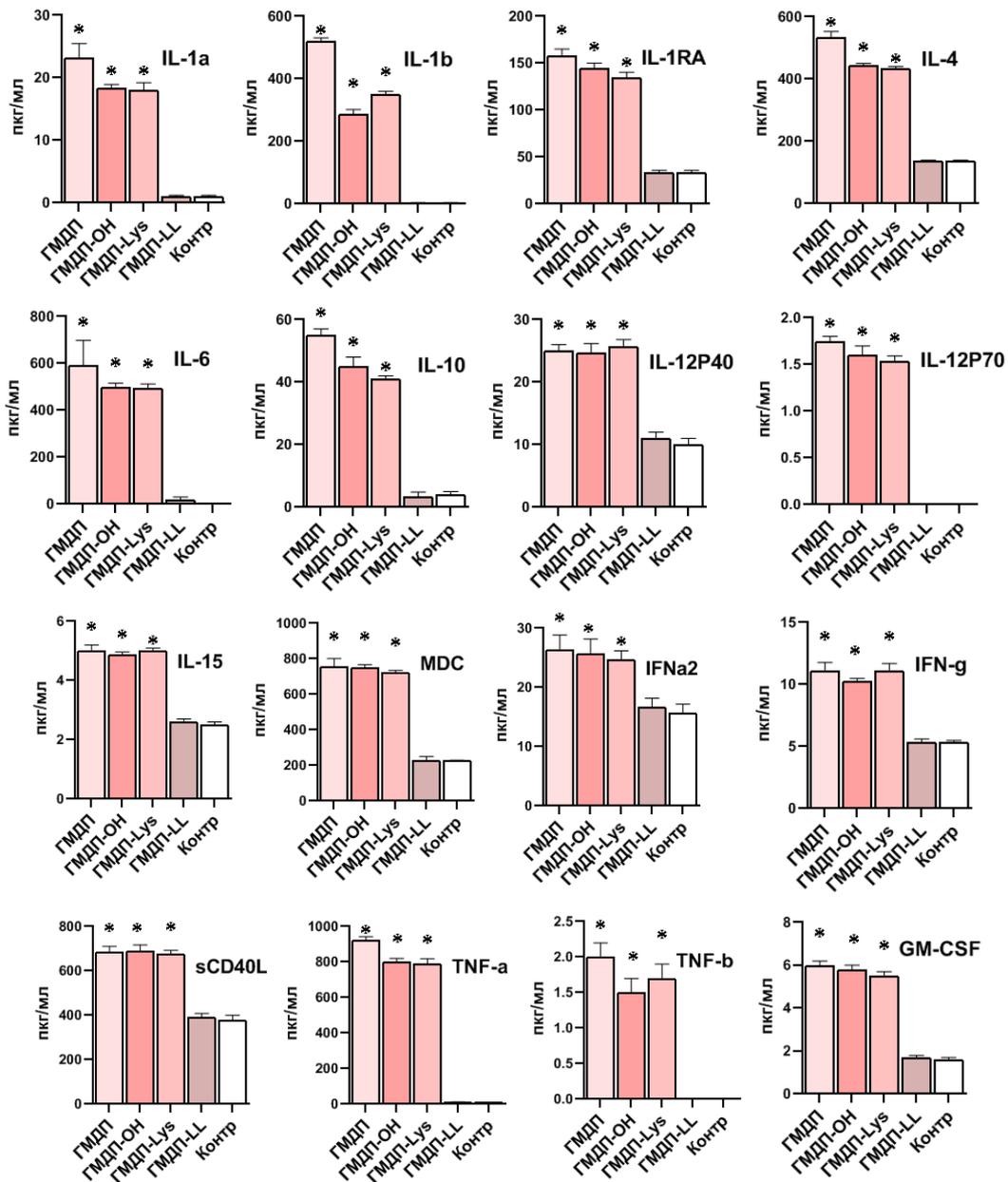
В результате исследования, таким образом, обнаружены структурно-функциональные закономерности, свидетельствующие о том, что L-D-изомерная форма гликопептида необходима для выработки оксида азота, который является универсальным мессенджером многочисленных физиологических процессов (увеличение бактерицидной активности макрофагов, участие в регуляции сосудистого тонуса, давления и поддержания функции эндотелия).

### 3.4 – Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов

#### 3.4.1 – Влияние дисахарид содержащих мурамилпептидов на продукцию цитокинов

Впервые на мононуклеарных клетках здоровых доноров исследована способность мурамилпептидов ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys и ГМДП-LL влиять на продукцию цитокинов IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF-a, TNF- $\beta$ , GM-CSF. Обнаружено, что ГМДП-LL не оказывает влияния на

продукцию цитокинов, что согласуется с ранее полученными данными по индукции экспрессии оксида азота (рисунк 16).



**Рисунок 16 – Концентрация хемокинов, факторов роста и цитокинов при воздействии мурамилпептидов на мононуклеарные клетки человека *in vitro***

*Примечание:* МДП, ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys ГМДП-LL – мурамилпептиды; \* -  $p < 0,05$  – при сравнении с контрольными значениями.

В результате исследований обнаружено, что L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) стимулируют выработку провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , участвующих в остром и системном воспалении. При этом максимальный эффект обнаружен при индукции IL-1 $\beta$  (до 520 пкг/мл), IL-6 (до 595 пкг/мл) и TNF- $\alpha$  (до 930 пкг/мл). Наиболее активным из исследованных мурамилпептидов оказался ГМДП. Примечательно, что L-D мурамилпептиды стимулируют выработку не только провоспалительных цитокинов IL-1a и IL-1b, но и их антагониста - антагониста рецептора интерлейкина -1 (IL-1RA), демонстрируя возможность контроля как про- так и противовоспалительных процессов. Цитокин IL-10, регулирующий баланс иммунного ответа,

снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах, он также может подавлять активность макрофагов и дендритных клеток. IL-10 повышался при воздействии ГМДП до 56 мкг/мл, что свидетельствует о возможности его использования в случае потери способности Th17 продуцировать IL-10 и предотвращения проявления Th17 патогенного фенотипа. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), стимулирующий выработку гранулоцитов и макрофагов из клеток-предшественников костного мозга и усиливающий функциональную активность зрелых лейкоцитов, при действии L-D мурамилпептидов повышался более чем в два раза до 6 пкг/мл. L-D мурамилпептиды не изменяли значения IL-2, IL-3, IL-5, IL-9 (данные не представлены)

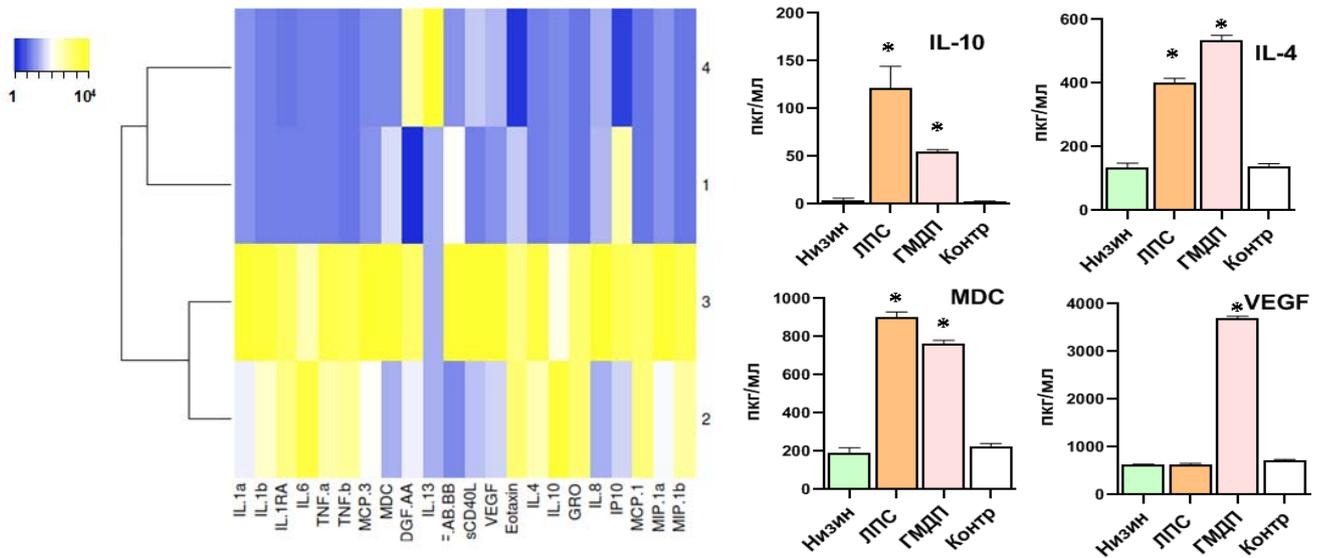
Примечательно, что L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) увеличивали продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, указывая на возможность регулирования разнонаправленных процессов в зависимости от контекста и микроокружения.

### **3.4.2 – Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и бактериоцина низина на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов**

Исследование влияния ЛПС, мурамилпептида и бактериоцина низина на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками доноров флуоресцентным методом показало существенные различия в их активности. Установлено, что самое активное влияние на мононуклеарные клетки оказывают мурамилпептид и липополисахарид (*рисунок 17*).

