Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медикобиологического агентства

На правах рукописи

МУРУГИНА НИНА ЕВГЕНЬЕВНА

КООПЕРАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА NOD1 И TLR4

3.2.7 – Аллергология и иммунология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Пащенков Михаил Владимирович

Москва, 2023 г.

оглавление

Список использованных сокращений 4
Введение5
Актуальность работы5
Задачи исследования б
Научная новизна7
Список статей по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых
журналах10
1.1 NOD-подобные рецепторы. Строение, функции, сигнальные пути.13
1.2. Toll-подобные рецепторы. Строение, функции, сигнальные пути17
1.3. Семейство факторов транскрипции NF-кВ и их регуляция 22
1.4. Описательные данные по кооперации NOD- и Toll-подобных
рецепторов
1.5. Возможные механизмы синергической кооперации NOD и Toll- подобных рецепторов
1.6. Метаболические изменения в клетке при активации NOD- и Toll-
подобных рецепторов
1.7. Клиническая значимость синергической кооперации NOD-TLR. 39
1.8. Резюме
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ
2.1. Реактивы, расходные материалы и оборудование
2.2. Использованные методы 55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 67
3.1. Продукция TNF при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR467
3.2. Экспрессия мРНК цитокинов и хемокинов при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4
3.3. Анализ кинетики ядерной транслокации NF-кB с помощью Вестерн-блоттинга75
3.4. Анализ ядерной транслокации NF-кВ р65 методом иммунофлюоресценции79

3.7. Взаимное влияние NOD1- и TLR4-зависимых сигнальных путей. 91

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 113

4.3. Роль факторов транскрипции NF-кВ в развитии синергического эффекта при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 115

4./. Заключение	
ВЫВОДЫ	
Список использованной литературы	

Список использованных сокращений

ДК – дендритные клетки

ИС – индекс синергизма

ЛПС – липополисахарид

МДП – мурамилдипептид

мезо-ДАП – мезо-диаминопимелиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

М-триДАП – N-ацетилмурамил-L-аланил-ү-D-глутамил-мезо-

диаминопимелиновая кислота

МФ – макрофаги

ПАМП – патоген-ассоциированный молекулярный паттерн

ПРР – паттерн-распознающий рецептор

IFN – interferon (интерферон)

ІКК – ІкВ kinase (І каппа В – киназа)

IL – interleukin (интерлейкин)

NCR – nucleus-to-cytoplasm ratio (отношение ядерной фракции к цитоплазматической)

NEMO – NF-кB essential modulator (основной модулятор NF-кB)

NF-кB – nuclear factor- кВ (ядерный фактор каппа В)

NOD – nucleotide-binding oligomerization domain (нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации)

NLR – NOD-like receptor (NOD-подобный рецептор)

TLR – Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор)

TNF – tumor necrosis factor (фактор некроза опухоли)

Введение

Актуальность работы

Детекция патогенов клетками врожденной иммунной системы основана на распознавании патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) паттерн-распознающими рецепторами (ПРР). При инфекционных заболеваниях иммунная система сталкивается не с одним ПАМП, а с набором различных ПАМП, которые распознаются разными рецепторами. Кооперация между рецепторами приводит к количественным и качественным изменениям суммарного ответа клеток.

Термином «синергизм» обозначают ситуации, когда эффект одновременной активации двух рецепторов больше, чем сумма эффектов активации каждого рецептора в отдельности. Синергическая индукция провоспалительных цитокинов и хемокинов комбинациями агонистов NODподобных и Toll-подобных рецепторов – двух крупных семейств ПРР – была описана во многих исследованиях, как in vitro, так и in vivo [1]. Однако механизмы кооперации ПРР остаются неясными.

Явление синергизма во врожденной иммунной системе может иметь двоякое значение. С одной стороны, неконтролируемая синергическая коопреация ПРР в ходе инфекций может приводить к развитию избыточной воспалительной реакции, лежащей в основе сепсиса, септического шока и других угрожающих жизни воспалительных заболеваний. С другой стороны, контролируемая синергическая кооперация рецепторов может быть использована терапевтически или профилактически для активации врожденной иммунной защиты.

Применяя низкие дозы двух синергически действующих агонистов, можно потенциально достичь того же защитного эффекта, что и при использовании высоких доз каждого отдельного агониста, что позволит снизить затраты на лечение и, возможно, обеспечит другие преимущества, такие как

расширение спектра защиты. Также, поскольку индукция адаптивного иммунного ответа зависит от активации врожденной иммунной системы, то явление синергизма при кооперации ПРР может быть положено в основу создания новых иммунологических адъювантов. Учитывая сказанное, изучение механизма взаимного влияния NOD- и Toll-подобных рецепторов является актуальной проблемой.

Рецепторы NOD1 и TLR4 являются ключевыми представителями семейств NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов, соответственно. Оба рецептора играют важную роль в распознавании грамотрицательных бактерий клетками врожденной иммунной системы: NOD1 узнает фрагменты пептидогликана, TLR4 – липополисахариды грамотрицательных бактерий. Учитывая значимость NOD1 и TLR4, эти рецепторы были выбраны в качестве модельных при изучении кооперации NOD-подобных и Toll-подобных рецепторов.

Таким образом, тема является актуальной и способствует использованию в иммунотерапии сепсиса и опухолей методов активации врожденной иммунной защиты при кооперации рецепторов NOD1и TLR4.

Цель исследования

Изучить биологические эффекты, возникающие при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4, на модели макрофагов человека.

Задачи исследования

- 1. Изучить продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4
- Изучить экспрессию генов, кодирующих цитокины, хемокины и внутриклеточные сигнальные молекулы, при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.

- 3. Изучить активациию NF-кВ-зависимого, МАП-киназного, Akt-зависимого сигнальных путей в макрофагах при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.
- 4. Изучить кинетику активации гликолиза в макрофагах при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.
- 5. С помощью ингибиторного анализа изучить вклад отдельных сигнальных путей и цитокинов в развитие синергического эффекта при сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.
- 6. Оценить противоопухолевую активность макрофагов, активированных агонистами NOD1, TLR4 и их сочетанием.

Научная новизна

Получены новые знания о механизмах кооперации рецепторов NOD1 и TLR4. Впервые изучены несколько последовательных стадий активации макрофагов человека под действием агонистов NOD1, TLR4 и их сочетания: активация сигнальных путей, активация гликолиза, деградация ингибиторных белков IкB и транслокация белков NF-кB в ядро, экспрессия генов цитокинов, хемокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов.

Впервые показано, что разные виды биологических ответов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 могут усиливаться как синергически, так И несинергически. Так, сигнальные пути, вплоть до поступления активационного сигнала в ядро, а также процессы, не требующие активации транскрипции (усиление гликолиза) при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 активируются несинергическим образом. Однако на выходе из ядра имеет место синергическое усиление экспрессии мРНК ряда провоспалительных цитокинов (TNF, IL6, IL23A, IL12B и др.). Этот синергический эффект развивается между 1 и 4 ч после начала стимуляции. При этом экспрессия ряда других генов иммунного ответа (NFKBIA, TNFAIP3 и др.) меняется несинергическим образом.

Таким образом, впервые установлены сроки развития и масштабы синергического эффекта. Впервые показано, что активация NF-кВ- и p38зависимого сигнальных путей недостаточна для развития синергического эффекта. Исключена роль аутокринных механизмов с участием цитокинов в развитии синергизма NOD1-TLR4. Впервые продемонстрировано, что комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным индуктором противоопухолевей активности макрофагов in vitro, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

Теоретическая значимость

В настоящей работе было изучено несколько этапов активации макрофагов при раздельной и сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4: передача сигнала от рецепторов в ядро, экспрессия генов цитокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов, перестройка клеточного метаболизма, активация противоопухолевых эффекторных механизмов.

Результаты работы раскрывают некоторые фундаментальные механизмы активации клеток врожденной иммунной системы под действием сочетания агонистов ПРР. Охарактеризованы этапы и сроки развития синергических эффектов, их место среди всех активационных процессов в клетке. Эти результаты могут иметь значения для понимания патогенеза сепсиса и других инфекционных заболеваний, связанных с избыточным воспалительным ответом.

В данной работе, при исследовании активности комбинации агонистов NOD1 и TLR4 впервые показано, что данная комбинация агонистов эффективно перепрограммирует активность макрофагов человека с проопухолевой на противоопухолевую, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

В диссертационной работе изучены новые аспекты противоопухолевой активности макрофагов, активированных комбинацией агонистов NOD1 и TLR4, по отношению к опухолевой клеточной линии K562: противоопухолевые эффекты макрофагов реализуются через TNF и другие растворимые и мембрано-ассоциированные молекулы, одним из компонентов противоопухолевой активности макрофагов является антипролиферативный эффект.

Научно-практическая значимость

Научно-практическую ценность представляют разработанные И оптимизированные методические модели, представленные в данной работе. На модели совместной активации рецепторов NOD1 и TLR4 продемонстрирована возможность активации макрофагов с использованием сочетания более низких доз агонистов. С практической точки зрения, полученные результаты работы использованы разработки комбинированных могут быть для иммуностимуляторов микробной природы.

При помощи ингибиторного анализа показана возможность отмены синергической продукции провоспалительных цитокинов при ингибировании NOD1 и его проксимального адаптора RIP2. Эти данные могут быть использованы для разработки новых препаратов для терапии сепсиса и других инфекционных заболеваний, связанных с избыточным воспалительным ответом.

B культивирования макрофагов модели совместного И клеток эритромиелолейкозной линии К562 человеческой разработана методика опухолевых подавления роста клеток путем сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4. Сочетание агонистов рецепторов NOD1 и TLR4 может рассматриваться в качестве кандидатного противоопухолевого препарата.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, 31 рисунок. Диссертация включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список использованных источников». Список литературы содержит 208 работ отечественных и зарубежных авторов.

Список статей по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых журналах

 Pashenkov, M.V., Synergistic interactions between NOD receptors and Toll-like receptors: mechanisms and clinical implications / M.V. Pashenkov, N.E.
Murugina, A.S. Budikhina, B.V. Pinegin // Journal of Leukocyte Biology. – 2019. – Vol.105. – Sup.4. – P.669-680.

2. **Муругина, Н.Е.**, Метаболическое репрограммирование макрофагов при их активации агонистом рецептора NOD1 / **Н.Е.Муругина**, Л.С.Балясова, А.С. Будихина, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2019. – т.40 - №1. – С.5-14.

3. **Муругина, Н.Е.**, Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета: транскрипционные и метаболические аспекты / **Н.Е. Муругина**, А.С. Будихина, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, Л.С. Балясова, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2019. – т.40. - №2. – С.9-16.

4. Будихина, А.С., О роли гликолиза в продукции провоспалительных цитокинов макрофагами / А.С. Будихина, **Н.Е. Муругина**, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, А.М. Николаева, Л.С. Балясова, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2019. – т.40. -№5. – С.11-22.

5. Муругина, Н.Е., Синергическое взаимодействие рецепторов NOD1 и TLR4 врожденного иммунитета / Н.Е. Муругина, А.С. Будихина, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, Л.С. Балясова, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В.

Пинегин, М.В. Пащенков // Российский иммунологический журнал. – 2019. – т.13. - №2-2. – С.858-860.

6. Пащенков, М.В., Метаболическое репрограммирование макрофагов, активированных агонистом рецептора NOD1 / М.В. Пащенков, **Н.Е. Муругина**, Л.С. Балясова, А.С. Будихина, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В. Пинегин // Российский иммунологический журнал. – 2019. –т.13. - №2-2. – С.891-893.

7. **Murugina, N.E.**, Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No association with proinflammatory cytokine production in normoxia / **N.E. Murugina**, A.S. Budikhina, Y.A. Dagil, P.V. Maximchik, L.S. Balyasova, V.V. Murugin, M.V. Melnikov, V.S. Sharova, A.M. Nikolaeva, G.Z. Chkadua, B.V. Pinegin, M.V. Pashenkov // Journal of Biological Chemistry. – 2020. – Vol.295. – Sup.10. – P.3099-3114.

8. Будихина, А.С., Аэробный гликолиз не играет незаменимой роли в продукции провоспалительных цитокинов дендритными клетками / А.С. Будихина, **Н.Е. Муругина**, П.В. Максимчик, Ю.А. Дагиль, М.В. Мельников, Л.С. Балясова, В.В. Муругин, Г.З. Чкадуа, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2020. – т.41 - №1 – С.31-41.

9. **Муругина, Н.Е.**, Роль NF-кВ в развитии синергического ответа макрофагов человека на сочетанную стимуляцию рецепторов NOD1 и TLR4 in vitro / **Н.Е. Муругина**, А.С. Будихина, В.В. Муругин, Е.М. Селезнёва, Г.З. Чкадуа, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2020. – т.41. - №2. – С.114-123.

10. Budikhina, A.S., Interplay between NOD1 and TLR4 receptors in macrophages: Nonsynergistic activation of signaling pathways results in synergistic induction of proinflammatory gene expression / A.S. Budikhina, **N.E. Murugina**, P.V. Maximchik, Y.A. Dagil, A.M. Nikolaeva, L.S. Balyasova, V.V. Murugin, E.M. Selezneva, Y.G. Pashchenkova, G.Z. Chkadua, B.V. Pinegin, M.V. Pashenkov // Journal of Immunology. – 2021. – Vol.206. – Sup.9. – P.2206-2220.

11. Муругина, Н.Е., Противоопухолевая активность макрофагов, активированных агонистами рецепторов NOD1 и TLR4 in vitro / H.E.

Муругина, В.В. Муругин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2022. – т.43. - №5. – С.548-557. 12.3(5): 548-557.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Врожденная иммунная система распознает патогены с помощью паттернраспознающих рецепторов (ПРР). К основным семействам ПРР относят Tollподобные рецепторы (Toll-like receptors [TLR]), NOD-подобные рецепторы (NOD-like receptors [NLR]), лектин-подобные рецепторы С-типа (C-type-lectinlike receptors [CLR]), RIG-подобные рецепторы (RIG-like receptors [RLR]) и цитозольные сенсоры ДНК [2, 3]. В данной работе мы рассматриваем кооперацию рецепторов NOD1 и TLR4, являющихся представителями двух семейств ПРР – NLR и TLR. Оба рецептора участвуют в распознавании грамотрицательных бактерий.

1.1 NOD-подобные рецепторы. Строение, функции, сигнальные пути.

Рецепторы NOD1 и близкий ему рецептор NOD2 (от англ. nucleotidebinding oligomerization domain-containing protein - белок, содержащий нуклеотид-связывающий домен олигомеризации) относятся к семейству NODподобных рецепторов (NOD-like receptors, NLR). Семейство NLR состоит из 4 подсемейств: NLRA, NLRB, NLRC и NLRP. Рецепторы NOD1 и NOD2 относятся к подсемейству NLRC.

Ген *NOD1* расположен на хромосоме 7p14 [4], ген *NOD2* – на хромосоме 16q12.1 [5]. Белки NOD1 и NOD2 состоят, соответственно, из 951 и 1040 аминокислотных остатков. Оба рецептора NOD1 и NOD2 имеют трехдоменную структуру и состоят из C-концевого домена LRR (leucine-rich repeats), центрального домена NACHT (<u>NA</u>IP - NLP family apoptosis inhibitor protein, <u>C</u>IITA - C2TA или MHC class II transcription activator, <u>H</u>ET-E - (incompatibility locus protein from *Podospora anserina* и <u>T</u>EP1 - TP1 или telomerase-associated protein) и N-концевого домена CARD (caspase activation and recruitment domain) [6]. NOD1 и NOD2 различаются тем, что содержат одну или две копии домена CARD, соответственно [7]. CARD-домен участвует в передаче сигнала адапторным белкам посредством гомофильных и гетерофильных белковых взаимодействий, NACHT-домен обеспечивает олигомеризацию и активацию рецептора, LRR-домен участвует в распознавании лиганда и играет ауторегулирующую роль [8]. LRR-домены рецепторов NOD1 и NOD2 состоят, соответственно, из 10 и 6 повторяющихся LRR-мотивов [7].

NOD1 и NOD2 участвуют в защите против микробных инфекций, регуляции воспалительного процесса и апоптоза. Рецептор NOD1 участвует в формировании врожденного и адаптивного иммунного ответа на бактериальные[9], протозойные инфекции [10], может усиливать аутофагию для удаления поврежденных органелл и защиты клеток [11]. Имеются данные, что сигнализация через рецептор NOD1 участвует в инсулинорезистентности адипоцитов млекопитающих [12].

Как и другие представители семейства NLR, NOD1 и NOD2 располагаются в цитозоле клеток [13]. Рецептор NOD1 экспрессируется внутриклеточно в большинстве типов клеток: в макрофагах, миелоидных дендритных клетках, В-клетках, $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетках, естественных киллерах, $\gamma\delta$ -Т-клетках, нейтрофилах, адипоцитах, клетках гладких и скелетных мышц, а также в тромбоцитах. Однако преимущественно он экспрессируется эпителиальными клетками и в эпителии кишечного тракта [13]. Белок NOD2 в основном присутствует в цитозоле моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и эпителии кишечного тракта [14].

