

ОЦЕНКА ПРОАПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА В ИЗОЛИРОВАННЫХ СУБПОПУЛЯЦИЯХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Е.Н. Филатова¹, Е.В. Анисенкова¹, Н.Б. Преснякова¹, Н.В. Неумоина¹,
Т.Д. Сычева², О.В. Уткин²

¹ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной
Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

²ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. При *in vitro* моделировании инфекционных процессов липополисахарид (ЛПС) применяется как активатор и индуктор апоптоза иммунокомпетентных клеток. На данный момент неясно, является ли ЛПС прямым индуктором апоптоза в Т-клетках человека. Субпопуляции эффекторных и наивных CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови человека были изолированы и культивировались раздельно в присутствии ЛПС. Показано, что ЛПС не является индуктором апоптоза в изученных субпопуляциях Т-клеток.

Ключевые слова: липополисахарид, Т-лимфоциты, апоптоз.

THE CHARACTERIZATION OF PROAPOPTOTIC ACTIVITY OF LIPOPOLYSACCHARIDE IN ISOLATED SUBPOPULATIONS OF HUMAN T-LYMPHOCYTES

Filatova E.N.^a, Anisenkova E.V.^a, Presnyakova N.B.^a, Neumoina N.V.^a, Sycheva T.D.^b, Utkin O.V.^b

^aBlokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^bNizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Lipopolysaccharide (LPS) is used as activator and inductor of immune cells apoptosis in case of infectious processes modeling. It is not clear if LPS is direct inductor of apoptosis in human T-cells. The subpopulations of effector and naive CD4⁺ T-helper and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes of human peripheric blood were isolated and cultivated in presence of LPS. It has been shown that LPS was inductor of apoptosis in studying T-cells populations.

Key words: lipopolysaccharide, T-lymphocytes, apoptosis.

Введение

При моделировании инфекционных процессов важную роль отводят исследованию характера программируемой гибели клеток

(ПГК) в различных популяциях лимфоцитов. Одним из ее вариантов является апоптоз. Иммуносупрессия вследствие апоптоза лимфоцитов — важный фактор патогенеза эндотоксемии и сепсиса при заболеваниях инфекционного

Адрес для переписки:

Филатова Елена Николаевна
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ГБОУ ВПО НижГМА МЗ РФ.
Тел.: 8 (831) 469-79-46, 8 (906) 368-37-22. Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: el.filatova83@gmail.com

Contacts:

Elena N. Filatova
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Nizhny Novgorod State Medical Academy.
Phone: +7 (831) 469-79-46, +7 (906) 368-37-22. Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: el.filatova83@gmail.com

Библиографическое описание:

Филатова Е.Н., Анисенкова Е.В., Преснякова Н.Б., Неумоина Н.В.,
Сычева Т.Д., Уткин О.В. Оценка проапоптотической активности
липополисахарида в изолированных субпопуляциях Т-лимфоцитов
человека // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 4. С. 347–352.
doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-347-352

Citation:

Filatova E.N., Anisenkova E.V., Presnyakova N.B., Neumoina N.V.,
Sycheva T.D., Utkin O.V. The characterization of proapoptotic activity
of lipopolysaccharide in isolated subpopulations of human T-lymphocytes //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2014,
vol. 4, no. 4, pp. 347–352. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-347-352

генеза [19]. В качестве активатора иммунокомпетентных клеток и потенциального индуктора апоптоза в модельных *in vitro* системах часто используется липополисахарид (ЛПС).

ЛПС — термостабильный компонент клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов. Он состоит из гидрофобного липида А, специфичной О-полисахаридной цепи и корового олигосахарида [23, 25]. Многие эффекты, оказываемые грамотрицательными микроорганизмами, связаны с действием ЛПС [20]. Ему также отводят роль в патогенезе различных воспалительных заболеваний, таких как астма и хронический обструктивный бронхит [13].

В качестве рецептора ЛПС идентифицирован Toll-подобный рецептор-4 (TLR-4) [2]. ЛПС эффективно связывается со своим рецептором при участии белков CD14 и MD-2 [1, 21]. Взаимодействие ЛПС с рецептором приводит к активации факторов транскрипции NF-κB и AP-1, повышению экспрессии провоспалительных цитокинов и костимулирующих молекул [10, 15]. Продукция провоспалительных цитокинов индуцирует окислительный стресс и повышает восприимчивость клеток к апоптозу [14].