Мурамилпептид повышал уровни всех исследуемых белков: EGF, FGF-2, Eotaxin, FLT-3L, GRO, IL-10, MCP-3, MDC, PDGF-AA, IL-13, PDGF-AB/BB, sCD40L, IL-1RA, IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IP10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF-a, TNF-b, VEGF, за исключением IL-13. Низин показал наименее выраженную активность в увеличении исследованных субстанций, а PDGF-AA понижался при его воздействии в два раза. В проведенном исследовании ЛПС и ГМДП повышали выработку IL-10 в 42 и 22 раза соответственно, при этом низин также повышал его уровень, но в гораздо меньшей степени, увеличение было в три раза по сравнению с контрольным значением. Противовоспалительный цитокин IL-10 регулирует баланс иммунного ответа, снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах, может также подавлять активность макрофагов и дендритных клеток.

IL-4 принадлежит ключевая роль в содействии дифференцировке наивных Т-хелперов в Th2, он также стимулирует активированную пролиферацию В- и Т-клеток, усиливает выработку МНС класса II. Известно, что IL-4 избирательно воздействует на продукцию цитокинов и хемокинов стимулированными липополисахаридом макрофагах: увеличивает экспрессию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , макрофагальный воспалительный белок-2, но ингибирует продукцию IL-12p40 (*Major J, et al, 2002*), и таким образом, изменяя спектр вырабатываемых цитокинов. Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) повышался при воздействии ГМДП в 4,6 раза.



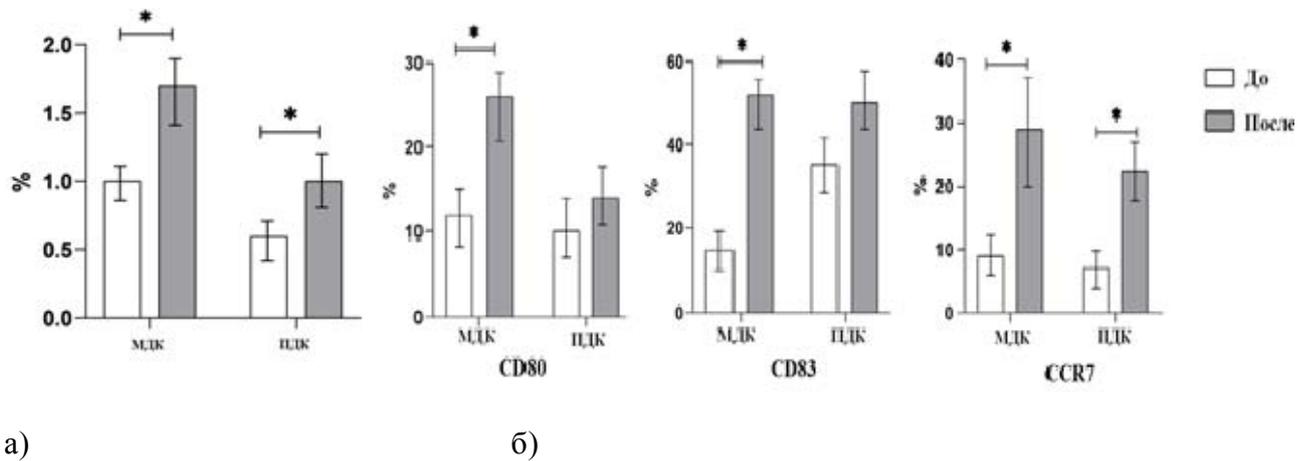
**Рисунок 17 – Изменение выработки цитокинов, хемокинов и факторов роста при воздействии липополисахарида, мурамилпептидов и низина мононуклеарными клетками**

*Примечание:* 1- образцы с низином; 2 – образцы с ЛПС; 3 – образцы с ГМДП; 4 - контрольные образцы. Значения представлены в диапазоне 1-10<sup>4</sup> пкг/мл; \* - p<0,05 – при сравнении с контролем.

### 3.5 – Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида, катехоламинов и низина на фенотипические изменения дендритных клеток человека в системе *in vivo* и *ex vivo*

Дендритные клетки (ДК) являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, координируя иммунный ответ на бактериальные и вирусные инфекции, а также на трансформированные клетки, а оптимальное соотношение их субпопуляций и степень их зрелости является необходимым условием поддержания иммунного гомеостаза (*Cheng H., et al, 2023*). Проведенное исследование относительного количества и фенотипических характеристик ДК в периферической крови 42 доноров методом цитофлуориметрии показало, что содержание ДК доноров в среднем составляло 1,41% (0,22-1,85%) от общего количества клеток периферической крови. Между тем после 10-дневного курса применения ГМДП с целью иммунопрофилактики сезонных респираторных заболеваний количество общего пула ДК увеличилось до 2,72% (0,93-2,95%), и в том числе, уровень миелоидных ДК (МДК) и плазмцитойдных ДК (ПДК) увеличился в 1,9 раз (p<0,05), а соотношение между этими популяциями оставалось на том же уровне - 1,8 (*рисунок 18а*).

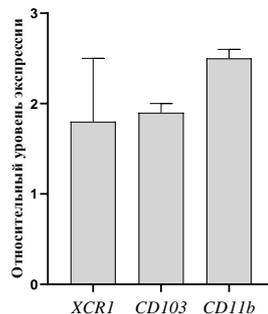
Известно, что основными маркерами, определяющими зрелость ДК, являются рецепторы CD80, CD83 и CCR7, обеспечивающие миграцию ДК в лимфатические узлы и взаимодействие их с Т-клетками (*Banchereau J, et al, 2000*). Исследованиями выявлены существенные изменения фенотипов функционально значимых популяций ДК после приема ГМДП в виде статистически значимого повышения экспрессии маркеров дифференцировки CD80, CD83 и CCR7 на всех ДК (*рисунок 18б*).



**Рисунок 18 – Изменение соотношения субпопуляций и фенотипа дендритных клеток после приема препарата на основе глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* а) количество миелоидных и плазмоцитоподобных дендритных клеток в % от общего количества клеток периферической крови доноров; б) изменения фенотипа функционально значимых популяций ДК периферической крови доноров до и после 10-дневного курса ГМДП; \* -  $p < 0,05$ .

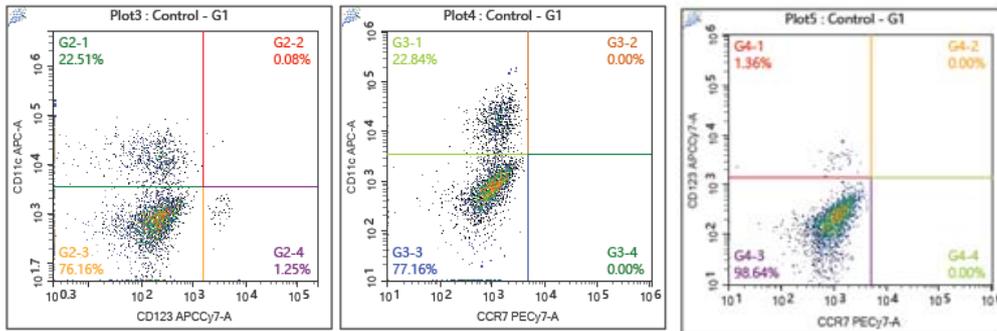
Оценка влияния 10-дневного курса ГМДП на уровень транскрипции мРНК генов *XCR1*, *CD11b* и *CD103* в мононуклеарах периферической крови доноров относительно исходного уровня показала тенденцию к возрастанию относительного уровня транскрипции мРНК генов *CD11b* (рисунок 19).



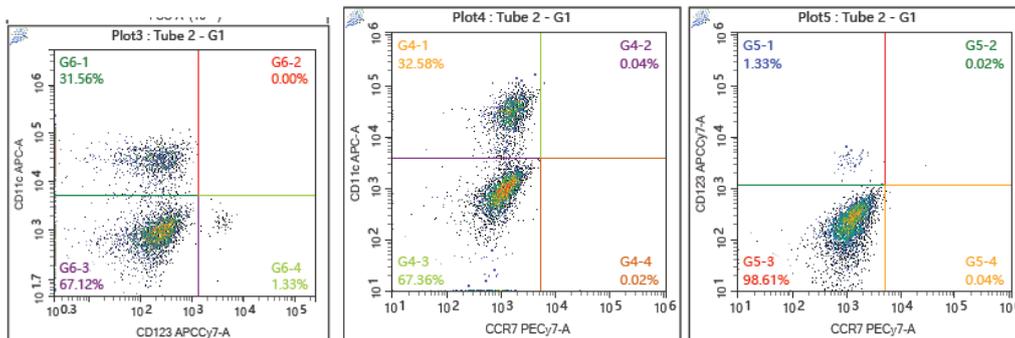
**Рисунок 19 – Изменение уровней транскрипции мРНК генов *XCR1*, *CD11b* и *CD103* в мононуклеарных клетках периферической крови после 10-дневного курса глюкозаминилмурамилдипептида по отношению к исходному уровню**

Известно, что интегрин альфа-M (CD11b) участвует в сайт-специфической локализации ДК совместно с Th17, конститутивно поддерживая созревание Th17 (Worbs T., 2017; Denning N.L., 2007). CD11b+ ДК экспрессируют белки, обеспечивающие контакты с эпителиальными клетками с целью захвата дендритами представителей микроорганизмов просвета кишечника (Rescigno M., 2001). Рецепторы CD11b, XCR1 и CD103 обеспечивают миграцию во вторичные лимфоидные органы, а затем в зону воспаления. После того, как была установлена способность ГМДП *in vivo* модулировать экспрессию поверхностных маркерных молекул в функционально значимых популяциях ДК крови студентов-спортсменов, включая маркер CCR7, было проведено исследование влияния ГМДП, а также ЛПС, адреналина и норадреналина в системе *ex vivo*. При занятиях спортом уровень катехоламинов в крови заметно повышается, для выявления вклада адреналина и норадреналина в изменение фенотипа ДК было исследовано их влияние на изменение маркеров ДК.

