



УДК 577.112.6.083.3

© 1991 г.

*Е. А. Мецерькова, С. В. Гурьянова, Е. А. Макаров,
Т. М. Андропова, В. Т. Иванов*

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМОИЛПЕПТИДОВ. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНИЛ-N-АЦЕТИЛМУРАМОИЛДИПЕПТИДА НА ЕГО ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА IN VIVO И IN VITRO

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Исследованы структурно-функциональные взаимоотношения в ряду синтетических глюкозаминилмурамоилпептидов — гликопептидных адьювантов бактериальной природы. Модификация молекулы N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина (GMDP) влияет на его адьювантную и пирогенную активности in vivo. Определено, что при вторичном иммунном ответе на белковый антиген GMDP в наибольшей степени стимулирует синтез иммуноглобулинов подклассов IgG_{2a} и IgG₃. Установлена корреляция адьювантного эффекта с комитогенным тестом реакции бласттрансформации спленоцитов в присутствии В-клеточного митогена. Не обнаружено прямой зависимости между величиной адьювантного действия гликопептидов и их влиянием на продукцию IL-1 макрофагами.

Как известно, минимальным фрагментом клеточной стенки бактерии, который может заменить *Mycobacteria* в полном адьюванте Фрейнда, является N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин [1]. В многочисленных работах было показано, что MDP обладает широким спектром биологических эффектов, среди которых наиболее важны иммуноадьювантная активность, стимуляция неспецифической резистентности к бактериальным и вирусным антигенам, сомногенный эффект [2, 3].

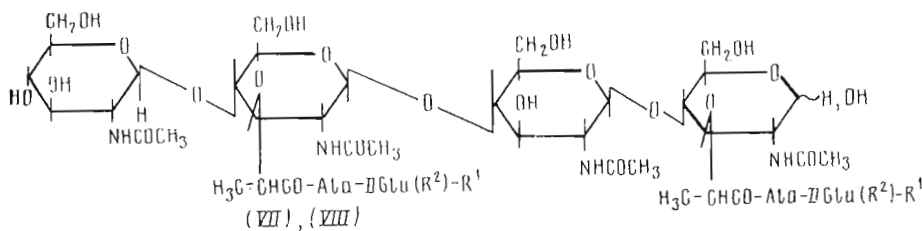
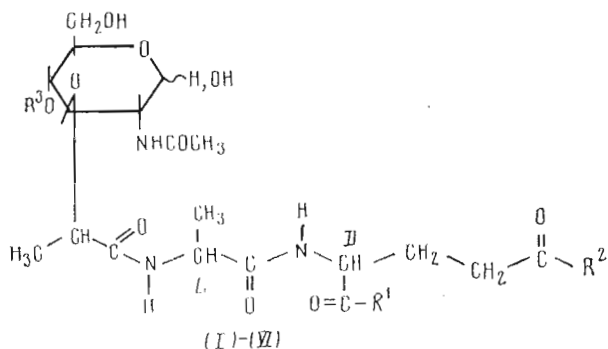
Всеми перечисленными активностями обладают глюкозаминилмурамоилпептиды — дисахаридсодержащие гликопептиды клеточных стенок бактерий, отличающиеся от мурамоилпептидов наличием остатка N-ацетилглюкозамина. Синтез N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамина был осуществлен в ряде лабораторий [4—6]. Оказалось, что GMDP обладает рядом преимуществ по сравнению с MDP: он менее пирогенен, менее токсичен и проявляет большую активность против опухоли Sarcoma 180, а также в тесте адьювантности [7, 8].

Способность GMDP повышать гуморальный ответ к белковым и корпускулярным антигенам представляет несомненный интерес, поскольку открывается возможность его применения как адьюванта при вакцинации и получении синтетических вакцин. Предложенный в работе [7] оригинальный способ синтеза GMDP позволяет получить широкий набор его аналогов как с целью выяснения связи структуры и функции, так и для разработки новых перспективных препаратов.

