

**ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОТВЕТ НА
СТИМУЛЯЦИЮ АДГЕЗИРУЮЩИХСЯ КЛЕТОК ДОНОРСКОЙ
КРОВИ РАСТВОРИМЫМ ЛПС И ФАГОЦИТИРУЕМЫМИ
БАКТЕРИЯМИ**

Лысакова Е. В. ¹,

Рыбцов С. А. ¹,

Тощакон В. Ю. ¹

¹ АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия.

**PROINFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION BY ADHERENT
DONOR BLOOD CELLS STIMULATED BY SOLUBLE LPS AND
PHAGOCYTED BACTERIA**

Lysakova E. V. ^a,

Rybtsov S. A. ^a,

Toshchakov V. Y. ^a,

^a Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation.

Резюме

Моделирование воспалительных процессов посредством специфической стимуляции рецепторов системы врожденного иммунитета широко используется как в исследованиях фундаментальных механизмов воспаления, так и при разработке противовоспалительных препаратов. Рецепторы врожденного иммунитета разделяют на две группы. Первую группу образуют рецепторы, располагающиеся на плазматической мембране клетки и на мембранах эндосом. К таким рецепторам, относят Толл-подобные рецепторы (TLRs, Toll-like receptors) и лектиновые рецепторы С-типа. Вторую группу представляют цитоплазматические рецепторы, играющие особую роль при распознавании присутствия патогенов (или их продуктов) внутри цитоплазмы клеток. К цитоплазматическим рецепторам относят NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors, NLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors, RLRs), цитозольный ДНК сенсор cGAS, а также рецептор Aim2 (absent in melanoma 2). Наиболее часто используемым способом индукции воспалительных процессов в различных экспериментальных моделях является стимуляция иммунного ответа путем введения очищенных бактериальных липополисахаридов (ЛПС), или других микробных молекул. В настоящей работе сравнивался ответ лейкоцитов периферической крови доноров на стимуляцию растворимым высокоочищенным ЛПС Грам-отрицательных бактерий с ответом, индуцированным фиксированными бактериями *E. coli*. Исследования показали, что ЛПС и бактерии индуцируют сходные уровни продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF и IL-6, в то время как ни ЛПС, ни цельные бактерии не вызывали измеримой продукции IFN- γ адгезированными лейкоцитами. Продукция цитокинов в ответ на ЛПС и бактерии резко различалась в чувствительности к TLR ингибитору широкого спектра действия, пептиду 5R667. ЛПС-стимулированная продукция цитокинов, как и ожидалось, была высокочувствительна к ингибированию пептидом, тогда как продукция, стимулированная корпускулярными бактериями, не ингибировалась. Анализ

фагоцитарной активности клеток крови с помощью метода проточной цитометрии показал, что TLR-блокирующий пептид не влиял на способность лейкоцитов крови фагоцитировать *E. coli*. Поскольку известно, что пептид 5R667 блокирует ряд TLRs, активируемых при бактериальных инфекциях, включая TLR4, TLR5 и TLR9, полученные данные, а также анализ литературы указывают на существенный вклад цитоплазматических рецепторов системы врождённого иммунитета (в частности рецепторов NOD1 и NOD2) в индукцию продукции провоспалительных цитокинов фагоцитами при бактериальных инфекциях. Полученные результаты указывают на существенные различия механизмов индукции цитокинов при стимуляции растворимым ЛПС и корпускулярными бактериями, а также позволяют предложить способ моделирования воспалительных процессов с использованием цельных фиксированных бактерий в качестве дополнения к моделям, использующим растворимые бактериальные продукты, для более полного отражения механизмов иммунного ответа на бактериальные инфекции.

Ключевые слова: фагоцитоз, бактерии, ЛПС, детекция патогенов, продукция цитокинов, ингибиторы Толл-подобных рецепторов.

Abstract

Specific stimulation of receptors of the innate immune system by their purified ligands is commonly used in basic studies of inflammation and in the development of anti-inflammatory drugs. Based on location, receptors of the innate immunity can be classified into two groups: i) cell plasma membrane and on membranes of endosomes (Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors), and recognizing the presence of pathogens in the extracellular space; ii) cytoplasmic sensors playing a special role in the recognition of intracellular pathogens (NOD-like receptors (NLRs), RIG-I-like receptors (RLRs), bacterial DNA sensor cGAS, and Aim2 (absent in melanoma 2)). Many experimental models of inflammation use bacterial lipopolysaccharides (LPSs) or other purified microbial molecules to simulate the innate immune response to microbes. In the present study, the response of human blood leukocytes to stimulation with soluble, highly purified LPS from Gram-negative bacteria was compared with that induced by formalin-fixed, corpuscular *E. coli*. The data obtained demonstrate that LPS and bacteria induce similar levels of TNF and IL-6 by plastic-adherent leukocytes, whereas neither LPS nor whole bacteria induce a measurable IFN γ production. The LPS- and bacteria-induced cytokine production, however, drastically differed in the sensitivity to a broad-spectrum TLR inhibitor, peptide 5R667. The LPS-stimulated human leukocyte cytokine production, as expected, was highly sensitive to inhibition by the peptide, whereas production stimulated by corpuscular bacteria was not. The TLR-blocking peptide did not affect the ability of blood leukocytes to phagocytose *E. coli* as shown by flow cytometry data obtained using FITC-stained fixed bacteria. Because peptide 5R667 blocks several TLRs, including TLR4, TLR5, and TLR9, the differential sensitivity of LPS- and bacteria-induced cytokine production to 5R667 suggests that the intracellular pathogen sensors, most likely NOD1 and/or NOD2, essentially contribute to the bacteria-induced cytokine induction. These results show that LPS and phagocytosed bacteria induce cytokine production via different mechanisms and also suggest that the models with corpuscular bacteria for simulating bacterially induced inflammation complement the models that using