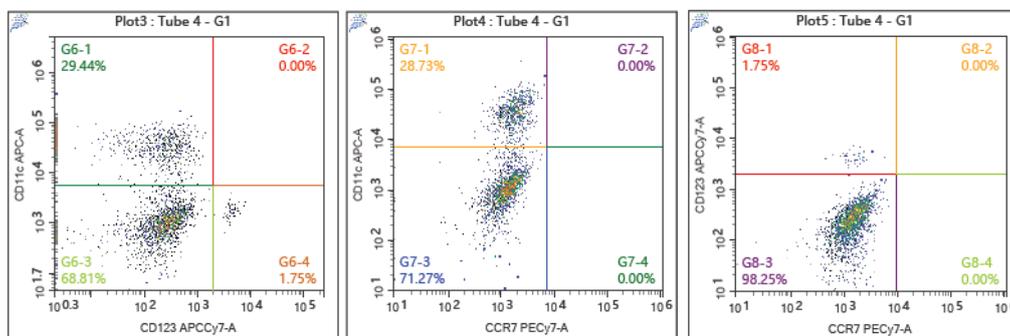
Исследованиями установлено, что внесение ГМДП, ЛПС, и норадреналина в периферическую кровь доноров *ex vivo* способствовало увеличению количества CD11c+ ДК, в отличие от низина и адреналина, которые не влияли на количество CD11c+ ДК (рисунки 20-25). Важно отметить, что мембранный белок CD11c – это альфа-субъединица интегрина  $\alpha X\beta 2$ , а также рецептора комплемента 4 (CR4), и интегрин CD11c/CD18 взаимодействует с различными лигандами, в том числе с iC3b системы комплемента, фибриногеном, с молекулами межклеточной адгезии (ICAM) или ЛПС и обеспечивает участие ДК в перестройке внеклеточного матрикса, фагоцитозе, миграции и клеточной адгезии (Lukácsi S, et al, 2020). Кроме того, ДК, лишённые CD11c, не способны реагировать на хемокины, индуцируемые воспалительными стимулами, такие, как MCP, MIP1, MIP3 (Caux C. et al, 2000).



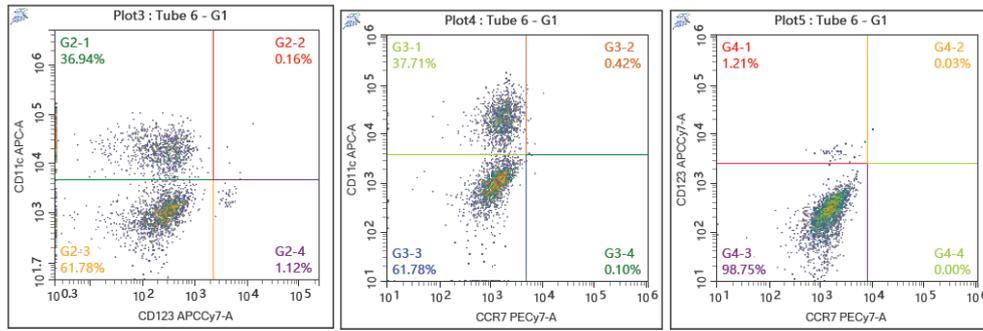
**Рисунок 20 - Экспрессия маркеров дендритных клеток в контрольном образце**



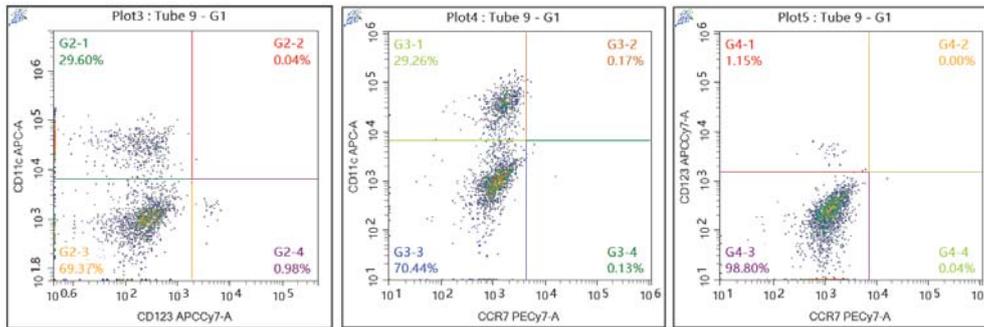
**Рисунок 21 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии глюкозаминилмурамиддипептида**



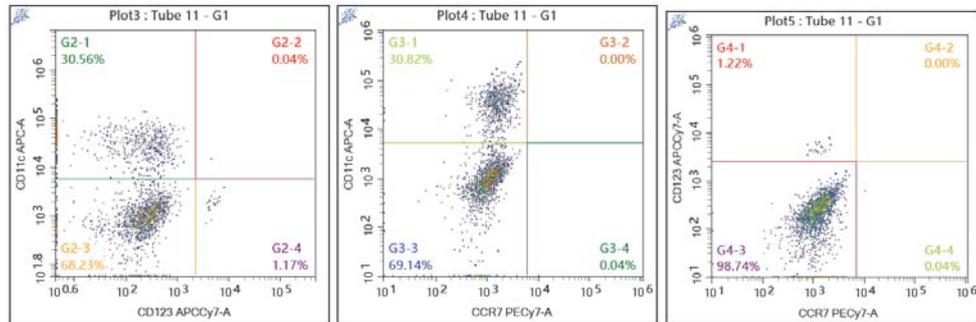
**Рисунок 22 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии липополисахарида**



**Рисунок 23 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии норадреналина**



**Рисунок 24 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии глюкозаминилмурамиддипептида и норадреналина**



**Рисунок 25 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии липополисахарида, и норадреналина**

По результатам исследования, ГМДП, ЛПС и норадреналин увеличивали количество CD11c+ ДК на 29%, 31% и 64%, соответственно, тогда как адреналин и бактериоцин низин не оказывали статистически значимого влияния на маркеры ДК (таблица 10).

**Таблица 10 – Изменение экспрессии CD11c под влиянием липополисахарида, низина, глюкозаминилмурамиддипептида, адреналина и норадреналина, Me(Q0,25-Q0,75)**

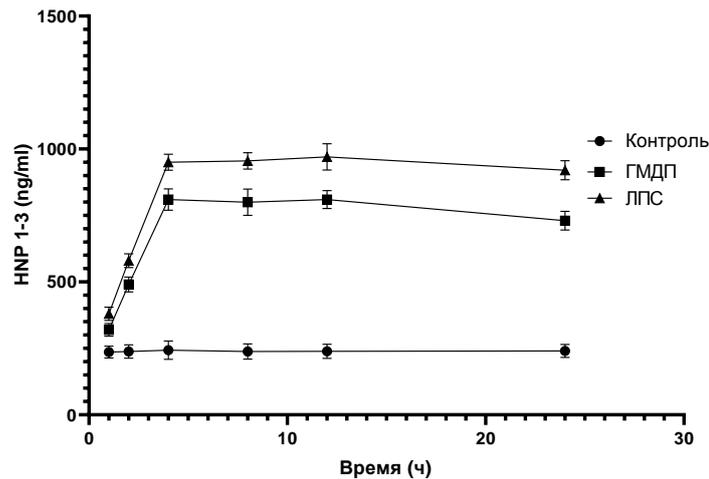
Контроль	ГМДП	ЛПС	Норадреналин	ГМДП+ Норадреналин	ЛПС+ Норадреналин	Адреналин	Низин
100% * (91-107)	129% * (119-139)	131% * (119-142)	164%* (150-179)	132%* (120-143)	136% * (122-149)	110% (99-121)	105% (95-116)

*Примечание:* \* – достоверность различий в сравнении с контрольными значениями,  $p < 0,05$ .

При совместном введении норадреналина с ГМДП или ЛПС увеличение составляло 32% и 36% соответственно, что в значительной степени уступало воздействию только норадреналина (64%). Фактически, совместное введение норадреналина с ГМДП или ЛПС снижало количество CD11c+ДК относительно такового при введении только норадреналина.

### 3.6 – Исследование уровней пептидов нейтрофилов человека HNP 1-3, экспрессии генов *TLR4*, *NOD2*, *ATF3* и *A20* при воздействии липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и катехоламинов на нейтрофилы человека *in vitro*

Известно, что эндогенные катехоламины (адреналин и норадреналин) оказывают прямое модулирующее влияние на активность иммунных клеток посредством взаимодействия с  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - и  $\beta 3$ - адренорецепторами (АР) на их клеточной мембране (Marino F., Cosentino M., 2013). При этом  $\alpha 2$ -АР участвуют в стимуляции функций нейтрофилов, а цАМФ, индуцированный  $\beta 2$ -АР, оказывает иммунодепрессивное действие, подавляя Са-зависимые функции нейтрофилов и способность к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек (Marino F., Cosentino M., 2013; Marino F. et al, 2018). Поскольку антимикробные альфа-дефенсины 1-3 (HNP1-3) нейтрофилов высвобождаются при активации рецепторов врожденного иммунитета и защите от патогенных бактерий, грибов и простейших (Yamamoto-Furusho J.K. et al, 2010; Selsted M.E., Ouellette A.J., 2005), интерес представляла оценка влияния ББП в присутствии адреналина и норадреналина на продукцию HNP1-3 нейтрофилами доноров в системе *in vitro* (рисунок 26).