ЛПС особенно активно взаимодействует с клетками неспецифического звена иммунной системы (моноциты, фагоциты и дендритные клетки) [16]. В настоящее время отсутствуют

данные, демонстрирующие прямое апоптоз-индуцирующее действие ЛПС на популяцию Т-клеток [18]. Применение ЛПС в некоторых *in vivo* животных моделях свидетельствует об активации апоптоза Т-лимфоцитов [17]. *In vitro* продемонстрировано повышение уровня апоптоза CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток при добавлении ЛПС в культуру мононуклеарных клеток периферической крови [14].

Целью данной работы явилась оценка проапоптотической активности ЛПС в изолированных субпопуляциях Т-лимфоцитов человека *in vitro*.

Материалы и методы

Выделение субпопуляций Т-лимфоцитов. Материалом для исследования явились образцы периферической крови здоровых волонтеров в количестве 20 мл. Все волонтеры дали информированное согласие на участие в исследовании. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови выделяли в градиенте плотности Гистопак (ρ = 1,077 г/см³, «Sigma», США). Выделение субпопуляций наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов (наивные T_H, CD4⁺CD45RO⁻), эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов (эффекторные T_H, CD4⁺CD45RO⁺), наивных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (наивные ЦТЛ,

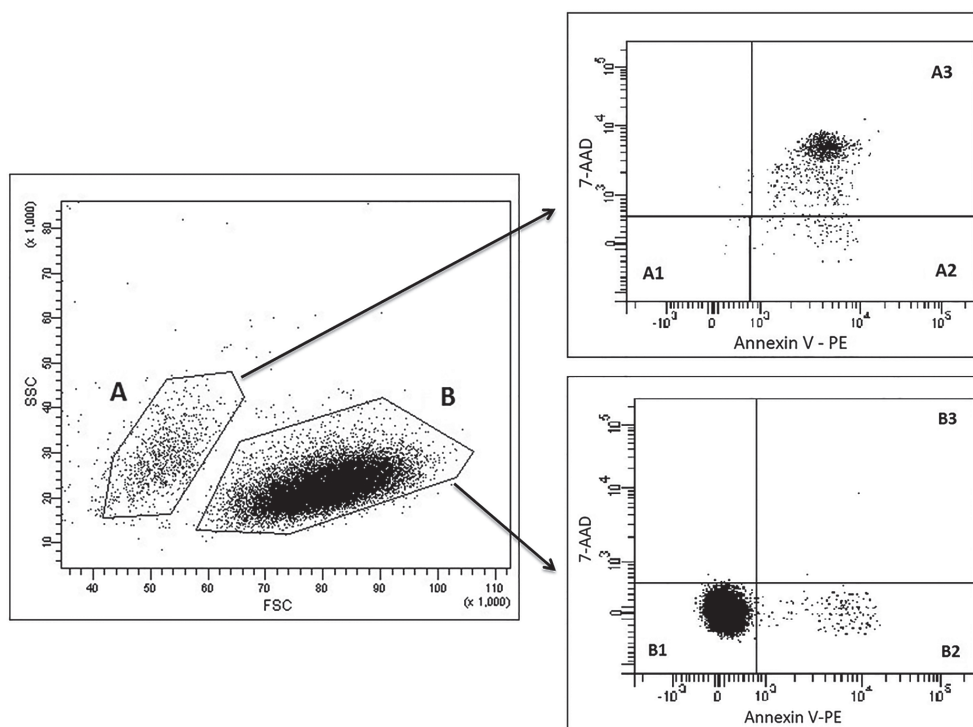


Рисунок. Принцип гейтирования субпопуляций Т-лимфоцитов для определения уровня апоптоза с помощью проточной цитофлуориметрии

Примечания. А — гейт лимфоцитов в поздней стадии апоптоза; В — гейт живых лимфоцитов и лимфоцитов в ранней стадии апоптоза. А1, В1 — AV⁻7AAD⁻ живые клетки; А2, В2 — AV⁺7AAD⁻ клетки в ранней стадии апоптоза; А3, В3 — AV⁺7AAD⁺ клетки в поздней стадии апоптоза для гейтов А и В соответственно.