soluble TLR ligands; therefore, both models should be applied to properly reflect anti-bacterial immune response.

Keywords: phagocytosis, bacteria, LPS, pathogen sensing, cytokine production, TLR inhibitors.

1 **1 Введение**

2 Система врожденного иммунитета распознаёт присутствие патогенных
 3 микроорганизмов посредством широкого набора рецепторов, каждый из
 4 которых активируется определённым классом микробных молекул [1].
 5 Структурные мотивы, характерные для микробных молекул, распознаваемых
 6 рецепторами врождённого иммунитета, называют патоген-ассоциированными
 7 молекулярными структурами (ПАМС) (от английского термина “pathogen-
 8 associated molecular patterns”). Рецепторы врождённого иммунитета разделяют
 9 на две группы на основании своей локализации. Рецепторы, располагающиеся
 10 на плазматической мембране клетки, а также на мембранах эндосом, образуют
 11 первую группу. Эта группа включает в себя семейства Толл-подобных
 12 рецепторов (TLR) и лектиновых рецепторов С-типа. Рецепторы этих семейств
 13 активируются ПАМС, располагающимися во внеклеточном пространстве, а
 14 также эндосомально располагающимися нуклеиновыми кислотами
 15 бактериального или вирусного происхождения [2]. Вторая группа микробных
 16 сенсоров образована цитоплазматическими рецепторами различных белковых
 17 семейств и включает в себя NOD-подобные рецепторы, (NLRs), RIG-I-
 18 подобные рецепторы (RLRs), цитозольный ДНК сенсор cGAS, а также
 19 рецептор Aim2 (absent in melanoma 2) [3]. Основная функция рецепторов
 20 цитоплазматической группы заключается в обнаружении ПАМС в цитозоле
 21 клеток. RLRs активируются вирусными нуклеиновыми кислотами, Aim2
 22 активируется бактериальной и вирусной ДНК [3]. Эффекторный механизмы,
 23 запускаемые цитоплазматическими рецепторами, разнообразны и включают в
 24 себя активацию противовирусного иммунитета посредством активации
 25 продукции интерферонов, протеолитическое созревание интерлейкинов IL-1 и
 26 IL-18 в их зрелые, секретируемые формы, индукцию различных форм
 27 программируемой клеточной смерти посредством активации каспаз, а также
 28 другие, более специализированные функции [2,4]. Некоторые NLRs,
 29 например NOD1 и NOD2, выполняют функции аналогичные функциям TLRs,
 30 так как эти рецепторы активируют транскрипционные факторы семейства NF-

31 □В и митоген-активируемые протеин киназы (МАПК), тем самым индуцируя
 32 продукцию цитокинов клеткой-хозяином [4]. NOD1 и NOD2 распознают
 33 молекулярные мотивы пептидогликанов клеточной стенки как Грам-
 34 положительных, так и Грам-отрицательных бактерий, играя важную роль в
 35 формировании иммунного ответа на оба эти класса бактериальных патогенов
 36 [4]. Пептидогликаны не являются единственным классом ПАМС, способных
 37 активировать NOD1 и NOD2, эти рецепторы также могут активироваться
 38 бактериальными эффекторами белковой природы, а также эндогенными
 39 молекулами [5]. NOD1 и NOD2 присутствуют в клетках различных типов [6],
 40 в частности, NOD2 особенно обильно экспрессируется моноцитами
 41 периферической крови [7].

42 Цитоплазматические рецепторы врождённой иммунной системы играют
 43 важную роль в распознавании патогенов, репликационный цикл которых
 44 протекает в цитоплазме эукариотических клеток, таких как вирусы, или
 45 бактерии, способные высвободиться из фагосом и реплицироваться в
 46 цитоплазме [3]. Кроме того, цитоплазматические сенсоры патогенов важны и
 47 для распознавания бактерий не способных к выходу из фагосом, но в
 48 значительной мере элиминирующихся посредством фагоцитоза [4,8].
 49 Механизмы, посредством которых ПАМС фагоцитируемых бактерий
 50 попадают из фагосом в цитоплазму, остаются предметом изучения, в
 51 литературе рассматривается как простая трансмембранная утечка ПАМС из
 52 фагосом, так и участие бактериальных транспортных систем в таком переносе
 53 [4]. В настоящее время распространено представление о кооперативности
 54 участия мембранных и цитоплазматических рецепторов в формировании
 55 иммунного ответа на фагоцитируемые бактерии [8], а также растёт понимание
 56 различий в последствиях активации клеток иммунной системы растворимыми
 57 ПАМС и корпускулярными, фагоцитируемыми бактериями [9].