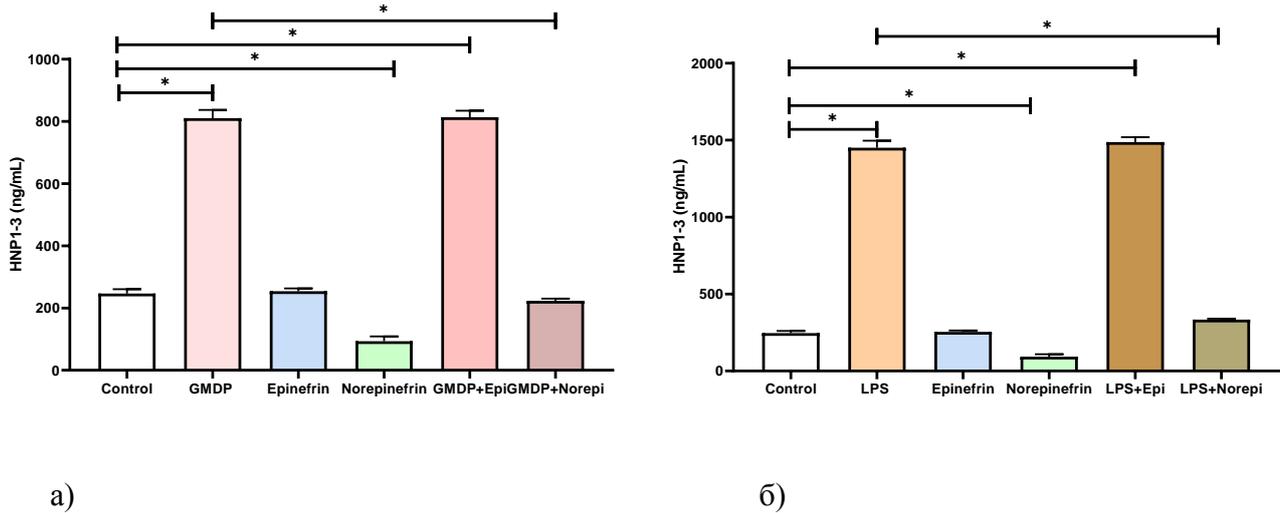


**Рисунок 26 – Уровень пептидов нейтрофилов человека HNP 1-3 при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида на нейтрофилы человека *in vitro***

*Примечание:* \* – данные выражены как среднее значение трех экспериментов; \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

Исследование уровня HNP1–3 через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после воздействия ЛПС и ГМДП показало значительное увеличение их продукции уже через 4 часа, которое оставалось на высоком уровне до конца наблюдения - до 24 часов (рисунок 27б).

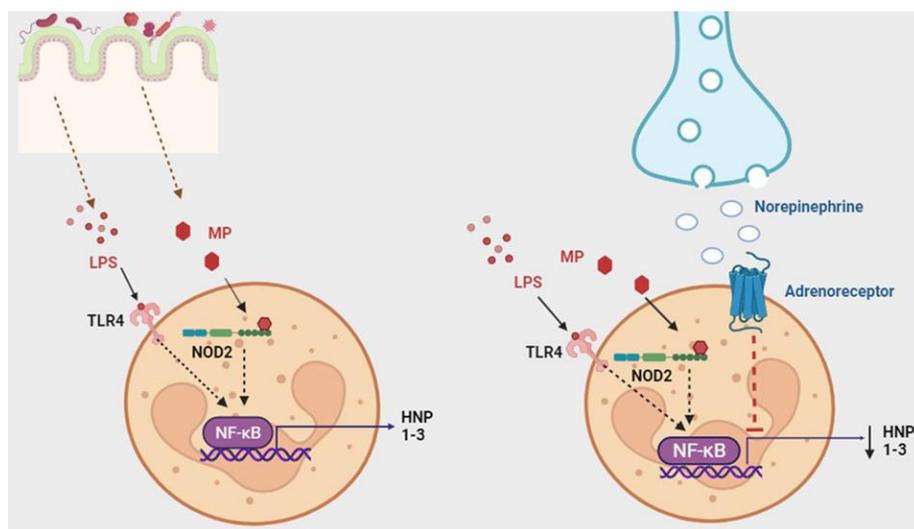
Исследование влияния ЛПС и ГМДП на продукцию альфа-дефенсинов нейтрофилами *in vitro* в присутствии адреналина и норадреналина показало, что ГМДП увеличивал синтез HNP1-3 в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ) (рисунок 27а), а ЛПС - в 5,8 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нестимулированными клетками (рисунок 27б).



**Рисунок 27 – Уровень пептидов нейтрофилов человека HNP 1-3 при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида, адреналина и норадреналина на нейтрофилы человека *in vitro***

*Примечание:* а) влияние ГМДП, адреналина (эпинефрина) и норадреналина (норэпинефрина) на уровень HNP 1-3 в нейтрофилах; б) влияние ЛПС, адреналина и норадреналина на уровни HNP 1-3 в нейтрофилах, данные представлены как среднее значение измерений; \* -  $p < 0,05$  при сравнении значений соответствующих групп.

В то время как адреналин не вызывал достоверных изменений в синтезе HNP1-3, норадреналин (норэпинефрин) снижал уровень дефенсинов HNP1-3 в 3 раза ( $p < 0,05$ ) в нестимулированной культуре клеток. Между тем если адреналин не отменял стимулирующего действия ЛПС на уровень дефенсинов, то норадреналин достоверно снижал индуцированный ЛПС синтез HNP1-3 в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). Сходный эффект катехоламинов наблюдался и в культуре нейтрофилов, стимулированных ГМДП: эпинефрин не отменял стимулирующего действия ГМДП, а норадреналин статистически значимо снижал индуцированный ГМДП синтез HNP1-3 в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ) (рисунки 27б и 28).

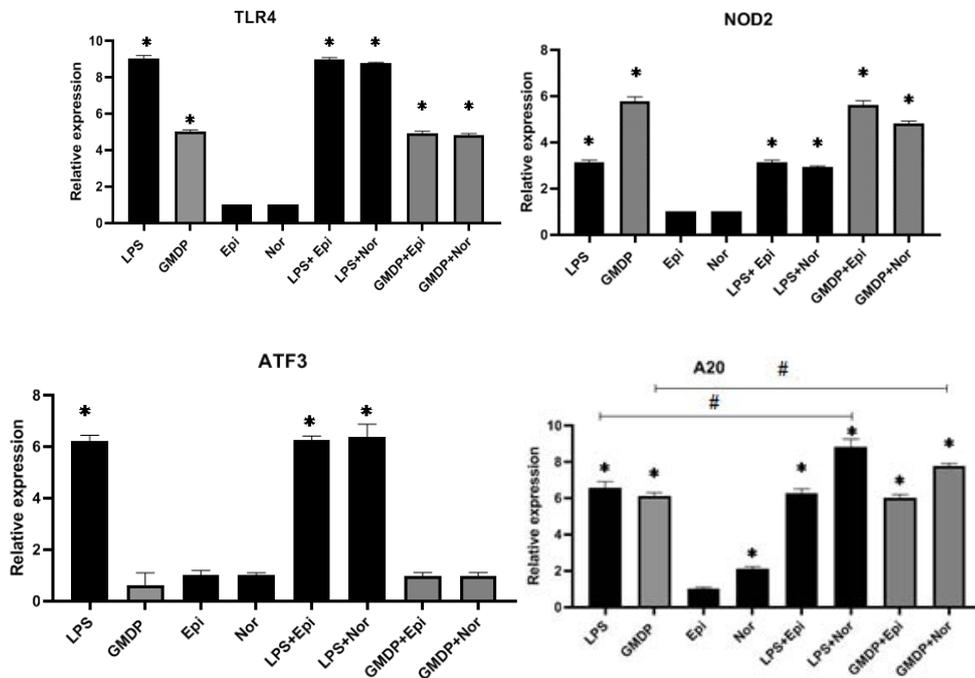


**Рисунок 28 – Изменение выработки пептидов HNP 1-3 нейтрофилами человека при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида, липополисахарида и норадреналина**

Это наблюдение важно, поскольку чрезмерная продукция HNP1-3 может иметь патогенетическое значение при инфекционных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях.

С целью выявления возможной связи между изменениями синтеза HNP1-3 и изменениями уровней экспрессии рецепторов, ответственных за связывание ЛПС и ГМДП, исследовано влияние катехоламинов и ББП на уровни экспрессии генов их рецепторов - *TLR4* и *NOD2*, соответственно.

