

## ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО МУРАМИЛДИПЕПТИДА (ГМДП-А) НА ЛИНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ NOD-2

© 2018 г. А. М. Гапонов<sup>1,2</sup>, Е. В. Якушенко<sup>1</sup>,  
А. В. Тутельян<sup>3</sup>, И. Г. Козлов<sup>1\*</sup>

\*E-mail: immunopharmacology@yandex.ru

<sup>1</sup>ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева” Минздрава РФ, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ “Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии”, ФАНО России, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Поступила: 05.05.2018. Принята: 08.05.2018

Мурамилдипептиды (МДП) являются многократно повторяющимся структурным элементом в составе пептидогликана клеточных стенок всех бактерий, которые сохраняют способность взаимодействовать с цитоплазматическими рецепторами семейства NOD в клетках человека и вызывать активацию врожденного иммунитета. Это делает их перспективными соединениями при разработке лекарственных препаратов для иммуномодулирующей терапии и, в частности, для биотерапии опухолей. Однако существуют данные об экспрессии целевых для МДП рецепторов NOD в опухолевых клетках, а также ассоциированности некоторых видов рака с различными полиморфными вариантами этих рецепторов. В связи с этим целью представленного исследования было изучить влияние синтетического аналога МДП – ГМДП-А на пролиферативный потенциал опухолевых клеточных линий различного происхождения, экспрессирующих NOD-2, а также эффект совместного использования ГМДП-А с цисплатином. В результате проведенных исследований показано, что влияние ГМДП-А (в дозах 1, 5, 10, 20 и 40 мкг/мл) отдельно и совместно с цисплатином имеет разнонаправленный характер.

**Ключевые слова:** мурамилдипептиды, ГМДП-А, NOD-2, неспецифическая иммунотерапия рака, опухолевые клеточные линии, цисплатин.

DOI: 10.7868/S1028722118020041

**Адрес:** 117997 Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева” Минздрава РФ, лаборатория экспериментальной и клинической фармакологии. Козлов Иван Генрихович. Тел./факс: +7 495 287 65 70, +79161317101 (моб.).

**E-mail:** immunopharmacology@yandex.ru

**Авторы:**

**Гапонов А.М.**, к.м.н., заведующий лабораторией инфекционной иммунологии ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева” Минздрава РФ, Москва, Россия; в.н.с. лаборатории молекулярных механизмов критических состояний, ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», ФАНО России, Москва, Россия;

**Якушенко Е.В.**, д.м.н., в.н.с. лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской

гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева” Минздрава РФ, Москва, Россия;

**Тутельян А.В.**, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия, г. Москва, Россия, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2706-6689>, eLibrary SPIN: 8150-2230;

**Козлов И.Г.**, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева” Минздрава РФ, Москва, Россия.

### ВВЕДЕНИЕ

Использование активной неспецифической иммунотерапии (ИТ) опухолей сегодня рассматривается как одно из обнадеживающих

прорывных направлений. В настоящее время в качестве адъювантной терапии рака наряду с химиопрепаратами используются моноклональные антитела, блокирующие различные рецепторы на опухолевых клетках (herceptin pertuzumab (HER2)), факторы роста опухолевых клеток (bevacizumab (VEGF), cetuximab (EGFR)), или активирующие иммунные клетки, в частности, Т-лимфоциты (keytruda, pembrolizumab (анти PD-1)), а также рекомбинантные цитокины (IFN, TNF-альфа). Иммуноterapia стала золотым стандартом ведения пациентов с различными опухолями: при высокой эффективности препаратов данной группы риск побочных реакций оказался существенно ниже традиционной химио- и радиотерапии. При этом господствующая сегодня теория патогенеза злокачественных новообразований – иммунный надзор за развитием опухолей, свидетельствует о том, что в процессе возникновения и прогрессии опухолевого процесса часто повреждаются основные звенья иммунной защиты организма и возникает иммунологическая недостаточность.

Самыми очевидными доказательствами существования иммунологического противоопухолевого надзора служат следующие факты: повышенная частота возникновения онкологических заболеваний при первичных иммунодефицитах, ВИЧ-инфекции и иммуносупрессивной терапии, а также положительная динамика опухолевого процесса при высокой степени инфильтрации ткани опухоли антиген-специфическими цитотоксическими Т-лимфоцитами [1, 2].

Кроме того, известно, что опухолевые клетки способны ингибировать функцию основных типов иммунных клеток, продуцируя IL-10, TGF-beta, а также факторы, способствующие их собственному росту (VEGF, PDGF, EGF, FGF, CSF-1, M-CSF) [2]. То есть, очевидно, что для восстановления активности иммунных клеток требуется не точечное воздействие на определенный тип клеток, или не только, но и активация всех звеньев иммунного ответа. В связи с вышесказанным сегодня идет активный поиск субстанций, обеспечивающих максимально полный охват всех пулов иммунных клеток, участвующих в защите от опухолевого процесса.

Среди наиболее привлекательных вариантов активной неспецифической ИТ опухолей можно выделить методы с использованием нецитокиновых адъювантов, в частности мурамилдипептидов (МДП), которые являются минимальными биологически активными

фрагментами, входящими в состав пептидогликана клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий.

По современным представлениям МДП – это патоген-ассоциированные молекулы (PAMP – pathogen-associated molecular patterns), являющиеся лигандами образ-распознающих сигнальных рецепторов (PRR-pattern-recognition receptors); они запускают весь каскад врожденного иммунитета, приводя к активации функциональной активности иммунных клеток, вовлеченных в борьбу с патогенными микроорганизмами и опухолевыми клетками. Основными сигнальными PRR для МДП служат внутриклеточные рецепторы семейства NOD (-1 и -2) [3]. NOD-рецепторы экспрессируются в основном в фагоцитирующих клетках (макрофаги, гранулоциты, дендритные клетки), обеспечивающих инициацию и финальные стадии иммунного ответа. Связывание МДП с этими молекулами приводит к активации транскрипционного фактора, NF-kB – фактора запускающего синтез провоспалительных цитокинов, которые стимулируют функции иммунокомпетентных клеток, пролиферацию Т- и В-лимфоцитов [3, 4].

Таким образом, МДП представляются перспективными для использования в ИТ опухолей с целью активации всех звеньев противоопухолевой защиты организма. К настоящему моменту для использования в ИТ опухолей уже зарегистрировано несколько фармпрепаратов на основе молекулы мурамилпептида: ромутид (romutide, Nopia, Япония), мурамил трипептид (mifamurtide, Mepact) и DTP-GDP (ImmTher). При этом, МДП – это относительно небольшие молекулы, которые могут быть получены синтетическим путем, что значительно снижает стоимость производства лекарственных препаратов на их основе.

Глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – полусинтетическое производное МДП, дополненное остатком N-ацетилглюкозамина (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин), которое было синтезировано в Институте биоорганической химии им. Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина РАН (Москва) и успешно доведено до готовой лекарственной формы (препарат ликопид, таблетки 1 мг и 10 мг). За более чем 20 лет препарат прошел многочисленные экспериментальные и клинические исследования, позволившие расшифровать молекулярный механизм действия ГМДП и определить его место в клинической практике в качестве иммуностимулятора врожденного иммунитета.

Часть из проведенных исследований касалась эффективности использования ГМДП в экспериментальных моделях терапии рака. Показано, что различные схемы введения ГМДП животным приводят к торможению роста солидной опухоли S-180 [5, 6], фибросаркомы Meth A [7], карциномы легких Льюиса, меланомы B16 [8], был продемонстрирован его антиметастатический эффект [9–11]. Кроме того, показано, что использование ГМДП приводит к усилению экспрессии опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) на трансформированных клетках, что увеличивает иммуногенность последних и существенно повышает вероятность развития эффективного противоопухолевого иммунного ответа [12, 13].

Помимо активации противоопухолевого иммунитета в литературе описана способность ГМДП потенцировать действие цитостатиков. Так, например, комбинированное использование цисплатина, TNF-альфа и ГМДП при асцитной карциноме Эрлиха у мышей приводит к увеличению выживаемости животных до 100%. Кроме того, в этой же работе было показано, что ГМДП обладает способностью нормализовать параметры гемограммы у животных на фоне использования цитостатиков [14].

Суммируя полученные данные, можно заключить, что эффективность использования ГМДП в экспериментальной противоопухолевой терапии объясняется активацией иммунных клеток, повышением уровня экспрессии ОАА на опухолевых клетках, потенцированием действия цитостатических препаратов и нормализацией показателей периферической крови. Вместе с тем, эти экспериментальные исследования показали, что для активного использования в биотерапии опухолей ГМДП должен назначаться в виде инъекций, более длительными курсами и в более высоких дозах по сравнению с оригинальным таблетированным препаратом ликопид. При этом увеличение дозы и длительности применения ГМДП может сопровождаться пирогенностью. Поэтому разработчиками из ЗАО “Пептек” было синтезировано другое производное МДП – ГМДП-А (N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовая кислота), не обладающее выраженной пирогенностью.

Другим возможным препятствием на пути использования ГМДП и ГМДП-А в терапии опухолей могут стать данные о способности различных опухолевых клеток экспрессировать РНК и продуцировать протеин NOD-2 (клетки колоректального рака, рака матки, рака шеи и головы, рака

легких и многих других гистотипов – The human protein atlas), причем разные опухолевые клетки могут экспрессировать различные полиморфные варианты этой молекулы и, соответственно, в разных экспериментальных моделях и при различных патологиях NOD-2 может демонстрировать различную активность, в частности, играть роль активатора хронического воспаления, как известно являющегося в ряде случаев предиктором онкологического процесса (колоректальный рак, рак желудка [15], активатора или ингибитора пролиферации опухолевых клеток [16]). Так, например, показано, что мутации R702W, G908R, 3020insC гена NOD-2 в греческой популяции ассоциированы с колоректальным раком, причем в данном случае колоректальный рак являлся спорадическим, то есть не ассоциированным с хроническим воспалением или болезнью Крона [17]. Таким образом, наряду с хорошо изученными механизмами противоопухолевых эффектов ГМДП, все еще остается много вопросов, связанных с его влиянием непосредственно на раковые клетки, остаются не выясненными механизмы участия различных полиморфных вариантов целевой для ГМДП молекулы NOD-2 в хроническом воспалении, прогрессии опухолевого процесса, а также механизмы потенцирования эффектов цитостатиков.

Учитывая высокую перспективность использования ГМДП в противоопухолевой защите, а также неоднозначные данные о механизмах его участия в опухолевом процессе в представленной работе изучается влияние ГМДП-А на пролиферативный потенциал опухолевых клеточных линий, экспрессирующих NOD-2, и его эффект при комбинированном использовании с цитостатическим препаратом цисплатином.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Используемые препараты*

ГМДП-А – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовая кислота (производитель – ЗАО “Пептек”, Москва, Россия). ГМДП-А использовали в дозах 1, 5, 10, 20 и 40 мкг/мл.

Цисплатин-Тева (TEVA Pharmaceutical Industries Ltd., Израиль), раствор для инъекций 0,5 мг/мл, 100 мл. Активное вещество – цисплатин, вспомогательные вещества: натрия хлорид, натрия гидроксид (для коррекции уровня pH), вода для инъекций. Цисплатин использовали в концентрации 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл.

### *Характеристика и источники получения клеточных линий*

а) Банк клеточных линий НИИ цитологии РАМН, Санкт-Петербург:

Клетки колоректальной аденокарциномы человека SW1417 (Код ATCC – CCL-238)

Клетки колоректальной аденокарциномы человека SW480 (Код ATCC – CCL-228)

Клетки колоректальной аденокарциномы человека SW620 (Код ATCC – CCL-227)

б) Коллекция клеточных линий ФНКЦ ДГОИ им. Д. Рогачёва, Москва:

Клетки аденокарциномы яичника человека CaOv3 (Код ATCC – НТВ-75)

Клетки острого моноцитарного лейкоза человека THP-1 (Код ATCC – TIB-202)

Клетки острого промиелобластного лейкоза человека HL-60 (Код ATCC – CCL-240).

### *Культивирование клеточных линий*

Клетки всех клеточных линий культивировали при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Nuclo, США), 1 мг/мл глутамина, 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) (полная среда). После окончания инкубации, питательную среду вместе с неадгезированными клетками удаляли и в лунки добавляли свежую питательную среду, содержащую ГМДП-А в концентрации 1 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл. В контрольные лунки вносили эквивалентный объём питательной среды. Клетки культивировали 1 час при 37 °С, в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> и после окончания инкубации вносили цисплатин в концентрации 0,25 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл. В контрольные лунки вносили эквивалентный объём питательной среды. Клетки инкубировали в течении 16 часов, при 37 °С, в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

### *Содержание NOD-2 в цитоплазме клеток опухолевых линий*

Клетки выращивали в лунках 96-луночного планшета до конфлюэнтного монослоя. После окончания культивирования, питательную среду из лунок удаляли и клетки трёхкратно промывали фосфатносолевым буфером (ФСБ). Затем в лунки вносили 100 мкл 4% параформальдегида в изотоническом ФСБ и инкубировали 10 мин. После окончания фиксации, раствор параформальдегида удаляли и клетки промывали 3-кратно ФСБ.