Рецепторы NOD1 и NOD2 распознают мурамилпептиды – мономерные фрагменты пептидогликана бактерий. NOD1 распознает мурамилпептиды только грамотрицательных бактерий, содержащие остаток мезодиаминопимелиновой кислоты (meso-DAP) или её близкие стерические аналоги, такие мезолантионин [15, 16]. Минимальной единицей, как эффективно распознающейся рецептором NOD1, является дипептид D-isoGlumeso-DAP (iE-DAP) [17]. Это консервативный фрагмент пептидогликана, общий почти для всех грамотрицательных и некоторых грамположительных

бактерий, таких как *Bacillus subtilis* и *Listeria monocytogenes* [17, 18]. Одним из наиболее мощных агонистов человеческого NOD1-рецептора является N-ацетилмурамил-L-аланил-γ-D-глутамил-мезо-диаминопимелиновая кислота (М-триДАП) [19]. NOD2 является общим сенсором пептидогликана благодаря распознаванию мурамилдипептида (MDP) – минимального биоактивного фрагмента пептидогликана, общего для всех бактерий. [20].

В отсутствие лигандов молекулы NOD1 и NOD2 имеют свернутую конформацию, при этом LRR домен «прикрывает» NACHT- и CARD-домены, предотвращая передачу сигнала [21, 22, 23]. Связывание мурамилпептидов с LRR-доменом NOD-рецептора (рис. 1) приводит к олигомеризации NODпосредством ИХ NACHТ-доменов. Затем CARD-домены рецепторов олигомеризованных белков NOD гомофильно взаимодействуют с CARDдоменами молекул адаптерного белка RIP2 (receptor-interacting-serine/threonineprotein kinase 2), что делает приводит к сближению молекул RIP2 [24]. Такая индуцируемая близость необходима для связывания RIP2 с белками TRIP и XIAP, что приводит к К63-полиубиквитинированию RIP2 в пределах его киназного домена убиквитиновыми лигазами ЕЗ [25]. К63 также осуществляет полиубиквитинирование белка NEMO (NF- κ B essential modulator, он же IKK γ). NEMO является регуляторной субъединицей комплекса IKK (ІкВ-киназа). Полиубиквитинирование белка NEMO необходимо для привлечения киназы TAK1 к комплексу ІКК. В результате киназа ТАК1 сближается с каталитической субъединицей ІККВ и фосфорилирует ее. Происходит активация всего комплекса IKK, который далее фосфорилирует ингибиторные белки ІкВ. В результате фосфорилирования белки ІкВ становятся мишенью для К47-убиквитинирования (присоединения цепей убиквитина, соединенных через лизин-47). Убиквитинированные таким образом белки ІкВ подвергаются деградации в протеасоме [26]. Это приводит к высвобождению факторов транскрипции NF-кВ и их транслокации в ядро [27], где они индуцируют

транскрипцию большого числа генов иммунного ответа, включая гены цитокинов, хемокинов и антибактериальных пептидов [13, 28].



Рисунок 1. Передача активационного сигнала через NOD1 - рецептор. Описание в тексте. Обозначения: LRR, NACHT, CARD – домены NOD1-рецептора, CARD, Kinase domain – домены RIP2, NEMO-IKKα-IKKβ – субъединицы сигнального комплекса IKK, p50-p65/c-REL – структурные компоненты NF-кB. Ub – убиквитин, МП - мурамилпептид.

В дополнение к активации NF-кВ, сигнализация через рецептор NOD1 приводит к активации MAPK-зависимых (mitogen-activated protein kinase) сигнальных путей [25, 29], результатом чего является активация факторов транскрипции семейства AP-1 (activator protein-1) [30]. В одной работе сообщается также, что NOD1 обладает способностью инициировать продукцию интерферонов (IFN) I типа [31]. Этот путь начинается со связывания адаптера RIP2 с TRAF3 – ключевым фактором в индукции интерферонов I типа. Затем

следует активация TANK-связывающей киназы 1 (ТВК1) и/или родственной ей ΙΚΚε, киназы которые активируют транскрипционные факторы IFNрегуляторный фактор 3 (IRF3) и IRF7. Последние активируют транскрипцию генов IFN I типа (в случае макрофагов речь идет в первую очередь о гене IFNB1, кодирующем IFN-β). IFN-β, высвобождаясь клеткой, связывается с IFNαβ-рецептором на той же или соседних клеток, что приводит к активации фактора транскрипции ISGF3 (interferon-stimulated genes transcription factor 3). ISGF3 активирует экспрессию генов хемокинов, генов противовирусной защиты и ряда других IFN-индуцибельных генов. К их числу относится и ген IRF7, что может приводить к усилению продукции IFN I типа [32].

1.2. Toll-подобные рецепторы. Строение, функции, сигнальные пути

Toll-подобные рецепторы (TLR) – мембраносвязанные белки, играющие ключевую роль в распознавании липидов, углеводов, пептидов и нуклеиновых кислот различных групп микроорганизмов. TLR делятся на две группы в зависимости от их клеточной локализации. Группа, которая экспрессируется на поверхности клеток, включает TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10. Другая группа состоит из TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 и TLR9, которые экспрессируются на внутриклеточных везикулах, таких как эндоплазматический ретикулум, эндосомы, лизосомы и эндолизосомы [33]. TLR4 является единственным TLR, который присутствует как на поверхности клеток, так и в эндосомах [34]. TLR4 экспрессируется, главным образом, в клетках миелоидного происхождения, макрофаги, TLR4 таких как моноциты, гранулоциты [35]. Также экспрессируется клетками кишечного эпителия, эндотелия, адипоцитами, хондроцитами, остеобластами и синовиоцитами [36].

ТLR4 играет ведущую роль в распознавании грамотрицательных бактерий. В качестве основного лиганда для TLR4 выступает липополисахарид (ЛПС). ЛПС – гликолипид, состоящий из гидрофобной порции (липида A), корового олигосахарида и дистального полисахарида (О-антигена) [37]. Было

показано, что TLR4 также участвует в распознавании различных эндогенных лигандов, высвобождающихся в результате клеточного стресса или некроза, которые включают белки теплового шока, главным образом HSP60 и HSP70, фибронектины, фрагменты гиалуроновой кислоты, гепарансульфат и в несколько меньшей степени фибриноген [38].

Толл-подобный рецептор 4 (TLR4) представляет собой трансмембранный белок I типа. Он образован 839 аминокислотными остатками и кодируется геном, расположенным на 9 хромосоме, в локусе q32-q33 [39]. В строении всех Toll-подобных рецепторов выделяют три части: 1) внеклеточный, обогащенный лейцином, N-концевой LRR-домен, который взаимодействует с лигандами, 2) трансмембранный домен, 3) внутриклеточный С-концевой домен Toll / IL-1R (TIR) [40]. Также в состав рецепторного комплекса TLR4 входит корецептор CD14 и вспомогательный белок MD-2. После лиганд-индуцированной активации TLR образуют гомо- и гетеродимеры (в случае TLR4 – гомодимеры). Тогда два внеклеточных домена приобретает m-образную конфигурацию с N-концами, простирающимися в противоположных направлениях, и C-концами, сходящимися в средней области (рис. 2) [40].

Стимуляция Toll-подобных рецепторов различными микробными компонентами, т.е. ПАМП, запускает экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе [41]. Как отмечено выше, основным микробным агонистом TLR4 является ЛПС. Высвобождаясь из клеточной стенки, ЛПС вначале связывается с сывороточным ЛПС-связывающим белком, который разрушает мицеллы ЛПС и облегчает связывание ЛПС с молекулой CD14. CD14 «передает» ЛПС на белок MD-2 (myeloid differentiation factor-2), после чего MD-2 в комплексе с ЛПС связывается с внеклеточным LRR-доменом TLR4 [42].

В отличие от других TLR, TLR4 активирует два различных сигнальных пути после своей димеризации. Оба пути имеют общую структурную единицу –



Рисунок 2. Строение Toll-подобных рецепторов, структурная модель проксимальной части пути передачи сигнала через Toll-подобный рецептор. Обозначения: DD, домен смерти; IRAK, киназа, ассоциированная с рецептором интерлейкина-1 (IL-1R); MyD88, ген первичного ответа миелоидной дифференцировки 88; TLR, Toll-подобный рецептор. По J.Napetching et al. [40].

цитоплазматический TIR-домен рецептора и, следовательно, используют перекрывающиеся компоненты для последующей передачи сигналов [43].

TLR4 Активация липополисахаридом приводит к начальному привлечению адаптерных белков TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) или TRAM (TRIF-related adaptor molecule) [44, 45]. Считается, что эти белки действуют как «мостики» для привлечения к рецептору главных адаптерных белков – MyD88 TRIF, соответственно, И ЧТО приводит К запуску, соответственно, MyD88-зависимого и MyD88-независимого сигнальных путей (рис. 3).

После связывания лиганда с внеклеточным доменом внутриклеточные домены TIR оказываются в непосредственной близости друг от друга и могут участвовать в гомотипическом взаимодействии. Это создает платформу начального уровня, на которой другие молекулы адапторов, содержащие домен TIR, могут собираться и олигомеризоваться. В рамках MyD88-зависимого сигнального пути TIR-домен TLR4 при участии TIR-домена белка TIRAP взаимодействует с TIR-доменом белка MyD88, который помимо TIR-домена включает также домен смерти (DD - death domain). DD-домен MyD88 белков DD-доменами семейства IL-1-рецепторсвязывается с ИЗ ассоциированной киназы (IRAK - interleukin-1 receptor associated kinase), а именно IRAK1/2 [46] и IRAK4 [47]. МуD88 и IRAK собираются в большой олигомерный комплекс, называемый миддосомой, который стабилизируется за счет взаимодействия консервативных N-концевых доменов смерти (DD) белков IRAK и MyD88 (рис. 2,3) [40].

IRAK1 участвует в фосфорилировании и активации рецептор– ассоциированного фактора 6 фактора некроза опухоли (TRAF6). После фосфорилирования TRAF6 приобретает убиквитин-лигазную активность (E3). Убиквитин-лигаза TRAF6 присоединяет К63-связанную полиубиквитиновую цепь к белку IKKγ (NEMO), в результате чего происходит привлечение убиквитин-зависимой киназы TAK1 к киназному комплексу IKK, активация комплекса IKK и миграция факторов транскрипции NF-кВ в ядро по механизму, подробно описанному для NOD-рецепторов [48, 49, 50].

Киназа ТАК1 является также МАП-киназой третьего уровня (МАРККК), вследствие чего она активирует МАП-киназный каскад. Активированная ТАК-1 фосфорилирует МАП-киназы 2-го уровня МКК3, МКК6, МКК4 и МКК7, а те, в свою очередь – МАП-киназы 1-го уровня р38 и JNK [48]. МАП-киназы активируют ряд факторов транскрипции и через них – экспрессию генов, а также



Рисунок 3. МуD88-зависимый и МуD88-независимый пути, активируемые рецептором TLR4. Подробное описание – см. в тексте.

оказывают ряд эффектов, не связанных с транскрипцией, в частности участвуют в стабилизации мРНК и активации трансляции [51].

TLR4 уникален среди рецепторов распознавания патогенов в том, что он инициирует различные пути активации в различных клеточных локациях. После взаимодействия с лигандом TLR4 интернализуется в ранние эндосомы, где использует вместо MyD88 другой адаптор – TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-beta) [36, 44, 45]. Как отмечено выше, TRIF взаимодействует с TIR-доменом TLR4 при посредстве мостикового адаптера TRAM. TRIF содержит мотив RHIM, позволяющий TRIF взаимодействовать с RIP1 RIP3. белками И За ЭТИМ следует пеллино1-опосредованное RIP1, полиубиквитинирование позволяющее осуществлять TAK/IKKиндуцированную активацию NFкB. Кроме того, через адаптер TRIF запускается сигнальная цепочка TRIF – TRAF3 – TBK1/IKKє – IRF3, которая приводит к активации экспрессии IFN-β (рис. 3) [44]. Также TLR4 и другой TRIFзависимый рецептор, TLR3, могут вызывать некроптоз [28].

1.3. Семейство факторов транскрипции NF-кВ и их регуляция

Пути передачи сигнала через NOD- и Toll-подобные рецепторы имеют общие структурные компоненты. Так, MyD88-зависимый путь активации Toll-подобных рецепторов посредством убиквитин-лигазы TRAF6 присоединяет K63-связанную полиубиквитиновую цепь к белку NEMO (IKKγ), а активация сигнального пути, инициированного через NOD-рецептор приводит к K63-связанному полиубиквитинированию NEMO, которое инициируется через RIP2. Таким образом, пути активации NOD- и Toll-подобных рецепторов сходятся на уровне NEMO. Далее происходит высвобождение и транслокация в ядро факторов транскрипции NF-кВ [13, 28]. Транскрипционные факторы NF-кВ регулируют экспрессию генов иммунного ответа, индуцированную стимуляцией NOD- и Toll-подобных рецепторов [52, 53].

Семейство NF-кВ представлено 5 белками и их предшественниками: RelA (или p65), RelB, c-Rel, NF-кB1 (или p50 и его предшественник p105) и NF-кB2 (p52 и его предшественник p100) [54]. Все белки семейства NF-кВ характеризуются наличием Rel-гомологичного домена, который необходим для связывания с ДНК [55].

В неактивном состоянии белки семейства NF-кВ находятся в цитоплазме в виде гомо- и гетеродимеров, ассоциированных с ингибиторными белками семейства ІкВ [56, 57, 58, 59]. Белки ІкВ обладают определенной селективностью по отношению к конкретным белкам NF-кB; в частности, ІкВа связывает наиболее распространенные димеры р65:р50, тогда как ІкВє предпочитает димеры p65:p65 и p65:c-Rel [60]. Белки семейства ІкВ характеризуются наличием В ИХ структуре анкириновых повторов, необходимых для взаимодействия с димерами NF-кВ и ингибирования их транслокации в ядро. В рамках канонического пути активации NF-кВ происходит фосфорилирование ІкВ киназным комплексом ІКК (ІкВ киназа). В результате фосфорилирования белки ІкВ становятся мишенью для К47убиквитинирования, то есть присоединения цепей убиквитина, соединенных через лизин-47. Убиквитинированные таким образом белки ІкВ подвергаются деградации в протеасоме [49]. Протеасомная деградация ІкВ является предпосылкой для ядерной транслокации NF-кВ [61], где они связываются с промоторами генов иммунного ответа, в частности цитокинов (медиаторов воспаления). В результате этого запускается транскрипция мРНК и далее синтез соответствующих белков, обеспечивающих врожденный иммунный ответ [57].

В случае неканонического пути активации NF-кВ сигнал передается через NIK и IKKα, независимо от NEMO. Неканонические стимулы запускают TRAF2-зависимую активацию cIAP1–cIAP2, что, в свою очередь, приводит к протеасомной деградации TRAF3; это нарушает комплекс cIAP–TRAF, снижающий деградацию NIK и приводящий к накоплению NIK [62]. После активации NIK активирует IKKA путем фосфорилирования остатков Ser и Thr в петле активации между поддоменами VII и VIII домена киназы.Сверхэкспрессия NIK приводит к канонической активации NFkB [62].

Процесс транслокации NF-кВ в ядро носит колебательный характер. Колебания уровней NF-кВ в ядре в значительной степени обусловлены отрицательной обратной связью со стороны ингибирующих NF-кВ белков. [63, 64]. Ингибирующие белки IкВа быстро ресинтезируется за счет повышенной транскрипции гена *NFKBIA*, который сам является NF-кВ-индуцибельным [65]. Вновь синтезированный IкВа транспортируется в ядро, где связывается с белками NF-кВ, способствуя их диссоциации от промоторов и экспорту из ядра [65, 66]. Таким образом, IкВа облегчает прекращение передачи сигналов NFкВ. Другим негативным регулятором пути NF-кВ является деубиквитиназа A20 (кодируемая геном *TNFAIP3*, который также является NF-кВ-индуцибельным) [67]. A20 удаляет активирующие K63-связанные полиубиквитиновые цепи из различных сигнальных белков, включая IKK γ , и помогает прекратить NOD- и TLR-зависимую активацию NF-кВ [68, 69, 70].

1.4. Описательные данные по кооперации NOD- и Toll-подобных рецепторов

При взаимодействии с клетками врожденного иммунитета патогены обычно активируют несколько ПРР, которые могут взаимодействовать друг с другом синергически, антагонистически или иным образом [71]. Кооперация ПРР формирует врожденный иммунный ответ. Кооперация между NOD- и Toll-подобными рецепторами может носить как позитивный, так и негативный характер. Синергизм – такой тип кооперации, при котором ответ на сочетанную стимуляцию двух рецепторов выше, чем сумма ответов на стимуляцию каждого рецептора по отдельности [72, 73]. Если суммарная реакция равна или меньше суммы реакций на отдельные стимулы, то речь идет, соответственно, об аддитивной или инфрааддитивной кооперации. Потенцирование - это вид кооперации, при котором первый стимул сам по себе не вызывает реакции, но усиливает реакцию на второй стимул. Прайминг, или сенсибилизация, относится к ситуациям, когда стимул 1 усиливает реакцию на стимул 2,

который воздействует в более поздний момент времени (последовательная стимуляция). Отрицательная кооперация представлена антагонизмом (т. е. стимул 1 снижает реакцию на одновременно применяемый стимул 2) и перекрестной толерантностью (т. е. предварительная обработка стимулом 1 подавляет реакцию на стимул 2, применяемый позже). Результатом кооперации ПРР является изменение количества продукции растворимых ИЛИ мембраносвязанных белков (таких как цитокины, ко-стимулирующие молекулы или антимикробные пептиды), увеличение выраженности антимикробной защиты. Механизмы развития эффекта синергизма могут быть связаны с изменением экспрессии паттерн распознающих рецепторов, регуляцией путей клетки, активацией транскрипции передачи сигнала внутри генов, посттранскрипционными изменениями [74].