CD8⁺CD45RO⁻) и эффекторных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (эффекторные ЦТЛ, CD8⁺CD45RO⁺) проводили методом магнитной иммуносепарации с помощью коммерческих наборов серии «EasySep» («Stemcell Technologies», Великобритания) согласно рекомендациям производителя. Чистоту выделения субпопуляций Т-клеток контролировали при помощи проточной цитофлуориметрии с использованием панели антител: CD3-PE, CD45RO-PE/Cy7, CD45RA-PerCp/Cy5.5, CD8-APC/eFluor780 (либо CD8-APC/eFluor780) («eBioscience», США). По результатам контроля чистота выделения субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток составила 95–99%.

Культивирование Т-лимфоцитов. Выделенные субпопуляции Т-лимфоцитов культивировали отдельно в концентрации 1×10^6 кл/мл в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («РАА Laboratories», Австрия) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37°C и 5% CO₂. Активацию субпопуляций наивных и эффекторных Тх и ЦТЛ проводили с помощью липополисахарида *E. coli* 0111:B4 («Sigma», США) высокой степени очистки в концентрации 10 мкг/мл в течение 20 ч. Концентрацию активатора и время экспозиции подбирали эмпирически исходя из скорости развития апоптотических процессов в культуре изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов. Клетки, не подвергавшиеся активации ЛПС, культивировали в аналогичных условиях и использовали в качестве контроля.

Проточная цитофлуориметрия. Уровень апоптоза в субпопуляциях Т-лимфоцитов определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II («Becton, Dickinson and Company», США). Для оценки уровня апоптоза применяли двойное окрашивание аннексином V-PE (AV) и 7-аминоактиномицином-D (7AAD) с использованием коммерческого набора «PE Annexin V Apoptosis Detection Kit» («BD Biosciences», США). На основании анализа прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния выделяли общий гейт живых лимфоцитов и лимфоцитов в ранней стадии апоптоза, а также гейт лимфоци-

тов в поздней стадии апоптоза. В дальнейшем гейты анализировали отдельно. На основании двойной окраски по AV и 7AAD выделяли живые лимфоциты (AV⁻7AAD⁻), лимфоциты в ранней (AV⁺7AAD⁻) и поздней (AV⁺7AAD⁺) стадиях апоптоза (рис.).

Уровень апоптоза определяли по процентам AV⁺7AAD⁻ и AV⁺7AAD⁺ клеток в каждой из субпопуляций Т-лимфоцитов. Все культуры исследовали в трех вариантах: свежеизолированные клетки, лимфоциты, культивируемые без добавления активатора, и клетки, культивируемые с ЛПС. Сбор данных, оценку и статистический анализ проводили с помощью программы «BD FACS Diva 6.1.3» («BD Biosciences», США) и алгоритма анализа, написанного на языке R в оболочке «RStudio 0.98.507» («RStudio», США). Различия в уровнях раннего и позднего апоптоза между исследуемыми образцами рассчитывали с применением критерия Фридмана и критерия Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,017$, рассчитанном с применением поправки Бонферрони.

Результаты

Спонтанная активация апоптоза изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов при культивировании

Обнаружено, что культивирование сопровождалось индукцией спонтанного апоптоза во всех изолированных субпопуляциях Т-лимфоцитов. По сравнению со свежеевыделенными Т-лимфоцитами, при культивировании доля клеток, находящихся в ранней стадии апоптоза, статистически значимо не менялась, а доля клеток в поздней стадии апоптоза значительно возрастала (табл.). Так, в субпопуляции эффекторных Тх процент клеток в поздней стадии апоптоза статистически значимо увеличился в 6,9 раза ($p = 0,012$), в наивных Тх — в 19,1 раза ($p = 0,012$), в эффекторных ЦТЛ — в 7,8 раза ($p = 0,003$), в наивных ЦТЛ — в 15,6 раза ($p = 0,012$) по сравнению со свежеевыделенными Т-клетками.

ТАБЛИЦА. ПРОЦЕНТ КЛЕТОК СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ АПОПТОЗА