Пермеабиллизацию клеток осуществляли с использованием 0,1% раствора тритон X100 (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ, в течении 10 мин. Затем лунки промывали ФСБ и вносили 100 мкл раствора мышинных антител к NOD-2 в разведении 1 : 1000 (BioLegend, США) в ФСБ, pH = 7,0, содержащим дополнительно 0,5% человеческого сывороточного альбумина и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре. После окончания инкубации плашку трижды промывали ФСБ, pH = 7,0, затем в лунки вносили конъюгат меченных пероксидазой поликлональных антител к мышинным иммуноглобулинам (BioLegend, США) в изотоническом ФСБ, содержащем дополнительно 0,5% человеческого сывороточного альбумина. Инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После окончания инкубации, лунки промывали 0,1 М изотоническим ФСБ, pH = 7,0 в объёме 1000 мкл/лунка. Активность пероксидазы выявляли в реакции с тетраметилбензидином (ТМБ), с использованием реактивов фирмы BioRad (США) и учитывали на вертикальном фотометре Multiscan FC.

### *Реакция бласттрансформации клеток*

Пролиферативный ответ опухолевых клеточных линий оценивали с помощью реакции бласттрансформации.

Клетки культивировали в плоскодонных 96-луночных планшетах в полной среде, так чтобы они находились в логарифмической фазе роста до окончания эксперимента. Планшеты инкубировали в течении 72 ч (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>). Пролиферативный ответ опухолевых клеток определяли через 72 часа по включению <sup>3</sup>H-тимидина (1 мкCi на лунку) в ДНК клеток. Уровень включения радиоактивной метки определяли с помощью сцинтилляционного β-счетчика (Rackbeta, США).

### *Статистическая обработка данных*

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для оценки статистической значимости различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при уровне *p* < 0,05.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### *1. Уровень экспрессии NOD-2 в клетках опухолевых линий различного гистогенеза*

На первом этапе работы с помощью “The human protein atlas” был проведен биоинформационный поиск и сделан предварительный отбор клеточных линий опухолевого

**Таблица 1.** Определение содержания молекул NOD-2 в цитоплазме клеточных линий, отобранных для последующего исследования (ед. оптической плотности)

Наименование линии клеток	SW480	SW620	CaOv3	HL-60	ТНР-1	SW1417
Конфлюэнтный монослой	136 ± 48 n = 4	132 ± 44 n = 4	211 ± 28 n = 4	315 ± 52 n = 6	224 ± 41 n = 4	0,021 ± 11 n = 3
Фаза логарифмического роста	172 ± 59* n = 4	201 ± 61* n = 4	185 ± 48* n = 4	253 ± 33 n = 6	247 ± 32* n = 4	0,018 ± 9* n = 3
Значимость различий	>0,05	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05

*Примечание:* данные представлены в виде средних значений измерений ( $M \pm m$ ), проведённых на каждом пассаже клеточных линий (n). Значения оптической плотности для конфлюэнтного монослоя и фазы логарифмического роста, нормированы по количеству клеток, взятых для анализа.

происхождения, в которых по данным литературы выявлена экспрессия NOD-2. Были выбраны линии различных гистотипов: колоректальная аденокарцинома человека (SW480, SW620, SW1417), аденокарцинома яичника человека (CaOv3), острый моноцитарный лейкоз человека (ТНР-1), острый промиелобластный лейкоз человека (HL-60). При этом по литературе линия SW1417 не экспрессирует NOD-2 рецепторы, в связи с чем она была использована как референтная при дальнейшей оценке уровня экспрессии NOD-2.

Результаты иммуноферментного определения содержания в цитоплазме опухолевых клеток NOD-2 рецепторов в зависимости от фазы клеточного цикла приведены в **таблице 1**. Как можно видеть из представленных данных, все отобранные клеточные линии экспрессируют NOD-2 рецепторы, за исключением линии SW1417. Уровень экспрессии различен для каждой клеточной линии. Наибольшая представленность молекул NOD-2 в цитоплазме наблюдается в клетках линий HL-60 и ТНР-1. Клетки линий колоректального рака содержат достоверно меньшее количество NOD-2 рецепторов. При этом для всех линий за исключением HL-60 отмечается тенденция к увеличению плотности NOD-2 молекул при переходе в фазу логарифмического роста.

## 2. Влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевых клеточных линий, экспрессирующих NOD-2

Одной из основных задач настоящего исследования явилось изучение влияния ГМДП-А на пролиферацию опухолевых культур клеток различной гистологической принадлежности, обладающих стабильной конституциональной экспрессией рецепторов NOD-2. В результате

предварительного изучения показателей пролиферативной активности опухолевых клеточных линий колоректальной аденокарциномы человека для дальнейшего исследования были использованы клеточные линии (SW480, SW620), как обладающие наиболее стабильными показателями пролиферации, а также опухолевые клеточные линии человека, происходящие из яичника (CaOv3), миелобластного (HL-60) и моноцитарного (ТНР-1) ряда.

### 2.1 Влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевой клеточной линии SW480

Как видно из представленных в **таблице 2** данных, внесение в культуру клеток SW480 ГМДП-А в различных концентрациях сопровождается тенденцией к увеличению включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток при концентрациях препарата 1 и 5 мкг/мл. В диапазоне концентраций 10–40 мкг/мл эти различия становятся статистически достоверными.

При изучении влияния ГМДП-А на пролиферацию клеток SW480 в присутствии цисплатина было установлено, что эффект препарата носит двунаправленный характер. Так, при использовании препарата ГМДП-А в дозе 1 и 5 мкг/мл в культурах, содержащих цисплатин в концентрации 0,25 и 0,5 мкг/мл, соответственно, происходит достоверное снижение включения метки в ДНК клеток. Применение более высоких доз препарата ГМДП-А 20 и 40 мкг/мл достоверно повышало пролиферативную активность клеток при использовании тех же концентраций цисплатина.

### 2.2 Влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевой клеточной линии SW620

Как видно из представленных в **таблице 3** данных, внесение в культуру клеток SW620 ГМДП-А сопровождается увеличением включения  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК клеток при

**Таблица 2.** Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки SW480 (срм).

Концентрация ГМДП-А (мкг/мл)	Концентрация цисплатина (мкг/мл)							
	0 (Контроль)		0,25		0,5		1,0	
	М	m	М	m	М	m	М	m
0 (Контроль)	13824	1000	11698	430	10520	192	3785	1271
1	17731	3541	10623*	257	9838*	587	3195	123
5	17322	3652	14510*	2604	8967*	97	3665	52
10	16014**	821	12250	754	10134	368	3973	633
20	15964**	135	12520**	678	12147**	216	3771	99
40	16606**	56	15674**	558	13102**	717	5112	1981

*Примечание:* в таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов ( $n = 3$ ). Данные представлены  $M \pm m$ . По оси абсцисс – концентрация цисплатина, мкг/мл. По оси ординат – концентрация ГМДП-А, мкг/мл. \*достоверное снижение включения метки в ДНК клеток; \*\*достоверное повышение включения метки в ДНК клеток.