1.4.1. Совместная экспрессия NOD- и Toll-подобных рецепторов

Поскольку NOD- и Toll-подобные рецепторы располагаются в разных компартментах клетки (NOD - в цитозоле, TLR4, в основном, на поверхностных/эндосомальных мембранах), их физический контакт вряд ли возможен. Под «кооперацией» рецепторов в данном случае понимается взаимодействие на уровне эффектов. Чтобы влиять на эффекты друг друга, NOD- и Toll-подобные рецепторы должны в идеале экспрессироваться в одной и той же клетке, хотя возможны и непрямые взаимодействия через паракринно действующие цитокины. Коэкспрессия NOD1 и/или NOD2 с различными TLR была продемонстрирована в различных типах клеток, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки, эпителиальные клетки и моноцитарные клеточные линии [75, 76, 77, 78].

1.4.2. Эффекты сочетанной стимуляции NOD- и Toll-подобных рецепторов in vitro

Синергическая индукция провоспалительных цитокинов и хемокинов различными комбинациями агонистов NOD- и Toll-подобных рецепторов была описана во многих исследованиях, как in vitro, так и in vivo. При стимуляции мононуклеарных клеток крови человека агонистами рецепторов NOD1 (М-триДАП) или NOD2 (МДП или M-triLYS) совместно с агонистами TLR1/2 (Pam₃CSK₄) или TLR4 (ЛПС) наблюдается синергическое увеличение продукции цитокинов, таких как TNF, IL-1β, IL-6, IL-8 и IL-10 [72, 73, 79, 80]. Агонист рецептора NOD1 (М-триДАП) также способен к синергической кооперации с агонистами TLR5 (флагеллин) и TLR7/8 (R-848) [72]. Сообщалось также о синергической кооперации МДП с агонистом TLR3 (poly-I:C), но не с флагеллином [79]. Что касается кооперации рецепторав NOD2-TLR9, то сообщалось как о синергизме между этими двумя рецепторами [72], так и об отсутствии такового [79].

Синергическое влияние агонистов NOD1 или NOD2 в комбинации с агонистами TLR2 или TLR4 на продукцию цитокинов показано также на моделях дендритных клеток человека и мыши, а также макрофагов мыши [53, 73, 75, 81, 82]. В нескольких исследованиях сообщалось, что агонисты рецепторов NOD1 или NOD2 потенциируют определенные TLRиндуцированные ответы дендритных клеток, хотя сами по себе не вызывают таких ответов [53, 75, 83, 84]: например, МДП и FK-156 (агонист NOD1) не индуцируют продукцию IL-12p70 дендритными клетками, но потенцируют продукцию IL-12p70, вызванную агонистами TLR4, такими как ЛПС или липид A [75].

Что касается маркеров созревания дендритных клеток, Кіт и др. (2007) сообщили о синергической индукции CD80, CD83, CD86 и MHC II класса при действии комбинации агонистов рецепторов NOD2 и TLR2 в дендритных

клетках человека [85]. В исследовании Тухватулина и др. (2016) было выявлено аддитивное, а не синергическое увеличение экспрессии CD80, CD86 и MHC II класса в мышиных дендритных клетках костно-мозгового происхождения, обработанных мурамилдипептидом и монофосфорилированным липидом А (MPLA - агонист TLR4) [53]. В исследовании Tada et al. (2005) экспрессия CD40, CD80 и CD86 человеческими дендритными клетками при действии агонистов рецепторов NOD1 или NOD2 одновременно с различными агонистами Toll-подобных рецепторов увеличивалась инфра-аддитивно [75]. Неясно, в какой степени расхождения между этими результатами обусловлены различиями в методах исследований, сроках инкубации и других (неучтенных) факторах. Кроме того, совместная стимуляция StLTA (staphylococcal bacterial lipoteichoic acid, агонист TLR2) и МДП приводила к ослаблению эндоцитарой емкости дендритных клеток, повышению экспрессии DEC-205, антигена, связанного с активацией дендритных клеток и снижению экспрессии CD206, увеличению способности дендритных клеток к миграции, продукции NO, аутофагии, что является типичными признаками созревания клеток [85].

В линии моноцитоидных клеток THP-1 человека, комбинация агонистов рецепторов NOD1 и TLR5 (пептид C12-iE-DAP и CBLB502, соответственно) синергически индуцирует продукцию IL-1β, IL-8, MIP-1α, MIP-1β и TNF [86]. Аналогично, агонисты рецепторов NOD1 или NOD2 в комбинации с агонистами TLR2, TLR4 или TLR9 синергически индуцируют экспрессию и продукцию IL-8 [87].

Стимуляция клеток линии THP-1 комбинацией агонистов NOD2 и TLR4 вызывает более широкий транскрипционный ответ, чем каждый агонист в отдельности. МДП сам по себе индуцирует экспрессию небольшого числа генов в клетках THP-1, но потенцирует экспрессию TLR4-индуцированных генов [53]. При действии на дендритные клетки и макрофаги мыши парных сочетаний агонистов TLR4, TLR9 и NOD2 происходит синергическая активация

транскрипции генов интерферонов и провоспалительных цитокинов (*TNF* и *IL6*) [81, 88].

Помимо моноцитов, дендритных клеток и макрофагов, упомянутых выше, многие другие типы клеток, которые участвуют во врожденных иммунных реакциях, могут синергически реагировать на агонисты NOD- и Tollподобных рецепторов. Так, в эпителиальных клетках полости рта ни агонисты рецепторов NOD1/2, ни агонисты Toll-подобных рецепторов, сами по себе или в комбинации, не индуцируют продукцию цитокинов или хемокинов [89]. Однако как агонист рецептора NOD1 (FK-156), так и агонист рецептора NOD2 (МДП) в сочетании с различными агонистами Toll-подобных рецепторов, прямой индуцируют продукцию пептидов и белков с синергически антимикробной активностью, таких как human β-defensin 2 и PGRP-1α [89]. В линиях эпителиальных клеток предстательной железы человека кооперация агонистов рецепторов NOD1 и NOD2 с агонистами TLR2 и TLR4, приводит к синергической индукции продукции IL-6 и IL-8 [90].

1.4.3. Эффекты сочетанной стимуляции NOD- и Toll-подобных рецепторов in vivo

Комбинированная стимуляция рецепторов NOD и TLR in vivo имеет как локальные, органоспецифичные, так и системные эффекты. Так, совместное введение МДП вместе с низкой дозой ЛПС крысам или мышам, значительно усиливает индуцированное ЛПС высвобождение цитокинов, повреждение органов и летальность [91, 92]. Мощным инструментом для изучения кооперации NOD- и Toll-подобных рецепторов in vivo являются мыши, несущие репортерный ген люциферазы под NF-кB-индуцибельным промотором [93]. Одновременное подкожное введение мышам липофильного агониста рецептора NOD1 (C12-iE - DAP) и агониста TLR5 (пептид CBLB502) приводит к синергическому увеличению NF-кB-зависимой люциферазной активности в тонком и толстом кишечнике. В почках и легких эффекты двух агонистов

просто суммируются, тогда как в печени и селезенке их комбинация не более эффективна, чем действие одного агониста TLR5 [86]. Причина различных исходов при кооперации рецепторов NOD1 и TLR5 в различных органах одного и того же животного остается неясной. В согласии с синергическим усилением люциферазной активности, в тонком кишечнике мышей при введении С12-іЕ-DAP совместно с CBLB502 наблюдается синергическая индукция IL-5, IL-6, IL-13, IL-21, TNF-а а также β-дефензина-3, по сравнению с действием каждого агониста по отдельности. Наиболее важно отметить, что мыши, которым вводили сочетание C12-iE-DAP и CBLB502, демонстрировали 80% защиту от смертельной пероральной дозы Salmonella typhimurium, в то время как защитные эффекты каждого отдельного агониста были сравнимы с эффектом ФСБ (выживаемость 20%) [86]. При использовании в качестве адъюванта комбинации гидроксида алюминия и МДП + MPLA происходит индукция значительно большего антиген-специфического антительного ответа, чем при использовании гидроксида алюминия, гидроксида алюминия +МДП или гидроксида алюминия + MPLA [53].

1.4.4. Продукция цитокинов при последовательной стимуляции NOD- и Toll-подобных рецепторов in vitro u in vivo.

Клетки, обработанные агонистом ПРР, обычно становятся временно невосприимчивыми (толерантными) к рестимуляции с тем же агонистом [94]. Однако рестимуляция клеток другим агонистом может приводить как к усилению, так и снижению ответа. Как правило, клетки, обработанные агонистами NOD-рецепторов остаются восприимчивы к последующему воздействию TLR. наоборот. агонистов И Мышиные макрофаги, предварительно простимулированные in vitro в течение 24 ч poly-I:C (агонист TLR3) или ЛПС (агонист TLR4), демонстрируют значительно усиленную продукцию TNF и IL-6 в ответ на МДП (агонист NOD2) [95]. И наоборот, предварительно обработанные МДП мышиные макрофаги продуцируют

повышенные уровни TNF и IL-6 в ответ на воздействие агонистов TLR2 и TLR4 [82, 94]. Предварительная обработка МДП в течение 24 ч значительно сильно TLR2-TLR4-индуцированную увеличивает И продукцию хемокинов эпителиальными клетками толстой кишки [96]. Внутримышечное введение мышам линии BALB/с МДП за 24 ч до внутрибрюшинного введения летальной приводит к синергическому увеличению продукции дозы ЛПС TNF-α перитонеальными макрофагами мышей и к более быстрому наступлению летального токсического эффекта по сравнению с контрольной группой [97]. Аналогичные результаты были получены при внутривенном введении МДП с последующим внутривенным введением ЛПС [98]. через 4 часа Внутрибрюшинное введение ЛПС крысам линии Wistar приводит к усилению цитокинового ответа плазмы на низкие дозы ЛПС, вводимые через 24 ч после МДП [91].

1.4.5. Антагонизм и кросс-толерантность при кооперации NOD- и Tollподобных рецепторов

Наряду с многочисленными исследованиями, демонстрирующими положительную кооперацию NOD- и Toll-подобных рецепторов, были описана и отрицательная кооперация этих рецепторов. Чаще всего это ингибирующее влияние NOD2 на эффекты, индуцированные Toll-подобными рецепторами. В одной из работ сообщалось, что при одновременной стимуляции мышиных перитонеальных макрофагов in vitro МДП и TLR2/1, МДП, в концентрации 10 мкг/мл, снижает уровень экспресии IL-1β, индуцированной агонистом TLR2/1 (пептидогликаном). В том же исследовании МДП не влиял на продукцию IL-1β, индуцированную ЛПС (который использовался в высокой концентрации 1 мкг/мл) и приводил к увеличению TLR2-индуцированной продукции IL-10 и TNF [99]. T.Watanabe et.al сообщает, что в мышиных селезеночных макрофагах in vitro МДП в концентрации 10-100 мкг/мл специфически снижает продукцию IL-12, инуцированную агонистом TLR2 [100]. Противоречивые данные о

положительном и отрицательном влиянии МДП на активацию, опосредованную через Toll-подобные рецепторы, частично объясняются работой Borm et al., где показано, что МДП при низких концентрациях (1-25 мкг/мл) увеличивает TLR2-индуцированную продукцию TNF моноцитами, но при высокой концентрации (100 мкг/мл) подавляет ее. Однако в том же исследовании было показано, что МДП при любых концентрациях усиливает продукцию TNF, индуцированную через TLR4 [101].

Что касается последовательного применения стимулов, у Hedl et al. сообщается, что предварительная обработка макрофагов человека МДП (100 мкг/мл) за 24-48 ч в выраженной степени ингибирует продукцию TNF, IL-1β и IL-8, индуцированную агонистами TLR4 и TLR2 [102]. С другой стороны, в исследовании Kullberg et al. показано, что предварительная обработка моноцитов человека 0,1-10 мкг/мл МДП в течение 24 ч приводит к снижению продукции TNF, индуцированной через TLR4, но не TLR2, и не влияет на продукцию IL-6 или IL-10, индуцированную через любой из этих TLR [103]. Согласно Watanabe et al., 24-часовая обработка МДП дендритных клеток, TLRполученных из моноцитов человека, не оказывает влияния на индуцированную продукцию TNF, но подавляет продукцию IL-6 и IL-12р40, индуцированную различными агонистами Toll-подобных рецепторов [104]. В исследовании введение МДП мышам (100 мкг в течение 3 том же последовательных дней) ослабляло продукцию IL-6, IL-12 TNF И мононуклеарными клетками мезентериальных лимфатических узлов и lamina propria кишечника, рестимулированными in vitro различными агонистами Tollподобных рецепторов [104].

В целом, исследования, утверждающие ингибирующее действие агонистов NOD-рецепторов на TLR-индуцированные ответы, не следует игнорировать, однако их результаты не согласуются друг с другом. Эти

ингибирующие эффекты могут в значительной степени зависеть от вида исследуемых клеток и условий экспериментов.

Интересно, что нокаут или нокдаун NOD2 (в отсутствии МДП) может приводить к повышенной чувствительности к агонистам Toll-подобных рецепторов [100, 105]. В исследовании Tsai et al., нокдаун NOD2 в макрофагальных мышиных клетках RAW264.7 привел к увеличению экспрессии IL-1, IL-6, MIP2, COX2 и других мРНК при стимуляции ЛПС [105]. В исследовании Watanabe et al. спленоциты мышей с нокаутом гена NOD2 продуцировали больше IL-12 и IL-18 в ответ на действие агонистов TLR2 (но не нескольких других TLR) по сравнению со спленоцитами дикого типа, тогда как TLR-индуцированная продукция TNF и IL-10 не была затронута [100]. По данным Udden и соавт., в макрофагах и дендритных клетках, полученных от NOD2^{-/-} мышей, при стимуляции ЛПС или poly-I:С усилена активация NF-кВ и МАРК, а также повышены уровни мРНК IL-1β, IL-6 и TNF по сравнению с мышами дикого типа [106]. Однако по данным клинических исследований, у пациентов с болезнью Крона, гомозиготных по мутациям NOD2^{null}, ответ мононуклеарных клеток на агонисты Toll-подобных рецепторов не изменен по сравнению с пациентами без таких мутаций. [103, 72, 79].

1.5. Возможные механизмы синергической кооперации NOD и Tollподобных рецепторов

Хотя описательная база по синергической кооперации NOD-TLR достаточно обширна, внутриклеточные механизмы их развития до сих пор не раскрыты. Теоретически, эти механизмы могут затрагивать различные этапы активации клетки, включая изменения экспрессии самих рецепторов, регуляцию путей передачи сигнала внутри клетки, активацию транскрипции генов, посттранскрипционные этапы регуляции экспрессии генов и белков. Ниже будут рассмотрены несколько возможных сценариев кооперации NOD-TLR.

1.5.1. Кооперация на уровне сигнальных путей и транскрипционных факторов

Экспрессия многих генов, индуцированных стимуляцией NOD- или Tollподобных рецепторов, регулируется транскрипционными факторами NF-кВ. Комбинации агонистов NOD- и Toll-подобных рецепторов синергически индуцируют экспрессию мPHK генов, регулируемых NF-кВ [105, 52, 53, 87]. Поэтому NF-кВ ожидаемо привлекает внимание исследователей, изучающих синергическую кооперацию NOD- и Toll-подобных рецепторов.

Как уже говорилось выше, внутриклеточная сигнализация от Tollподобных рецепторов может проходить по MyD88-зависимому и MyD88независимому путям (рис. 3). Канонический путь активации NF-кВ опосредован главным образом через MyD88-зависимый путь. Два TLR, TLR3 и TLR4, используют также адапторный белок TRIF. TRIF-зависимый, MyD88независимый сигнальный путь также может приводить к активации NF-кВ; однако этот эффект может быть косвенным, опосредованным ауто- или паракринно малыми количествами TNF, высвобождаемыми на ранних стадиях TRIF-зависимой сигнализации [64]. Рецепторы NOD1 и NOD2 используют адаптер RIP2 вместо MyD88 или TRIF.

МуD88-зависимый и NOD-зависимый сигнальный пути сходятся на уровне TAK1 и NEMO (рис. 4). Abbott и соавт. показали, что в клетках THP-1 комбинация МДП и Pam3CSK4 (лиганд TLR2) индуцирует более сильную и более длительную убиквитинацию NEMO и более быструю и полную деградацию ІкВα по сравнению с каждым стимулом в отдельности, что и является причиной более мощной индукции NF-кB-зависимых генов при сочетанной стимуляции [107].

Однако даже если NOD-зависимый и MyD88-зависимый пути сходятся, непонятно, почему это должно привести к синергической активации IKK. В лучшем случае, каждый путь будет фосфорилировать «свою» часть общего

пула IKK и далее IkB, что привело бы к простому суммированию эффектов, а не к синергии. Действительно, уровни фосфорилированных IKK α/β и IkB α в клетках THP-1, проанализированных через 20 мин после добавления МДП и/или MPLA, при сочетанной стимуляции суммируются, но синергизма не наблюдается [53]. В этот момент времени наблюдаются аддитивные, несинергические фосфорилирования ряда других киназ, таких как p38, ERK, JNK и AKT [53]. Кроме того, оптимальная активация TLR может сама по себе истощить доступный пул IkB [108, 82], что не оставило бы места ни для синергии, ни для суммирования на этом уровне.