В связи с этим в настоящей работе исследованы адьювантные свойства GMDP и ряда его производных (I)–(IX) и рассмотрена возможная связь адьювантности с пирогенным эффектом. Проведен анализ стимуляции с помощью GMDP гуморального ответа к белковому антигену по подклассам иммуноглобулинов. Кроме того, с целью изучения механизма адью-

Сокращения: Con A — конканавалин А, IL-1 — интерлейкин 1, GMDP — N-ацетилглюкозаминил-(β1-4)-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин, MDP — N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-изоглутамин, ЛПС — липополисахарид *E. coli*, РБТ — реакция бласттрансформации, ФГА — фитогемагглютинин.

вантного действия гликопептидов проведен ряд иммунологических тестов *in vitro* и сделана попытка установить их корреляцию с тестами *in vivo*.



		R ¹	R ²	R ³
(I)	MDP	NH ₂	OH	H
(II)	GMDP	NH ₂	OH	GlcNAcβ1
(III)	MDP-OBu	OC ₄ H ₉	NH ₂	H
(IV)	GMDP-OBu	OC ₄ H ₉	NH ₂	GlcNAcβ1
(V)	GMDP-Lys	NH ₂	-Lys	GlcNAcβ1
(VI)	GMDP-OH	OH	OH	GlcNAcβ1
(VII)	(GMDP-OH) ₂	OH	OH	GlcNAcβ1
(VIII)	(GMDP-Lys) ₂	NH ₂	-Lys	GlcNAcβ1
(IX)	GMDP(LL)*	NH ₂	OH	GlcNAcβ1

* Аналог GMDP с LAla и LGlu-NH₂.

Способность анализируемых соединений повышать гуморальный ответ к белковому антигену определялась по величине титра мышинных антител к овальбумину. Через 2 нед после введения мышам антигена совместно с гликопептидом в сыворотках не было обнаружено повышения уровня IgG-антител к овальбумину. Адьювантный эффект наблюдался после повторного введения антигена на 28-е сут, причем оказалось достаточно однократного введения гликопептида совместно с антигеном при первой иммунизации.

Полученные данные (табл. 1) позволяют сделать определенные выводы о зависимости между строением гликопептидов и их биологическим действием *in vivo*. Так, увеличение сахарной части молекулы гликопептида на N-ацетилглюкозаминильное звено приводит к уменьшению пирогенных свойств и увеличению адьювантных (ср. соединения (I) и (II), (III) и (IV)). GMDP проявляет адьювантный эффект в меньших дозах, чем MDP (I). Удлинение пептидной части молекулы GMDP на остаток лизина усиливает и пирогенные, и адьювантные свойства. Замена амидной группы в положении R¹ на гидроксил или C₄H₉O-группу приводит к исчезновению пирогенного эффекта и сохранению адьювантных свойств (ср. соединения (I) и (III), (II) и (IV), (VI)). Кроме того, обнаружено, что для апиогенного соединения (VI) индексы стимуляции при всех исследованных концентрациях больше, чем для GMDP, что указывает на отсутствие прямой связи между пирогенными и адьювантными свойствами пептидов. Для биологического действия необходимо сохранение D-конфигурации изоглутамина.