58 Передача сигнала активированными Толл-подобными рецепторами
 59 происходит за счёт белок-белковых взаимодействий, осуществляемых TIR
 60 доменами, присутствующими как во всех TLRs, так и в адаптерных белках,

61 рекрутируемых к TLRs при активации [2,10]. Блокировка взаимодействий TIR
 62 доменов пептидами, происходящими из сайтов, осуществляющих сигнал-
 63 зависимые белковые взаимодействия является эффективной стратегией
 64 разработки ингибиторов TLR [11,12]. Пептид, соответствующий третьему
 65 спиральному участку TIR домена TLR5 и синтезированный вместе с
 66 пептидным вектором, обеспечивающим проникновение всей конструкции в
 67 клетку (пептид 5R667), является мультиспецифичным ингибитором TLR
 68 способным ингибировать TLR5, TLR4, TLR2, и TLR9, но не TLR7 или TLR8
 69 [13].

70 В настоящем исследовании было изучено влияние пептида 5R667 на
 71 фагоцитарную способность гранулоцитов и моноцитов периферической крови
 72 доноров. Сравнивали лейкоцитарную продукцию цитокинов,
 73 индуцированную высокоочищенным ЛПС, с таковой, индуцированной
 74 фагоцитируемыми, фиксированными Грам-отрицательными бактериями, а
 75 также эффекты TLR-блокирующего пептида на продукцию цитокинов при
 76 стимуляции как ЛПС, так и фагоцитируемыми бактериями. Полученные
 77 результаты указывают на существенные различия в механизмах реакции
 78 лейкоцитов на ЛПС и на фагоцитируемые бактерии, что выявляет неполноту
 79 моделирования ответа иммунной системы на бактериальные инфекции
 80 исключительно высокоочищенными TLR агонистами.

81 2 Материалы и методы

82 Получение проб донорской крови

83 Забор образцов периферической крови производился с помощью
 84 системы для вакуумного взятия венозной крови условно здоровых
 85 добровольцев в гепаринизированные пробирки вакутейнеры (Химмедснаб,
 86 Россия) в медпункте Университета «Сириус» квалифицированным
 87 персоналом. Непосредственно после забора производился цитологический
 88 анализ крови на гемоцитометре Celltac MEK-7300K (Nihon Kohden, Япония).

89 Определение фагоцитарной активности лейкоцитов

90 Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов к 100 мкл
91 цельной крови, контрольной, или предобработанной пептидом 5R667 в
92 конечной концентрации 10, 20, или 40 мкМ в течение 30 мин, добавляли
93 фиксированные, конъюгированные с флуоресцеином (FITC) бактерии *E. coli*
94 (штамм *DH5a*) в соотношении лейкоциты:бактерии 1:20. Фиксированные и
95 конъюгированные бактерии были приготовлены согласно ранее
96 опубликованной методике [14]. После добавления бактерий аликвоты крови
97 инкубировали в течение часа в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По окончании
98 инкубации эритроциты лизировали BD Pharm Lyse буфером по протоколу
99 производителя (BD Biosciences, USA). Анализ на фагоцитарную активность
100 лейкоцитов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSRFortessa как
101 описано ранее [14].

102 **Определение продукции провоспалительных цитокинов**

103 Образцы крови распределяли по 250 мкл на лунку в 48-луночные
104 культуральные планшеты (NEST, Китай) и инкубировали в течение 2-х часов
105 в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По окончании инкубации кровь аспирировали,
106 и адгезировавшиеся клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером.
107 После промывки добавляли культуральную среду RPMI 1640, содержащую
108 10% телячьей сыворотки, глутамин и HEPES. Блокирующий пептид 5R667,
109 имеющий последовательность -RQIKIWFQNRRMKWKKWCLEAFSYAQGR-,
110 добавлялся в культуральную среду в концентрации 10, или 20 мкМ [13]
111 (Genscript, США). После 30-ти минутной инкубации в присутствии пептида,
112 стимулировали продукцию цитокинов либо очищенным *E. coli* ЛПС (100
113 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США), либо фиксированными бактериями,
114 добавленными в соотношении лейкоциты:бактерии 1:20. Клеточные
115 супернатанты собирали через 22 часа после стимуляции, очищали
116 центрифугированием и замораживали. Анализ содержания TNF и IFN- γ в
117 супернатантах проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) при
118 помощи наборов компании «ВекторБест» (Россия). Содержание IL-6
119 анализировалось при помощи ИФА наборов компании «Biolegend» (США).

120 **Статистический анализ**

121 Статистическую достоверность различий средних оценивали при
 122 помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием
 123 программного обеспечения GraphPad Prism. Различия считали статистически
 124 значимыми при $p < 0.05$.