Известно, что рецепторы врожденного иммунитета TLR4 и NOD2 при взаимодействии со своими лигандами не только запускают каскад сигнальных путей для стимуляции провоспалительных ответов, но и повышают экспрессию этих рецепторов, демонстрируя положительную обратную связь. Изучение уровней экспрессии генов рецепторов *TLR4* и *NOD2* выявило стимулирующее действие фрагментов клеточной стенки бактерий, что согласуется с ранее полученными данными синергизма ЛПС и ГМДП (Мещерякова Е.А. и др, 1991). Причем ЛПС и ГМДП повышали экспрессию не только собственных рецепторов, но и наблюдалось их перекрестное действие: ЛПС повышал экспрессию генов собственного рецептора *TLR4* в 9 раз ( $p < 0,05$ ) и экспрессию рецептора *NOD2* для ГМДП - в 3 раза ( $p < 0,05$ ), а ГМДП повышал экспрессию собственного рецептора *NOD2* в 5,8 раза ( $p < 0,05$ ) и экспрессию *TLR4*, отвечающего за связывание с ЛПС - в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). Показано, что катехоламины (адреналин и норадреналин) не влияли на уровни экспрессии генов *TLR* и *NOD2* и не отменяли стимулирующее действие ЛПС и ГМДП на экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета. Изучение уровней экспрессии гена регулятора воспаления *A20* показало статистически значимое влияние норадреналина: в то время как эпинефрин не влиял на экспрессию генов *A20* и *ATF3*, присутствие норадреналина в нестимулированной культуре клеток увеличивало экспрессию гена *A20*, а в условиях стимуляции клеток ЛПС и ГМДП было статистически значимое увеличение его экспрессии (рисунок 29).



**Рисунок 29 – Относительная экспрессия (RT-qPCR) генов *TLR4*, *NOD2*, *ATF3* и *A20* в нейтрофилах человека, нормализованная по *GAPDH***

*Примечание:* Данные представлены как среднее значение трех независимых измерений, \* –  $p < 0,05$  – достоверность различий в опытной пробе по сравнению с контрольной пробой; # –  $p < 0,05$  – достоверность различий в соответствующих группах

В нашем исследовании показано повышение уровня HNP1-3 под воздействием фрагментов клеточных стенок бактерий (ББП), что согласуется с известными данными о значительном увеличении концентрации HNP1-3 в сыворотке крови при воспалении (*Ihi T. et al, 1997*) и с ранее установленной зависимостью секреции HNP-1 от NOD2 в виде отсутствия секреции HNP1-3 при мутантном варианте NOD2 (3020insC), обуславливающим повышенную предрасположенность к болезни Крона (*Quinn K, 2008*).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюционно сформировавшиеся системные взаимосвязи между микроорганизмами и макроорганизмом на уровне слизистых, органов и тканей имеют большое значение для поддержания иммунного гомеостаза и лежат в основе разработки способов профилактики и терапии социально значимых иммунозависимых заболеваний. При этом сохраняет актуальность комплексное изучение в норме и при патологиях микробиома, генома, транскриптома, метаболома, среди которых особо значимо определение механизмов влияния биорегуляторов бактериального происхождения (ББП), являющихся фрагментами клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий, на иммунный гомеостаз. В этой связи с целью изучения роли таких ББП как мурамилпептиды (МП, ГМДП) и липополисахарид (ЛПС) в аллергическом, инфекционном и аутоиммунном воспалении были исследованы механизмы их иммуностропных эффектов на основе изучения экспрессии генов ряда регуляторных и транскрипционных факторов, а также на основе изучения их влияния на внутриклеточные сигнальные пути, фенотип и функциональную активность клеток врожденного иммунитета, в том числе с оценкой их совместного с катехоламинами влияния.

Изучение проводили на основании результатов клинических исследований эффективности мурамилпептидов в профилактике респираторных заболеваний, терапии пациентов с псориазом, изменения микробиологических и иммунологических показателей ротовой жидкости. Для объяснения полученных данных исследовались механизмы аллергического воспаления в экспериментальной модели аллергической астмы, а также изучались изменения рецепторов и молекул адгезии на поверхности иммунокомпетентных клеток, способность ББП изменять выработку цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и оксида азота, - важных регуляторов иммунологических реакций.

В частности, представленное в работе исследование эффектов ГМДП и ЛПС в модели OVA-индуцированной астмы у мышей *in vivo* показало наличие их двойственного характера: введение ~~этих~~ биорегуляторов бактериального происхождения перед сенсibilизацией снижало выраженность нейтрофилии и эозинофилии в БАЛ, а совместное их введение вместе с аллергеном (OVA) значительно увеличивало содержание данных клеток в БАЛ. Кроме того, инъекции ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA способствовали достоверному снижению повышенных при IgE-зависимом аллергическом воспалении IgA (в БАЛ) и IgE (в сыворотке крови), а также значительное увеличение уровня IgG2a, обеспечивающего основной гуморальный иммунный ответ на антигены у мышей. Последнее позволяет предположить, что испытываемые лекарственные средства на основе биорегуляторов бактериального происхождения способны активировать рецепторы врожденного иммунитета для поддержания адекватного иммунного гомеостаза даже в отсутствии бактериальных антигенов, подавляя при этом IgE-ответ на аллерген OVA.

Впервые обнаружен двойственный эффект ББП: снижение интенсивности аллергического воспаления в случае введения ББП до сенсibilизации аллергеном, в случае же совместного введения с антигеном они в значительной степени увеличивают приток в легкие макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов, что может усугублять течение патологического

процесса. Полученные в данной работе результаты расширяют представления о клиническом течении воспалительного процесса при астме, при этом лекарственные средства на основе ББП могут иметь позитивное влияние на маркеры воспаления в период ремиссии за счет уменьшения в легких бокаловидных клеток, лимфоцитоза, эозинофилии и нейтрофилии в бронхоальвеолярном лаваже, а также IgE в крови, что обнаружено в данном исследовании.

Проведена оценка профилактической и клинико-иммунологической эффективности ГМДП при инфекционном процессе в исследованиях *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* в группах условно здоровых добровольцев и у пациентов с вирусной и бактериальной инфекцией. В представленном исследовании при профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период показано, что применение препарата ГМДП (ликопид 1мг) по 1 таблетке 3 раза в день в течение 10 дней способствовало снижению количества эпизодов ОРВИ в 3,7 раза, а среди 48,4 % добровольцев, контактировавших с больными COVID-19, лишь у 2 человек (1,6 %) в анамнезе был подтвержденный COVID-19 легкого течения, тогда как в группе сравнения этот показатель в 6 раз выше — 9,8 % (14 человек, 4-м из которых потребовалась медицинская помощь и лечение в стационаре).

Наряду с этим обнаружены позитивные иммуотропные эффекты препарата ГМДП в составе комплексной терапии условно здоровых субъектов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов в виде нормализации содержания в ротовой жидкости антимикробных альфа-дефенсинов (HNP1-3), локального содержания sIgA, а также позитивное изменение состава микрофлоры с приближением микробиоценоза к нормоценозу у всех обследуемых.

Исследования роли ГМДП при аутоиммунном воспалении проведены с использованием периферической крови 86 пациентов с псориазом преимущественно средней степени тяжести, которые в период ремиссии применяли препарат на основе ГМДП. Установлено, что монотерапия в период ремиссии препаратом ликопид привела к клиническому улучшению у 98,2% пациентов, у 24,4% - имело место отсутствие клинических проявлений псориаза в течение четырех лет. Применение ГМДП на этапе ремиссии способствовало увеличению концентрации цитокинов IL-10, IL-12 и уменьшению IL-4, TNF- $\alpha$ , количества CD54+ клеток в сыворотке крови, а также уменьшению концентрации растворимых молекул межклеточной адгезии-1, фактора торможения миграции макрофагов и оксида азота.

Известная сегодня роль микробного разнообразия, относительного обилия определенных бактериальных штаммов в развитии и становлении локального и системного иммунитета и в патогенезе заболеваний различного генеза (*Pei Han, et al., 2021*), а также позитивное иммуотропное действие постбиотиков, к которым относятся нежизнеспособные клетки, клеточные фракции и продукты ферментации пробиотических клеток (*Hamayuni RA, et al., 2020*), обусловили интерес к исследованию микробного пейзажа полости рта в норме и при инфекционном процессе (у пациентов с кариесом). Микробиологическое исследование ротовой жидкости (РЖ) проводили у 48 здоровых добровольцев 18–23 лет до и через 4 дня после 10-дневного профилактического курса ликопид 1 мг, а также у 43 пациентов 19–22 лет с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов, среди которых 21 пациент принимал сублингвально препарат ГМДП (ликопид 1 мг) в течение 10 дней после базового лечения заболевания. Согласно результатам, представленным в настоящем исследовании, изменение микробного пейзажа РЖ было выявлено у 30 (62,5%;  $p < 0,05$ ), здоровых добровольцев, получавших препарат ГМДП. По составу микробиоценоз обследуемых был максимально приближен к нормоценозу, что подтверждалось полным отсутствием *Candida albicans* с замещением грибковой флоры на лакто- и

бифидобактериальную, двукратным снижением бактерий *Clostridium spp* и преобладанием в микробиоте *Firmicutes spp*. В группе пациентов с кариесом, получавших препарат ГМДП, у всех обследуемых (100%;  $p < 0,05$ ) имело место изменение состава микрофлоры в виде преобладания *Firmicutes spp*, двукратного увеличения встречаемости *Lactobacterium spp*, уменьшения встречаемости *Clostridium spp* (более чем в 2 раза;  $p < 0,05$ ), *P. gingivalis* (в 8 раз;  $p < 0,05$ ) и *St. epidermidis*, а разнообразие микрофлоры у 85,7%; ( $p < 0,05$ ) пациентов повысилось за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*.

Стимулирующее влияние ГМДП и ЛПС на выработку провоспалительных цитокинов хорошо известно, однако механизм, объясняющий роль этих ББП в ограничении воспаления, до конца не изучен.