Адьювантное действие гликопептидов in vivo и in vitro

Соединение	Доза, мг/кг	Индекс стимуляции гуморального ответа на овальбумин	Пирогенность		Доза, мкг/мл	Влияние на РЕТ спленоцитов *			Влияние на продукцию IL-1 макрофагами **
			доза, мг/кг	эффект		без митогена	в присутствии		
						ЛПС (5 мкг/мл)	Соп А (2 мкг/мл)		
I. MDP	5·10 ⁻⁶	0,7			0,5	9,3	12,0	3,3 #	
	5·10 ⁻⁶	0,6			5,0	12,6	13,5	6,2 #	
	5·10 ⁻⁴	0,5			50	19,6 #	15,0	4,7 #	
	5·10 ⁻⁸	0,7 #	+						
	5·10 ⁻²	2,8 #	+	1·10 ⁻²					
	5·10 ⁻¹	3,0 #	+	1·10 ⁻¹					
	5,0	2,8 #	+	2·10 ⁻¹					
	50	2,5 #							
	500	2,5 #							
	II. GMDP	5·10 ⁻⁷	1,27			0,5	16,1 #	16,2	3,2 #
5·10 ⁻⁶		1,46			5,0	18,2 #	14,7	3,1 #	
5·10 ⁻⁵		1,12			50	26,4 #	9,5	2,3 #	
5·10 ⁻⁴		2,20 #							
5·10 ⁻³		1,38	-	2·10 ⁻²					
5·10 ⁻²		0,80	+	1·10 ⁻¹					
5·10 ⁻¹		0,90							
5,0		5,1 # #							
50		1,9							
500		2,4 #							
III. MDP-OBu	5·10 ⁻²	1,4			0,5	9,9	11,5	2,2 #	
	5·10 ⁻¹	3,2 #			5,0	10,2	15,6	3,1 #	
	5,0	3,5 # #		5,0	50	12,8	16,6	7,0 #	
	5·10 ⁻²	4,0 # #			0,5	9,2	13,4	2,8 #	
	5·10 ⁻¹	3,2 # #			5,0	9,4	18,3 #	1,0	
IV. GMDP-OBu	5,0	5,0 # #		5,0	50	13,8 #	16,6	1,4	
	5·10 ⁻²	6,3 # #			0,5	10,9	15,6	5,0 #	
	5·10 ⁻¹	2,3 #	+	1·10 ⁻²	5,0	8,4	15,7	11,3 #	
	5,0	4,8 # #		5,0	50	14,7 #	15,1	3,4	
V. GMDP-Lys	5·10 ⁻²	6,3 # #			0,5	10,9	15,6	5,0 #	
	5·10 ⁻¹	2,3 #	+	5,0	50	8,4	15,7	11,3 #	
	5,0	4,8 # #		5,0	50	14,7 #	15,1	3,4	

Таблица 1 (продолжение)

Соединение	Доза, мг/кг	Индекс стимуляции гуморально-го ответа на овальбумин	Пирогенность		Доза, мкг/мл	Влияние на РБТ спленодитов*			Влияние на продукцию ИЛ-1 макрофагами**		
			доза, мг/кг	эффект		в присутствии					
						ЛПС (5 мкг/мл)	Соп А (2 мкг/мл)				
VI. GMDP-OH	5·10 ⁻⁴	1,3 #	—	—	0,5	2,5	8,2	6,8	3,7 #		
	5·10 ⁻²	2,0 #			5,0	1,7	10,4	6,0	3,7 #		
	5·10 ⁻¹	3,5 ##			5,0	2,9	17,0 #	12,0	1,4		
	5,0	8,0 ##				1,3	18,3 #	19,0 #	4,8 #		
VII. (GMDP-OH) ₂	5·10 ⁻⁴	2,8 #	+	+	0,5	1,2	26,4 #	18,4 #	1,3		
	5·10 ⁻³	1,7			5,0	1,3	20,7 #	19,0 #	1,1		
	5·10 ⁻²	2,1			4,0	1,3	0,9	0,8	11,0	11,8	1,7
	5·10 ⁻¹	2,3 #									
	5,0	4,0 ##			5,0	2,2	1,1	1,1	11,6	14,7	1,1
	10,0	5,3 ##									
VIII. (GMDP-Lys) ₂	5·10 ⁻⁴	0,9	—	—	0,5	0,9	11,0	11,8	1,7		
	5·10 ⁻³	4,3 #			5,0	0,8	15,3 #	13,1	5,3 #		
	5·10 ⁻²	2,0 #			2·10 ⁻²	1,0	1,0	17,1 #	15,45	3,0 #	
	5,0	10,5 ##									5,0
10,0	11,3 ##	5,0	1,1	11	14,2	14,2	0,5				
IX. GMDP(LL)	5·10 ⁻²	0,9	—	—	0,5	1,3	11,6	14,7	1,1		
	5·10 ⁻¹	1,0			5,0	1,5	13,2	14,5	1,1		
	5,0	1,1			5,0	1,1	12,9	15,1	0,7		
X. GlcNAc(4-MurNAc	—	—	—	—	0,5	1,1	11	14,2	0,5		
					5,0	0,9	10,9	14,2	0,9		
					5,0	2,2	12,2	14,3	0,6		

* Данные представлены в индексах пролиферации. ИЛ-ЛПС = 10, ИЛ-Соп А = 15,0.