125 **3 Обсуждение и результаты**

126 Целью первой серии экспериментов было определение влияния TLR-
 127 блокирующего пептида 5R667 на фагоцитоз бактерий лейкоцитами
 128 периферической крови. Для этого к образцам крови здоровых доноров
 129 добавлялся 5R667 до конечной концентрации 40, 20, 10, или 0 мкМ, и пробы
 130 инкубировались в течение 30 минут в CO₂ инкубаторе. Затем добавлялись
 131 меченные флуоресцеином бактерии в количестве ~20 бактерий на лейкоцит.
 132 Фагоцитарная способность лейкоцитов оценивалась методом проточной
 133 цитометрии отдельно для популяций моно- и гранулоцитов, выделяемых по
 134 размеру и гранулярности клеток (Рис. 1А). Фагоцитарная активность
 135 оценивалась по интенсивности флуоресценции клеток в канале FITC (Рис. 1А).

136 Анализ полученных данных показал, что инкубация крови с
 137 проникающим в клетки пептидом не вызывала значимых изменений
 138 фагоцитарной способности лейкоцитов периферической крови (Рис. 1В). В
 139 случае добавления 40 мкМ пептида можно было отметить тенденцию к
 140 некоторому снижению фагоцитарной активности моноцитов. Такой
 141 тенденции, однако, не наблюдалось в популяции гранулоцитов (Рис. 1В).
 142 Отсутствие значимого эффекта пептида на фагоцитарную активность
 143 лейкоцитов крови также подтверждалась визуальным анализом поглощения
 144 FITC-меченных *E. coli* адгезированными на пластик лейкоцитами методом
 145 микроскопии флуоресценции (не показано). Результаты, представленные на
 146 рисунке 1, показывают, что обработка лейкоцитов TLR-блокирующим
 147 пептидом не отражается существенным образом на их фагоцитарной
 148 активности.

149 В следующей серии экспериментов сравнивали лейкоцитарный
 150 цитокиновый ответ, индуцированный растворимым ЛПС, с ответом,
 151 индуцированным корпускулярными, фагоцитируемыми бактериями.
 152 Оценивалось содержание TNF, IL-6 и IFN- γ в супернатантах, собранных через
 153 22 часа после стимуляции лейкоцитов бактериальными продуктами.
 154 Стимуляция лейкоцитов как ЛПС, так и цельными бактериями активировала
 155 продукцию цитокинов сходным образом (Рис. 2). Следует отметить, однако,
 156 что ни ЛПС, ни цельные бактерии не вызывали продукции IFN- γ (не
 157 показано). Это наблюдение указывает на отличие спектра цитокинов,
 158 продуцируемых адгезирующимися клетками крови от такового,
 159 продуцируемого перитониальными макрофагами. Так, ранее сообщалось, что
 160 стимуляция первичной культуры перитониальных макрофагов ЛПС вызывает
 161 TLR4-зависимую, MyD88-независимую активацию продукции IFN-
 162 γ . Эти различия могут быть объяснены сниженной экспрессией
 163 компонентов TRIF-зависимого сигнального пути адгезирующимися
 164 лейкоцитами периферической крови.

165 Установив, что корпускулярные, фагоцитируемые бактерии вызывают
 166 продукцию провоспалительных цитокинов количественно сравнимую с
 167 продукцией, вызываемой растворимым ЛПС, было оценено влияние
 168 мультиспецифического ингибитора TLRs пептида 5R667 на индуцированную
 169 продукцию TNF и IL-6. Эксперименты показали значительные различия в
 170 чувствительности цитокиновой продукции к ингибированию TLRs. Пептид
 171 5R667 вызывал значительное, статистически достоверное снижение
 172 продукции обоих цитокинов, индуцированной растворимым ЛПС, но не влиял
 173 на продукцию, индуцированную корпускулярными бактериями (Рис. 2).
 174 Данные, представленные на рисунке 2, также подтверждают ранее сделанный
 175 вывод о вероятном отсутствии видовой специфичности ингибиторного
 176 действия пептида 5R667 [13], что подтверждается эффективным
 177 блокированием пептидом ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в
 178 лейкоцитах человека (Рис. 2).