В рамках изучения механизмов иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения изучено их влияние продукцию цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, а также на экспрессию генов регуляторных факторов на трех уровнях: сигнальных путей (рецепторов TLR4, NOD2); транскрипционных факторов (A20, ATF3); провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  в системе *in vivo* и *in vitro*. При этом получены новые данные о динамических ББП-индуцированных изменениях в активации сигнальных путей, ответственных за ограничение воспалительных реакций: на начальном этапе воздействия ББП увеличивается экспрессия TLR4, NOD2 и TNF- $\alpha$ , способствующая появлению петли положительной обратной связи и усилению воспалительных реакций, тогда как гены цитозольных белков, контролирующих воспаление (A20 и ATF3), продуцируются в клетках с задержкой по времени. Полученные данные дополняют известную информацию об OTULIN, CYLD и MYSM1, которые, деубиквитинируя RIPK2, осуществляют негативную регуляцию воспалительных реакций, вызванных NOD2 (Fiil B.K, 2013; Wex K., 2016; Panda S., 2018).

Наряду с этим оценка влияния ГМДП-ОН на экспрессию генов мембранных рецепторов, цитокинов, адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм, в НК-клетках доноров в условиях *in vitro* выявила способность мурамилпептида влиять на различные этапы фосфорилирования MAPK, гидролиз фосфолипидов, экспрессию адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами, интегрируя внешние и внутренние клеточные сигналы. Получены данные о высокодифференцированной модуляции ГМДП-ОН экспрессии генов сигнального пути MAPK, интерферонов и их рецепторов, а также C $\beta$ - и C $\gamma$ - фосфолипазы (PLCG1 и PLCG2), что определяет возможность мурамилпептида воздействовать на сигнальных механизмы, контролирующие цитотоксические реакции НК-клеток.

Учитывая тот факт, что оксид азота оказывает влияние на иммунную систему и воспалительный ответ, угнетая апоптоз и активируя хемотаксис эозинофилов и нейтрофилов (Pérez-Figueroa E., et al., 2021), интерес представляют полученные нами данные о том, что мурамилпептиды являются эффективными индукторами оксида азота, однако для проявления эффекторной активности необходима L-D-конфигурация мурамилпептидов. L-D-конфигурация также необходима для индукции хемокинов, цитокинов и ростовых факторов.

Исследование влияния ГМДП в системе *in vivo* на фенотипические изменения дендритных клеток (ДК) человека позволило установить, что профилактический прием препарата ликопид 1 мг статистически значимо увеличивал общий пул ДК и в его составе - уровень миелоидных (МДК) и плазмоцитоидных ДК (ПДК). Кроме того, выявлено ГМДП-индуцированное усиление экспрессии на клетках маркеров дифференцировки: на миелоидных ДК CD80 в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ), CD 83 в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) и CCR7 в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ); на плазмоцитоидных ДК – CCR7 – в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ). Хемотаксисный рецептор CCR7 ответственен за рекрутирование ДК во вторичные лимфоидные

органы. ГМДП также увеличивал уровни экспрессии генов *XCRI*, *CD11b* и *CD103*. Наши результаты согласуются с исследованиями Prescott D. и коллег, которые показали, что мурамилдипептиды (МДП) активируют толерогенные CD103+ дендритные клетки и обеспечивают толерантность к комменсальной микрофлоре, поддерживая иммунный гомеостаз (Prescott D., 2020). Между тем, исследование эффектов ББП (ГМДП, ЛПС и низина) совместно с катехоламинами (адреналином и норадреналином) на данные показатели в системе *ex vivo* позволило установить, что внесение в образец периферической крови ЛПС, ГМДП и норадреналина способствовало увеличению количества CD11c+ДК на 40%, 31% и 64%, соответственно, тогда как совместное введение ГМДП и норадреналина снижало количество CD11c+ДК относительно таковых при введении только норадреналина. Бактериоцин низин не оказывал влияния на экспрессию CD11c.

Исходя из того, что эндогенные катехоламины посредством адренорецепторов способны влиять на функциональную активность нейтрофилов (Wahle M., Greulich T., Baerwald C.G., 2005), интерес представляла оценка влияния ББП в присутствии адреналина и норадреналина на продукцию HNP1-3 нейтрофилами человека и уровни экспрессии генов рецепторов для ЛПС и ГМДП (*TLR4* и *NOD2*) в системе *in vitro*. В результате проведенных исследований впервые обнаружено, что адреналин не снижает уровни HNP 1-3 как в нестимулированной культуре, так и при стимуляции клеток ЛПС и ГМДП, тогда как под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 был снижен в 3 раза в нестимулированной культуре, в стимулированной ЛПС культуре клеток отмечалось снижение в 4,4 раза, а при стимуляции ГМДП - в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ). Это наблюдение весьма важно, поскольку чрезмерная продукция HNP1-3 может иметь патогенетическое значение при инфекционных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях. Кроме того, обнаружено стимулирующее влияние ЛПС и ГМДП на уровень экспрессии генов *TLR4*- и *NOD2*-рецепторов, причем не только собственных: ЛПС повышал экспрессию генов собственного *TLR4* (в 9 раз;  $p < 0,05$ ) и экспрессию рецептора *NOD2* для ГМДП (в 3 раза;  $p < 0,05$ ), а ГМДП повышал экспрессию собственного рецептора *NOD2* (в 5,8 раза;  $p < 0,05$ ) и экспрессию *TLR4*, отвечающего за связывание с ЛПС, - в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). При этом катехоламины не влияли на уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR* и *NOD2* и не отменяли стимулирующие эффекты ББП на данные показатели. Изучение уровней экспрессии регулятора воспаления *A20* показало статистически значимое влияние норадреналина: в то время как эпинефрин не влиял на экспрессию генов *A20* и *ATF3*, присутствие норадреналина в нестимулированной культуре клеток увеличивало экспрессию гена *A20*, а в условиях стимуляции клеток ЛПС и ГМДП было статистически значимое увеличение его экспрессии.

Анализ полученных результатов в целом позволяет заключить, что биорегуляторы бактериального происхождения ЛПС и ГМДП могут играть позитивную модулирующую роль при развитии аллергического, инфекционного и аутоиммунного воспаления благодаря их способности влиять на фенотипические и функциональные характеристики клеток врожденного иммунитета, на экспрессию генов их рецепторов (*TLR4*, *NOD2*), транскрипционных факторов (*A20*, *ATF3*) и провоспалительных цитокинов (*TNF- $\alpha$* ), а также на состав и разнообразие микробиологического сообщества слизистых. Широкий спектр биорегуляторов бактериального происхождения, источником которых являются микроорганизмы, регулирует гомеостаз хозяина и запускает иммунные реакции, которые, в зависимости от контекста, могут иметь противоположные эффекты. Полученные данные дополняют современные представления о молекулярных механизмах действия биорегуляторов бактериального происхождения и обосновывают возможность и целесообразность их применения для разработки новых стратегий организации медицинской помощи с целью оптимизации иммунного гомеостаза организма.

## ВЫВОДЫ:

1. Применение липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в модели аллергической OVA-индуцированной астмы у мышей перед сенсibilизацией приводит к снижению выраженности нейтрофилии, эозинофилии, лейкоцитоза и повышенного при аллергическом воспалении sIgA в бронхоальвеолярном лаваже в 2,1 раза и 2,6 раза соответственно, IgE в сыворотке крови - в 2,0 раза и 2,2 раза соответственно, а также увеличивают IgG2a на 60% и 110% соответственно; в случае совместного их введения с аллергеном (OVA) в бронхоальвеолярном лаваже значительно увеличивается содержание нейтрофилов, эозинофилов, лейкоцитов.

2. Применение глюкозаминилмурамилдипептида у молодых людей в возрасте 20-22 года в неблагоприятный эпидемиологический период снижает число эпизодов ОРВИ (в 3,7 раза), а также эпизодов COVID -19 (в 6 раз).

3. Применение глюкозаминилмурамилдипептида изменяет микробный пейзаж ротовой жидкости у 62,5% здоровых добровольцев и у всех пациентов с кариесом боковых поверхностей зубов, при этом увеличивается встречаемость *Lactobacterium spp*, уменьшается встречаемость *Clostridium spp* (более чем в 2 раза), *P. gingivalis* (в 8 раз), а также повышается разнообразие микрофлоры у 85,7 % пациентов за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*.

4. Применение глюкозаминилмурамилдипептида приводит к клиническому улучшению у 98,2% пациентов с псориазом, корректирует дисбаланс патогенетически значимых цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), снижает количество клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы, плазменную концентрацию растворимых молекул межклеточной адгезии-1 и фактора торможения миграции макрофагов.

5. При внутрибрюшинной инъекции липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в мононуклеарных клетках мышей на начальном этапе воздействия увеличивается экспрессия генов *TLR4* в 9,5 и 6,9 раз соответственно, *NOD2* рецепторов - в 4,2 и 9 раз соответственно, *TNF- $\alpha$*  - в 22 раза и 8,1 раз соответственно; на более поздних этапах воздействия увеличивается экспрессия транскрипционных факторов *A20*, *ATF3*.

6. При воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в мононуклеарных клетках человека увеличивается экспрессия генов *TLR4* в 9 раз и 6,1 раз соответственно, *NOD2* - в 3 и 10,9 раз соответственно, *TNF- $\alpha$*  - в 22 и 12 раз соответственно, что способствует усилению воспалительных реакций, тогда как гены цитозольных белков, контролирующих воспаление *A20* и *ATF3*, экспрессируются в клетках с задержкой по времени.