** Влияние выражено в индексе пролиферации тимоцитов в присутствии 2,5 мкг/мл ФГА. ИЛ-ФГА = 1,5

$p < 0,05$.## $p < 0,01$.

Содержание IgG разных подклассов в антисыворотках к овалбумину, полученных с использованием GMDP в качестве адьюванта

Доза GMDP, мг/кг	IgG ₁		IgG _{2a}		IgG _{2b}		IgG ₃	
	титр, Ig	индекс стимуляции	титр, Ig	индекс стимуляции	титр, Ig	индекс стимуляции	титр, Ig	индекс стимуляции
—	4,00±0,10	—	2,05±0,13	—	1,40±0,10	—	2,30±0,15	—
5,0	4,40±0,45	2,5*	2,75±0,10	5,0*	1,80±0,12	2,5*	2,90±0,13	4,0*
5·10 ⁻⁴	4,25±0,10	1,8*	2,45±0,16	2,5*	1,8±0,15	2,5*	2,65±0,15	2,2*
5·10 ⁻⁶	4,15±0,23	1,4	2,35±0,10	2,0*	1,55±0,10	1,4	2,55±0,12	1,8*

* $p < 0,03$.

Замена на $L\text{-Glu-NH}_2$ полностью исключила и адьювантный, и пирогенный эффекты молекулы (соединение (IX)).

Интересными адьювантными свойствами обладают «димеры» соединений (V) и (VI). Индексы стимуляции гуморального ответа соединения (VII) по величине не превышают индексы, соответствующие «мономеру» в интервале доз $(5,0-5) \cdot 10^{-2}$ мг/кг. Однако соединение (VII) в отличие от (VI) значительно стимулирует гуморальный ответ в малых дозах. В случае соединения (VIII) наблюдается очень высокая адьювантная активность, причем пирогенные свойства его такие же, как у GMDP. В целом значительная стимуляция гуморального ответа отмечается для соединений (II), (IV), (V)–(VIII).

Обращает на себя внимание сложный характер зависимости индекса стимуляции гуморального ответа от дозы, который отчетливо прослеживается на примере соединений (II), (VII) и (VIII). Поскольку у этих соединений адьювантное действие сохраняется при очень малых дозах, при которых уже исключен пирогенный эффект, становится возможным их использование в фармакологии.

Представляет интерес выяснить распределение подклассов IgG, образующихся при использовании в качестве адьюванта GMDP. Для тестирования были выбраны антисыворотки к овалбумину, полученные с применением различных доз GMDP: 5,0, $5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-6}$ мг/кг. Оказалось, GMDP стимулирует синтез всех подклассов IgG, но в различной степени (табл. 2). Наибольший титр имеет подкласс IgG₁, наименьший — IgG_{2b}. GMDP в дозе 5 мг/кг более всего увеличивает содержание IgG_{2a} и IgG₃ (индексы стимуляции 5,0 и 4,0 соответственно) и в равной степени IgG₁ и IgG_{2b} (индекс стимуляции 2,5). GMDP в дозе $5 \cdot 10^{-4}$ мг/кг приводит к преимущественному росту продукции IgG_{2b} и IgG_{2a} (индекс стимуляции 2,5); доза $5 \cdot 10^{-6}$ мг/кг для этих подклассов Ig по своему действию аналогична дозе 5 мг/кг, хотя вызываемая ею стимуляция гуморального ответа значительно меньше.

Таким образом, используя разные дозы GMDP, можно определенным образом влиять на синтез IgG различных подклассов. В настоящее время появляются данные по характеристике биологического действия различных подклассов иммуноглобулинов. Так, например, полагают, что моноклональные антитела подкласса IgG_{2a} обладают наилучшими протективными свойствами против инфекций и опухолей [9]. В связи с этим противовоспалительный и антибактериальный эффекты GMDP можно частично объяснить стимуляцией IgG_{2a}-антител.