179 Отсутствие эффекта пептида на продукцию цитокинов не может быть
 180 объяснено участием дополнительных TLRs при стимуляции бактериальными
 181 частицами, содержащими ПАМС различных классов, поскольку пептид 5R667
 182 ингибирует множественные TLRs [13]. Так, помимо TLR4, активируемого
 183 ЛПС Грам-отрицательных бактерий, 5R667 ингибировал TLRs, активируемые
 184 и другими ПАМС Грам-отрицательных бактерий: TLR5, агонистом которого
 185 является флагеллин (белок, формирующий бактериальные жгутики); а также
 186 TLR9, активируемый бактериальной, неметилированной ДНК [13]. Несмотря
 187 на то, что TLR7 не ингибировался пептидом 5R667, вклад TLR7 и TLR8 в
 188 индукцию продукции цитокинов бактериями можно исключить на основании
 189 того, что эти рецепторы активируются вирусной одноцепочечной РНК, а не
 190 бактериальными ПАМС [2]. Наиболее вероятными индукторами,
 191 ответственными за TLR-независимую продукцию провоспалительных
 192 цитокинов, являются члены семейства NOD-подобных рецепторов, NOD1 и
 193 NOD2. Эти рецепторы активируются различными фрагментами
 194 пептидогликанов, присутствующих в бактериальной стенке как Грам-
 195 положительных, так и Грам-отрицательных бактерий [5]. Оба рецептора
 196 активируют транскрипционные факторы, стимулирующие транскрипцию
 197 провоспалительных цитокинов (транскрипционные факторы семейства NF-
 198 κ B, а также МАПК) [4]. Эти рецепторы экспрессируются лейкоцитами
 199 периферической крови, в частности NOD2 обильно экспрессируется в
 200 моноцитах [7].

201 **4 Заключение**

202 Настоящее исследование выявило существенные различия механизмов
 203 индукции цитокинов растворимым, очищенным ЛПС и корпускулярными
 204 бактериями. Эти различия обусловлены не только более широким спектром
 205 ПАМС, активирующих дополнительные TLR рецепторы при стимуляции
 206 цельными бактериями, но и задействованием цитоплазматических
 207 рецепторов, предположительно NOD1 и NOD2, распознающих бактериальное
 208 присутствие, за счёт интернализации бактериальных продуктов посредством

209 фагоцитоза. Наше исследование также указывает на неполноту
210 моделирования бактериальных инфекций с использованием растворимого
211 ЛПС (или иных высокоочищенных бактериальных продуктов).
212 Использование корпускулярных, содержащих ПАМС фагоцитируемых
213 частиц, таких как фиксированные бактерии, может повысить корректность
214 моделирования иммунного ответа на бактериальные инфекции. В будущем
215 мы планируем более детально изучить механизмы активации продукции
216 цитокинов цельными бактериями, а также использовать фиксированные
217 бактерии в экспериментальном моделировании иммунного ответа на
218 бактериальные инфекции.

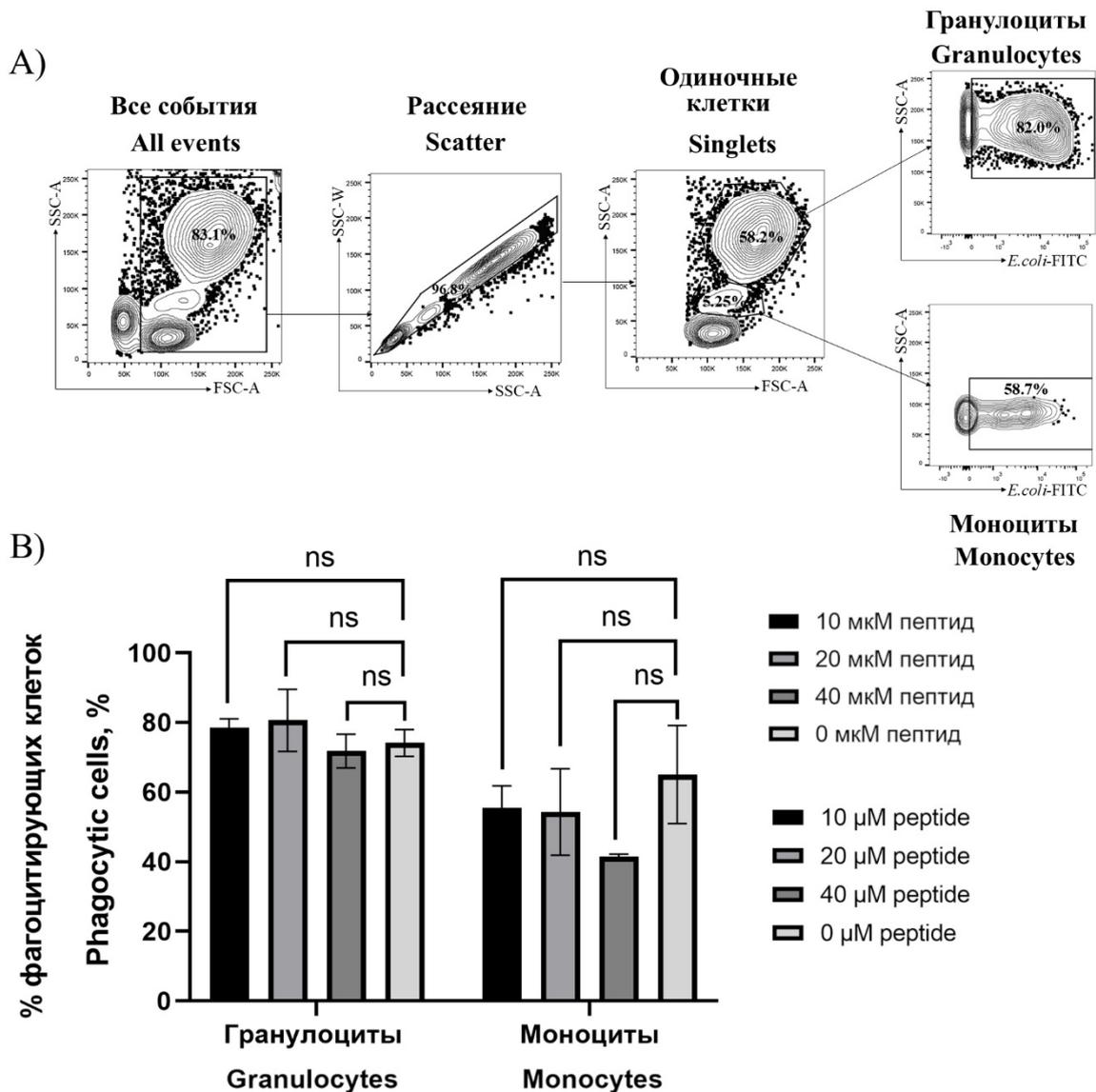
219 **Благодарности:** Авторы благодарят сотрудников ресурсного центра
220 клеточных технологий и иммунологии, лабораторного комплекса НТУ
221 «Сириус» за предоставление оборудования и техническую поддержку
222 исследований.

223 **Финансирование:** работы по анализу фагоцитоза с использованием
224 проточной цитометрии, конфокальной микроскопии и иммуноферментный
225 анализ провоспалительных цитокинов был выполнен при поддержке
226 Российского Научного Фонда, проект № 23-15-00443 ([https://rscf.ru/project/23-](https://rscf.ru/project/23-15-00443/)
227 [15-00443/](https://rscf.ru/project/23-15-00443/)). Дизайн и выполнение экспериментов по культивированию клеток
228 с TLR-блокирующим пептидом 5R667 были произведены в рамках реализации
229 государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-
230 технологическое развитие федеральной территории «Сириус».

231 **Соблюдение этических норм:** Все процедуры, выполненные в
232 исследовании с образцами добровольцев на анонимной основе, соответствуют
233 национальным этическим стандартам, Хельсинкской декларации 1964 года и
234 её последующим изменениям и были одобрены комитетом по биоэтике
235 Университета «Сириус» (протокол от 06.03.2023 г.). Информированное
236 добровольное согласие получено от всех участников исследования до отбора
237 образцов крови.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Влияние TLR-блокирующего пептида 5R667 на фагоцитоз бактерий *E. coli* моноцитами и гранулоцитами периферической крови. **Figure Table 1.** Effect of dose-dependent effect from TLR-blocking peptide 5R667 on phagocytosis of *E. coli* bacteria by peripheral blood monocytes and granulocytes.



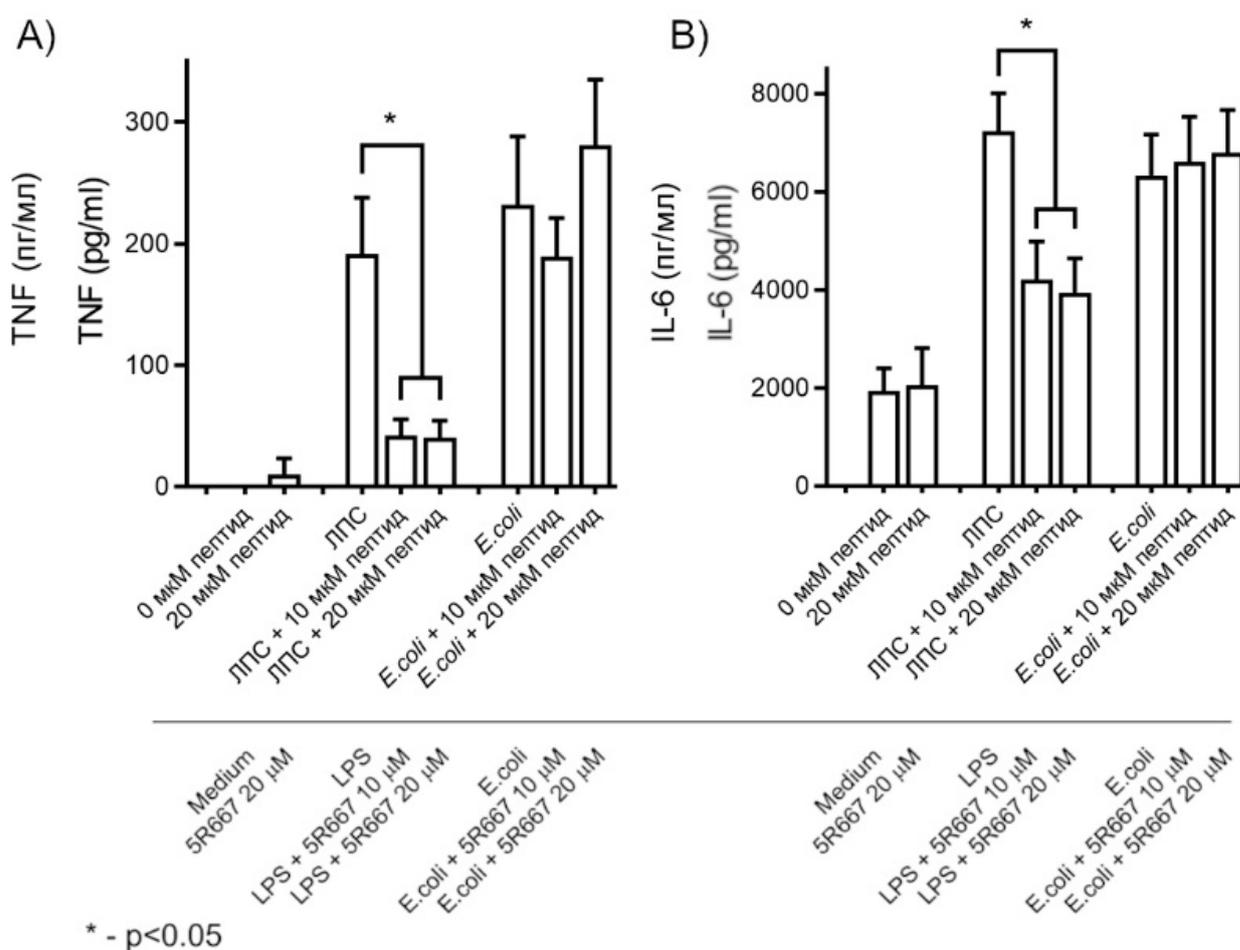
(А) Стратегия гейтирования популяций лейкоцитов периферической крови. Популяции гранулоцитов и моноцитов выделяли среди одиночных клеток (singlets) по размеру и гранулярности клеток. Фагоцитирующие клетки характеризовались наличием флуоресценции в канале FITC в связи с добавлением меченных FITC бактерий, как показано на правых панелях

Рисунка. (B) Пептид 5R667 не вызывает значимых изменений фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови. Цельную гепаринизированную кровь инкубировали в присутствии различных концентраций пептида 5R667 в течении 30 минут, после чего добавляли меченные флуоресцеином бактерии. Долю фагоцитирующих клеток оценивали методом проточной цитометрии через 1 час после добавления бактерий. Статистический анализ выполнен с помощью U-критерия Манна–Уитни.

(A) Gating strategy for peripheral blood leukocyte populations. Granulocyte and monocyte populations were distinguished from singlets based on cell size and granularity. Phagocytic cells were characterized by fluorescence in the FITC channel due to the addition of FITC-labeled bacteria, as shown in the right panels of the figure. (B) Peptide 5R667 does not significantly affect the phagocytic activity of peripheral blood leukocytes. Heparinized blood was incubated in the presence of various concentrations of peptide 5R667 for 30 min, then the fluorescein-labeled bacteria were added. The proportion of phagocytic cells was assessed by flow cytometry 1 h after the addition of bacteria. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney U-test.

Рисунок 2. Продукция провоспалительных цитокинов адгезирующимися лейкоцитами крови человека при стимуляции растворимым ЛПС и фагоцитируемыми бактериями.

Figure 2. Proinflammatory cytokine production by adherent human blood leukocytes stimulated with soluble LPS and phagocytosed bacteria.



Адгезировавшиеся к пластику клетки крови отмывали от эритроцитов, преинкубировали с различными концентрациями пептида 5R667 в течение 30 минут и стимулировали либо высокоочищенным, растворимым ЛПС в дозе 100 нг/мл, либо фиксированными бактериями в количестве ~20 бактерий на лейкоцит. Супернатанты для измерения содержания цитокинов собирали через 22 часа после стимуляции клеток. (А) Продукция TNF. (В) Продукция IL-6. Статистический анализ выполнялся методом однофакторного дисперсионного анализа. * — p<0.05. Проанализированы пробы крови, полученные от 12 доноров.

Plastic-adherent blood cells were washed from erythrocytes, preincubated with different concentrations of peptide 5R667 for 30 min and stimulated with either highly purified, soluble LPS (100 ng/ml) or formalin-fixed bacteria at ~20 bacteria per leukocyte. Supernatants for cytokine measurement were collected 22 h after cell stimulation. (A) TNF production. (B) IL-6 production. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance. * — $p < 0.05$. Blood samples from 12 donors were analyzed.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Тоцаков Владимир Юрьевич – к.м.н., ведущий научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия;

АНОО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия;

адрес: 354340 Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр-т, 1;

телефон: 8(926)560-7449;

e-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Toshchakov, Vladimir Y., PhD, Leading Researcher, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation;

Sirius University of Science and Technology, Sirius, Russia;

address: 1 Olympic Avenue, Sirius, Krasnodar Region, Russian Federation 354340;

telephone: 8(926)560-7449;

e-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Блок 2. Информация об авторах

Лысакова Елена Васильевна – магистрант, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Lysakova E. V., Master's degree student, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Рыбцов С. А. – к.б.н., руководитель ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии, Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия

Rybtsov S. A., PhD, Head, Resource Center for Cell Technologies and Immunology, Sirius University of Science and Technology, Krasnodar Region, Russian Federation

Блок 3. Метаданные статьи

ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОТВЕТ НА
СТИМУЛЯЦИЮ АДГЕЗИРУЮЩИХСЯ КЛЕТОК ДОНОРСКОЙ КРОВИ
РАСТВОРИМЫМ ЛПС И ФАГОЦИТИРУЕМЫМИ БАКТЕРИЯМИ
PROINFLAMMATORY CYTOKINE PRODUCTION BY ADHERENT DONOR
BLOOD CELLS STIMULATED BY SOLUBLE LPS AND PHAGOCYTED
BACTERIA

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ФАГОЦИТОЗ И ИНДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ
PHAGOCYTOSIS AND CYTOKINE INDUCTION

Ключевые слова: фагоцитоз, бактерии, ЛПС, детекция патогенов,
продукция цитокинов, ингибиторы Толл-подобных рецепторов.

Keywords: phagocytosis, bacteria, LPS, pathogen sensing, cytokine production,
TLR inhibitors.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 9,

количество таблиц – 0,

количество рисунков – 2.

02.08.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi
1	Janeway, C.A., Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. <i>Annu. Rev. Immunol.</i> , 2002, vol. 20, pp. 197–216.		[10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359]
2	Kawai, T., Akira, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. <i>Immunity</i> , 2011, vol. 34, pp. 637–650.		[10.1016/j.immuni.2011.05.006]
3	Núñez, G. Intracellular Sensors of Microbes and Danger. <i>Immunol. Rev.</i> , 2011, vol. 243, pp. 5–8.		[10.1111/j.1600-065X.2011.01058.x]
4	Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., Flavell, R.A. Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. <i>Immunity</i> , 2011, vol. 34, pp. 665–679.		[10.1016/j.immuni.2011.05.007]

5	Keestra-Gounder, A.M., Tsohis, R.M. NOD1 and NOD2: Beyond Peptidoglycan Sensing. Trends Immunol., 2017, vol. 38, pp. 758–767.		[10.1016/j.it.2017.07.004]
6	Sundaram, B., Tweedell, R.E., Prasanth Kumar, S., Kanneganti, T.D. The NLR Family of Innate Immune and Cell Death Sensors. Immunity, 2024, vol. 57, pp. 674–699.		[10.1016/j.immuni.2024.03.012]
7	Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Núñez, G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF-KB. Journal of Biological Chemistry, 2001, vol. 276, pp. 4812–4818.		[10.1074/jbc.M008072200]
8	Zhou, H., Coveney, A.P., Wu, M., Huang, J., Blankson, S., Zhao, H., O’Leary, D.P., Bai, Z., Li, Y., Redmond, H.P., Wang, J.H., Wang, J. Activation of Both TLR and NOD Signaling Confers Host Innate Immunity-Mediated Protection against Microbial		[10.3389/fimmu.2018.03082]

	Infection. Front. Immunol., 2019, vol. 9, 3082.		
9	Fu, Y.L., Harrison, R.E. Microbial Phagocytic Receptors and Their Potential Involvement in Cytokine Induction in Macrophages. Front. Immunol., 2021, vol. 12, 662063.	-	[10.3389/fimmu.2021.662063]
10	Toshchakov, V.Y., Neuwald, A.F. A Survey of TIR Domain Sequence and Structure Divergence. Immunogenetics, 2020, vol. 72, pp. 181–203.	-	[10.1007/s00251-020-01157-7]
11	Toshchakov, V.Y., Javmen, A. Targeting the TLR Signalosome with TIR Domain-Derived Cell-Permeable Decoy Peptides: The Current State and Perspectives. Innate Immun., 2020, vol. 26, pp. 35–47.		[10.1177/1753425919844310]
12	Toshchakov, V.Y. Peptide-Based Inhibitors of the Induced Signaling Protein Interactions: Current State and Prospects. Biochemistry (Moscow), 2024, vol. 89, pp. 784–798.		[10.1134/S000629792405002X]

13	Javmen, A., Zou, J., Nallar, S.C., Szmazinski, H., Lakowicz, J.R., Gewirtz, A.T., Toshchakov, V.Y. TLR5-Derived, TIR-Interacting Decoy Peptides to Inhibit TLR Signaling. <i>The Journal of Immunology</i> , 2023, vol. 210, pp. 1419–1427.		[10.4049/jimmunol.2200394]
14	Lysakova, E. V., Shumeev, A.N., Chuvpilo, S.A., Laktyushkin, V.S., Arsentieva, N.A., Bobrov, M.Y., Rybtsov, S.A. Quantitative Analysis of Phagocytosis in Whole Blood Using Double Staining and Visualization. <i>Biochemistry (Moscow)</i> , 2024, vol. 89, pp. 923–932.		[10.1134/S0006297924050122]
15	Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R.G., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., Vogel S.N. TLR4, but Not TLR2, Mediates IFN- β -Induced STAT α/β -Dependent Gene Expression in Macrophages. <i>Nat. Immunol.</i> , 2002, vol. 3, no. 4, pp. 392–398.		[10.1038/ni774]