**Таблица 3.** Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки SW620 (срм).

Концентрация ГМДП-А (мкг/мл)	Концентрация цисплатина (мкг/мл)							
	0 (Контроль)		0,25		0,5		1,0	
	М	m	М	m	М	m	М	m
0 (Контроль)	2363	225	1940	271	1131	82	1287	43
1	2812**	167	1574*	32	1722*	160	1747*	171
5	2128	186	1285*	23	1103	74	1323	38
10	2092	230	1676	130	1164	117	1315	60
20	2883**	277	1389*	37	1319**	145	1521	55
40	2451	211	1434*	92	1280**	96	1407	73

*Примечание:* в таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов ( $n = 3$ ). Данные представлены  $M \pm m$ . По оси абсцисс – концентрация цисплатина, мкг/мл. По оси ординат – концентрация ГМДП-А, мкг/мл. \*достоверное снижение включения метки в ДНК клеток; \*\*достоверное повышение включения метки в ДНК клеток.

**Таблица 4.** Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки CaOv3 (срм).

Концентрация ГМДП-А (мкг/мл)	Концентрация цисплатина (мкг/мл)							
	0 (Контроль)		0,25		0,5		1,0	
	М	m	М	m	М	m	М	m
0 (Контроль)	11431	1300	11151	454	8753	1031	6395	293
1	11975	1469	11189	594	7150*	772	5450*	336
5	11789	1788	10594	926	8606*	781	5536*	539
10	12252	1170	9359	374	8388*	1300	5637*	569
20	12920	494	11183	934	7703	819	6535	537
40	11174	809	10411	415	8311	1473	6146	757

*Примечание:* в таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов ( $n = 3$ ). Данные представлены  $M \pm m$ . По оси абсцисс – концентрация цисплатина, мкг/мл. По оси ординат – концентрация ГМДП-А, мкг/мл. \*достоверное снижение включения метки в ДНК клеток.

**Таблица 5.** Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки HL-60 (срм).

Концентрация ГМДП-А (мкг/мл)	Концентрация цисплатина (мкг/мл)							
	0 (Контроль)		0,25		0,5		1,0	
	М	m	М	m	М	m	М	m
0 (Контроль)	61187	5694	47790	3425	40314	2987	29831	4281
1	59162	3850	48572	3581	39272	4787	27586	3318
5	63757	6581	51057	3697	41407	3732	32336	3209
10	65815	4486	47014	3570	39542	4226	28763	3244
20	66094	1716	45317	5664	44412	2625	35605	2847
40	63023	4566	46888	4688	45032	3293	28396	3338

*Примечание:* в таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов ( $n = 3$ ). Данные представлены  $M \pm m$ . По оси абсцисс – концентрация цисплатина, мкг/мл. По оси ординат – концентрация ГМДП-А, мкг/мл.

концентрации препарата 1 и 20 мкг/мл. В концентрации 5, 10 и 40 мкг/мл препарат не оказывал достоверного влияния на включение метки в ДНК. При изучении влияния ГМДП-А на пролиферацию клеток SW620 в присутствии цисплатина было установлено, что эффект препарата носит двунаправленный характер. Так, при использовании препарата ГМДП-А в дозе 1, 5, 20 и 40 мкг/мл в культурах, содержащих цисплатин в концентрации 0,25 мкг/мл, происходит достоверное снижение включения метки в ДНК клеток. Применение более высоких доз препарата ГМДП-А 20 мкг/мл и 40 мкг/мл достоверно повышало пролиферативную активность клеток при использовании цисплатина в концентрации 0,5 мкг/мл.

В то же время, ГМДП-А в концентрации 1 мкг/мл достоверно увеличивал резистентность клеток SW620 к действию цисплатина в концентрации 0,5 и 1,0 мкг/мл.

### 2.3 Влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевой клеточной линии CaOv3

Из представленных в **таблице 4** данных следует, что влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевых клеток другого тканевого происхождения (фолликулярный эпителий яичника) имеет сходные тенденции с действием препарата на клетки колоректального рака, а именно – в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл препарат потенцировал цитотоксическое действие цисплатина (концентрация 0,5 и 1 мкг/мл), а в концентрации 20 и 40 мкг/мл незначительно усиливал включение  $^3\text{H}$ -тимидина в ДНК, не изменяя чувствительность клеток к цитостатику.

### 2.4 Влияние ГМДП-А на пролиферацию опухолевых линий HL-60 и ТНР-1

Как видно из представленных данных, ГМДП-А не влияет на пролиферацию клеток линий HL-60 (**таблица 5**) и ТНР-1 (**таблица 6**) во всём диапазоне использованных концентраций

**Таблица 6.** Включение  $^3\text{H}$ -тимидина в клетки ТНР-1 (срм).

Концентрация ГМДП-А (мкг/мл)	Концентрация цисплатина (мкг/мл)							
	0 (Контроль)		0,25		0,5		1,0	
	М	m	М	m	М	m	М	m
0 (Контроль)	98966	3955	20437	2664	5028	410	1821	203
1	88363	1935	18494	2496	4983	537	1712	163
5	91971	6724	20075	1628	6226	747	1709	172
10	93542	3267	18606	777	6014	88	1632	117
20	79484	7467	14210	1844	4576	598	1473	56
40	117934	6672	22604	1745	4641	483	1680	100

*Примечание:* в таблице представлены данные 3-х независимых экспериментов ( $n = 3$ ). Данные представлены  $M \pm m$ . По оси абсцисс – концентрация цисплатина, мкг/мл. По оси ординат – концентрация ГМДП-А, мкг/мл.

препарата. Установлено, что ГМДП-А не влияет на чувствительность клеток обеих линий к цисплатину.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск новых методов лечения опухолей на сегодня наиболее бурно развивающееся направление фармакологии и использование иммуностропных препаратов в качестве адъювантов в дополнение к классическим методам (хирургическому, химио- и радиотерапии) наиболее перспективно. МДП в настоящее время уже начали использовать в лечении рака в качестве неспецифического активатора противоопухолевого иммунитета. Однако, наряду с его общеизвестной активностью в отношении врожденного иммунного ответа, существуют некоторые данные, которые заставляют продолжать исследования этого субстрата и, на данном этапе знаний, относиться к его использованию осторожно и выборочно. Данная работа направлена на изучение прямого влияния ГМДП-А и ГМДП-А совместно с цисплатином на клетки опухолевых линий различного происхождения.