Механизм адьювантного действия гликопептидов неизвестен, поэтому представляет интерес исследование их влияния на различные иммунокомпетентные клетки *in vitro*. Такой подход может помочь выявить клетки-мишени и процессы, ответственные за адьювантный эффект. Известно, что MDP стимулирует ряд функций макрофагов, и в частности продукцию IL-1 [10, 11] который является важным медиатором стимулирующих эффектов адьювантов и сам обладает адьювантным свойством [12]. Было также показано, что MDP оказывает прямое действие на активированные В-клетки

Реакция бласттрансформации спленоцитов в присутствии GMDP и ЛПС (50 мкг/мл*)

Доза GMDP, мкг/мл	Включение [³ H]тимидина **, имп/мин	K, %
—	10 027 ± 195 А	
50	1 314 ± 117 Б	
	13 987 ± 284 В	114
100	1 722 ± 24 Б	
	13 440 ± 298 В	123
500	1 132 ± 81 Б	
	16 045 ± 1130 В	144

* Оптимальная доза ЛПС для клеток селезенки.

** Приведены данные, полученные в присутствии ЛПС (А), GMDP(Б) и при их совместном присутствии (В). $K = \frac{B}{A+B} \cdot 100$.

[13], ответственные за гуморальный иммунный ответ. В связи с вышеизложенным в настоящей работе была изучена способность GMDP и его аналогов влиять на продукцию IL-1 перитонеальными макрофагами и стимулировать пролиферацию спленоцитов в присутствии В-клеточного митогена липополисахарида (ЛПС), а также Т-клеточного митогена конканавалина А (Con A). Из данных табл. 1 следует, что все изученные соединения обладают низким индексом стимуляции реакции бласттрансформации (РБТ) спленоцитов, т. е. являются слабыми митогенами. Спленоциты, стимулированные гликопептидами, в присутствии ЛПС показывают значительное увеличение индекса стимуляции РБТ. Наибольшие эффекты отмечаются для соединений (VI), (I), (II), (VII), (VIII). Важно подчеркнуть, что большинство из этих соединений обладает также наибольшим адьювантным эффектом *in vivo*.

С целью выяснения природы комитогенного эффекта гликопептидов с ЛПС на примере GMDP была проведена РБТ спленоцитов с оптимальной дозой ЛПС по методике, описанной в работе [14]. Полученные данные представлены в табл. 3. В РБТ спленоцитов оптимальная доза ЛПС (50 мкг/мл) обеспечивает максимальное включение [³H]тимидина культурой клеток, и превышение этой дозы приводит уже к уменьшению включения меченого тимидина. Если добавление GMDP к оптимальной дозе ЛПС вызовет такой же эффект, это будет означать, что в системе происходит конкурентное влияние GMDP и ЛПС на одни и те же центры клеточной поверхности и, как следствие этого, ингибирование действия ЛПС. В таком случае величина K в табл. 3 должна быть меньше 100%. Как видно из полученных данных, значение K для исследованных доз GMDP больше 100%, т. е. можно предположить синергизм в действии ЛПС и гликопептида на клетки селезенки.

Поскольку ЛПС считается В-клеточным митогеном, можно полагать, что, как и в случае MDP, для GMDP В-клетки являются клетками-мишенями. Не удивительно, что РБТ в присутствии ЛПС под воздействием гликопептидов заметно стимулируется, поскольку, как уже упоминалось, MDP может стимулировать только активированные В-клетки [13], и в нашем случае ЛПС можно рассматривать в качестве активатора В-клеток.

В табл. 1 приведены также результаты по комитогенному эффекту гликопептидов и Con A на клетки селезенки. Известно, что Con A является Т-клеточным митогеном, поэтому представляло интерес оценить влияние гликопептидов на Т-клеточные субпопуляции. Как видно из полученных данных, среди изученных соединений комитогенным действием с Con A обладали только соединения (VII и (IV).

Такая дифференциация в действии аналогов GMDP на различные клетки иммунной системы может быть использована при выборе иммуномодуляторов, действующих достаточно избирательно на гуморальный ответ или на клеточно опосредованные иммунные реакции.

Необходимо отметить, что соединения (IX) и (X), не обладающие адьювантным эффектом *in vivo*, не имеют также и костимулирующей активности в РБТ *in vitro*.