Условия культивирования	Стадия апоптоза	Эффекторные Тх	Наивные Тх	Эффекторные ЦТЛ	Наивные ЦТЛ
До культивирования	Ранний апоптоз	1,2 (0,9; 1,4)	0,9 (0,5; 1,4)	1,6 (1,0; 2,0)	1,0 (0,5; 2,8)
	Поздний апоптоз	1,7 (1,4; 2,1)	0,7 (0,5; 1,0)	2,7 (1,9; 3,6)	1,1 (0,7; 1,3)
Культивирование без ЛПС	Ранний апоптоз	1,2 (0,8; 1,4)	0,8 (0,5; 1,2)	1,7 (0,9; 3,0)	1,5 (1,0; 2,6)
	Поздний апоптоз	11,8 (7,5; 36,5)*	13,4 (6,2; 22,0)*	21,0 (11,2; 32,4)*	17,2 (8,0; 28,1)*
Культивирование с ЛПС	Ранний апоптоз	1,6 (1,1; 1,8)	1,2 (0,8; 1,6)	1,8 (0,9; 2,8)	3,1 (1,8; 4,2)
	Поздний апоптоз	15,6 (8,2; 29,1)*	16,3 (7,8; 22,2)*	25,3 (11,2; 35,7)*	25 (12,3; 50,7)*

Примечания. * — статистически значимые различия по сравнению с клетками до культивирования ($p < 0,05$). Результаты представлены с указанием медианы, 25 и 75 перцентилей.

Влияние ЛПС на индукцию апоптоза изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов *in vitro*

Исследовано влияние ЛПС на индукцию апоптоза при культивировании изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов. Так же, как и при культивировании без ЛПС, выявлено статистически значимое увеличение процента Т-лимфоцитов, находящихся в стадии позднего апоптоза по сравнению со свежесыведенными клетками (табл. 1). Процент клеток в поздней стадии апоптоза возрастал в субпопуляции эффекторных Тх в 9,2 раза ($p = 0,012$), в наивных Тх — в 23,3 раза ($p = 0,012$), в эффекторных ЦТЛ — в 9,4 раза ($p = 0,012$) и в наивных ЦТЛ — в 22,7 раза ($p = 0,012$). При этом процент клеток в ранней стадии апоптоза статистически значимо не менялся.

По сравнению с клетками, культивируемыми без активатора, стимуляция ЛПС не вызвала статистически значимых изменений процента клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза во всех изученных субпопуляциях Т-лимфоцитов.

Обсуждение

Исследован уровень апоптоза в свежеизолированных субпопуляциях Т-лимфоцитов человека, при культивировании *in vitro* без ЛПС и в его присутствии. Апоптоз Т-клеток, культивируемых в отсутствие активатора, расценивался нами как спонтанный вариант ПГК.

Полученные результаты свидетельствуют о различной восприимчивости субпопуляций Т-лимфоцитов к спонтанной индукции апоптоза. В свежеизолированных культурах наивные Т-лимфоциты характеризовались более низким процентом клеток в ранней и поздней стадиях апоптоза по сравнению с эффекторными. При культивировании скорость накопления клеток в поздней стадии апоптоза для наивных Т-лимфоцитов была выше, чем для эффекторных Т-клеток. Процент клеток в ранней стадии апоптоза при этом не изменялся (табл.). То есть чувствительность наивных Т-клеток к спонтанной индукции апоптоза была выше, чем у эффекторных Т-лимфоцитов. Схожие результаты были получены при культивировании мононуклеарных клеток периферической крови, не разделенных на субпопуляции [8]. При этом наивные Тх и ЦТЛ были более восприимчивы к индукции апоптоза, чем эффекторные клетки и клетки памяти за счет повышенной экспрессии ряда проапоптотических факторов.

По результатам наших предварительных исследований и данных литературы [14, 18], ЛПС-стимуляция различных иммунокомпетентных

клеток в течение 12–20 ч приводила к индукции апоптоза. Увеличение времени культивирования субпопуляций Т-лимфоцитов с ЛПС, а также дозы активатора, не сопровождалось изменениями уровня апоптоза (данные не представлены). Полученные результаты указывают на отсутствие апоптоз-индуцирующей активности ЛПС в отношении изолированных субпопуляций Т-лимфоцитов.

Данные литературы о функциональной роли ЛПС как активатора и индуктора апоптоза различных субпопуляций Т-клеток противоречивы. У мышей функциональный TLR-4 экспрессировался только субпопуляцией регуляторных Тх. При этом ЛПС стимулировал пролиферацию зрелых CD4⁺ Т-регуляторных клеток и увеличивал их супрессивную активность в отношении других субпопуляций Т-лимфоцитов [3]. В работах других авторов эти данные частично опровергались. Экспрессия мРНК TLR-4 выявлялась во всех субпопуляциях Тх, но ЛПС не оказывал влияния на супрессивную активность CD4⁺ Т-регуляторных клеток [4, 22]. Предполагалось, что обнаруженные свойства ЛПС как активатора Т-регуляторных клеток связаны с контаминацией препарата лигандом рецептора TLR-2, распознающего многие антигены бактерий, вирусов и грибов. Gelman et al. обнаружили экспрессию гена TLR-4 в наивных Тх мышей, которая ингибировалась после активации клеток антителами к CD3 и CD28 [6]. При этом воздействие ЛПС на активированные клетки не приводило к активации фактора транскрипции NF-κB.