Мурамилдипептиды и их производные (ГМДП и ГМДП-А) — синтетические гликопептиды микробного происхождения, стимулируют различные функции макрофагов (хемотаксис, фагоцитоз, бактерицидную активность, презентацию антигенов) и, как результат, врожденный иммунный ответ против бактериальных и вирусных агентов, а также участвуют в противоопухолевой защите организма. МДП, являясь аналогом фрагмента бактериальной стенки, связывается с сигнальными рецепторами (sPRR), что приводит к стимуляции многих звеньев иммунной системы, в частности, повышается продукция цитокинов (TNF-альфа, IL-1, IL-6, IL-8 и др.), оксида азота NO, С-реактивного белка, молекул адгезии (CD11a, b, c/CD18, CD54); активируется цитотоксичность [18–21]. В настоящее время показано, что основной целевой молекулой для МДП в цитоплазме иммунных клеток миелоидного происхождения служит молекула семейства NLR — NOD-2 [3–4]. При взаимодействии МДП с мономерной формой NOD-2 происходит его димеризация и связывание с Rip2, который в свою очередь активирует NEMO и MAPK-киназы, что приводит к активации транскрипционного фактора NFκB и AP1/Jun. Эти факторы запускают транскрипцию целого ряда провоспалительных цитокинов в ядре клетки (IL-1, IL-18, IL-6,

IL-8, TNF-альфа, IFN, MIP2, CCL2), что в свою очередь активирует функцию клеток, участвующих в противоопухолевой защите.

Недавние исследования показывают, что NOD-2 экспрессируется не только в клетках крови миелоидного и лимфоидного происхождения, но также и в негемопоэтических клетках различного происхождения (эпителиальные клетки тонкого кишечника [22]; клетки Панета [23] и опухолевых клетках различного тканевого происхождения (рак легких, гортани, кишечника, яичников, молочной железы) [24].

В представленной работе было отобрано несколько опухолевых клеточных линий, экспрессирующих NOD-2 (табл. 1) и изучено влияние ГМДП-А на пролиферацию этих клеток. При анализе полученных результатов можно отметить, что ГМДП-А влияет на пролиферативную активность не всех опухолевых клеточных линий. Клетки, относящиеся к миелоидному ряду (HL-60, THP-1) оказались не чувствительны к действию ГМДП-А. Максимальной чувствительностью к препарату обладают опухолевые клетки, происходящие из эпителия толстого кишечника — SW480 и SW620. Так, внесение в культуру клеток SW480 ГМДП-А в различных концентрациях сопровождается тенденцией к увеличению пролиферативного потенциала. В работе [25] блокирование экспрессии NOD-2 в клетках опухолевых линий HT-29 (аденокарцинома толстого кишечника) и SW480 (колоректальная аденокарцинома) с помощью интерферирующей РНК (short hairpin RNA) приводит к снижению жизнеспособности клеток линии HT-29 на 20% к 6-му дню и клеток SW480 через 4 недели на 60%, что может объясняться усилением апоптоза клеток, а также экспрессией в опухолевых клетках мутатных аллелей NOD-2.

Нужно отметить, что относительно взаимодействия МДП с рецепторами семейства NOD (NOD-1 и NOD-2) на сегодня нет ясности. Часть исследований свидетельствует о прямом взаимодействии МДП с NOD-2 (Franchi L, 2009), в других работах показано, что взаимодействие происходит через MurNac или α-карбоксильную группы МДП [3].

Известно, что в негемопоэтических и опухолевых клетках могут экспрессироваться различные полиморфные варианты гена NOD-2. Так, например, наиболее часто встречающаяся мутантная форма 3020insC гена NOD-2 характеризуется появлением стоп-кодона в 11 экзоне и генерацией молекулы NOD-2 с потерей 33 аминокислот [26]. Этот вариант мутации



ассоциирован с повышенной активностью NFκB [27]. Экспрессия мутантного варианта 3020insC гена NOD-2 в эпителии кишечника является ключевым фактором развития хронического воспаления, участвуя в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника (язвенный колит, болезнь Крона) и является патогенетическим фактором развития колоректального рака [28]. В работе Hampe J. et al. показано, что примерно 25% пациентов с болезнью Крона в популяциях Германии и Великобритании несут мутантный аллель 3020insC гена NOD-2 [29]. В популяции Польши эта мутантная форма гена NOD-2 встречается в 7% случаев и колоректальный рак, рак легких и яичников у индивидов с этим аллелем встречается значительно чаще [24]. В греческой популяции мутантные аллели гена NOD-2 R702W, G908R и 3020insC статистически значимо чаще встречаются у пациентов с колоректальным раком, чем у здоровых индивидов [17]. В проспективном когортном исследовании показано, что мутация NOD-2 также ассоциирована с карциномой желудка, индуцированной *H. pylori* [30] и лимфомой желудка [31].

Мутантные аллели гена NOD-2 демонстрируют сниженную функциональную активность белка, что приводит к неконтролируемой продукции провоспалительных цитокинов и развитию хронического воспаления [32]. В работе Penack O. et al. на мышинной модели реакции трансплантат против хозяина (GVHD) показано, что результатом наличия мутантного гена NOD-2 является сниженная функция антиген-презентирующих и Т-регуляторных клеток [33]. Показано, что молекулы мутантного гена 3020insC NOD-2 имеют дефект распознаемости и не отвечают на стимуляцию МДП [3, 34].

К настоящему моменту существует достаточно много работ о совместном применении МДП и цитостатиков при опухолевых процессах. В нашей работе при изучении способности ГМДП-А модулировать цитотоксические эффекты цитостатического действия химиотерапевтического препарата цисплатин были отмечены разнонаправленные эффекты препарата в зависимости от его дозы и типа клеток. Выяснено, что ГМДП-А не влияет на чувствительность к цисплатину опухолевых клеток, происходящих из миелоидных предшественников. Опухолевые клетки эпителия кишечника становятся более чувствительными к цитостатическому действию цисплатина в присутствии ГМДП-А. При этом следует отметить, что ГМДП-А также способен защищать клетки

SW480 и SW620 от цитостатического действия цисплатина. Полученные данные могут быть объяснены исходя из предположения, что в разных типах клеток ГМДП-А активирует различные сигнальные пути, а степень активации зависит от концентрации препарата. В литературе имеются указания, что проведение сигнала от NOD-2 рецептора, помимо канонической CARD-зависимой активации RIC-киназ, может включать и активацию MAPK и связанных с ними сигнальных путей [32]. Это обстоятельство представляется важным, так как механизмы пролиферации клеток и механизмы апоптоза зависят от активации этих MAPK-зависимых сигнальных путей. Кроме этого, в литературе имеются данные о том, что цитотоксическое действие цисплатина зависит от наличия и активности некоторых белков, относящихся к MAPK или MAPK-зависимым сигнальным путям.