7. Использование глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты в условиях *in vitro* изменяет экспрессию генов в НК-клетках, участвующих в фосфорилировании MAPK, гидролизе фосфолипидов, генов адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами (*PLCB1*, *FCGR3A*, *PIK3R3*, *IFNA1*, *IFNA6*, *IFNAR1*, *MAPK8IP1*, *MAPK2K7*, *MAP4K2*, *MAP3K6*, *MAPKAPK5*, *TNFRSF9*, *TNFRSF14* и *TNFSF18*).

8. D-конфигурация изоглутамин является принципиальной для реализации регуляторной активности мурамилпептидов: в мононуклеарных клетках человека, глюкозаминилмурамилдипептид с L-конфигурацией изоглутамин не влияет на выработку оксида азота (NO), а также цитокинов IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF-a, TNF- $\beta$ , GM-CSF.

9. В стимулированной липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом культуре нейтрофильных гранулоцитов человека под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 в нейтрофилах снижается 4,4 раза и в 3,6 раза, соответственно, что способствует ограничению патогенетически значимой гиперпродукции альфа-дефенсинов HNP1-3; при этом адреналин в

системе *in vitro* не влияет на уровни альфа-дефензинов HNP 1-3 как в не стимулированной культуре нейтрофилов, так и при стимуляции клеток липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом, тогда как под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 в нейтрофилах снижается в нестимулированной культуре в 3 раза.

10. Применение глюкозаминилмурамилдипептида *in vivo* статистически значимо увеличивает относительные значения дендритных клеток, количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови человека, а также вызывает усиление экспрессии на клетках маркеров их дифференцировки: на миелоидных ДК CD80 в 2,4 раза CD 83 в 3,1 раза и хемокинового рецептора CCR7, способствующего миграции дендритных клеток во вторичные лимфоидные органы, в 3,3 раза на миелоидных ДК и в 1,9 раза на плазмоцитоидных ДК, увеличивает уровень экспрессии генов *CD11b* на 128%, *XCR1* на 82%, также *CD103* на 95%.

11. Использование липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и низина в системе *ex vivo* способствует повышению выработки в мононуклеарных клетках человека IL-10 в 42, 22 и 3 раза соответственно; увеличению количества в цельной крови дендритных клеток, экспрессирующих CD11c, на 40%, 31% и 64%, соответственно, что указывает на возможность биорегуляторов бактериального происхождения регулировать механизмы разнонаправленных процессов.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Биорегуляторы бактериального происхождения – липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептиды и бактериоцин низин – рекомендуются к использованию в качестве перспективных средств для разработки новых способов фармакологической терапии иммуноопосредованных патологий при персональном контроле факторов, усиливающих воспалительный процесс и факторов, участвующих в реализации отрицательной обратной связи.

### СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ (по специальностям 3.2.7. Иммунология) и/или индексируемых в международных базах данных WoS, Scopus, RSCI:

1. **Guryanova, S.V.** Immunomodulation, Bioavailability and Safety of Bacteriocins / S.V. Guryanova // *Life*. - 2023. - № 13. – 1521. (*IF Scopus – 4.3, Q-2; K-1*).
2. **Guryanova, S.V.** Inflammation Regulation by Bacterial Molecular Patterns / S.V. Guryanova, A. Kataeva // *Biomedicines*. – 2023. - № 11. – 183. (*IF Scopus – 5.2, Q-1; K-1*).
3. **Guryanova, S.V.** Inflammatory response modulation by epinephrine and norepinephrine / S.V. Guryanova, A.S. Ferberg, I.A. Sigmatulin // *RUDN Journal of Medicine*. - 2023. - Vol. 27, № 3. - P. 329-341. (*ИФ РИНЦ – 1.042, K-2; IF Scopus -0.12, Q-4*).
4. Marine Invertebrate Antimicrobial Peptides and Their Potential as Novel Peptide Antibiotics / **S.V. Guryanova, S.V. Balandin, O.Y. Belogurova-Ovchinnikova, T.V. Ovchinnikova** // *Mar. Drugs*. - 2023. - № 21. - 503. (*IF Scopus - 0.88, Q-1; K-1*).
5. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators / **S.V. Guryanova, I.A. Sigmatulin, O.O. Gigani, S.A. Lipkina** // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. – 2023. - Vol. 27, № 4. – P. 470–482. (*ИФ РИНЦ – 1.042, K-2; IF Scopus – 0.12, Q-4*).
6. **Guryanova, S.V.** Immunomodulatory and Allergenic Properties of Antimicrobial Peptides / S.V. Guryanova, T.V. Ovchinnikova // *Int. J. Mol. Sci*. - 2022. - № 23. - 2499. (*IF Scopus- 1.18, Q-1*).
7. **Guryanova S.V.** Innate Immunity Mechanisms in Marine Multicellular Organisms / S.V. Guryanova, T.V. Ovchinnikova // *Marine Drugs*. - 2022. - № 20 (9). - 549. (*IF Scopus - 0.88, Q-1*).

8. **Guryanova, S.V.** Regulation of Immune Homeostasis via Muramyl Peptides-Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin / S.V. Guryanova // *Microorganisms*. - 2022. - № 10. - 1526. (*IF Scopus* – 0.94, *Q-2*).
9. Dual Effect of Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin in Experimental Model of Asthma / **S.V. Guryanova**, O.B. Gigani, G.O. Gudima, A.M. Kataeva, N.V. Kolesnikova // *Life*. – 2022. - № 12. – 192. (*IF Scopus* – 4.3, *Q-2*).
10. How Do Pollen Allergens Sensitize? / **S.V. Guryanova**, E.I. Finkina, D.N. Melnikova, I.V. Bogdanov, B. Bohle, T.V. Ovchinnikova // *Front. Mol. Biosci.* - 2022. - № 9. – 900533. (*IF Scopus* – 1.23, *Q-1*).
11. Динамика иммунологических и микробиологических показателей ротовой жидкости при терапии кариеса / **С.В. Гурьянова**, Н.В. Колесникова, Г.О. Гудима, Н.Л. Лежава, А.В. Караулов // *Иммунология*. – 2021. - № 42 (4). - С. 386–394. (*ИФ РИНЦ* – 1.992; *IF Scopus* - 0.16, *Q-4*; *RSCI*).
12. **Guryanova, S.V.** Strategies for Using Muramyl Peptides - Modulators of Innate Immunity of Bacterial Origin - in Medicine / S.V. Guryanova, R.M. Khaitov // *Frontiers in Immunology*. - 2021. - № 12. – 607178. (*IF Scopus* – 1.87, *Q-1*).
13. Novel approaches to increase resistance to acute respiratory infections / **S.V. Guryanova**, N.A. Kudryashova, A.A. Kataeva, B.T. Orozbekova, N.V. Kolesnikova, A.G. Chuchalin // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. - 2021. - Т. 25, № 3. - С. 181-195. (*ИФ РИНЦ* – 1.042).
14. Влияние компонентов микроэмульсионной системы на трансдермальный перенос иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, **С.В. Гурьянова** // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2020. – № 22 (3). – С. 149-155. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-3-149-155>. (*ИФ РИНЦ* – 0.596; *IF Scopus* – 0.18, *Q-3*; *RSCI*).
15. Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток / **С.В. Гурьянова**, А.М. Гапонов, В.М. Писарев, Е.В. Якушенко, А.В. Тутельян, И.А. Александров, Е.В. Цыпандина, И.Г. Козлов // *Иммунология*. – 2020. - № 41 (3) – С. 235–248. (*ИФ РИНЦ* – 1.992; *IF Scopus* - 0.16, *Q-4*; *RSCI*).
16. **Гурьянова, С.В.** Глюкозаминилмурамилдипептид в терапии и профилактике инфекционных заболеваний / С.В. Гурьянова, Р.М. Хаитов // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. - 2020. - Т. 9, № 3. - С. 79–86. (*ИФ РИНЦ* – 1.481; *IF Scopus* - 0.12, *Q-4*; *RSCI*).
17. **Гурьянова, С.В.** Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики) / С.В. Гурьянова, Р.М. Хаитов // *Иммунология*. – 2020. - № 41 (2). – С. 174-183 (*ИФ РИНЦ* – 1.992; *IF Scopus* - 0.16, *Q-4*; *RSCI*).
18. Разработка и валидация методики определения глюкозаминил-мурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, **С.В. Гурьянова**, О.Ю. Борисова, Г.О. Гудима, В.И. Севастьянов // *Иммунология*. – 2020. - № 1, Т. 41. - С. 74–82. (*ИФ РИНЦ* – 1.992; *IF Scopus* - 0.16, *Q-4*; *RSCI*).
19. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости / **С.В. Гурьянова**, О.Ю. Борисова, Н.В. Колесникова, Н.Л. Лежава, И.Г. Козлов, Г.О. Гудима // *Иммунология*. - 2019. - Т. 40, № 6. - С. 34–40. (*ИФ РИНЦ* – 1.992; *IF Scopus* – 0.16, *Q-4*; *RSCI*).
20. **Guryanova, S.** Pathogenetic Therapy of Psoriasis by Muramyl Peptide / **S. Guryanova**, V. Udzhukhu, A. Kubylynsky // *Front. Immunol.* - 2019. - № 10. – 1275. (*IF Scopus* – 1.82, *Q-1*).
21. **Гурьянова, С.В.** Интегрированные подходы в диагностике и терапии аллергических заболеваний / С.В. Гурьянова // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина*. - 2018. – Т. 22, № 1. – С. 75-85. (*ИФ РИНЦ* – 1.042).
22. Колесникова, Н.В. Вторичные иммунодефициты мелких домашних животных и их коррекция мурамилдипептидами / Н.В. Колесникова, А.Г. Кошаев, **С.В. Гурьянова** // *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. - 2017. - № 131. - С. 559-571. (*ИФ РИНЦ* – 1.148).