По данным, полученным на клетках крови человека, ген TLR-4 экспрессировался во всех субпопуляциях Т-лимфоцитов [9, 26]. При этом рецептор TLR-4 синтезировался на поверхности Тх только после их активации IFNα и антителами к CD3. Активированные Тх не отвечали на стимуляцию ЛПС, что было связано с недостатком экспрессии корцепторной молекулы CD14 [11].

Наивные ЦТЛ человека характеризуются слабой экспрессией TLR-4, усиливающейся при активации этих клеток через Т-клеточный рецептор. При этом на поверхности наивных ЦТЛ не детектировалась корцепторная молекула CD14. Аналогично TLR-4, активация наивных ЦТЛ вызывала усиление экспрессии CD14. Экспрессия TLR-4 также выявлялась в субпопуляции CD8⁺ Т-клеток памяти. ЛПС-активация ЦТЛ сопровождалась усилением продукции провоспалительных цитокинов. Следует отметить, что у мышей ЦТЛ не экспрессировали TLR-4 и не отвечали на ЛПС-стимуляцию [12].

Противоречивость данных относительно способности ЛПС выступать в качестве активатора Т-лимфоцитов отчасти объясняется

гетерогенностью его биохимических свойств у разных микроорганизмов, межвидовыми различиями в реакциях на эндотоксины, а также техническими особенностями проведения эксперимента. Показано, что интенсивность ЛПС-индуцированного апоптоза в популяциях Т-лимфоцитов зависит от структурной организации активатора. Различают S- и R-формы ЛПС. R-форма отличается отсутствием O-специфической области и высокой вариабельностью коровой части [5]. В отличие от S-формы, R-форма ЛПС индуцирует прямую активацию клеток через TLR-4 без участия промежуточных рецепторных комплексов и в большей степени обладает способностью индуцировать апоптоз Т-лимфоцитов [18].

Рецепторный комплекс CD14/TLR-4/MD-2 активно экспрессируется на поверхности гранулоцитов, макрофагов, моноцитов, дендритных клеток и В-лимфоцитов. Активация ЛПС культуры мононуклеарных клеток периферической крови человека приводила к запуску

неспецифических воспалительных реакций, в том числе, инициирующих апоптоз Т-клеток [14, 18]. В отношении В-лимфоцитов человека показано, что ЛПС-активированные В-клетки способны индуцировать апоптоз и анергию Т-лимфоцитов, не подвергавшихся воздействию данного активатора [24]. Подобные взаимодействия иммунокомпетентных клеток лежат в основе усиления апоптоза Т-лимфоцитов, наблюдаемого в *in vitro* модельных системах. Полученные нами результаты указывают на то, что в отсутствие кооперации иммунокомпетентных клеток ЛПС не индуцирует апоптоз изученных субпопуляций Т-лимфоцитов.

С учетом полученных результатов и данных литературы предполагается, что ЛПС является активатором, но не индуктором апоптоза изолированных субпопуляций эффекторных и наивных Тх и ЦТЛ. На наш взгляд, полученные результаты следует учитывать при *in vitro* моделировании инфекционных процессов с применением ЛПС.