Рисунок 4. Возможные точки взаимодействия сигнальных путей NOD- и Tollподобных рецепторов.

Как обсуждалось выше, агонисты NOD-рецепторов не индуцируют многие типы ответов, которые запускаются агонистами Toll-подобных рецепторов, но потенцируют эти TLR-индуцированные ответы. Например, ни агонисты рецепторов NOD1, ни агонисты рецепторов NOD2 не индуцируют секрецию IL-12p70 или экспрессию генов *IL12A* и *IL12B* в дендритных клетках человека, но усиливают те же процессы, индуцированные липидом A [75]. МДП потенцирует экспрессию гена *IL23A*, индуцированные агонистом TLR2 в дендритных клетках, и, следовательно, потенцирует способность дендритных клеток индуцировать дифференцировку клеток Th17 [109]. В макрофагах мышей линиии RAW264.7 МДП не вызывает сколь-нибудь значимую активацию NF-кB и не индуцирует экспрессию NF-кB-регулируемых генов, таких как *TNF*, однако МДП потенцирует ЛПС-индуцированную экспрессию TNF, IL-6, IL-1β, и iNOS, а также продукцию нитритов [105].

В целом, трудно объяснить эти синергетические эффекты только активацией NF-кВ вследствие активации NOD- и Toll-подобных рецепторов. Однако транскрипционные факторы, включая NF-кB, не функционируют сами по себе, но взаимодействуют с другими транскрипционными факторами и механизмами ремоделирования хроматина, которые могут значительно изменять «пейзаж» связывания NF-кВ с хроматином после активации клетки [110, 111]. Другие сигнальные пути NOD- и Toll-подобных рецепторов, такие МАП-киназный, могут активировать собственные как свои наборы транскрипционных факторов, которые могут взаимодействовать с NF-кB. Однако данные о роли взаимодействия факторов транскрипции в синергизме NOD-TLR в настоящее время практически отсутствуют.

1.5.2. Кооперация на посттранскрипционном уровне

Другой вариант кооперации рецепторов NOD2 и TLR4 был описан Wolfert et al. на модели человеческой моноцитоидной клеточной линии Mono Mac 6. И МДП, и ЛПС по отдельности индуцировали транскрипцию гена *TNF*,

причем при сочетанном воздействии уровни экспрессии мРНК суммировались (аддитивная, а не синергическая кооперация). Однако только ЛПС индуцировал секрецию белка TNF. Это указывает, что трансляция мРНК *TNF* в клетках Mono Mac 6 в базальном состоянии блокирована, и эта блокировка преодолеваетя только при стимуляции ЛПС, но не при стимуляции МДП. В результате на уровне белка наблюдается потенцирующий эффект МДП на ЛПС-индуцированную секрецию TNF [112]. Механизмы этого эффекта остаются неизвестными.

1.5.3. Взаимная транскрипционная регуляция сигнальных путей NOD- и Toll-подобных рецепторов

Исследования кооперации TLR-TLR показали, что положительная кооперация (синергизм или прайминг) происходит тогда, когда два Tollподобных рецептора используют различные сигнальные пути (т.е. МуD88зависимый и TRIF-зависимый). Напротив, инфрааддитивная кооперация или толерантность наблюдаются в тех случаях, когда два рецептора активируют один и тот же сигнальный путь [94]. В случае прайминга или толерантности эти виды кооперации могут быть объяснены селективной блокадой проксимальных частей сигнальных путей рецептора (которые уникальны для каждого из путей), наряду с усилением дистальных событий сигнальных путей (которые являются общими для обоих путей) [94].

Это правило может быть применимо и к кооперации NOD-TLR, поскольку проксимальные части сигнальных путей NOD- и Toll-подобных рецепторов различны, а дистальные части действительно являются общими, по крайней мере в части NF-кВ (рис. 3). В подтверждение этого сценария, макрофаги мыши, предварительно обработанные ЛПС в течение 24 ч,
демонстрируют усиленное фосфорилирование NF-кВ а также p38, JNK и ERK при воздействии агонистов NOD1 и NOD2, и наоборот [82].

Кроме того, NOD- и Toll-подобные зависимые сигнальные пути могут взаимно регулировать экспрессию своих уникальных компонентов. К таким компонентам, наиболее очевидно, относятся рецепторы и их адаптеры, такие как MyD88, TRIF и RIP2. Эта перекрестная регуляция может быть как прямой, так и опосредованной аутокринными и/или паракринными механизмами. Например, гены RIP2, NOD1, NOD2 являются NF-кВ-зависимыми [113, 114] и их экспрессия усиливается под действием различных агонистов Toll-подобных рецепторов [115, 116]. ЛПС индуцирует экспрессию мРНК рецепторов NOD1 и NOD2 в клетках RAW264 двумя путями, причем первый путь опосредуется через активацию NF-кВ непосредственно через TLR4, а второй путь – через аутокринное действие TNF [117]. ЛПС также увеличивает экспрессию белка RIP2 в мышиных макрофагах начиная с 3 ч и с максимумом через 24 ч стимуляции [118, 82]. Еще один механизм перекрестного регулирования может быть опосредован IFN I типа, экспрессия которых индуцируется несколькими Toll-подобными рецепторами, включая TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 и TLR9. IFN I типа могут увеличивать экспрессию рецепторов NOD1 и NOD2, что приводит к повышению чувствительности клеток к агонистам этих рецепторов [119, 95]. И наоборот, сообщалось, что МДП повышает экспрессию MyD88 [120], что Toll-подобных рецепторов. может стимулировать ответы на агонисты Механизмы кросс-регуляции, описанные выше, зависят от синтеза мРНК и белка de novo и, следовательно, требуют не менее 2-3 ч для своего развития. Они могут объяснить сенсибилизацию обработанных агонистами Tollподобных рецепторов клеток или животных к агонистам NOD-рецепторов и наоборот (последовательное применение агониста). Они могут объяснить также синергические реакции на одновременно применяемые агонисты и NOD- и Toll-подобных рецепторов, но только при условии, что агонисты остаются в

контакте со своими рецепторами по меньшей мере в течение нескольких часов и что рецепторы не десенситизируются и/или не деградируют в течение этого периода времени. Например, МДП может сохраняться в поздних эндосомах до 3 ч, может постепенно высвобождаться в цитозоль откуда он ЛЛЯ взаимодействия с рецептором NOD2 [121]. Однако после добавления МДП к макрофагам происходит деградация как рецептора NOD2, так и адаптера RIP2, так что после 4-х часовой обработки МДП клеточные ответы на стимуляцию новыми порциями МДП снижаются до <25% от исходного уровня [118]. С другой стороны, агонисты Toll-подобных рецепторов увеличивают экспрессию белков NOD2 и RIP2 [118, 82]. Неясно, в какой степени деградация и ресинтез NOD2 и RIP2 уравновешивают друг друга в клетках, одновременно обработанных МДП и агонистом TLR, и может ли это привести к более длительной сигнализации через NOD2-RIP2.

И наоборот, TLR4 после связывания с ЛПС быстро интернализуется в эндосомы, откуда он может активировать только TRIF-зависимый путь, но не MyD88 - зависимый путь [122]. Кроме того, Toll-подобные рецепторы в лизосомах деградируют в течение 2-3 ч после распознавания лиганда [123, 124], что временно блокирует сигнализацию через Toll-подобный рецептор.

В целом, на сегодня неизвестен вклад каждого из рассмотренных механизмов в развитие синергических эффектов при сочетанной стимуляции NOD- и Toll-подобных рецепторов.

1.6. Метаболические изменения в клетке при активации NOD- и Tollподобных рецепторов

Клетки врожденной иммунной системы, в первую очередь макрофаги и дендритные клетки, претерпевают глубокие метаболическое перестройки в ответ на сигналы окружающей среды, такие как гипоксия, изменение количества питательных веществ. Нормоксия или гипоксия способны

перепрограммировать метаболизм клеток, причем при нормоксии производство АТФ происходит за счет цикла Кребса и окислительного фосфорилирования, а гипоксия стимулирует гликолиз. Активация клеток врожденного иммунитета ПРР сопровождается масштабным метаболическим через также репрограммированием. В частности, ЛПС и мурамилпептиды значительно усиливают интенсивность гликолиза в макрофагах и дендритных клетках [125, 126, 127]. Важно, что усиление гликолиза под действием агонистов ПРР происходит в аэробных условиях, что носит название аэробного гликолиза или эффекта Варбурга [128]. Этот метаболический сдвиг имеет важное значение для усиления продукции провоспалительных цитокинов, в частности IL-1β, а также для подготовки клеток к возможному попаданию в условия гипоксии, имеющие место в воспалительном очаге. Усиление гликолиза в макрофагах и дендритных клетках под действием ЛПС и мурамилпептидов опосредовано активацией сигнального пути с участием фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы Akt [126, 127]. W. Huang и соавт. показали, что повышение уровня внеклеточной глюкозы и ЛПС синергически могут активировать сигнальный путь NOD1-RIP2-NF-kB через рецептор NOD1 [129]. Однако неизвестно, как сами процессы гликолиза в макрофагах меняются при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4.

1.7. Клиническая значимость синергической кооперации NOD-TLR

Явление синергизма во врожденной иммунной системе может иметь как отрицательное, так и положительное значение [130]. С одной стороны, неконтролируемые синергические эффекты при кооперации ПРР при инфекциях могут быть одной из причин избыточной воспалительной реакции, лежащей в основе сепсиса, септического шока и других угрожающих жизни проявлений инфекционных заболеваний. С другой стороны, контролируемые синергические эффекты могут быть использованы для усиления врожденной иммунной защиты против патогенов, а также для создания высокоэффективных иммунологических адъювантов.

1.7.1. Возможное участие синергической кооперации NOD- и Tollподобных рецепторов в развитии сепсиса

Сепсис – это патологический процесс, в основе которого лежит избыточный врожденный иммунный ответ на инфекции различной природы (бактериальные, вирусные, грибковые), что приводит к генерализованному (системному) воспалению и дисфункции органов [131, 132]. В норме, при инфекции, ПАМП и DAMP (damage-associated molecular patterns) через ПРР запускают активацию генов, участвующих в воспалительном ответе хозяина, что приводит к выработке провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии и вазоактивных субстанций, включая оксид азота. Молекулы адгезии экспрессируются на сосудистом эндотелии вблизи места инфицирования, и привлекают лейкоциты. Полиморфноядерные лейкоциты (такие как нейтрофилы) активируют и экспрессируют свои собственные молекулы адгезии для агрегации на эндотелии в месте инфекции. Отсюда они мигрируют к месту заражения и, наряду с другими типами клеток (включая макрофаги), высвобождают свой собственный набор медиаторов, убивают и поглощают инфицированной ткани. патогенные микроорганизмы В Этот процесс регулируется тонким балансом между провоспалительными И противовоспалительными сигналами, которые диктуют активацию И ингибирование клеток иммунной системы. При сепсисе развивается самоподдерживающаяся провоспалительная реакция, опосредованная резким повышением уровня воспалительных цитокинов (таких как TNF-α, интерферонгамма и интерлейкин-1), компонентов и продуктов бактериальной клеточной стенки (эндотоксины) [133]. Эта реакция является наиболее частой причиной смерти пациентов В первые сепсиса. После начальной, дни гипервоспалительной фазы, развивается гиповоспалительная фаза, в которой

преобладает противовоспалительный ответ, здесь на первый план выходит иммуносупрессия. Проблемы, с которыми сталкиваются пациенты на этой стадии, связаны с активацией латентных очагов бактериальной или вирусной инфекции, а также оппортунистическими или нозокомиальными инфекциями. Классический подход к лечению сепсиса включает антибактериальную терапию, симптоматическую терапию, направленную на поддержку пораженных органов и контроль источника инфекции [134].

Подавление активации ПРР является потенциальным терапевтическим или превентивным способом воздействия при сепсисе, направленным на прекращение избыточной продукции цитокинов и уменьшение системного воспаления. Поскольку ЛПС (эндотоксин) является одним из наиболее сильных провоспалительных микробных соединений, усилия многих исследователей были направлены либо на нейтрализацию самого ЛПС, либо на блокаду TLR4 низкомолекулярными антагонистами, такими как Эриторан [135]. Однако, несмотря на эффективность в профилактике эндотоксинового шока (т.е. шока, вызванного чистым ЛПС), эти препараты оказались неэффективными у больных сепсисом [135, 136]. Одной из причин этой неудачи, возможно, были неучтенная синергическая кооперация. Например, при сепсисе в тканевые жидкости и кровоток высвобождаются чрезмерные количества агонистов TLR и NOD1/NOD2 [137]. Синергическая кооперация этих агонистов могут быть одной из причин гиперпродукции цитокинов, ведущей к развитию системного воспалительного синдрома в первой (гипервоспалительной) фазе сепсиса. Агонисты NOD-рецепторов могут значительно усиливать ответ даже на небольшие остаточные количества ЛПС. Так, предварительное введение мышам 10 или 100 мкг МДП приводит к снижению LD₅₀ ЛПС до 17,8 или <2,7 мкг, соответственно, по сравнению со 100 мкг у наивных мышей [92]. Можно предположить, что у пациентов, получающих анти-ЛПС терапию, даже остаточная активность ЛПС в синергии с агонистами рецепторов NOD1/NOD2

будет по-прежнему индуцировать избыточную продукцию цитокинов, что сделает анти-ЛПС терапию неэффективной. Более того, агонисты NODрецепторов могут синергически взаимодействовать не только с ЛПС, но и с агонистами других Toll-подобных рецепторов, таких как липопептиды, флагеллин или ДНК. Мыши, нокаутные по гену Nod2, имеют значительно выживаемость при полимикробном сепсисе, индуцированном лучшую перевязкой и прокалыванием слепой кишки [138], а у мышей, гомозиготных по мутации с потерей функции (loss-of-function) гена Nod2 снижена смертность в модели сепсиса, вызванного Enterococcus faecalis [139]. Таким образом, NODпотенциально рецепторы, по-видимому, важны при терапевтическом вмешательстве в случае развития сепсиса и септического шока.

В настоящее время разрабатываются антагонисты рецепторов NOD1 и NOD2. Большинство этих соединений являются производными гетероциклических бициклических соединений, таких как индол, пурин или бензимидазол [140, 141, 142, 6]. Некоторые из них являются двойными антагонистами рецепторов NOD1/NOD2 [140, 142], в то время как другие селективны по отношению к рецептору NOD1 [6] или NOD2 [141]. Терапевтическая эффективность этих препаратов отдельно или в комбинации с анти-ЛПС агентами должна быть проверена на доклинических моделях сепсиса и септического шока. Также выживание мышей с полимикробным сепсисом значительно улучшается под действием препарата SB203580, мощного ингибитора RIP2, который ингибирует передачу сигнала через рецепторы NOD1 и NOD2 [138]. Потенциально важной мишенью в терапии сепсиса является ІКК, так как и NOD1/2-, и TLR-сигнальные пути действуют через ІКК/NF-кВ. Различные ингибиторы ІКК либо улучшают выживаемость животных с полимикробным сепсисом, либо, по крайней мере, препятствуют ухудшению жизненно важных функций, наблюдаемому у этих животных [105, 143, 144, 145, 146].

1.7.2. Использование синергической кооперации NOD- и Tollподобных рецепторов для защиты от инфекций

Наряду с вышесказанным, профилактическое применение комбинаций агонистов NOD- и Toll-подобных рецепторов, за счет эффекта синергизма, может обеспечить лучшую защиту против патогенов, чем каждый агонист по отдельности в той же дозе, или обеспечить сопоставимую защиту при использовании более низких доз агонистов. Известно, что введение мышам агонистов NOD- или Toll-подобных рецепторов за несколько часов или дней до летальных доз бактериальных патогенов значительно улучшает выживаемость. NOD-Защитные эффекты агонистов И Toll-подобных рецепторов опосредованы, скорее всего, усилением бактерицидной активности клеток врожденного иммунитета, усиленной активацией факторов транскрипции и продукцией цитокинов/хемокинов [102, 147, 148, 149, 150]. Однако изолированные агонисты ПРР малоэффективны против патогенов с высокой вирулентностью. В этих случаях могут быть использованы синергически взаимодействующие комбинации агонистов. Так, однократная подкожная инъекция мышам коктейля из агониста рецептора NOD1 (C12-iE-DAP) и агониста TLR5 (CBLB502) за 9 ч до заражения обеспечивает 80% защиту от смертельной пероральной дозы высоковирулентного патогена Salmonella typhimurium, тогда как каждый агонист в отдельности в той же дозе не оказывает защитного влияния [86]. Вспомогательная терапия с использованием рецепторов NOD2, TLR4 активаторов позволяет снизить дозы противотуберкулезных препаратов и уменьшить продолжительность лечения туберкулеза. Так, совместная стимуляция рецепторов NOD2 и TLR4 у мышей C57BL/6, больных туберкулезом, эффективность повысила противотуберкулезных препаратов за счет снижения их дозы до концентрации в 5 раз меньшей, чем рекомендовано [151].