В работе Немцовой Е.Р. с сотр. на моделях перевиваемых опухолей у животных показано, что ГМДП-А проявляет модифицирующие свойства в отношении активности цисплатина, гемцитабина и циклофосфамида, усиливая их противоопухолевые свойства [35]. Причем, в ситуации *in vivo* эффективность совместного использования ГМДП-А и цитостатиков зависела от гистологической формы опухоли и проявлялась в отношении иммунозависимых опухолей (меланома B16, лимфолейкоз P-388 и рак шейки матки PШМ-5), что очевидно связано с активирующим влиянием ГМДП-А на врожденный иммунитет и увеличением экспрессии опухолевых маркеров на клетках. На моделях иммунонезависимых опухолей (саркома S-37, аденокарцинома толстой кишки С-26 и АКАТОЛ) потенцирующего действия ГМДП-А отмечено не было.

Исследование эффективности использования конъюгата доцетаксела и МДП (Salutaxel) продемонстрировало значительную эффективность конъюгата по сравнению с доцетакселом в отношении прогрессии опухолевого роста и метастазирования [36]. На модели высокоинвазивной метастазирующей карциномы молочной железы 4T1 у мышей BALB/c при внутривенном введении salutaxel или доцетаксела в различных дозах был продемонстрирован ингибирующий дозозависимый эффект в отношении роста и метастазирования опухоли, причем использование salutaxel было значительно более выраженным. Так, рост опухоли при введении salutaxel в дозах 5, 10 или 20 мг/кг был ингибирован на 12, 37 и 57,2% соответственно,

что значительно превышало показатели от применения доцетаксела (5,7 мг/кг – 19,6%).

Механизмов потенцирующего влияния МДП в отношении цитостатиков может быть несколько. Во-первых, показана способность МДП ингибировать систему цитохрома P450, что приводит к снижению скорости окисления ксенобиотиков [37]. Так, например, salutarin ингибирует экспрессию изоформы CYP2C8 цитохрома P450, что вероятно приводит к замедлению метаболизма цитостатика. Результатом этого является тот факт, что введение salutarin мышам BALB/c приводит к значительно более высокой концентрации доцетаксела в плазме крови и ткани опухоли по сравнению с введением одного доцетаксела (Cmax 5,35 и 2,52 соответственно) [36].

Во-вторых, ГМДП может потенцировать действие цитостатиков через различные молекулярно-клеточные механизмы. Одним из патогенетических звеньев прогрессии опухолевого процесса являются супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC человека экспрессируют маркеры миелоидных клеток CD11b и CD33, но обычно негативны по антигенам HLA-DR и линейным специфическим антигенам (Lin), таким как CD3, CD19 и CD57) [38], способные ингибировать функцию натуральных киллерных клеток, В-лимфоцитов, дендритных и Т-цитотоксических клеток, стимулировать Т-регуляторные клетки, ангиогенез, металлопротеиназы, тем самым приводя к прогрессии опухолевого роста и метастазированию опухолевых клеток [39]. В работе Wen X. et al., salutarin значительно снижает количество миелоидных супрессорных клеток (CD11b+Gr1+ у мышей) в ткани селезенки по сравнению с использованием доцетаксела. Кроме того, salutarin значительно снижает экспрессию металлопротеиназы MMP9 и TIMP-1 (медиатор NFκB-индуцированной пролиферации опухолевых клеток) в плазме крови, в селезенке и легких мышей [36].

Таким образом, учитывая полученные в данной работе неоднозначные данные о стимуляции пролиферации опухолевых клеточных линий разного тканевого происхождения с помощью ГМДП-А, а также совместный эффект от применения ГМДП-А и цисплатина, очевидно стоит с осторожностью подходить к использованию ГМДП-А в иммунотерапии некоторых видов опухолей, а именно продолжить изучение эффективности и механизмов противоопухолевой активности ГМДП-А в условиях *in vivo* при сохраненной иммунной системе. В перспективе,

возможно, понадобится персонализировать пациентов с определением чувствительности опухолевых клеток к ГМДП-А, как это происходит сегодня с целым рядом инновационных таргетных противоопухолевых препаратов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Corthay A.* Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol.* 2014, 5, 197.
2. *Симбирцев А.С.* Роль цитокинов в развитии опухолей и в иммунотерапии рака. В кн.: Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. Фолиант, СПб. 2018, 479–509. [*Simbirsev A.S.* The role of cytokines in the development of tumors and in cancer immunotherapy. In: *Cytokines in the pathogenesis and treatment of human diseases.* Folio, St. Petersburg 2018, 479–509].
3. *Girardin S.E., Travassos L.H., Hervé M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., Sansonetti P.J., Mengin-Lecreulx D.* Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and NOD-2. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(43), 41702–8.
4. *Traub S., von Aulock S., Hartung T., Hermann C.* MDP and other muropeptides-direct and synergistic effects on the immune system. *J Endotoxin Res.* 2006, 12 (2), 69–85.
5. *Ростовцева Л.И., Андропова Т.М., Малькова В.П.* Синтез и противоопухолевое действие гликопептидов, содержащих N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамил-дисахаридное звено. *Биоорганическая химия* 1981, 7, 12, 1843–1858. [*Rostovtseva L.I., Andronova T.M., Malkova V.P.* Synthesis and antitumor activity of glycopeptides containing N-acetylglucosaminyl (β1–4)-N-acetylmuramyl-disaccharide unit. *Bioorganic Chemistry* 1981, 7, 12, 1843–1858].
6. *Сорокина И.Б., Малькова В.П., Ростовцева Л.И.* Поиск противоопухолевых соединений среди природных и синтетических гликопептидов, моделирующих клеточные стенки бактерий. В кн.: Актуальные проблемы экспериментальной химиотерапии опухолей. II Всесоюзное совещание. М., 1982; 147–9. [*Sorokina I.B., Malkova V.P., Rostovtseva L.I.* Search for antitumor compounds among natural and synthetic glycopeptides, which model cell walls of bacteria. In the book: *Actual problems of experimental chemotherapy of tumors.* Second All-Union Conference. M., 1982; 147–9].
7. *Shimizu T., Iwamoto Y., Yanagihara Y., Ikeda K., Achikawa K.* Combined effects of synthetic lipid A analogs or bacterial lipopolysaccharide with glucosaminylmuramyl dipeptide on antitumor activity against meth A fibrosarcoma in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992, 14(8), 1415–20.
8. *Симонова М.А.* Влияние ГМДП на биологическую активность цисплатина и фактора некроза опухолей-альфа. Автореф. дисс. Москва 2008. [*Simonova M.A.* The influence of GMDP on the biological activity of cisplatin and tumor necrosis factor-alpha. Author's abstract. diss. Moscow 2008].