Список литературы/References

1. Akashi S., Shimazu R., Ogata H., Nagai Y., Takeda K., Kimoto M., Miyake K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the Toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.*, 2000, vol. 164, no. 7, pp. 3471–3475.
2. Beutler B. TLR4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr. Opin. Immunol.*, 2000, vol. 12, no. 3, pp. 20–26.
3. Caramalho I., Lopes-Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. Regulatory T cells selectively express Toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 197, no. 4, pp. 403–411.
4. Crellin N.K., Garcia R.V., Hadisfar O., Allan S.E., Steiner T.S., Levings M.K. Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, no. 12, pp. 8051–8059.
5. Da Silva C.J., Soldau K., Christen U., Tobias P.S., Ulevitch R.J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 24, pp. 21129–21135.
6. Gelman A.E., Zhang J., Choi Y., Turka L.A. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+T cell survival. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 10, pp. 6065–6073.
7. Gonzalez-Navaias J.M., Fine S., Law J., Data S.K., Nguyen K.P., Yu M., Corr M., Katakura K., Eckman L., Lee J., Raz E. TLR4 signaling in effector CD4+ T cells regulates TCR activation and experimental colitis in mice. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, no. 2, pp. 570–581.
8. Gupta S., Gollapudi S. Susceptibility of naive and subsets of memory T cells to apoptosis via multiple signaling pathways. *Auto-immune Rev.*, 2007, vol. 6, no. 7, pp. 476–481.
9. Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartman G. Quantitative expression of toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.*, 2002, vol. 168, no. 9, pp. 4531–4537.
10. Kaisho T., Akira S. Dendritic-cell function in toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.*, 2001, vol. 22, no. 2, pp. 78–83.
11. Komai-Koma M., Jones L., Ogg G.S., Xu D., Liew F.Y. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 9, pp. 3029–3034.
12. Komai-Koma M., Gilchrist D.S., Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8+ T cells via TLR4 complex. *Eur. J. Immunol.*, 2009, vol. 39, no. 6, pp. 1564–1572.
13. Liew F.Y., Xu D., Brint E.K., O'Neill L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5, pp. 446–458.
14. Mburu S., Marnewick J.L., Abayomi A., Ipp H. Modulation of LPS-induced CD4+ T-cell activation and apoptosis by antioxidants in untreated asymptomatic HIV infected participants: an in vitro study. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, vol. 2013, 9 p. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3856122>.
15. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, vol. 388, no. 6640, pp. 394–397.
16. Muzio M., Polentarutti N., Bosisio D., Prahaldan M.K., Mantovani A. Toll-like receptor family (TLT) and signaling pathway. *Eur. Cytokine Netw.*, 2000, vol. 11, no. 3, pp. 489–490.

17. Nielsen J.S., Larsson A., Brix-Christensen V., Nvengaard J.R., Ledet T., Tonnesen E. Endotoxemia-induced lymphocyte apoptosis is augmented by a hyperinsulinemic-euglycemic clamp. *J. Anesthesiology*, 2005, vol. 102, no. 4, pp. 768–773.
18. Nielsen J.S., Larsson A., Ledet T., Turina M., Tonnesen E., Krog J. Rough-form lipopolysaccharide increases apoptosis in human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2011, vol. 75, pp. 193–202.
19. Perl M., Chung C.S., Swan R., Ayala A. Role of programmed cell death in the immunopathogenesis of sepsis. *Drug. Discov. Today Dis. Mech.*, 2007, vol. 4, no. 4, pp. 223–320.
20. Raetz C.R. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, vol. 59, pp. 129–170.
21. Schromm A.B., Lien E., Henneke P., Chow J.C., Yoshimura A., Heine H., Latz E., Monks B.G., Schwartz D.A., Miyake K., Golenbock D.T. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, no. 1, pp. 79–88.
22. Suttmuller R.P., den Brok M.H., Kramer M., Bennink E.J., Toonen L.W., Kullberg B.J., Joosten L.A., Akira S., Netea M.G., Adema G.J. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, 2006, vol. 116, no. 2, pp. 485–494.
23. Takeda K., Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, vol. 21, pp. 335–376.
24. Tian J., Zekzer D., Hanssen L., Lu Y., Olcott A., Kaufman D.L. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, no. 2, pp. 1081–1089.
25. Ulevitch R.J., Tobias P.S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, pp. 437–457.
26. Zarembek K.A., Godowski P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.*, 2002, vol. 168, no. 2, pp. 554–561.

Авторы:

Филатова Е.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Анисенкова Е.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Преснякова Н.Б., научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Неумоина Н.В., к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Сычева Т.Д., ординатор кафедры детских болезней ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия;

Уткин О.В., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, доцент кафедры микробиологии и иммунологии ГБОУ ВПО Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Filatova E.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Anisenkova E.V., Junior Researcher Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Presnyakova N.B., Researcher Scientist Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Neumoina N.V., PhD (Medicine), Medical Director, Clinic of Infectious Diseases of Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Sycheva T.D., Resident Physician, Department of Children Diseases of Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Utkin O.V., PhD (Biology), Head of Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Assistant Professor of the Department of Microbiology and Immunology of Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 19.06.2014
Отправлена на доработку 23.06.2014
Принята к печати 12.09.2014

Received 19.06.2014
Revision received 23.06.2014
Accepted 12.09.2014