Кроме того, вакцины, включающие в себя комбинацию активаторов NOD- и Toll-подобных рецепторов (MPLA и МДП), усиливают поглощение антигена, способствуют созреванию и активации дендритных клеток и приводят к усиленным гуморальным и клеточным адаптивным иммунным ответам у мышей по сравнению с вакцинами, основанными на других адъювантах [53].

1.7.3. Роль NOD- и Toll-подобных рецепторов в активации противоопухолевых свойств макрофагов.

Одну из ключевых ролей в регуляции роста злокачественной опухоли играют опухоль-ассоциированные макрофаги. В зависимости от вида сигнала, поступающего из микроокружения, макрофаги могут реализовывать разные функциональные программы, описываемые как поляризация М1/М2. Как правило, макрофаги M1 индуцируются INF-у, бактериальными компонентами, такими как ЛПС, они продуцируют провоспалительные цитокины, такие как IL-1β, -6, -12 и -23, TNF-а. Тогда как макрофаги M2 индуцируются IL-4, -10, -13 и ТGF-β вырабатывают иммуносупрессивные цитокины, такие как IL-10, TGF-β и VEGF [152]. Известно, что фенотип M2, может способствовать росту и прогрессированию опухоли. Ожидается, что трансдифференцировка макрофагов макрофаги M1 M2 станет альтернативным способом В противоопухолевого лечения [153, 154]. Ключевым фактором действия М1-макрофагов противоопухолевого является TNF, который оказывает непосредственное повреждающее действие на клетки опухоли [155] интерлейкином 12, принимает участие совместно с в И, активации цитотоксических противоопухолевых Т-клеток [156]. TNF также может служить аутокринным регулятором активации макрофагов [157]. Макрофаги могут непосредственно уничтожать опухолевые клетки при помощи оксида азота, активных форм кислорода или путем фагоцитоза [158, 159].

Показано, реализации механизмов противоопухолевой что ДЛЯ активности необходима инфильтрация опухоли макрофагами с М1-подобным фенотипом, которые обладают способностью убивать опухолевые клетки. Изменение поляризации макрофагов в сторону М1 возможно при активации паттерн-распознающих рецепторов, которые координируют элиминацию патогенов и инфицированных клеток [160, 161]. Так, некоторые агонисты Tollподобных рецепторов (резиквимод, имиквимод) используются для местного лечения рака кожи [162, 163]. В агрессивной модели метастатического рака молочной железы мыши 4T1 применение препарата Иммуномакс®, агониста TLR4, приводит к успешному излечению от опухоли 30% мышей [164]. В работе Rodell C.B. и соавторов на модели мышей показано, что наночастицы, нагруженные R848, агонистом TLR7/8, накапливаются в опухоли, поляризуют макрофаги в М1-тип и подавляют рост опухоли толстой кишки [165]. R848, конъюгированный с антителами, нацеленными на опухоль, вызывает сильную локальную активацию макрофагов и дендритных клеток, что приводит к клиренсу опухоли и иммунологической памяти в моделях опухоли молочной железы [166]. БЦЖ активирует макрофаги через Toll-подобные рецепторы 2/4 (TLR2/4) и стимулирует перитонеальные макрофаги мышей к поляризации типа М1, что приводит к киллингу клеток опухоли МСА207 [167, 168].

Цитозольные паттерн-распознающие рецепторы NOD1 и NOD2 также представляют собой интересные мишени с точки зрения усиления иммунного ответа против раковых клеток, так как активация NOD1 и NOD2 способствует поляризации макрофагов в сторону фенотипа M1. На модели NOD1-нокаутных мышей показана роль NOD1 в поляризации макрофагов в сторону фенотипа M1. Так, при заражении мышей, дефектных по гену NOD1-/- helicobacter pylori происходит нарушение поляризации макрофагов в M1, что способствует повышенному риску развития рака желудка [169]. Синтетический агонист NOD2 мифамуртид, также известный как липосомальный мурамилтрипептид

фосфатидилэтаноламин, применяемый при лечении неметастазирующей остеосаркомы, индуцирует поляризацию макрофагов до промежуточного фенотипа M1/M2 [170, 171]. Таким образом, усиление противоопухолевой активности макрофагов с помощью агонистов паттерн-распознающих рецепторов является перспективным направлением в противоопухолевой иммунотерапии.

Как уже говорилось выше, при одновременной активации клеток врождённого иммунитета парными сочетаниями агонистов ПРР происходит синергическое усиление некоторых видов ответа [172]. Так, совместная активация макрофагов агонистами TLR3- и TLR4 приводит к кратному усилению экспрессии генов, кодирующих противоопухолевые эффекторные белки, в частности iNOS и IFN-β, а также к значительному усилению противоопухолевого цитотоксического действия макрофагов [173].

1.8. Резюме

Таким образом, синергическая кооперация рецепторов врожденного иммунитета имеют важное значение как в патогенезе, так и в профилактике инфекционно-воспалительных заболеваний. Однако несмотря на большой описательный материал, внутриклеточные механизмы такой кооперации остаются в значительной степени неясными. Изучению этих механизмов и посвящена данная работа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Реактивы, расходные материалы и оборудование

2.1.1 Реактивы для выделения моноцитов из крови человека и культивирования макрофагов.

Полная культуральная среда (ПКС): среда RPMI-1640 (Life Technologies, Великобритания) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (кат номер K052м/SV30160.03 Cytiva, США) и 2 мМ глутамина (Sigma, США). Готовили в стерильных условиях, хранили не более 1 недели при +4°C. Содержание эндотоксина в полной культуральной среде оценивали в кинетическом турбидиметрическом тесте с помощью тест-системы Endosafe®KTA2 (Charles River Endosafe, США). Его содержание составило <0,05 единиц эндотоксичности в 1 мл (ниже нижнего предела чувствительности метода).

Среда для адгезии моноцитов: RPMI-1640 с добавлением 1% пуловой человеческой сыворотки IV группы, полученной от здоровых доноров (Biowest, США). Готовили в стерильных условиях, хранили не более 1 недели при +4°С.

ПКС с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором (ГМ-КСФ) для культивирования макрофагов: ПКС с добавлением рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ (Miltenyi Biotec, Германия) до конечной концентрации 40 нг/мл. Готовили в стерильных условиях непосредственно перед использованием.

Раствор трипанового синего: 0,4% раствор трипанового синего (Sigma, США) в ФСБ.

Прочие реактивы для культуральных работ: фиколл-верографин с плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия); стерильный фосфатно-солевой буфер в модификации Дюльбекко (Life Technologies, Великобритания).

2.1.2. Агонисты NOD- и Toll-подобных рецепторов

Агонисты рецептора NOD1 – M-triDAP и лауроил-D-изоглутамил-мезодиаминопимелиновая кислота (C12-iE-DAP), Invivogen (США). Агонист TLR4 – ЛПС *E. Coli* серовар O111:B4 был закуплен у Merck Millipore (США). Список ингибиторов ферментов, антагонистов цитокинов и цитокиновых рецепторов – см. таблицу 1.

Таблица 1. Ингибиторы киназ и рецепторов, агонисты и антагонисты цитокинов и цитокиновых рецепторов.

Название	Кат. Номер	Производитель	
Агонист рецептора интерлейкина-1 (IL-1RA)	BMS2080	Life Technologies,	
		Великобритания	
Козьи поликлональные нейтрализующие	MAB200-SP	R&D Systems,	
антитела против человеческого IL-1α		США	
Козьи поликлональные нейтрализующие	AF-210-SP	R&D Systems,	
антитела против человеческого TNF		США	
Козьи поликлональные нейтрализующие	MAB201-SP	R&D Systems,	
антитела против человеческого IL-1β		США	
Нормальный козий IgG	F0109	R&D Systems,	
		США	
Мышиная поликлональная нейтрализующая	213851	Life Technologies,	
антисыворотка против IFN-α		США	
Мышиная поликлональная нейтрализующая	16-9978-81	Life Technologies,	
антисыворотка против IFN-β		США	
SB203580	5633S	Sigma, США	
Полимиксин Б	1405-20-5	Sigma, США	

2.1.3. Реактивы для анализа экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции обратного транскрипта в реальном времени

Реактивы для выделения РНК: набор реактивов для выделения тотальной РНК из клеток (Jena Bioscience, ФРГ).

Реактивы для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей: набор Cleanup S-Cap (Евроген, Россия).

Реактивы для обратной транскрипции: набор реактивов для обратной транскрипции (Thermo scientific, США).

Реакционная смесь для ПЦР: 5-кратная реакционная смесь, содержащая интеркалирующий краситель SYBR Green (Евроген, Росия).

Праймеры. Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi</u>). Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров представлены в таблице 2, все праймеры синтезированы фирмой Евроген.

Gene	Gene full name	Primer	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
symbol	A service to de service se 1	Esmand	
ACODI	Aconitate decarboxylase 1	Forward	
		Reverse	
CCL3	C-C motif chemokine ligand 3	Forward	
a at t		Reverse	GCACAGACCTGCCGGCTTCG
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4	Forward	GCIGCCTICIGCICICCAGCG
		Reverse	AGCAGCICAGTICAGTICCAGGIC
CEBPD	CCAAT enhancer binding protein delta	Forward	GGAGAGACTCAGCAACGACC
		Reverse	TTGCGCTCCTATGTCCCAAG
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Forward	CAGCCTCCCGCTTCGCTCTC
		Reverse	ACCAGGCGCCCAATACGACC
ILIB	Interleukin 1B	Forward	GAGCTCGCCAGTGAAATGATG
		Reverse	TGGTGGTCGGAGATTCGTAG
IL6	Interleukin 6	Forward	GCCACTCACCTCTTCAGAACG
		Reverse	TCAGCCATCTTTGGAAGGTTCA
IL12B	Interleukin 12B	Forward	ATTCTGCGTTCAGGTCCAGG
		Reverse	AGAACCTAACTGCAGGGCAC
IL23A	Interleukin 23 subunit alpha	Forward	GCAAAAAGATGCTGGGGAGC
		Reverse	TCTCTTAGATCCATGTGTCCCAC
IRF5	Interferon regulatory factor 5	Forward	AGAAGCTCATTACTGTACAGGTGG
		Reverse	ACCATGCGGTCTTTGAGGTC
MX1	MX dynamin like GTPase 1	Forward	GGATTTTGGGGGCTTTCCAGTC
		Reverse	CCGTACGTCTGGAGCATGAAG
MYD88	MYD88 innate immune signal transduction	Forward	ACTGCTCGAGCTGCTTACCA
	adaptor	Reverse	CGGCCACCTGTAAAGGCTTC
NFKB1	Nuclear factor kappa B subunit 1	Forward	AATGGGCTACACCGAAGCAA
(p50)		Reverse	TTGCGGAAGGATGTCTCCAC
NFKB2	Nuclear factor kappa B subunit 2	Forward	GTACCGACAGACAACCTCACC
(n52)	Rueleur Rueler Ruppu D Subunit D	Reverse	CTGTCTTCCTTCACCTCTGTGC
NFKBIA	NFKB inhibitor alpha	Forward	AAGCAGCAGCTCACCGAG
		Reverse	
NODI	nucleotide binding oligo-merization domain	Forward	TCAGATCACAGCTAAGGGGAC
NODI	containing 1	Reverse	TAGACTTTGGCCTCCTCTGG
REI	REL proto-oncogene NE-kB subunit	Forward	TTCCTGAGAGACCAAGACCTG
(c_Ral)	KEE proto-oncogene, NI -KB subunit	Poverse	TGCTTGACTTGAAAACCCCTGT
DEL A	PELA proto opcogene NE kB subunit (p65)	Forward	
(n65)	REEA proto-oncogene, NT-KB subunit (po3)	Polwaru	CACCTAAACGCATACCCCTCC
	DEL P proto opogono NE kP subunit	Forward	TACTTCCTCTCCCACAACGTC
KELD	KELB proto-oncogene, NF-KB subunit	Polwalu	
סוחע	Decenter interacting coming/throaning lings	Econycond	
(PIP2)	Receptor interacting serine/tireonine kinase	Porward	
	Z T-ll lile monsten edenter melende 1	Eamound	CCACCCACCACCACC
TICAMI (TDIE)	Toll like receptor adaptor molecule 1	Forward	
		Reverse	AGIGICCCTACCCATICACI
TICAM2 (TDAM)	1 oil like receptor adaptor molecule 2	Forward	
(IKAM)		Reverse	
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein	Forward	CIGGCICICGGCCTAAGAAG
		Keverse	
TLR4	1 oll-like receptor 4	Forward	ATGATGCCAGGATGATGTCTGC
(T) / F		Reverse	
TNF	Tumor necrosis factor	Forward	TCGGCCCCCAGAGGGAAGAG
		Reverse	CGGCGGTTCAGCCACTGGAG
TNFu	Tumor necrosis factor unspliced	Forward	GAACCGACATGGCCACACTG
		Reverse	GAGGTACAGGCCCTCTGATG
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	Forward	AGGTTCCAGAACACCATTCCG
(A20)		Reverse	GTTCGAGGCACATCTCTGCG

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР-РВ.

2.1.4. Реактивы для вестерн-блоттинга

Раствор для лизиса клеток (Triton X-100 lysis buffer): 150 mM NaCl (Sigma), 1% Triton X-100 (Amresco, CША), 50 mM TRIS (Amresco), pH 8,0. Хранить при +4°C. Непосредственно перед использованием добавляется коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз MSSAFE (Sigma) или коктейль ингибиторов протеаз cOmplete mini (Roche, Франция) согласно инструкции.

6-кратный буфер для образцов: 0,35 М TRIS (pH 6,8), 30% глицерин (Sigma), 10% додецилсульфат натрия (SDS, Serva, Германия), 0,6 М дитиотреитол (Sigma), 0,012% бромфеноловый синий (Amresco). Аликвоты хранятся при -70°С.

5-кратный электродный буфер: 0,125 М TRIS, 0,96 М глицин (Amresco), 0,5% SDS. Хранить при комнатной температуре. Перед использованием развести 1:5 деионизованной водой.

Буфер для полусухого переноса (Bjerum and Shafer-Nielsen): 48 mM TRIS, 39 mM глицин, 20% этанол, 0,04% SDS. Хранить при +4°С.

Промывающий буфер: PBS (ПанЭко, Россия) с 0,05% Твин-20 (Sigma). Готовится непосредственно перед опытом.

Блокирующий буфер: промывающий буфер с добавлением 5% БСА (ПанЭко, Россия) или 5% обезжиренного сухого молока (Applichem, Германия) в зависимости от инструкции к первичным антителам. Готовится непосредственно перед опытом.

Полиакриламидный гель с SDS (SDS-PAGE): TGX Any kD (Bio-Rad, США).

Мембрана для электроблоттинга белков: Immun-Blot PVDF Membranes for Protein Blotting (Bio-Rad, США).

Фильтровальная бумага для полусухого переноса: Gel Dryer Bio-Rad Model 543 (Bio-Rad, США).

Первичные антитела: см. Таблицу 3.

Вторичные антитела: к кроличьим IgG, меченные пероксидазой, к мышиному IgG1, меченные пероксидазой, к козьим иммуноглобулинам, меченные биотином (все Jackson Immunoresearch, США).

Стрептавидин, меченный пероксидазой (BD Pharmingen, США).

Целевой белок	Описание антител	Кат. №	Производитель	
c-Rel	Кроличьи моноклональные	4727	Cell Signaling Technology (CIIIA)	
p65/Rel-A	Кроличьи моноклональные	8242	Cell Signaling Technology	
p105/p50	Кроличьи моноклональные	12540	Cell Signaling Technology	
p100/p52	Кроличьи моноклональные	37359	Cell Signaling Technology	
ΙκΒα	Кроличьи поликлональные	9242	Cell Signaling Technology	
гистон Н3	Кроличьи поликлональные	9715	Cell Signaling Technology	
p38	Кроличьи поликлональные	9212	Cell Signaling Technology	
фосфо-р38 (рТ180/рҮ182)	Кроличьи поликлональные	9211	Cell Signaling Technology	
Akt	Кроличьи поликлональные	9272	Cell Signaling Technology	
фосфо-Akt (pT308)	Кроличьи поликлональные	9275	Cell Signaling Technology	
фосфо-Akt (pS473)	Кроличьи поликлональные	4060	Cell Signaling Technology	
MNK1	Кроличьи поликлональные	2195	Cell Signaling Technology	
фосфо-MNK1 (рТ197/рТ202)	Кроличьи поликлональные	2111	Cell Signaling Technology	
eIF4E	Кроличьи поликлональные	9742	Cell Signaling Technology	
фосфо-еIF4E (pS209)	Кроличьи поликлональные	9741	Cell Signaling Technology	
фосфо-р70 (рТ389)	Кроличьи поликлональные	9205	Cell Signaling Technology	
α-тубулин	Мышиные моно-	NB100-	Novus Biologicals (CIIIA)	
	клональные, клон DM1A	690		
ERK1/2	Мышиные моноклональные	4696	Cell Signaling Technology	
фосфо-ERK1/2 (рТ202/рҮ204)	Мышиные моноклональные	9106	Cell Signaling Technology	
IL-1β	Козьи поликлональные	AF-401- NA	R&D Systems(CIIIA)	
ACOD1	Кроличьи моноклональные	77510	Cell Signaling Technology	
ΙκΒε	Кроличьи моноклональные	ab13414 3	Abcam (Великобритания)	
TNFAIP3/A20	Кроличьи моноклональные	5630	Cell Signaling Technology	

Таблица 3. Использованные в работе антитела.