9. *Ахматова Н.К.* Молекулярные и клеточные механизмы действия иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность эффекторов врожденного иммунитета. Автореф. дисс. Москва 2006. [*Akhmatova N.K.* Molecular and cellular mechanisms of immunomodulators of microbial origin on the functional activity of the effectors of innate immunity. Author's abstract. diss. Moscow 2006].
10. *Ахматова Н.К., Кислевский М.В.* В кн.: Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. Практическая медицина, Москва 2008. [*Akhmatova N.K., Kislevsky M.V.* In the book: Congenital immunity: antitumor and anti-infective. Practical medicine, Moscow 2008].
11. *Уманский В.Ю., Стефанов А.В., Бондарь О.П.* Эффект ГМДП, заключенного в липосомы, на метастазирование карциномы легкого Льюис. Экспериментальная онкология 1988, Т. 10, № 5, 40–3. [*Umansky V. Yu., Stefanov A.V., Bondar O.P.* The effect of GMDP, encapsulated in liposomes, on the metastasis of Lewis lung carcinoma. Experimental oncology 1988, T. 10, No. 5, 40–3].
12. *Ревазова Е.С.* Мурамилдипептиды модулируют экспрессию опухолеассоциированных антигенов. Иммунология 1989. Т. 4, 32–6. [*Revazova E.S.* Muramyl dipeptides modulate the expression of tumor-associated antigens. Immunology 1989. Vol. 4, 32–6].
13. *Valyakina T.I., Malakhov A., Malakhova N., Petrova E., Bykovskaya S., Revazova E., Nesmeyanov V.* Glucosaminylmuramyl dipeptide induced changes in phenotype of melanoma cells result in their increased lysis by peripheral blood cells. Int. J. Oncol. 1996, 9, 885–91.
14. *Petrova E.E., Simonova M.A., Komaleva R.L., Britsina M.V., Andronova T.M., Nesmeyanov V.A., Valyakina T.I.* GMDP augments antitumor action of the CP/TNF $\alpha$  combination in vivo. Biomed Pharmacother. 2010, 64 (4), 240–8.
15. *Werts C., Rubino S., Ling A., Girardin S.E., Philpott D.J.J.* Nod-like receptors in intestinal homeostasis, inflammation, and cancer. Leukoc Biol. 2011, 90 (3), 471–82.
16. *Velloso F.J., Sogayar M.C., Correa R.G.* Expression and in vitro assessment of tumorigenicity for NOD1 and NOD-2 receptors in breast cancer cell lines. BMC Res Notes. 2018, 3, 11(1), 222.
17. *Papaconstantinou I., Theodoropoulos G., Gazouli M., Panoussopoulos D., Mantzaris G.J., Felekouras E., Bramis J.* Association between mutations in the CARD15/NOD-2 gene and colorectal cancer in a Greek population. Int. J. Cancer. 2005, 10, 114(3), 433–5.
18. *Dzierzbicka K., Trzonkowski P., Sewerynek P., Kolodziejczyk A.M., Myśliwski A.* Synthesis and biological activity of tuftsin, its analogue and conjugates containing muramyl dipeptides or normuramyl dipeptides. J. Pept. Sci. 2005, 11(3), 123–35.
19. *Klimp A.H., de Vries E.G., Scherphof G.L., Daemen T.* A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2002, 44(2), 143–61.
20. *Ekman A.K., Cardell L.O.* The expression and function of Nod-like receptors in neutrophils. Immunology 2010, 130(1), 55–63.
21. *van der Meer J.H., Netea M.G., Dinarello C.A.* Modulation of muramyl dipeptide stimulation of cytokine production by blood components. Clin. Exp. Immunol. 2009, 156(3), 428–33.
22. *Barnich N., Aguirre J.E., Reinecker H.C., Xavier R., Podolsky D.K.* Membrane recruitment of NOD-2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. J. Cell Biol. 2005, 4; 170(1), 21–6.
23. *Ogura Y., Lala S., Xin W., Smith E., Dowds T.A., Chen F.F., Zimmermann E., Tretiakova M., Cho J.H., Hart J., Greenson J.K., Keshav S., Nuñez G.* Expression of NOD-2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. Gut. 2003, 52(11), 1591–7.
24. *Lubiński J., Huzarski T., Kurzawski G., Suchy J., Masojć B., Mierzejewski M., Lener M., Domagała W., Chosia M., Teodorczyk U., Medrek K., Debnia T., Złowocka E., Gronwald J., Byrski T., Grabowska E., Nej K., Szymańska A., Szymańska J., Matyjasik J., Cybulski C., Jakubowska A., Górski B., Narod S.A.* The 3020insC Allele of NOD-2 Predisposes to Cancers of Multiple Organs. Hered Cancer Clin. Pract. 2005, 15, 3(2), 59–63.
25. *Cruickshank S.M., Wakenshaw L., Cardone J., Howdle P.D., Murray P.J., Carding S.R.* Evidence for the involvement of NOD-2 in regulating colonic epithelial cell growth and survival. World J. Gastroenterol. 2008, 14, 14(38), 5834–41.
26. *Ogura Y., Bonen D.K., Inohara N., Nicolae D.L., Chen F.F., Ramos R., Britton H., Moran T., Karaliuskas R., Duerr R.H., Achkar J.P., Brant S.R., Bayless T.M., Kirschner B.S., Hanauer S.B., Nuñez G., Cho J.H.* A frameshift mutation in NOD-2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 2001, 31; 411 (6837), 603–6.
27. *Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G.* NOD-2, a Nod1/Ipaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- $\kappa$ B. J. Biol. Chem. 2001, 16, 276(7), 4812–8.
28. *Hugot J.P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J.P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C.A., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Cortot A., Modigliani R., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Macry J., Colombel J.F., Sahbatou M., Thomas G.* Association of NOD-2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001, 31; 411(6837), 599–603.
29. *Hampe J., Cuthbert A., Croucher P.J., Mirza M.M., Mascheretti S., Fisher S., Frenzel H., King K., Hasselmeier A., MacPherson A.J., Bridger S., van Deventer S., Forbes A., Nikolaus S., Lennard-Jones J.E., Foelsch U.R., Krawczak M., Lewis C., Schreiber S., Mathew C.G.* Association between insertion mutation in NOD-2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 2001, 16, 357(9272), 1925–8.
30. *Companioni O., Bonet C., Muñoz X., Weiderpass E., Panico S., Tumino R., Palli D., Agnoli C., Vineis P., Boutron-Ruault M.C., Racine A., Clavel-Chapelon F.,*