Влияние гликопептидов на продукцию IL-1 перитонеальными макрофагами оценивалось по индексу стимуляции РБТ тимочитов в присутствии фитогемагглютинаина (ФГА) [15]. По данным табл. 1, наибольшие эффекты обнаружены для соединений (V), (III), (I), (VIII) и (VII), причем соединение (VIII) имеет также самый высокий индекс стимуляции гуморального ответа *in vivo*. Однако количественной корреляции между продукцией IL-1 макрофагами *in vitro* и адьювантным эффектом *in vivo* для изученных соединений не наблюдается. Пирогенный эффект, обнаруженный для некоторых гликопептидов, также невозможно связать с продукцией IL-1. Так, соединения (IV) и (VI) апиrogenны, но оказывают заметное стимулирующее действие на продукцию IL-1.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать заключение, что GMDP стимулирует синтез иммуноглобулинов в основном IgG_{2a}- и IgG₃-подклассов, однако открывается возможность влиять на синтез других IgG-подклассов путем использования более низких концентраций адьюванта.

Установлено также отсутствие связи адьювантного действия гликопептидов на гуморальный ответ с пирогенным эффектом. Обнаруживается определенная корреляция между величинами комитогенного эффекта гликопептидов с ЛПС на клетки селезенки *in vitro* и стимуляцией гуморального ответа *in vivo*, но комитогенный эффект, по-видимому, нельзя считать основным вкладом в адьювантную активность изученных соединений. Наконец, стимуляция гликопептидами продукции IL-1 макрофагами *in vitro* характерна только для соединений, обладающих адьювантным действием *in vivo*, однако не установлена количественная зависимость между этими тестами.

Экспериментальная часть

n-Бутиловый эфир *N*-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-*N*-ацетилмурамоил-аланил-*D*-глутамина (GMDP—OBu). 1,0 г (2,46 ммоль) Z Ala-*D*-Gln-OBu [16] растворяли в 20 мл метанола и гидрировали 2 ч с Pd-чернью. Катализатор отфильтровывали, метанол упаривали. Остаток растворяли в 10 мл *N,N*-диметилформамида и добавляли 1,79 г (2,7 ммоль) пентафторфенилового эфира *N*-ацетилглюкозаминил-(β 1-4)-*N*-ацетилмурамовой кислоты [17]. Через 6 ч растворитель упаривали, остаток наносили на колонку с силикагелем 60 (0,040—0,063 мм, Merck) и хроматографировали в системе хлороформ — метанол — вода, 6 : 4 : 1. Фракцию, содержащую продукт (ТСХ), упаривали, растворяли в воде и лиофилизировали. Выход 1,22 г (1,62 ммоль, 66%).

Синтез и очистку остальных гликопептидов проводили по методикам, описанным в работах [4, 18, 19].

Адьювантный эффект гликопептидов оценивали по величине гуморального ответа на овальбумин (Sigma). Мышей (самок) весом 15—20 г линии Balb/c, по 5 животных в каждой группе, иммунизировали внутрибрюшинно, вводя по 25 мкг овальбумина в 0,2 мл физиологического раствора одновременно с различными дозами гликопептида. Повторную иммунизацию на 28-е сут проводили внутрибрюшинно половинной дозой антигена. Антисыворотку получали через 7 сут после последней иммунизации и тестировали методом иммуноферментного анализа (ELISA).

Имуноферментный анализ осуществляли в 96-луночных планшетах с плоским дном (Nunc). В лунки добавляли по 100 мкл раствора антигена (5 мкг/мл) в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4 (буфер А), инкубировали при 4° С в течение ночи. После промывки планшетов буфером А их выдерживали 1 ч при 37° С с раствором BSA (1 мг/мл; Sigma) в буфере А. После промывки на планшеты наносили антисыворотку в соответствующих разведениях и инкубировали при 4° С в течение ночи. После промывки вносили в каждую лунку по 100 мкл раствора конъюгата антимышиных

IgG антител и пероксидазы хрена (Rio-Rao) в разведении 1 : 3000 в буфере А с 0,05% твина 20 и инкубировали 1,5 ч при 37° С. После промывки в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора *o*-фенилендиамина (1 мг/мл) в 1% лимонной кислоте, рН 4,4, и H₂O₂ до концентрации 0,01%. Планшеты выдерживали 10 мин при 37° С и реакцию останавливали 2 н. H₂SO₄. Оптическое поглощение измеряли при 492 нм на приборе Multiskan MCC. Титр антисыворотки определяли при A₄₉₂ = 1,0 и индекс стимуляции вычисляли по отношению титра антисыворотки, полученной с использованием различных доз пептидов, к титру антисыворотки, полученной без применения адъюванта.