23. **Guryanova, S.** sbv IMPROVER: Modern Approach to Systems Biology / **S. Guryanova, A. Guryanova** // *Methods Mol. Biol.* - 2017. - № 1613. - P. 21-29. doi:10.1007/978-1-4939-7027-8\_2. (*IF Scopus* – 0.4, *Q-3*).

24. Колесникова, Н.В. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении atopических заболеваний / Н.В. Колесникова, И.Г. Козлов, **С.В. Гурьянова**, Е.А. Коков, Т.М. Андропова // *Медицинская иммунология.* - 2016. - Т.18, № 1. - С. 15-20. (*ИФ РИНЦ* – 1.039; *IF Scopus* – 0.14; *Q-4*).

25. **Гурьянова, С.В.** Сравнительная оценка мурамилпептидов - лигандов рецепторов врожденного иммунитета в регуляции экспрессии оксида азота / С.В. Гурьянова // *Российский иммунологический журнал.* - 2015. - Т. 9 (18), № 4. - С. 453-456. (*ИФ РИНЦ* – 0.420).

26. Мурамилпептиды и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в комплексной терапии аллергических заболеваний / И.Г. Козлов, **С.В. Гурьянова**, Н.В. Колесникова, Т.М. Андропова // *Российский аллергологический журнал.* - 2015. - № 5. - С. 59-67. (*ИФ РИНЦ* – 1.992).

27. Community-reviewed biological network models for toxicology and drug discovery applications / A.A. Namasivayam, A.F. Morales, Á.M. Lacave, A. Tallam, B. Simovic, D.G. Alfaro, D.R. Bobbili, F. Martin, G. Androsova, I. Shvydchenko, J. Park, J.V. Calvo, J. Hoeng, M.C. Peitsch, M.G. Racero, M. Biryukov, M. Talikka, M.B. Pérez, N. Rohatgi, N. Díaz-Díaz, R. Mandarapu, R.A. Ruiz, S. Davidyan, S. Narayanasamy, S. Boué, **S. Guryanova**, S.M. Arbas, S. Menon, Y. Xiang // *Gene Regulation and Systems Biology.* - 2016. - № 10. - P. 51-66. (*IF Scopus* – N/A, *Q-2*).

28. Enhancement of COPD biological networks using a web-based collaboration interface / S. Boue, B. Fields, J. Hoeng, J. Park, M.C. Peitsch, W.K. Schlage, M. Talikka, I. Binenbaum, V. Bondarenko, O.V. Bulgakov, V. Cherkasova, N. Diaz-Diaz, L. Fedorova, **S. Guryanova**, J. Guzova, G.I. Koroleva, E. Kozhemyakina, R. Kumar, N. Lavid, Q. Lu, S. Menon, Y. Ouliel, S.C. Peterson, A. Prokhorov, E. Sanders, S. Schrier, N.G. Schwaitzer, I. Shvydchenko, A. Tallam, G. Villa-Fombuena, J. Wu, I. Yudkevich, M. Zelikman // *F1000Research.* - 2015. - № 4. – 32. (*IF Scopus* – 0.82, *Q-2*).

*Тезисы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science*

29. **Guryanova, S.** Low molecular weight regulator of innate immunity of bacterial origin, glucosaminyl muramyl dipeptide, modulates the induced production of neutrophil alpha defensins in vitro / **S. Guryanova**, N. Kolesnikova, I. Shvydchenko // *Allergy.* – 2021. – № 76, S. 110. – P. 152. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/all.15095> (*Scopus*, *Q-1*).

30. Regulation by muramyl peptide GMDPA effector functions of NK cells from peripheral blood of healthy donors / **S. Guryanova**, O. Borisova, I. Kozlov, T. Andronova // *Allergy.* – 2020. - № 75, S. 109 - 1505. – P. 432. <https://doi.org/10.1111/all.14508>. (*Scopus*, *Q-1*).

31. **Guryanova, S.** Bacterial agonist of innate immunity LPS regulates spontaneous and induced production of alfa defensins of human neutrophils in vitro / **S. Guryanova**, I. Shvydchenko, N. Kudryashova // *Allergy.* – 2019. – № 74. – P. 795 (*Scopus*, *Q-1*).

32. **Guryanova, S.** Bacterial Cell Wall Fragment Glucosaminyl Muramyl Dipeptide In Treatment Of Allergic Disease / **S. Guryanova** // *Allergy.* – 2019. – № 74, S. 106. – PD0590, DOI: 10.1111/all.13957 (*Scopus*, *Q-1*).

33. **Guryanova, S.** Antibiotic resistance: ligands of innate immunity take the challenge. Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI) / **S. Guryanova** // *Allergy.* – 2018. – № 73. – P. 581. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/all.13539> (*Scopus*, *Q-1*).

34. Влияние катехоламинов на продукцию интерлейкина-1 $\beta$  нейтрофилами *in vitro* / И.Н. Швыдченко, **С.В. Гурьянова**, А.А. Тамбовцева, С.В. Сергеев, А.С. Гронская // *Медицинская иммунология.* - 2017. - Т. 19, № S. - С. 106. (*ИФ РИНЦ* – 1.039, *K-1*; *Scopus Q-4*; *RSCI*).

35. **Гурьянова, С.В.** Подходы системной биологии и биоинформатики в методологии диагностических исследований аллергических заболеваний / С.В. Гурьянова // *Медицинская иммунология.* - 2017. - Т. 19, № S. - С. 124. (*ИФ РИНЦ* – 1.039, *K-1*; *Scopus Q-4*; *RSCI*).

*Публикации в материалах научных форумов и конференций:*

36. **Гурьянова, С.В.** Факторы врожденного иммунитета в регуляции иммунного гомеостаза / С.В. Гурьянова // Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации: материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Краснодар, 2-3 декабря 2022 г.). - Краснодар, 2022. – С. 53-55.

37. Управление уровнем экспрессии альфа-дефенсинов низкомолекулярными биорегуляторами / **С.В. Гурьянова**, Н.В. Колесникова, И.Н. Швыдченко, Т.В. Овчинникова // Биотехнологии: состояние и перспективы развития: сборник материалов международного конгресса (31 окт.-1 нояб. 2022 г., Москва). – Москва, 2022. – Вып. 20. - С. 40-42.

38. **Гурьянова, С.В.** Оптимизации методов профилактики инфекционных заболеваний респираторного тракта. Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации / С.В. Гурьянова, Н.А. Кудряшова, А.А. Катаева // Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации: материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (26-27 нояб. 2021 г., г. Краснодар). – Краснодар, 2021. – С. 43-46.

39. **Гурьянова, С.В.** Профилактические меры по повышению резистентности к инфекциям - залог конкурентоспособности спортсмена / С.В. Гурьянова // Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации: материалы X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Кубанский государственный университет физической культуры, 11-12 дек. 2020 г., г. Краснодар). – Краснодар, 2021. – С. 192.

40. The effect of catecholamines on spontaneous and lipopolysaccharide-induced production proinflammatory cytokines by human neutrophils in vitro / I. Shvydchenko, E. Vykovskaya, S. Guryanova, V. Golubtsov, A. Tambovtseva, S. Sergeev // 5th Europ. Congr. of Immunol. ECI: abstr. (02-05 sep. 2018, Amsterdam). - Netherlands, Amsterdam, 2018. - P. 429.

41. Катехоламины в модуляции функциональной активности нейтрофилов in vitro / И.Н. Швыдченко, **С.В. Гурьянова**, А.С. Гронская, А.А. Тамбовцева, С.В. Сергеев, А.С. Степукова, А.А. Близнюк // Материалы XXIII съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова (18–22 сент. 2017 г., г. Воронеж). - Воронеж, 2017. - С. 2173-2175.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ББП – биорегуляторы бактериального происхождения

ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид

ДК – дендритные клетки

ЛПС – липополисахарид

МДК – миелоидные дендритные клетки

МДП – мурамилдипептид

МП – мурамилпептиды

ПДК – плазмоцитоидные дендритные клетки

A20 –альфа белок 3, индуцированный фактором некроза опухоли (он же TNFAIP3)

ATF3 – активирующий фактор транскрипции 3

CCL – хемокиновый лиганд (Chemokine (C-C motif) ligand)

HNP – пептиды нейтрофилов человека (human neutrophil peptides)

ICAM-1 – молекула клеточной адгезии (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, также CD54)

IFN-γ – интерферон гамма (interferon gamma)

MIP – воспалительные белки макрофагов (macrophage inflammation proteins)

NF-κB – транскрипционный ядерный фактор κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

OVA – овалбумин (ovalbumin)

PRR – паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptor)

RLR – RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors)

TLR – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors)

ГУРЬЯНОВА  
СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА  
БИОРЕГУЛЯТОРАМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.2.7. Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук