

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

Е.В. Лысакова, С.А. Рыбцов, В.Ю. Тощакон

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

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 Toll-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 грамотрицательных 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, стимулирован-

Адрес для переписки:

Тощакон Владимир Юрьевич
354340, Россия, Краснодарский край, Федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., 1, АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус». Тел.: 8 926 560-74-49. E-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Contacts:

Vladimir Yu. Toshchakov
354340, Russian Federation, Krasnodar Region, Sirius Federal Territory, Olimpiiskii pr., 1, Sirius University of Science and Technology. Phone: +7 926 560-74-49. E-mail: toschakov.vy@talantiuspeh.ru

Для цитирования:

Лысакова Е.В., Рыбцов С.А., Тощакон В.Ю. Продукция провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию адгезирующихся клеток донорской крови растворимым ЛПС и фагоцитируемыми бактериями // Инфекция и иммунитет. 2025. Т. 15, № 1. С. 178–184. doi: 10.15789/2220-7619-PCP-17752

Citation:

Lysakova E.V., Rybtsov S.A., Toshchakov V.Yu. Proinflammatory cytokine production by adherent donor blood cells stimulated by soluble LPS and phagocytosed bacteria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2025, vol. 15, no. 1, pp. 178–184. doi: 10.15789/2220-7619-PCP-17752

Работы по анализу фагоцитоза с использованием проточной цитометрии, конфокальной микроскопии и иммуноферментный анализ провоспалительных цитокинов были выполнены при поддержке Российского Научного Фонда, проект № 23-15-00443 (<https://rscf.ru/project/23-15-00443>).

Дизайн и выполнение экспериментов по культивированию клеток с TLR-блокирующим пептидом 5R667 были произведены в рамках реализации государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (номер соглашения по ФТ 18-03 от 10.09.2024).

Phagocytosis analysis using flow cytometry, confocal microscopy and immunoenzymatic analysis of proinflammatory cytokines were supported by the Russian Science Foundation, project No. 23-15-00443 (<https://rscf.ru/project/23-15-00443>). The design and execution of experiments on culturing cells with TLR-blocking peptide 5R667 were performed as part of the implementation of the state programme of the federal territory "Sirius" "Scientific and Technological Development of the Federal Territory 'Sirius'" (agreement number under FT 18-03 dated 10.09.2024).

ная 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 врожденного 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 Toll-подобных рецепторов.

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

Lysakova E.V., Rytstov S.A., Toshchakov V.Yu.

Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation

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.

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

Введение

Система врожденного иммунитета распознает присутствие патогенных микроорганизмов посредством широкого набора рецепторов, каждый из которых активируется определенным классом микробных молекул [3]. Структурные мотивы, характерные для микробных молекул, распознаваемых рецепторами врожденного иммунитета, называют патоген-ассоциированными молекулярными структурами (ПАМС) (от английского термина «pathogen-associated molecular patterns»). Рецепторы врожденного иммунитета разделяют на две группы на основании их локализации. Рецепторы, располагающиеся на плазматической мембране клетки, а также на мембранах

эндосом, образуют первую группу. Эта группа включает в себя семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) и лектиновых рецепторов С-типа. Рецепторы этих семейств активируются ПАМС, располагающимися во внеклеточном пространстве, а также эндосомально располагающимися нуклеиновыми кислотами бактериального или вирусного происхождения [5]. Вторая группа микробных сенсоров образована цитоплазматическими рецепторами различных белковых семейств и включает в себя NOD-подобные рецепторы (NLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RLRs), цитозольный ДНК-сенсор cGAS, а также рецептор Aim2 (absent in melanoma 2) [8]. Основная функция рецепторов цитоплазматической группы заключается в обнаружении

ПАМС в цитозоле клеток. RLRs активируются вирусными нуклеиновыми кислотами, Aim2 активируется бактериальной и вирусной ДНК [8]. Эффекторный механизм, запускаемый цитоплазматическими рецепторами, разнообразен и включает в себя активацию противовирусного иммунитета посредством активации продукции интерферонов, протеолитическое созревание интерлейкинов IL-1 и IL-18 в их зрелые, секретруемые формы, индукцию различных форм программируемой клеточной смерти посредством активации каспаз, а также другие, более специализированные функции [1, 5]. Некоторые NLRs, например NOD1 и NOD2, выполняют функции аналогичные функциям TLRs, так как эти рецепторы активируют транскрипционные факторы семейства NF- κ B и митоген-активируемые протеин киназы (МАПК), тем самым индуцируя продукцию цитокинов клеткой-хозяином [1]. NOD1 и NOD2 распознают молекулярные мотивы пептидогликанов клеточной стенки как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, играя важную роль в формировании иммунного ответа на оба эти класса бактериальных патогенов [1]. Пептидогликаны не являются единственным классом ПАМС, способных активировать NOD1 и NOD2, эти рецепторы также могут активироваться бактериальными эффекторами белковой природы, а также эндогенными молекулами [6]. NOD1 и NOD2 присутствуют в клетках различных типов [10], в частности, NOD2 особенно обильно экспрессируется моноцитами периферической крови [9].

Цитоплазматические рецепторы врожденной иммунной системы играют важную роль в распознавании патогенных вирусов и бактерий, репликационный цикл которых протекает в цитоплазме эукариотических клеток [8]. Кроме того, цитоплазматические сенсоры патогенов важны и для распознавания бактерий, не способных к выходу из фагосом, но в значительной мере элиминирующихся посредством фагоцитоза [1, 15]. Механизмы, посредством которых ПАМС фагоцитируемых бактерий попадают из фагосом в цитоплазму, остаются предметом изучения. В литературе рассматривается как простая трансмембранная утечка ПАМС из фагосом, так и участие бактериальных транспортных систем в таком переносе [1]. В настоящее время распространено представление о кооперативности участия мембранных и цитоплазматических рецепторов в формировании иммунного ответа на фагоцитируемые бактерии [15], а также растет понимание различий в последствиях активации клеток иммунной системы растворимыми ПАМС и корпускулярными, фагоцитируемыми бактериями [2].

Передача сигнала активированными Toll-подобными рецепторами происходит за счет

белок-белковых взаимодействий, осуществляемых TIR-доменами, присутствующими как во всех TLRs, так и в адаптерных белках, рекрутируемых к TLRs при активации [5, 14]. Блокировка взаимодействий TIR-доменов пептидами, происходящими из сайтов, осуществляющих сигнал-зависимые белковые взаимодействия, является эффективной стратегией разработки ингибиторов TLR [11, 12]. Пептид, соответствующий третьему спиральному участку TIR-домена TLR5 и синтезированный вместе с пептидным вектором, обеспечивающим проникновение всей конструкции в клетку (пептид 5R667), является мультиспецифичным ингибитором TLR, способным ингибировать TLR5, TLR4, TLR2, и TLR9, но не TLR7 или TLR8 [4].

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

Материалы и методы

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

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов. Для определения фагоцитарной активности лейкоцитов к 100 мкл цельной крови, контрольной или предобработанной пептидом 5R667 в конечной концентрации 10, 20 или 40 мкМ в течение 30 мин, добавляли фиксированные, конъюгированные с флуоресцеином (FITC) бактерии *E. coli* (штамм DH5a) в соотношении лейкоциты:бактерии 1:20. Фиксированные и конъюгированные бактерии были приготовлены согласно ранее опубликованной методике [7]. После добавления бактерий аликвоты крови инкубировали в течение часа в атмосфере 5% CO₂

при 37°C. По окончании инкубации эритроциты лизировали BD Pharm Lyse буфером по протоколу производителя (BD Biosciences, США). Анализ на фагоцитарную активность лейкоцитов проводили на проточном цитофлуориметре BD LSRFortessa как описано ранее [7].

Определение продукции провоспалительных цитокинов. Образцы крови распределяли по 250 мкл на лунку в 48-луночные культуральные планшеты (NEST, Китай) и инкубировали в течение 2 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. По окончании инкубации кровь аспирировали, и адгезировавшиеся клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером. После промывки добавляли культуральную среду RPMI 1640, содержащую 10% телячьей сыворотки, глутамин и HEPES. Блокирующий пептид 5R667, имеющий последовательность -RQIKIWFQNRRMKWKKWCLEAFSYAQGR-, добавлялся в культуральную среду в концентрации 10 или 20 мкМ [4] (Genscript, США). После 30-минутной инкубации в присутствии пептида, стимулировали продукцию цитокинов либо очищенным *E. coli* ЛПС (100 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США), либо фиксированными бактериями, добавленными в соотношении лейкоциты:бактерии 1:20. Клеточные супернатанты собирали через 22 ч после стимуляции, очищали центрифугированием и замораживали. Анализ содержания TNF и IFN γ в супернатантах проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) при помощи наборов компании «Вектор-Бест» (Россия). Содержание IL-6 анализировалось при помощи ИФА наборов компании «BioLegend» (США).

Статистический анализ. Статистическую достоверность различий средних оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

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

Анализ полученных данных показал, что инкубация крови с проникающим в клетки пептидом не вызывала значимых изменений фагоцитарной способности лейкоцитов периферической крови (рис. 1В). В случае добавления 40 мкМ пептида можно было отметить тенденцию к некоторому снижению фагоцитарной активности моноцитов. Такой тенденции, однако, не наблюдалось в популяции гранулоцитов (рис. 1В). Отсутствие значимого эффекта пептида на фагоцитарную активность лейкоцитов крови также подтверждалось визуальным анализом поглощения FITC-меченных *E. coli* адгезированными на пластик лейкоцитами методом флуоресцентной микроскопии (не показано). Результаты, представленные на рис. 1, показывают, что обработка лейкоцитов TLR-блокирующим пептидом не отражается существенным образом на их фагоцитарной активности.

В следующей серии экспериментов сравнивали лейкоцитарный цитокиновый ответ, индуцированный растворимым ЛПС, с ответом, индуцированным корпускулярными фагоцитируемыми бактериями. Оценивалось содержание TNF, IL-6 и IFN γ в супернатантах, собранных через 22 ч после стимуляции лейкоцитов бактериальными продуктами. Стимуляция лейкоцитов как ЛПС, так и цельными бактериями активировала продукцию цитокинов сходным образом (рис. 2). Следует отметить, однако, что ни ЛПС, ни цельные бактерии не вызывали продукции IFN γ (не показано). Это наблюдение указывает на отличие спектра цитокинов, продуцируемых адгезирующимися клетками крови от такового, продуцируемого перитонийными макрофагами. Так, ранее сообщалось, что стимуляция первичной культуры перитонийных макрофагов ЛПС вызывает TLR4-зависимую, MyD88-независимую активацию продукции IFN γ [13]. Эти различия могут быть объяснены сниженной экспрессией компонентов TRIF-зависимого сигнального пути адгезирующимися лейкоцитами периферической крови.

Установив, что корпускулярные фагоцитируемые бактерии вызывают продукцию провоспалительных цитокинов, количественно сравнимую с продукцией, вызываемой растворимым ЛПС, было оценено влияние мультиспецифического ингибитора TLRs пептида 5R667 на индуцированную продукцию TNF и IL-6. Эксперименты показали значительные различия в чувствительности цитокиновой продукции к ингибированию TLRs. Пептид 5R667 вызывал значительное, статистически достоверное снижение продукции обоих цитокинов, индуцированной растворимым ЛПС, но не влиял на продукцию, индуцированную корпускулярными бактериями (рис. 2). Данные, представленные на рис. 2, также подтверждают ранее сделанный вывод о вероятном

отсутствии видовой специфичности ингибиторного действия пептида 5R667 [4], что подтверждается эффективным блокированием пептидом ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в лейкоцитах человека (рис. 2).

Отсутствие эффекта пептида на продукцию цитокинов не может быть объяснено участием дополнительных TLRs при стимуляции бактериальными частицами, содержащими ПАМС различных классов, поскольку пептид 5R667 ингибирует множественные TLRs [4]. Так, помимо TLR4, активируемого ЛПС грамотрицательных бактерий, 5R667 ингибировал TLRs, активируемые и другими ПАМС грамотрицательных

бактерий: TLR5, агонистом которого является флагеллин (белок, формирующий бактериальные жгутики); а также TLR9, активируемый бактериальной, неметилированной ДНК [4]. Несмотря на то что TLR7 не ингибировался пептидом 5R667, вклад TLR7 и TLR8 в индукцию продукции цитокинов бактериями можно исключить на основании того, что эти рецепторы активируются вирусной одноцепочечной РНК, а не бактериальными ПАМС [5]. Наиболее вероятными индукторами, ответственными за TLR-независимую продукцию провоспалительных цитокинов, являются члены семейства NOD-подобных рецепторов — NOD1 и NOD2. Эти ре-

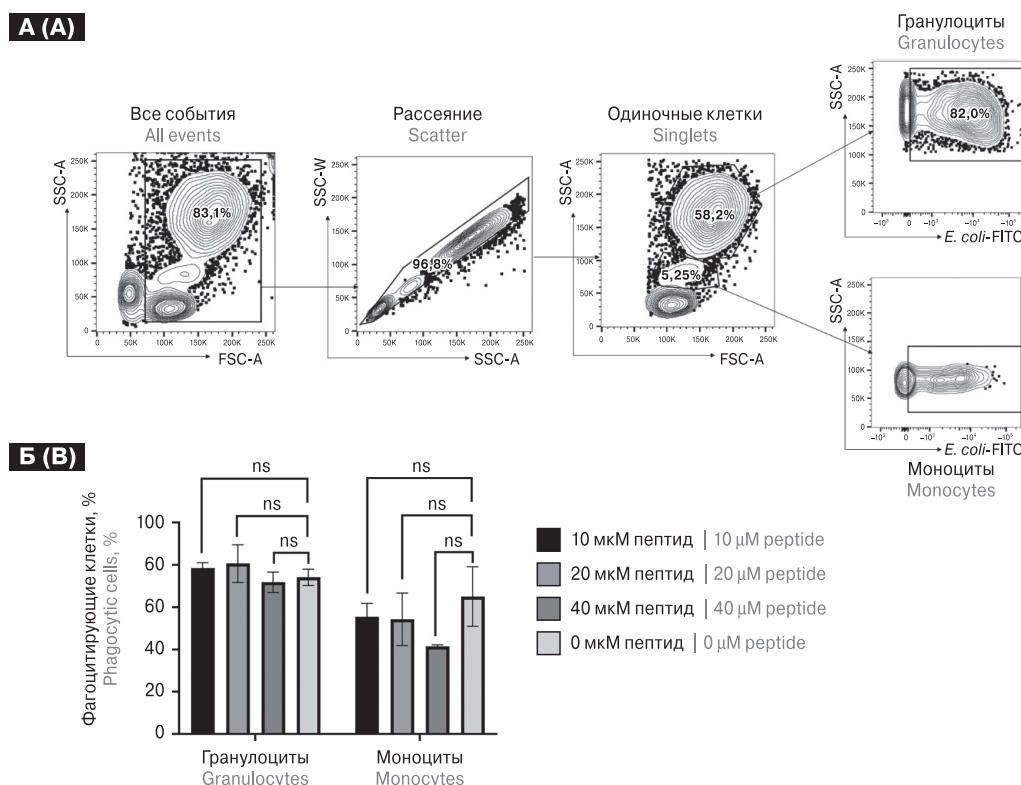


Рисунок 1. Влияние TLR-блокирующего пептида 5R667 на фагоцитоз бактерий *E. coli* моноцитами и гранулоцитами периферической крови

Figure 1. Effect of dose-dependent effect from TLR-blocking peptide 5R667 on phagocytosis of *E. coli* bacteria by peripheral blood monocytes and granulocytes

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

Note. (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.

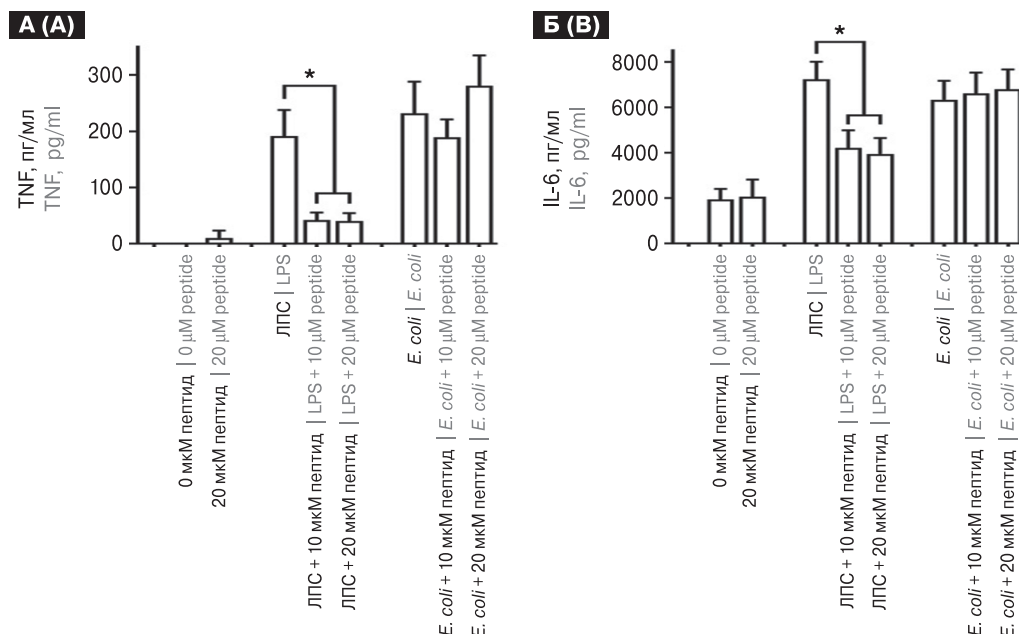


Рисунок 2. Продукция провоспалительных цитокинов адгезирующими лейкоцитами крови человека при стимуляции растворимым ЛПС и фагоцитируемыми бактериями

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

Примечание. Адгезировавшие к пластику клетки крови отмывали от эритроцитов, преинкубировали с различными концентрациями пептида 5R667 в течение 30 мин 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 ч после стимуляции клеток. (А) Продукция TNF. (Б) Продукция IL-6. Статистический анализ выполнялся методом однофакторного дисперсионного анализа. * — $p < 0.05$. Проанализированы пробы крови, полученные от 12 доноров.

Note. 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.

цепторы активируются различными фрагментами пептидогликанов, присутствующих в бактериальной стенке как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [6]. Оба рецептора активируют транскрипционные факторы, стимулирующие транскрипцию провоспалительных цитокинов (транскрипционные факторы семейства NF- κ B, а также МАПК) [1]. Эти рецепторы экспрессируются лейкоцитами периферической крови, в частности NOD2 обильно экспрессируется в моноцитах [9].

Заключение

Настоящее исследование выявило существенные различия механизмов индукции цитокинов растворимым очищенным ЛПС и корпускулярными бактериями. Эти различия обусловлены не только более широким спектром ПАМС, активирующих дополнительные TLR рецепторы при стимуляции цельными бактериями, но и задействованием цитоплазматических рецепторов, предположительно NOD1 и NOD2, распознающих бактериальное присутствие,

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

Благодарности

Авторы благодарят сотрудников ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии, лабораторного комплекса НТУ «Сириус» за предоставление оборудования и техническую поддержку исследований.

Дополнительная информация

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с образцами добровольцев на анонимной основе, соответствуют национальным этическим стандартам,

Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям и были одобрены комитетом по биоэтике Университета «Сириус» (протокол от 06.03.2023 г.). Информированное добровольное согласие получено от всех участников исследования до отбора образцов крови.

Список литературы/References

1. Elinav E., Strowig T., Henao-Mejia J., Flavell R.A. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*, 2011, vol. 34, pp. 665–679. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.007
2. Fu Y.L., Harrison R.E. Microbial phagocytic receptors and their potential involvement in cytokine induction in macrophages. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 662063. doi: 10.3389/fimmu.2021.662063
3. Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, vol. 20, pp. 197–216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
4. 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. *J. Immunol.*, 2023, vol. 210, pp. 1419–1427. doi: 10.4049/jimmunol.2200394
5. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, vol. 34, pp. 637–650. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
6. Keestra-Gounder A.M., Tsois R.M. NOD1 and NOD2: beyond peptidoglycan sensing. *Trends Immunol.*, 2017, vol. 38, pp. 758–767. doi: 10.1016/j.it.2017.07.004
7. 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. *Biochemistry (Moscow)*, 2024, vol. 89, pp. 923–932. doi: 10.1134/S0006297924050122
8. Núñez G. Intracellular sensors of microbes and danger. *Immunol. Rev.*, 2011, vol. 243, pp. 5–8. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01058.x
9. 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- κ B. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 4812–4818. doi: 10.1074/jbc.M008072200
10. 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. doi: 10.1016/j.immuni.2024.03.012
11. Toshchakov V.Y. Peptide-based inhibitors of the induced signaling protein interactions: current state and prospects. *Biochemistry (Moscow)*, 2024, vol. 89, pp. 784–798. doi: 10.1134/S000629792405002X
12. Toshchakov V.Y., Javmen A. Targeting the TLR Signalingosome with TIR domain-derived cell-permeable decoy peptides: the current state and perspectives. *Innate Immun.*, 2020, vol. 26, pp. 35–47. doi: 10.1177/1753425919844310
13. 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 STAT1 α/β -dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.*, 2002, vol. 3, no. 4, pp. 392–398. doi: 10.1038/ni774
14. Toshchakov V.Y., Neuwald A.F. A survey of TIR domain sequence and structure divergence. *Immunogenetics*, 2020, vol. 72, pp. 181–203. doi: 10.1007/s00251-020-01157-7
15. 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 infection. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 9: 3082. doi: 10.3389/fimmu.2018.03082

Авторы:

Лысакова Е.В., аспирант АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия;
Рыбцов С.А., к.б.н., руководитель ресурсного центра клеточных технологий и иммунологии АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия;
Тошчаков В.Ю., к.м.н., ведущий научный сотрудник, направление «Иммунобиология и биомедицина», АНО ВО Научно-технологический университет «Сириус», Федеральная территория «Сириус», Краснодарский край, Россия.

Authors:

Lysakova E.V., PhD Student, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation;
Rybtsov S.A., PhD (Biology), Head of the Resource Center for Cell Technologies and Immunology, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation;
Toshchakov V.Yu., PhD (Medicine), Leading Researcher, Division of Immunobiology and Biomedicine, Sirius University of Science and Technology, Sirius Federal Territory, Krasnodar Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 02.08.2024
 Принята к печати 05.08.2024

Received 02.08.2024
 Accepted 05.08.2024