Двухкомпонентный субстратный раствор для хемилюминесцентной детекции пероксидазы: Immobilon Western (Merck Millipore) или Clarity (Bio-Rad).

2.1.5. Реактивы для выделения цитозольной и ядерной фракций макрофагов.

Коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete mini, Roche)

Нонидет P-40 (Amresco)

6-кратный буфер для образцов: см. раздел по Вестерн-блоттингу.

10-кратный гипотонический буфер: 100 mM HEPES, 1.5 mM MgCl2, 100 mM KCl (все Sigma). Перед использованием разводится деионизованной водой в 10 раз.

2.1.6. Реактивы для иммуноферментного анализа

TNF alpha Human ELISA Kit (Thermo scientific, CIIIA); IL-6 Human ELISA Kit (Thermo scientific, CIIIA); IL-1β Human ELISA Kit (Thermo scientific, CIIIA).

2.1.7. Реактивы для иммунофлуоресцентного окрашивания клеток

Кроличьи поликлональные антитела против p65 и c-Rel человека (Cell Signaling Technologies, cat.# 8242 и 4727, соответственно).

Ослиные антитела к кроличьему IgG, конъюгированные с NorthernLights NL493 (R&D Systems).

Среда ProLong anti-fade Gold, содержащая DAPI (Thermo Fisher, США).

Поли-D-лизин 1мг/мл (Thermo Fisher, США)

4% параформальдегид (Sigma, США), 95% - этанол (ООО «Гиппократ», Россия)

2.1.8. Реактивы для оценки противоопухолевой активности макрофагов

Клетки человеческой эритромиелолейкозной линии К562 (Всероссийский банк клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Пропидий-йодид (PI, Sigma, CША)

5,6-карбоксифлюоресцеиндиацетат-сукцинимидиловый эфир (CFSE, Molecular Probes, США)

2.1.9. Расходные материалы

Планшеты 96-луночные для ПЦР (Ахудеп, США); плоскодонные стерильные планшеты для культивирования клеток 6 и 24-луночные (SPL Life Sciences, Республика Корея); чашки Петри, 60мм, (SPL Life Sciences, Республика Корея) планшеты Seahorse XF96 (Agilent, США); пробирки центрифужные стерильные объемом 15 и 50мл (SPL Life Sciences, Республика Корея); скребки для клеток (SPL Life Sciences, Республика Корея); одноразовые полипропиленовые микропробирки на 1,5 мл и 0,5 мл типа Эппендорф (Ахудеп, США); одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с аэрозольным барьером до 200 мкл и до 1000 мкл (Ахудеп, США); одноразовые наконечники для дозаторов переменного объема с США); стерильные пробирки, содержащие литий-гепарин фирмы Sarstedt (Германия), 8-луночные слайды поли-D-лизиновой камеры (SPL Life Sciences, Южная Корея).

2.1.10. Оборудование

СО₂-инкубатор Jouan IGO150 (Jouan, Франция).

Спектрофотометр DU[®] 730 (Beckman Coulter, CША).

Прибор для проведения ПЦР в реальном времени 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США).

Планшетный ридер Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation, США).

Камера для вертикального электрофореза Mini Protean II (Bio-Rad, США). Проточный цитометр FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Установка для полусухого переноса Trans-Blot SD (Bio-Rad, CША).

Имиджер Amersham Imager 600 (Amersham, Великобритания) для хемилюминесцентной детекции результатов Вестерн-блоттинга и флюоресцентной детекции результатов электрофореза ДНК.

Прибор для анализа клеточного метаболизма в реальном времени Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies, США)

Флюоресцентный микроскоп Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия).

Ламинарные шкафы, центрифуга с качающимися подвесками, центрифуга с ротором фиксированного угла, холодильники с поддержанием температуры +4, -20 и 70°C, дозаторы переменного объема.

2.2. Использованные методы

2.2.1. Доноры крови

Для каждой серии экспериментов использовали кровь не менее чем от 3 здоровых доноров обоего пола. Критериями включения в донорские группы были: возраст от 20 до 60 лет, отсутствие хронических инфекционных и воспалительных заболеваний, отсутствие онкологических заболеваний, а также отсутствие острых инфекционных заболеваний на момент исследования либо разрешившихся менее чем за две недели до исследования.

2.2.2. Забор крови и выделение мононуклеарных клеток

Забор крови у здоровых доноров (50-100 мл) осуществляли из периферической вены в стерильные пробирки фирмы Sarstedt (Германия), содержащие литий-гепарин. Кровь разводили средой RPMI-1640 в 2 раза, и по 10 мл разведенной крови наслаивали на 3 мл фиколл-верографина. Пробирки центрифугировали при 400g в течение 25 минут при +15°C, после чего отбирали слой мононуклеарных клеток (МНК) с границы между фиколл-верографином и плазмой. Клетки два раза отмывали средой RPMI-1640.

2.2.3. Культивирование макрофагов

Макрофаги получали методом культивирования с ГМ-КСФ, который является одним из факторов роста и дифференцировки макрофагов [174]. Мононуклеарные клетки ресуспендировали в среде для адгезии моноцитов, считали в камере Горяева и доводили концентрацию до 10 млн/мл. Вносили требуемый объем суспензии МНК в планшеты или чашки Петри. Инкубировали в CO₂-инкубаторе с поддержанием температуры +37°C и концентрации CO₂ 5% (Jouan, Франция) 1 час. После этого отбирали среду с неприлипшими клетками; оставшиеся неприлипшие клетки удаляли путем двукратной промывки теплой RPMI-1640. Прилипшие мононуклеарные клетки (моноциты) культивировали в ПКС с добавлением ГМ-КСФ в течение 6 суток. На 3-и сутки культуральную среду полностью меняли на свежую ПКС с добавлением ГМ-КСФ. Через 6 дифференцированные макрофаги суток отделяли ОТ пластика трипсинизированием, отмывали и подсчитывали. Макрофаги представляли собой округлые, распластанные, плотно прикрепленные к субстрату клетки (рис. 10). По данным проточной цитометрии фенотип макрофагов был CD11c⁺, CD14⁺ (для окрашивания использовали антитела к CD11c FITC и CD14 PE, изотипический контроль - мышиные IgG1 с меткой FITC и PE (все Beckman Coulter, США). Измерения проводились на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, CIIIA).

2.2.4. Стимуляция клеток

Макрофаги стимулировали М-триДАП (Invivogen, США), ЛПС *E. coli* O111:B4 (Merck Millipore, США) и их сочетаниями. В предварительных экспериментах концентрации М-триДАП варьировали от 0,1 до 10 мкг/мл, ЛПС – от 0,1 до 100 нг/мл. В дальнейшем М-триДАП использовали в концентрации 10 мкг/мл, ЛПС – 10 нг/мл (сочетание концентраций, дающее выраженный

синергический эффект). Контрольные клетки инкубировали без агонистов. В зависимости от цели эксперимента, время стимуляции варьировало от 15 мин до 24 часов.

Для оценки продукции цитокинов клетки помещали в 96-луночные 20 000 клеток/лунку в плоскодонные планшеты по 100 мкл ПКС и стимулировали различными концентрациями М-триДАП и/или ЛПС в дублях. Для комбинированной стимуляции агонисты добавляли одновременно. Супернатанты собирали через 3 и 24 ч после начала стимуляции и хранили при температуре -70°С до анализа. Для ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР), вестерн-блоттинга и измерения потребления глюкозы и высвобождения лактата макрофаги стимулировали в 24-луночных культуральных планшетах МтриДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) или их комбинацией или оставляли без обработки и собирали в указанные моменты времени.

Ингибитор RIP2 (SB203580, конечная концентрация 5 мкМ) и ингибитор NOD1 (ML130, 10 мкМ) добавляли за 15 мин до или через 60 мин после добавления агонистов. Все остальные ингибиторы (PF-184, 1 мкМ; Амлексанокс, 100 мкМ), нейтрализующие антитела и антисыворотки против TNF (конечная концентрация 5 мкг/мл), IL-1α (5 мкг/мл), IL-1β (5 мкг/мл), IFNα (5000 HE/мл), IFN-β (1360 HE/мл), нормальный козий IgG (5 мкг/мл), а также IL-1RA (500 нг/мл) добавляли за 15 мин до внесения агонистов.

Эксперименты с переносом супернатанта проводились следующим образом. Макрофаги высевали в 6-луночные культуральные планшеты по 10⁶ клеток/лунку и стимулировали 10 мкг/мл М-триДАП, 10 нг/мл ЛПС или их комбинацией или оставляли необработанными в течение 1 часа. Затем среды удаляли, монослои клеток дважды промывали 5 мл теплой RPMI-1640 и культивировали в течение еще 3 часов с 2 мл полной культуральной среды без агонистов. Эти супернатанты собирали, инкубировали с полимиксином Б (25 мкг/мл) или без него в течение 10 мин при 37°С, после чего аккуратно

добавляли к отмытым монослоям нестимулированных аутологичных макрофагов. В добавленный супернатант вносили М-триДАП (10 мкг/мл) или ЛПС (10 нг/мл). Через 4 часа эти макрофаги собирали и использовали для измерения мРНК цитокинов с помощью ПЦР-РВ.

2.2.5. Выделение ядер и цитозольной фракции макрофагов

Эксперимент проводили в 24-луночных планшетах. Образцы ядерной и цитозольной фракции макрофагов получали каждые 15 мин. в течение 210 мин после добавления агонистов – М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетания. В те же сроки получали контрольные образцы нестимулированных клеток. После стимуляции из лунок удаляли супернатант, макрофаги отмывали однократно 0,5 мл холодного PBS, после чего добавляли 100 МКЛ гипотонического буфера, содержащего коктейль ингибиторов протеаз. Планшет инкубировали на льду 12 мин, периодически покачивая. Добавляли 6 мкл 10% Нонидета P-40 (Amresco, США) до конечной концентрации 0,6%, инкубировали еще 30 с, затем интенсивно пипетировали и собирали клеточные лизаты. Ядра осаждали путем центрифугирования при 2000 g в охлажденной центрифуге. Отбирали надосадок (цитозольную фракцию) и добавляли к нему 1/5 объема 6кратного буфера для образцов. Осадок ядер отмывали однократно 150 мкл гипотонического буфера с ингибиторами протеаз (2000 g в охлажденной центрифуге), после чего лизировали в 1-кратном буфере для образцов. Все образцы прогревали в течение 5 минут при 90°С, после чего анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

2.2.6. Иммуноферментный анализ

Уровни фактора некроза опухоли (TNF), IL-6 и IL-1β в супернатантах клеточных культур определяли методом сэндвич-ИФА с использованием наборов реагентов, соответственно, от Thermo Fisher / eBioscience.

2.2.7. Определение экспрессии генов с помощью в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией

Тотальную РНК выделяли из культур макрофагов с помощью набора реактивов фирмы Jena Bioscience (Германия). Качество РНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле. Количество РНК определяли на спектрофотометре DU[®]730 (Beckman Coulter, CША), для этого измеряли абсорбцию образцов (А) при длинах волн 260 и 280нм. Соотношение A_{260}/A_{280} составляло не менее 2,0. Концентрацию РНК рассчитывали по формуле $C_{исх. образца}$ [мкг/мл] = $A_{260} * 40 *$ разведение.

0,5 мкг тотальной РНК подвергали обратной транскрипции с помощью набора реактивов для синтеза первой цепи кДНК RevertAid (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Использовали олигодезокситимидиновый праймер.

Дизайн праймеров для ПЦР-РВ проводили с помощью программы Primer-(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi). BLAST Праймеры произведены в компании «Евроген» и представлены в списке реактивов (таблица 1). Для амплификации использовали стандартные условия: 95°С, 5 мин, затем 40 циклов 95°C, 15 с / 60°C, 45 с. Специфичность реакции подтверждали путем анализа кривых плавления (наличие единственного пика в координатах «температура – 1-я производная сигнала»). Относительную экспрессию рассчитывали по методу относительного количественного анализа Livak (2^{-ΔΔCt}) [175]. Для нормирования использовали ген *GAPDH*. В качестве референс-образца служили нестимулированные клетки В точке 1 Ч, относительную экспрессию исследуемых генов в этих образцах принимали за 1.

2.2.8. Количественное определение сплайсированной мРНК и несплайсированной пре-мРНК ТNF с помощью ПЦР-РВ

Праймеры для определения сплайсированной мРНК *TNF* располагались в 1-м и 4-м экзонах, для определения полноразмерной пре-мРНК *TNF* – в 3-м

(последнем) интроне и 4-м (последнем) экзоне. Для количественного определения мРНК и пре-мРНК были получены два стандартных ампликона с количеством копий. Стандартные известным ампликоны полностью перекрывали соответствующие ампликоны ПЦР-РВ и содержали 50-100 дополнительных пар оснований с обоих концов. Последовательности TNF forward праймеров получения стандартных ампликонов: для AGGCGGTGCTTGTTCCTC, reverse TTGAAGAGGACCTGGGAGTAGA, TNF несплайсированная forward CAGAACGTCATGGCCAGGTG, reverse ТСТСGTAGGAGACGGCGAT. Условия ПЦР-амплификации: 95°С, 5 мин, затем 40 циклов 95°C, 15 с / 60°C, 45 с. Ампликоны выделяли путем электрофореза в 1,5% агарозном геле с последующей очистком набором (Евроген, Россия). Количество Cleanup S-Cap реактивов выделенных ампликонов измеряли путем спектрофотометрии при длине волны 260 нм, количество копий в 1 мкл рассчитывали по формуле: количество копий = (концентрация ДНК [г/мкл] / М(ампликона) [г/моль]) * N_A [копий/моль]. При постановке ПЦР-РВ готовили калибровочные пробы, содержащие от 10³ до 10⁷ копий на реакцию с шагом 10, по значениям Сt калибровочных проб строили калибровочные кривые, которые использовали для определения количества копий РНК в исследуемых образцах. кДНК для ПЦР-РВ получали, как описано выше в разделе 2.2.7, однако в качестве праймера при обратной транскрипции использовали гексамеры случайной последовательности.

2.2.9. Вестерн-блоттинг

Клетки отмывали PBS и лизировали в растворе для лизиса клеток с Тритоном X-100 с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS (SDS-PAGE) проводили с использованием готовых гелей TGX Any kD (Bio-Rad, CША) в камере для вертикального электрофореза Mini Protean II (Bio-Rad, CША). Далее белки переносили на мембраны из поливинилиден-дифторида Immun-Blot PVDF

Membranes for Protein Blotting (Bio-Rad, США). Полусухой перенос делали в буфере Bjerrum Schäfer-Nielsen (30 мин. при 15 В) в камере для полусухого переноса Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, США). После переноса мембраны блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином или 5% обезжиренным сухим молоком, в зависимости от рекомендаций к конкретным антителам (1 ч при комнатной температуре). Инкубацию с первичными антителами проводили при +4°C в течение ночи, после чего мембраны отмывали PBS с 0,05% Твин-20 (3 раза по 10 мин). Связавшиеся первичные антитела выявляли с помощью соответствующих вторичных антител, меченных пероксидазой (Jackson Immunoresearch, США). При определении про-IL-1β в качестве вторичных антител использовали антитела к козьему IgG, меченные биотином, после чего мембраны дополнительно инкубировали с раствором стрептавидин-пероксидазы (BD Pharmingen, США). Далее мембраны отмывали и инкубировали с субстратным раствором для хемилюминесцентной детекции (Bio-Rad, CША). Хемилюминесцентный сигнал выявляли с помощью высокочувствительного имиджера Amersham Imager 600 (Amersham, Великобритания). Денситометрический анализ делали в программе ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij). Для нормировки результатов использовали сигнал альфа-тубулина. Все результаты выражали как отношение сигнала в опытном образце к сигналу в референс-образце (нестимулированные клетки в точке 0 часов). Гистон НЗ и α-тубулин использовали как контроли загрузки, соответственно, для ядерной и цитозольной фракции; наряду с этим, отсутствие α-тубулина в ядерной фракции и отсутствие гистона НЗ в цитозольной фракции служило критерием их чистоты.

2.2.10. Исследование потребления глюкозы и высвобождения лактата

Макрофаги помещали в 24-луночные планшеты в количестве 250 тыс. клеток в 500 мкл ПКС на лунку, после чего добавляли растворы М-триДАП и ЛПС, приготовленные на ПКС. В лунки отрицательного контроля добавляли ПКС без агонистов. В качестве референс-образца использовали чистую ПКС без клеток. Планшеты инкубировали 24 ч. при +37°С в атмосфере 5% СО₂, после чего собирали супернатанты. Концентрацию глюкозы в супернатантах и в ПКС определяли на биохимическом анализаторе Synchron CX5 Pro или AU480 (Beckman Coulter, США). Потребление глюкозы (ПГ) одной клеткой за 24 ч рассчитывали по формуле $\Pi\Gamma = (C_{\Pi KC} - C_{cvпернатант}) * 5*10^{-4} / 250000, где$ 5*10⁻⁴ – объем культуры (в литрах), 250000 – количество клеток в культуре. Результаты нормализовали по количеству клеточного белка, принимая количество белка в нестимулированной лунке в данном опыте за 100%. Концентрации лактата измеряли колориметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы Biovision (США), либо на приборе AU480. Высвобождение в расчете на лактата клетку вычисляли аналогично потреблению глюкозы.