При определении титра подклассов IgG после инкубации планшетов с антисывороткой к овальбумину наносили раствор кроличьих антител к мышинным антителам подклассов IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ (DRG) в разведении 1 : 2000 и инкубировали 1,5 ч при 37° С. Далее после промывки буфером А наносили конъюгат пероксидазы хрена с антикроличьими антителами (Bio-Rad) в разведении 1 : 3000 и инкубировали 1,5 ч при 37° С. Реакцию с субстратом проводили как описано выше. Титр антисыворотки оценивали при оптическом поглощении 0,3.

Пирогенность изучаемых пептидов исследовали по методу, описанному в «Фармакопее СССР» (1968), на кроликах породы шиншилла весом 2,0—2,5 кг.

Для проведения реакции бласттрансформации спленоцитов селезенки от 6—7 мышей линии Balb/c, полученные в стерильных условиях, гомогенизировали, клетки центрифугировали 3 раза и отмывали в среде RPMI 1640 (Flow Lab). В каждую лунку 96-луночного планшета (Nunc) добавляли по 0,2 млн. спленоцитов в полной среде RPMI 1640, гликопептиды в соответствующих концентрациях и, при необходимости, митогены (ЛПС или Con A). Общий объем содержимого в лунке доводили до 200 мкл. Планшеты выдерживали 48 ч при 37° С в атмосфере 5% CO₂. Тестирование проводили для концентраций пептидов 0,5; 5,0; 50 и 500 мкг/мл; конечная концентрация для ЛПС *E. coli* (Difco) составляла 5 мкг/мл и для Con A (Sigma) — 2 мкг/мл. Затем в каждую лунку добавляли по 1 мкКи [³H]тимидина (Amersham) и инкубировали 18 ч при 37° С в атмосфере 5% CO₂. С помощью харвестера (Flow Lab.) содержимое лунок переносили на фильтр, осаждали ДНК 5% трихлоруксусной кислотой и смывали несвязавшуюся радиоактивную метку этанолом. Фильтры высушивали, помещали во флаконы с толуоловым сцинтиллятором и производили подсчет импульсов в счетчике жидкостной сцинтилляции. Результаты опытов оценивали по индексу пролиферации (ИП):

$$\text{ИП} = \frac{\text{Включение } [^3\text{H}] \text{ тимидина в присутствии митогена и/или иммуномодулятора}}{\text{Включение } [^3\text{H}] \text{ тимидина нестимулированной культурой}}$$

Для определения секретируемого IL-1 перитонеальные макрофаги были взяты от нормальных взрослых мышей Balb/c, отмывы в среде RPMI 1640. Макрофаги в концентрации 5 · 10⁵ мкг/мл были суспендированы в среде RPMI 1640, содержащей 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки и 5 мМ 2-меркаптоэтанол. Суспензию в объеме 200 мкл вносили в каждую лунку 96-луночного планшета и инкубировали 2 ч при 37° С в атмосфере 5% CO₂, после чего неадсорбированные клетки отмывали. Сорбированные клетки инкубировали 48 ч с гликопептидами в концентрациях 0,5, 5,0, 50 мкг/мл. Далее супернатант в разведении 1 : 4 добавляли в среду, содержащую 1 · 10⁶ тимоцитов с 2,5 мкг/мл ФГА. Тимоциты были получены от мышей Balb/c. После 48 ч культивирования при 37° С в атмосфере 5% CO₂ в каждую лунку вносили по 1 мкКи [³H]тимидина, через 18 ч пробы смывали на фильтры с помощью харвестера и производили подсчет импульсов в счетчике жидкостной сцинтилляции. Индексы пролиферации определяли как показано для РБТ спленоцитов.