- Travis R.C., Khaw K.T., Riboli E., Murphy N., Vergnaud A.C., Trichopoulou A., Benetou V., Trichopoulos D., Lund E., Johansen D., Lindkvist B., Johansson M., Sund M., Ardanaz E., Sánchez-Cantalejo E., Huerta J.M., Dorransoro M., Ramón Quirós J., Tjønneland A., Mortensen L.M., Overvad K., Chang-Claude J., Rizzato C., Boeing H., Bueno-de-Mesquita H.B., Siersema P., Peeters P.H., Numans M.E., Carneiro F., Licaj I., Freisling H., Sala N., González C.A. Polymorphisms of Helicobacter pylori signaling pathway genes and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer-Eurgast cohort. *Int. J. Cancer*. 2014, 1, 134(1), 92–101.
31. Rosenstiel P., Hellmig S., Hampe J., Ott S., Till A., Fischbach W., Sahly H., Lucius R., Fölsch U.R., Philpott D., Schreiber S. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD-2/CARD15 genes on the clinical outcome of Helicobacter pylori infection. *Cell Microbiol*. 2006, 8(7), 1188–98.
32. Philpott D.J., Sorbara M., Robertson S.J., Croitoru K., Girardin S.E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat. Rev. Immunol*. 2014, 14(1), 9–23.
33. Penack O., Holler E., van den Brink M.R. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010, 11, 115(10), 1865–72.
34. Bonen D.K., Ogura Y., Nicolae D.L., Inohara N., Saab L., Tanabe T., Chen F.F., Foster S.J., Duerr R.H., Brant S.R., Cho J.H., Nuñez G. Crohn's disease-associated NOD-2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003, 124(1), 140–6.
35. Немцова Е.Р., Безбородова О.А., Морозова Н.Б., Воронцова М.С., Венедиктова Ю.Б., Андреева Т.Н., Нестерова Е.И., Андреева Т.М., Якубовская Р.И. Эффективность сочетанного лечения экспериментальных опухолей цитостатическими препаратами и ГМДП-А. *Российский биотерапевтический журнал* 2017, 16, 2, 13–22. [Nemtsova E.R., Bezborodova O.A., Morozova N.B., Vorontsova M.S., Venediktova Yu.B., Andreeva T.N., Nesterova E.I., Andronova T.M., Yakubovskaya R.I. Efficiency of combined treatment of experimental tumors with cytostatic drugs and GMDP-A. *Russian Biotherapeutic Journal* 2017, 16, 2, 13–22].
36. Wen X., Zheng P., Ma Y., Ou Y., Huang W., Li S., Liu S., Zhang X., Wang Z., Zhang Q., Cheng W., Lin R., Li H., Cai Y., Hu C., Wu N., Wan L., Pan T., Rao J., Bei X., Wu W., Jin J., Yan J., Liu G. Salutaxel, a conjugate of docetaxel and a muramyl dipeptide (MDP) analogue, acts as multifunctional prodrug that inhibits tumor growth and metastasis. *J. Med. Chem*. 2018, 22, 61(4), 1519–1540.
37. Trescec A., Iskrić S., Ljevaković D., Hrsak I., Tomasić J. The effects of immunomodulating peptidoglycan monomer and muramyl dipeptide on hepatic microsomal UDP-glucuronyltransferase and beta-glucuronidase. *Int. J. Immunopharmacol*. 1987, 9(3), 371–8.
38. Montero A.J., Diaz-Montero C.M., Kyriakopoulos C.E., Bronte V., Mandruzzato S. Myeloid-derived suppressor cells in cancer patients: a clinical perspective. *J. Immunother*. 2012, 35 (2), 107–15.
39. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol*. 2009, 9(3), 162–74.

## INFLUENCE OF MURAMYL DIPEPTIDE DERIVATE (GMDP-A) ON NOD-2 EXPRESSED TUMOUR CELL LINES

© 2018 A. M. Gaponov<sup>1,2</sup>, E. V. Yakushenko<sup>1</sup>, A. V. Tutelyan<sup>3</sup>, I. G. Kozlov<sup>1\*</sup>

\*E-mail: immunopharmacology@yandex.ru

<sup>1</sup>D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatrics Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Federal Scientific and Clinical Center for Reanimation and Rehabilitation, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Federal Budget Institution of Science “Central Research Institute of Epidemiology” of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, Moscow, Russia

Received: 05.05.2018. Accepted: 08.05.2018

Muramyl dipeptides (MDP) are the multiple repeating structural unit of a cell wall peptidoglycan of all the bacteria, which possess the ability to interact with cytoplasmic receptors of the NOD family in human cells and induce activation of the innate immunity. This makes them the promising compounds for the development of drugs for immunomodulating therapy and in particular for biototherapy of tumors. However, there exists data on the expression of MDP targeting NOD receptors in tumor cells and association of some types of cancer with different polymorphic variants of these receptors. In this connection, the purpose of the reported study was to investigate the effect of MDP synthetic analogue, i.e. GMDP-A on the proliferative capacity of NOD2-expressing tumor cell lines of various origin, and the effect of the combined use of GMDP-A with cisplatin. As a result of the performed studies, it has been demonstrated that GMDP-A (at the doses of 1, 5, 10, 20 and 40 µg/ml) itself and GMDP-A in combination with cisplatin exerted differently directed effects.


**Key words:** muramyl dipeptide, GMDP-A, NOD-2, nonspecific cancer immunotherapy, tumour cell lines, cisplatin

**Authors:**

**Gaponov A.M.**, PhD, Head of the Laboratory of Infection Immunology D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatrics Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia; Leading Researcher, Laboratory of Molecular Mechanisms of Critical States, Federal Scientific and Clinical Center for Reanimatology and Rehabilitation, Moscow, Russia;

**Yakushenko E.V.**, DrSci, Leading Researcher, Experimental and Clinical Pharmacology Department, D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatrics Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia;

**Tutelyan A.V.**, DrSci, Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory Associated Infections Health Care, Federal Budget Institution of Science “Central Research Institute of Epidemiology” of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance (CRIE), Moscow, Russia, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2706-6689>, eLibrary SPIN: 8150–2230;

**Kozlov I.G.**,  DrSci, professor, Chief of Experimental and Clinical Pharmacology Department, D. Rogachev National Medical Research Center for Pediatrics Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia;

117997 Moscow, Samory Mashela str. 1. Phone/fax: +74952876570, +79161317101 (mob.). **E-mail:** immunopharmacology@yandex.ru.