2.2.11. Анализ клеточного метаболизма в реальном времени

Скорость закисления внеклеточной (extracellular medium среды acidification rate или ECAR) и скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate или OCR) измеряли на приборе Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies, CША). ECAR и OCR отражают интенсивность, соответственно, гликолиза и митохондриального дыхания. Изменения рН и содержания кислорода фиксируются чувствительными датчиками в тонком слое среды, прилегающем к клеточному монослою. Макрофаги высевали в планшеты Seahorse XF96 (Agilent) в количестве 16000 клеток на лунку в 80 мкл ПКС. Наутро производили замену ПКС на специальную среду для измерений (рецептура – см. выше). После уравновешивания рН в инкубаторе с атмосферным воздухом планшеты переносили в прибор. ECAR и OCR измеряли каждые 9 мин (продолжительность измерений – 3 мин). После 3 базальных измерений впрыскивали стимуляторы (растворы М-триДАП, ЛПС или среду для измерений) и делали еще 22 измерения. Результаты

нормализовали по клеточному белку. Вычисляли площади под кривыми «время – ответ» (AUC) после добавления стимуляторов.

2.2.12. Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток.

Иммунофлуоресцентное окрашивание макрофагов проводили по ранее описанному протоколу [176], с некоторыми изменениями. 8-луночные слайдфлаконы (SPL Life Sciences, Южная Корея) покрывали поли-D-лизином (100 мкг/мл, 10 комнатной температуре), отмывали МИН. при стерильной деионизованной водой и подсушивали. Макрофаги вносили в лунки по 5*10⁴ клеток/лунку и оставляли на ночь. На следующий день клетки стимулировали М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл), их комбинацией, или оставляли без стимуляции. Спустя необходимое время супернатант удаляли и клетки 4%-ным фиксировали параформальдегидом (15 МИН при комнатной температуре). Клетки отмывали и пермеабилизировали 95% ледяным этанолом (-20°С, 30 мин). Неспецифическое связывание блокировали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина на PBS с 0,05% Твин-20. Затем клетки инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против p65 (Cell Signaling Technologies, cat.# 8242; 1:400 на блокирующем буфере, 1 ч при комнатной температуре). Слайды отмывали 3 раза, после чего инкубировали с ослиными антителами к кроличьему IgG, меченными NorthernLights NL493 (R&D Systems, США, 1:100 на разводящем буфере, 1 ч при комнатной температуре в темноте). После отмывок слайды покрывали средой ProLong Gold, содержащей DAPI (Thermo Fisher). Изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM LB (Leica Microsystems, Германия). Анализ изображений проводили в программе ImageJ. Ядерные регионы интереса (ROI) устанавливали в соответствии с окрашиванием DAPI, цитоплазматические ROI – в соответствии с фоновым окрашиванием цитоплазмы р65. Анализировали не менее 100 клеток для каждого времени стимуляции и типа агониста. Для каждой клетки измеряли среднюю интенсивность окрашивания p65 в цитоплазме и ядре и рассчитывали соотношение интенсивностей ядра и цитоплазмы (nucleus-to-cytoplasm ratio [NCR]). Клетки с положительным окрашиванием на ядерный NF-кB определяли как те, у которых NCR превышал среднее значение NCR + 2σ нестимулированных клеток.

2.2.13. Оценка противоопухолевых свойств макрофагов

Макрофаги помещали в 24-луночные планшеты (SPL Life Sciences) в количестве $2*10^5$ клеток (если не указано иное) в 400 мкл ПКС на лунку. Планшеты оставляли на 24 часа в CO₂-инкубаторе для прикрепления макрофагов к пластику. Через 24 ч меняли ПКС на свежую. Далее к макрофагам добавляли: М-триДАП (конечная концентрация – 10 мкг/мл), либо ЛПС (конечная концентрация – 10 нг/мл), либо сочетание М-триДАП и ЛПС в тех же концентрациях, либо рекомбинантный TNF (конечная концентрация – 100 нг/мл), либо равный объем ПКС. Сразу после этого в лунки вносили клетки K562, меченные CFSE, в количестве $4*10^3$ на лунку (соотношение эффектор : мишень = 50:1, если не указано иное). Суммарный объем среды в лунках составлял 400 мкл. Контролем служили культуры K562 без макрофагов. Нейтрализующие антитела к TNF и контрольный козий IgG (конечная концентрации – 7,5 мкг/мл), нейтрализующие антитела к IFN- β (конечная концентрация - 1,36*10³ НЕ/мл) и апоцинин (конечная концентрация – 100 мкМ) вносили за 15 минут до внесения агонистов и клеток K562.

Планшеты инкубировали в течение 24 ч или 72 ч в CO₂-инкубаторе, после чего оценивали количество живых клеток К562 методом проточной цитометрии. Для этого клетки К562 взбалтывали в имеющемся объеме супернатанта, который полностью переносили в цитометрические пробирки с добавлением РІ до конечной концентрации 1 мкг/мл. Клетки, котороые отделялись методом пипетирования далее называются «неприлипшие».

«Прилипшие» клетки - это клетки, плотно связанные с макрофагами, не отделяемые при пипетировании и переходящие в суспензию только при трипсинизации. Оставшиеся прилипшие клетки трипсинизировали, собирали, доводили объем до 400 мкл с помощью ПКС, переносили в цитометрические пробирки и добавляли PI (1 мкг/мл). Все пробы записывали на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, США) в течение 120 с, что 30% соответствует объема пробы. Постоянство скорости потока контролировали с помощью частиц Flow-CheckTM (Beckman Coulter, CША). Живые клетки К562 определяли как CFSE⁺PI⁻ события. Пробы с неприлипшими и прилипшими клетками из каждой лунки записывали раздельно, число живых К562 в обоих пробах суммировали. Результаты выражали в процентах по отношению к численности живых клеток К562 в культурах без макрофагов в том же эксперименте.

Эффект сочетания агонистов NOD1 и TLR4 оценивали по индексу синергизма (ИС), который рассчитывали по формуле: ИС = (D–A)/((D–B)+(D–C)), где А – количество живых клеток К562 в культурах с М-триДАП+ЛПС, В – с М-триДАП, С – с ЛПС, D – без агонистов.

2.2.14. Опыты с переносом супернатантов

Для получения супернатантов макрофаги ($2*10^5$ клеток в 400 мкл ПКС) культивировали в 24-луночных планшетах в течение 72 ч без агонистов или с М-триДАП+ЛПС. Супернатанты полностью собирали и центрифугировали 10 мин при 16000 об/мин для осаждения клеточных фрагментов, надосадок аккуратно отбирали в стерильные эппендорфы. Для нейтрализации остаточного ЛПС супернатанты инкубировали с 50 мкг/мл антагониста ЛПС – полимиксина В, для нейтрализации TNF – с 7,5 мкг/мл нейтрализующих антител к TNF (все в течение 30 мин. при +37°С). Далее из отдельно приготовленных лунок с неактивированными аутологичными макрофагами ($2*10^5$) полностью отбирали

культуральную среду и заменяли ее на равный объем супернатантов, после чего вносили CFSE-меченные клетки K562 (4*10³). Содержание живых клеток K562 оценивали через 72 ч, как описано выше.

Прямое действие супернатантов на клетки К562 оценивали аналогичным образом, но супернатанты переносили в свежие лунки без макрофагов.

2.2.15. Опыты с разобщением макрофагов и клеток К562

Использовали 24-луночные трансвелл-планшеты с полупроницаемыми мембранами (диаметр пор – 8 мкм, Corning, США). Макрофаги (2*10⁵) и агонисты NOD1 и TLR4 помещали в нижние камеры планшетов, клетки К562 (4*10³) – в верхние. Через 72 ч собирали клетки из верхних камер, анализировали содержание живых К562 с помощью проточного цитометра, как описано выше.

2.2.16. Анализ данных

Для оценки кооперации двух агонистов вычисляли индексы синергизма (ИС) по формуле: ИС = Ответ (С1, С2) / (Ответ (С1) + Ответ (С2)), где Ответ (С1, С2) – ответ клеток на стимуляцию сочетанием агонистов 1 и 2 в концентрациях С1 и С2 соответственно, Ответ (С1) и Ответ (С2) – ответы на стимуляцию агонистом 1 в концентрации С1 и агонистом 2 в концентрации С2. Кооперация считалась синергической при ИС > 1 с достоверностью p < 0,05 в t-тесте Стьюдента, аддитивным – при отсутствии достоверного отличия ИС от 1, инфра-аддитивным – при 0,5 < ИС < 1, с достоверностью отличия от 1 p < 0,05. Для статистического анализа использовали программы GraphPad Instat 3.06 или GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Для отражения степени линейной зависимости между двумя массивами данных вычисляли коэффициент корреляции по Пирсону. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Продукция TNF при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4

Вначале мы определили, при каких концентрациях агонистов NOD1 и TLR4 происходит синергическое увеличение продукции цитокинов макрофагами. Для этого определяли уровни TNF в супернатантах макрофагов, полученных от здоровых доноров, через 3 и 24 ч после одновременного добавления М-триДАП и ЛПС в различных концентрациях раздельно и в сочетаниях.



В Индексы синергизма TNF						
	Зч		244			
МтриДАП ЛПС	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл
0,1 нг/мл	0,62±0,2	1,04±0,4	1,31±0,36	0,99±0,52	2,48±0,98	2,36±0,68*
1 нг/мл	0,68±0,32	1,07±0,68	1,19±0,2	1,61±0,29*	4,18±1,16*	3,87±0,56**
10 нг/мл	0,71±0,21	0,75±0,31	1,32±0,32	1,43±0,32	3,81±1,49*	3,82±0,76**
100 нг/мл	0,88±0,22	0,92±0,58	1,01±0,17	1,39±0,17*	3,83±0,29***	3,66±0,71**

Рисунок 5. Уровни TNF в супернатантах культур макрофагов человека. при раздельной и сочетанной стимуляции агонистами NOD1 (М-триДАП) и TLR4 (ЛПС) в указанных концентрациях. А – уровни TNF через 3 ч и Б – уровни TNF через 24 ч (средние значения, 4 донора). В - индексы синергизма по продукции TNF при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях. М $\pm \sigma$, n = 4. * Отличие индексов синергизма (ИС) от 1 с р < 0,05; ** отличие ИС от 1 с р < 0,01; *** отличие ИС от 1 с р < 0,001.

При стимуляции ЛПС и М-триДАП по отдельности продукция TNF возрастает по мере увеличения концентрации агониста; при этом уровни TNF в точке 24 ч не выше, чем в точке 3 ч (рис. 5А, 5Б). При сочетанной стимуляции наблюдается взаимное усиление эффектов двух агонистов, преимущественно в точке 24 ч; уровни TNF в этой точке нарастают по сравнению с точкой 3 ч при большинстве сочетаний концентраций агонистов (рис. 5А, 5Б).

Анализ индексов синергизма (ИС) продукции TNF показал, что через 3 ч после начала стимуляции имеет место простая суммация эффектов агонистов (ИС ≈ 1; рис. 5В). Однако через 24 ч очевиден синергический эффект двух агонистов (ИС > 2 при большинстве сочетаний концентраций).

Таким образом, судя по продукции TNF, кооперация агонистов NOD1 и TLR4 носит синергический характер, однако синергизм проявляется на относительно поздних сроках активации клетки.

Для дальнейших экспериментов М-триДАП и ЛПС использовали в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл (концентрации, дающие выраженный синергический эффект по продукции TNF).

3.2. Экспрессия мРНК цитокинов и хемокинов при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4

Чтобы подробнее охарактеризовать ответ макрофагов на сочетанную стимуляцию агонистами NOD1 и TLR4, изучили экспрессию мРНК ряда цитокинов, хемокинов и интерферон-индуцируемого гена *MX1*, являющегося маркером интерферонового ответа I типа. Все эти гены индуцируются в разные сроки стимуляции как М-триДАП, так и ЛПС, за исключением *MX1*, который индуцируется только ЛПС (рис. 6).



🗆 без стимуляции 🛛 М-три ДАП 10 мкг/мл 🔳 ЛПС 10 нг/мл 🔳 М-триДАП + ЛПС

Рисунок 6. Экспрессия мРНК *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL12B*, *IL23A*, *MX1*, *CCL3*, *CCL4* через 1, 4 и 9 часов после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл (М ± σ, n = 4).

Как видно на рис. 6, через 1 ч после добавления стимуляторов происходит увеличение экспрессии мРНК всех исследованных генов, кроме *MX1*, однако синергическая индукция мРНК еще отсутствует, наблюдается простая суммация эффектов двух агонистов (табл. 4).

Таблица 4. Индексы синергизма по экспрессии мРНК *TNF*, *IL6*, *IL1B*, *IL12B*, *IL23A*, *CCL3*, *CCL4* и *MX1* через 1, 4 и 9 часов после добавления М-триДАП и ЛПС в концентрациях 10 мкг/мл и 10 нг/мл, соответственно ($M \pm \sigma$, n = 5). * Отличие индексов синергизма (ИС) от единицы с p < 0.05; ** отличие ИС от единицы с p < 0.01.

	Время	1 час	4 часа	9 часов
Ген				
TNF		1,04±0,31	4,41±1,58**	5,87±2,60*
IL6		1,76±1,38	4,05±1,12**	18,13±5,19*
IL1B		1,38±0,63	2,25±0,71**	4,25±2,88
IL12B		2,67±2,64	5,56±2,58*	8,55±3,66*
IL23A		1,65±0,74	3,17±0,81**	9,25±4,94*
MX1		2,94±5,9	2,09±2,40	0,99±0,19
CCL3		1,00±0,28	2,72±2,08	3,19±1,45*
CCL4		1,1 4±0,39	2,71±2,53	2,85±1,51

В более поздних точках – 4 и 9 ч – наблюдается синергическое увеличение экспрессии мРНК цитокинов TNF, IL6, IL1B, IL12B, IL23A, а также хемокина CCL3 (только в точке 9 ч).

Данные по экспрессии мРНК TNF и IL6 согласуются с данными по продукции этих цитокинов (рис. 6), если учесть, что наработка и секреция белкового продукта гена запаздывает по сравнению с экспрессией мРНК.

Таким образом, синергический эффект агонистов NOD1 и TLR4 формируется на уровне экспрессии мРНК между 1 и 4 ч после начала стимуляции (табл. 4).

Что касается генов *MX1*и *CCL4*, то увеличение экспрессии их мРНК не носило синергического характера ни в одной из исследованных точек.

3.2.1. Анализ кинетики экспрессии мРНК TNF и IL6 при стимуляции МтриДАП и ЛПС

Чтобы точнее определить временные рамки развития синергического эффекта, исследовали кинетику экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* в первые 4 часа после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов ЛПС и М-триДАП.

В присутствии М-триДАП и ЛПС уровень мРНК *TNF* достигал максимума, соответственно, через 120±30 мин. и 100±17 мин. после начала стимуляции, а затем снижался, оставаясь к исходу 4 ч значительно выше базальных значений (рис. 7А, таблица 5).

Накопление мРНК *TNF* при стимуляции М-триДАП несколько запаздывало по сравнению с таковым при стимуляции ЛПС (рис. 7А). Вероятно, это обусловлено различиями в субклеточной локализации соответствующих рецепторов, из-за чего агонистам NOD1 требуется больше времени для достижения «своего» рецептора, чем агонистам TLR4

При сочетанной стимуляции уровни мРНК *TNF* вплоть до 90-й минуты не отличались от таковых при стимуляции ЛПС, но со 120-й минуты становились достоверно выше, чем при стимуляции ЛПС (рис. 7А).



Рисунок 7. Кинетика экспрессии и индексы синергизма мРНК *TNF* и *IL6* в течение первых 4 часов после стимуляции клеток М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетанием. А, В – log-трансформированные значения ОЭ (относительной экспрессии) *TNF* и *IL6*, Б и Г - соответствующие значения индексов синергизма (M $\pm \sigma$, n = 4). * - значения достоверностей: на графиках А и В p<0,05 для сравнения клеток, стимулированных ЛПС и М-триДАП+ЛПС в соответствующих точках, на графиках Б и Г p<0,05 для отличия ИС от 1.

Максимум экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции достигался через 150±30 мин, что достоверно позже, чем при стимуляции ЛПС (таблица 5). Далее вплоть до конца опыта уровень мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции находился на плато. Достоверный синергический эффект (ИС > 1 при р < 0,05) регистрировался со 150-й минуты включительно (рис. 7Б).
Таблица 5. Время (в минутах) достижения максимальных (T_{max}) значений уровней мРНК TNF и IL6 в зависимости от условий стимуляции. М ± σ, n = 3.

Показатель		1	2	3	р	р	р
		М-триДАП	ЛПС	М-триДАП	(1-2)	(1-3)	(2-3)
				+ЛПС			
мРНК TNF	T _{max}	120±30	100±17	150±30	0,187	0,144	0,033
мРНК <i>IL6</i>	T _{max}	190±46	180±46	220±17	0,415	0,174	0,165

Таким образом, особенность экспрессии мРНК *TNF* при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 состоит в продолжающемся накоплении мРНК *TNF* между 90-й и 150-й минутами после начала стимуляции.