Статистическая обработка результатов. Данные табл. 2 и 3 представлены в виде средних величин и их стандартных ошибок. Сравнение средних величин и определение уровня значимости индексов стимуляции пролиферации проводилось по *t*-тесту Стьюдента. Использовались результаты не менее трех экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ellouz F., Adam A., Ciobaru R., Lederer E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 59. № 4. P. 1317—1325.
2. Adam A., Petit J.-F., Lefrancier P., Lederer E. // Mol. and Cell. Biochem. 1981. V. 41. № 1. P. 27—47.
3. Adam A., Lederer E. // Med. Res. Rev. 1984. V. 4. № 2. P. 111—152.
4. Андропова Т. М., Ростовцева Л. И., Добрушкина Е. П., Гаврилов Ю. Д., Дешко Т. Н., Иванов В. Т. // Биооргани. химия. 1980. Т. 6. № 12. С. 1830—1841.
5. Durette P. L., Meitzner E. P., Shen T. Y. // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. C1—C4.
6. Kusumoto S., Yamamoto K., Shiba T. // Tetrahedron Lett. 1978. V. 77. № 3. P. 4407—4410.
7. Ростовцева Л. И., Андропова Т. М., Малькова В. П., Сорокина И. Б., Иванов В. Т. // Биооргани. химия. 1981. Т. 7. № 12. С. 1843—1857.
8. Иванов В. Т. // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30. Вып. 3. С. 1—114.
9. Allison A. C., Byars N. E., J. // Immunol. Meth. 1986. V. 95. № 2. P. 157—168.
10. Juy D., Chedid L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 72. № 10. P. 4105—4109.
11. Oppenheim J. J., Togawa A., Chedid L., Mizel S. // Cell. Immunol. 1980. V. 50. № 1. P. 71.
12. Staruch M. J., Wood D. D. // J. Immunol. 1983. V. 130. № 5. P. 2191—2194.
13. Souvannovong V., Brown S., Adam A. // Mol. Immunol. 1988. V. 25. № 4. P. 385—391.
14. Dziarski R. // Cell. Immunol. 1988. V. 111. № 1. P. 10—27.
15. Bahr G. M., Chedid L. A., Behbehani K. // Cell. Immunol. 1987. V. 107. № 2. P. 443—454.
16. Lefrancier P., Derrien M., Jamet X., Choay J. // J. Med. Chem. 1982. V. 25. № 1. P. 87—90.
17. Андропова Т. М., Титов В. М., Макаров Е. А., Месчерякова Е. А., Иванов В. Т., Подгорнова Н. Н., Бириченко А. С. // Proc. 2nd Forum Peptides. London — Paris, 1988. P. 561.
18. Jezek J., Makarov E. A., Balashova T. A., Budesinsky M., Andronova T. M., Ivanov V. T. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. № 5. P. 1326—1335.
19. Кайдалов А. А., Уткин Ю. Н., Андропова Т. М., Цетлин В. И., Иванов В. Т. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 11. С. 1523—1529.

Поступила в редакцию
16.I.1991

E. A. MESCHERYAKOVA, S. V. GURYANOVA, E. A. MAKAROV, T. M. ANDRONOVA,
V. T. IVANOV

STRUCTURE-FUNCTION INVESTIGATION OF GLUCOSAMINYLMURAMYLPEPTIDES.
INFLUENCE OF CHEMICAL MODIFICATION OF THE
N-ACETYLGUCOSAMINYL-N-ACETYLMURAMYL DIPEPTIDE (GMDP)
ON ITS IMMUNOMODULATORY PROPERTIES IN VIVO AND IN VITRO

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow

The structure-function relationships in a series of synthetic glucosaminylmuramyl peptides — glycopeptide adjuvants of the bacterial origin — have been investigated. Modification of the N-acetylglucosaminy-(β1—4)-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (GMDP) molecule affects its adjuvant and pyrogenic activity in vivo. GMDP is shown to readily stimulate the synthesis of the IgG_{2a} and IgG₃ of the immunoglobulin subclasses upon the secondary immune response to the protein antigen. The adjuvant effect correlates with the comitogenic test of the reaction of splenocytes blast-transformation in the presence of B-cell mitogen. No direct dependence has been revealed between the level of the glycopeptides adjuvant action and their effect on the IL-1 production by macrophages.