Экспрессия мРНК *IL6* возрастала медленнее, чем экспрессия мРНК *TNF*: максимум экспрессии мРНК *IL6* при стимуляции М-ДАП достигался через 190±46 мин, при стимуляции ЛПС – 180±46 мин, при сочетанной стимуляции – 220±17 мин (рис. 7В, таблица 5). Как и в случае мРНК *TNF*, синергическое усиление экспрессии мРНК *IL6* регистрировалось начиная со 150-й минуты стимуляции (рис. 7Г). Таким образом, события, приводящие к синергическому усилению экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* происходят в период примерно после 150-й минуты от начала стимуляции.

3.2.2. Анализ сплайсинга мРНК TNF

Сплайсинг пре-мРНК с образованием зрелой мРНК является критическим шагом в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов [177]. Существуют работы, где особенности кинетики экспрессии различных зрелых мРНК в процессе активации клетки пытались объяснить именно особенностями кинетики сплайсинга, а не транскрипции [178].

Мы проверили, может ли синергическое увеличение уровней мРНК *TNF*, наблюдаемое при сочетанной стимуляции NOD1+TLR4, быть вызвано

увеличением сплайсинга пре-мРНК, накапливающейся в избытке при Для агонистами. стимуляции отдельно ВЗЯТЫМИ этого с помощью количественной ПЦР-РВ исследовали кинетику экспрессии «обычной» сплайсированной мРНК и несплайсировнной пре-мРНК в макрофагах, стимулированных сочетанием М-триДАП и ЛПС по отдельности и в комбинации (рис. 8А-В).



Рисунок 8. Кинетика уровней мРНК и пре-мРНК *TNF* при раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС ($M \pm \sigma$, n = 4). А и Б – кинетика несплайсированной пре-мРНК (A) и сплайсированной (Б) мРНК *TNF*. В – отношения уровней сплайсированной мРНК к несплайсированной пре-мРНК. Г – отношения уровней сплайсированной мРНК при сочетанной стимуляции к сумме уровней пре-мРНК при раздельной стимуляции (индекс сплайсинга).

В нестимулированных клетках количество несплайсированной пре-мРНК и сплайсированной мРНК TNF было примерно одинаковым (рис. 8В). При стимуляции увеличивалось количество как мРНК, так и пре-мРНК, однако увеличение мРНК было гораздо более значительным (рис. 8А, Б); при стимуляции как отдельными агонистами, так и их сочетанием количество сплайсированной мРНК в десятки раз превышало количество пре-мРНК (рис. 8B). Кроме того, количество сплайсированной мРНК В клетках, стимулированных сочетанием агонистов, в десятки раз превышало сумму количеств пре-мРНК при стимуляции отдельными агонистами (рис. 8Г). Эти данные позволяют утверждать, что при стимуляции макрофагов отдельно взятыми агонистами не создается какого-либо избытка пре-мРНК, который подвергается усиленному сплайсингу при стимуляции сочетанием агонистов; большая часть пре-мРНК превращается в мРНК независимо от условий стимуляции. Таким образом, наблюдаемые синергические изменения уровней мРНК TNF при сочетанной стимуляции обусловлены синергическим увеличением транскрипции.

3.3. Анализ кинетики ядерной транслокации NF-кВ с помощью Вестерн-блоттинга

Чтобы изучить механизмы синергической индукции транскрипции при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 И TLR4, ΜЫ проанализировали кинетику ядерной транслокации белков NF-кB, являющихся ключевыми регуляторами транскрипции генов провоспалительных цитокинов [179, 180]. Как отмечено в Обзоре литературы, сигнализация через NF-кВ – это не разовое событие, а колебательный процесс с чередующимися фазами переноса NF-кВ в ядро и из ядра. Эти колебания концентрации NF-кВ в ядре наиболее типичны для сигнализации через рецепторы TNF, но могут наблюдаться также при стимуляции TLR [181, 182, 63, 64].

Учитывая сказанное, кинетику уровней белков RelA (p65), с-Rel и p50 в ядре исследовали с интервалами 15 минут в течение первых 210 минут после активации макрофагов (т.е. в период, когда развивается синергическое увеличение уровней мРНК *TNF* и *IL6*).

Как правило, в течение этого периода мы наблюдали единичную волну ядерной транслокации белков NF-кB, в некоторых случаях – возможно, начало второй волны (рис. 9).

Как и ожидалось, уровни белков NF-кВ в ядре достигали пика на 40-50 минут раньше, чем уровни мРНК *TNF*, а ядерное накопление NF-кВ в клетках, стимулированных М-триДАП, отставало от такового в клетках, стимулированных ЛПС (табл. 6), что аналогично кинетике мРНК *TNF* и *IL6*.

При сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 происходило наложение кинетик ядерной транслокации p65, c-Rel и p50, индуцированной каждым из двух рецепторов, однако синергического эффекта не наблюдалось (рис. 9).

В случае с-Rel имело место аддитивная кооперация сигналов от NOD1 и TLR4 (ИС \approx 1), а в случае p65 и p50 – инфра-аддитивное (ИС < 1) (рис. 9). Самые низкие значения ИС наблюдались для p50 (около 0,5 в течение большей части эксперимента; рис. 9).

Хотя в данной работе мы не ставили задачу определить ядерную транслокацию конкретных видов гомо- и гетеродимеров NF-кB, данные по индексам синергизма позволяют предположить, что при сочетанной стимуляции может иметь место относительный дефицит p50 в ядре и, следовательно, дефицит ингибиторных гомодимеров p50:p50.



Рисунок 9. Кинетика ядерной транслокации белков NF-кВ раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл. Уровни с-Rel, RelA (рб5), р50, гистона НЗ и α -тубулина в ядрах оценивали в течение 3,5 часов с интервалами 15 минут. А, Г, Ж – изображения, полученные при Вестернблоттинге (репрезентативный опыт). Б, Д, З – результаты денситометрии изображений, полученных при Вестерн-блоттинге. В, Е, И – индексы синергизма с-Rel, RelA (рб5), р50, рассчитанные по результатам денситометрии. * Отличие ИС от единицы с р < 0,01. К, Л – результаты Вестерн-блоттинга с антителами к гистону НЗ и α -тубулину, подтверждающие чистоту ядерной фракции. # на графике Л – образец цитоплазматической фракциях в качестве положительного контроля.

Мы не обнаружили p100/p52 в ядрах макрофагов в течение первых 210 мин стимуляции (данные не показаны), что говорит против участия неканонического пути активации NF-кВ в развитии синергического ответа на сочетанную активацию NOD1-TLR4.

Таблица 6. Время (в минутах) достижения максимальных (T_{max}) значений уровней p65, c-Rel, p50 в ядре в зависимости от условий стимуляции. М ± σ , n = 3.

Показатель		1	2	3	р	р	р
		М-триДАП	ЛПС	М-триДАП	(1-2)	(1-3)	(2-3)
				+ЛПС			
р65 в ядре	T _{max}	75±15	55±9	40±9	0,058	0,012	0,05
с-Rel в ядре	T _{max}	90±26	50±17	90±30	0,045	0,500	0,058
р50 в ядре	T _{max}	110±53	60±15	75±30	0,095	0,187	0,241

Интегральным показателем, характеризующим изменение параметра за определенный промежуток времени, является площадь под кривой (area under curve, AUC). Для получения интегральной оценки накопления ядерного NF-кВ рассчитывали площади под кинетическими кривыми AUC с 60-й по 180-ю минуты стимуляции (AUC_{60–180}), то есть в период развития синергического усиления экспрессии мPHK TNF.

Как показано в таблице 7, при стимуляции М-триДАП + ЛПС происходило достоверно большее накопление p65, чем при стимуляции ЛПС, а также достоверно большее накопление с-Rel по сравнению со стимуляцией М-триДАП. AUC_{60–180} для с-Rel при сочетанной стимуляции изменялся аддитивно (ИС \approx 1), тогда как AUC_{60–180} для p65 и p50 – инфра-аддитивно (ИС < 1), что согласуется со значениями индексов стимуляции в отдельные моменты времени.

Таблица 7. Площади под кинетическими кривыми от 60-й до 180-й минуты стимуляции, нормализованные к ЛПС в каждом эксперименте. # р <0,05 по сравнению с ЛПС, * P < 0,05 по сравнению с М-триДАП, + P < 0,05, +++ P < 0,001 для отличий ИС от 1.

AUC ₆₀₋₁₈₀ (нормализован по ЛПС)						
	М-триДАП	ЛПС	М-триДАП+ЛПС	ИС		
p-65	1.16±0.5	1	1.19±0.11 [#]	$0.57{\pm}0.16^+$		
c-Rel	0.79±0.46	1	1.8±0.98*	0.97±0.36		
p 50	0.75±0.43	1	0.88±0.18	$0.51 \pm 0.07^{+++}$		

3.4. Анализ ядерной транслокации NF-кВ р65 методом иммунофлюоресценции

Повышенные уровни ядерных p65 и c-Rel, наблюдаемые при сочетанной стимуляции клеткок М-триДАП и ЛПС, могут быть обусловлены повышением ядерной транслокацией p65 и c-Rel в отдельных клетках или же увеличением доли отвечающих клеток. Поскольку последний параметр не может быть определен методом вестерн-блоттинга, мы оценили ядерную транслокацию p65 в единичных клетках методом иммунофлуоресценции (рис. 10).

Как отмечено в Материалах и методах, для каждой клетки рассчитывали отношение средних интенсивностей флюоресценции ядро:цитоплазма (nucleusto-cytoplasm ratios [NCR]) при окрашивании антителами к p65. Кинетика NCR для p65, полученная методом иммунофлюоресценции, была в целом сопоставима с кинетикой ядерной транслокации p65, измеренной методом вестерн-блоттинга (рис. 11А).



Рисунок 10. Окрашивание макрофагов антителами к p65 и ядерным красителем DAPI. Макрофаги культивировали без агонистов, с М-триДАП, ЛПС или М-триДАП+ЛПС в течение 30 минут. Один эксперимент из 2 с аналогичными результатами. Увеличение объектива 20х.

Комбинированная стимуляция М-триДАП+ЛПС давала значительно более высокие значения NCR, чем любой из агонистов в отдельности, однако эффект комбинации агонистов был инфрааддитивным (ИС =0,5-1; рис. 11А, Б).

На пике ответа (60-90 мин от начала стимуляции) почти у 100% МтриДАП-, ЛПС- или М-триДАП+ЛПС-стимулированных макрофагов имела место ядерная транслокация p65; таким образом, практически все клетки реагировали на стимуляцию как отдельными агонистами, так и их сочетанием (рис. 11В). Однако в более поздние моменты времени среди макрофагов, стимулированных сочетанием М-триДАП+ ЛПС, наблюдался более высокий процент клеток, позитивных по ядерному p65, по сравнению со стимуляцией каждым агонистом по отдельности (рис. 11Г).



Рисунок 11. Кинетика ядерной транслокации р65 в популяции макрофагов. А - кинетика отношения интенсивностей окрашивания ядра и цитоплазмы (NCR) антителами к р65. Среднее значение \pm SD, не менее 100 клеток на одно состояние. Значения р: ***, Р < 0,001 для сравнения М-триДАП- и М-триДАП+ЛПС-стимулированных клеток; # Р < 0,05, ### Р < 0,001 для сравнения ЛПС- и М-триДАП+ЛПС-стимулированных клеток. Б - значения ИС, рассчитанные по данным, приведенным в А. В - кинетика процентного содержание макрофагов, позитивных по ядерному окрашиванию на р65. Г - Кинетика NCR в макрофагах, позитивных по ядерному окрашиванию на р65.

Кроме того, мы оценили NCR только в клетках, позитивных по ядерному р65, и тоже обнаружили, что этот параметр достоверно выше при стимуляции сочетанием агонистов, чем при стимуляции каким-либо одним агонистом (рис. 11Г). Таким образом, как иммунофлуоресценция, так и Вестерн-блоттинг показали, что в макрофагах, стимулированных сочетанием М-триДАП+ЛПС, происходит более выраженное накопление p65 в ядре, чем в клетках, стимулированных отдельными агонистами, однако эффект комбинации агонистов не является синергическим.

Совокупность этих данных позволила заключить, что транслокация белков NF-кВ в ядро при сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 регулируется несинергическим образом.

3.5. Анализ механизмов позитивной регуляции NF-кB-зависимого сигнального пути

Известно, транскрипции функционируют что факторы В виле последовательных «волн», когда предсуществующие (первичные) факторы транскрипции, активированные непосредственно в результате сигнализации с рецепторов, запускают экспрессию вторичных факторов транскрипции, которые могут запускать экспрессию новых генов, либо взаимодействовать с первичными факторами транскрипции, приводя к усилению ответа. Мы проанализировали экспрессию мРНК пяти генов, кодирующих белки семейства NF-кВ (*NFKB1* [p105/p50], *NFKB2* [p100/p52], *NFKB3* [p65/RelA], *REL* [c-Rel] и *RELB*). Экспрессия всех этих генов была повышена через 4 ч стимуляции (рис. 12А-Д). Следует отметить, что сочетанная стимуляция NOD1+TLR4 приводила к аддитивной, но не синергической индукции экспрессии этих генов (рис. 12А-Д, таб. 8).

IRF5 и С/ЕВРб являются факторами транскрипции, которые взаимодействуют с NF-кВ и регулируют индукцию провоспалительных генов [183, 184]. В частности, IRF5 совместно p65 с связывается с энхансером гена *TNF*, вызывая образование петли ДНК в локусе *TNF* – механизм, предложенный

для объяснения устойчивой продукции TNF ЛПС-активированными дендритными клетками [185].



Рисунок 12: Экспрессия мРНК *NFKB1* [p105/p50], *NFKB2* [p100/p52], *NFKB3* [p65/RelA], *REL* [c-Rel], *RELB*, *CEBPD*, IRF5 через 1, 4 и 9 часов после раздельной и сочетанной

стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл (М $\pm \sigma$, n = 4). * Отличие от единицы с p < 0,05; ** отличие от единицы с p < 0,01.

Белок IRF5 присутствовал в ядрах макрофагов, но его уровни не менялись при стимуляции (данные не представлены); также не менялась и экспрессия мРНК *IRF5* (рис. 12Ж).

С/ЕВРб относится к факторам транскрипции второй волны, экспрессия которых индуцируется ЛПС [183, 186]. Индукция мРНК *СЕВРD* при раздельной стимуляции М-триДАП и ЛПС наблюдалась не у всех доноров, однако при сочетанной стимуляции наблюдалось синергическое усиление экспрессии этого гена в точке 4 ч. (рис. 12Е, таб. 8).

Таблица 8. Индексы синергизма по экспрессии мРНК *NFKB1* [p105/p50], *NFKB2* [p100/p52], *NFKB3* [p65/RelA], *REL* [c-Rel], *RELB*, *CEBPD*, *IRF5* через 1, 4 и 9 ч после добавления М-триДАП и ЛПС в концентрациях 10 мкг/мл и 10 нг/мл, соответственно ($M \pm \sigma$, n = 5). * Отличие ИС от 1 с p < 0,05.

Ген Время	NFKB1	NFKB2	NFKB3	REL	RELB	CEBPD	IRF5
1ч	1,22±0,51	1,21±0,87	0,25±0,94	1,42±0,84	0,30±1,03	1,13±1,81	0,84±0,42
4ч	1,46±0,89	1,19±0,44	1,13±0,42	2,11±1,24	0,92±0,65	2,81±1,02*	0,33±0,36
9ч	1,23±0,64	1,3±1,24	0,91±0,42	1,06±0,66	0,7±0,16	1,27±1,25	0,53±0,22

Повышенная экспрессия генов, кодирующих белки NF-кВ и С/ЕВРб, индуцированная комбинацией агонистов, может способствовать более устойчивой передаче сигналов через NF-кВ и усилению продукции цитокинов на относительно поздних стадиях активации макрофагов.

3.6. Анализ механизмов негативной регуляции NF-кB-зависимого сигнального пути Колебания уровней NF-кВ в ядре в значительной степени обусловлены отрицательной обратной связью со стороны ингибирующих белков, таких как IкВ и A20 [63, 64]. Условием транслокации NF-кВ в ядро является протеасомная деградация белков семейства IкB, в результате чего демаскируется сигнал ядерной локализации на молекулах NF-кB.

В дальнейшем происходит ресинтез белков ІкВ, что приводит к уменьшению транспорта NF-кВ из цитозоля в ядро. Кроме того, белки ІкВ сами поступают в ядро, где способствуют отделению белков NF-кВ от промотеров, тем самым прекращая NF-кВ-зависимую экспрессию генов [182]. Деубиквитиназа A20 уменьшает активацию комплекса IKK, что дополнительно угнетает NF-кВ-опосредованную передачу сигнала.

Ресинтез ІкВ и повышение уровня A20 в активированных клетках обусловлены повышенной транскрипцией соответствующих генов (*NFKBIA* для IкBα, *TNFAIP3* для A20), которые сами являются NF-кB-индуцибельными [65, 67].

Чтобы охарактеризовать роль этих генов и белков в формировании эффекта синергизма при сочетанной активации NOD1 и TLR4, исследовали кинетику экспрессии их мРНК, а также их уровни в цитоплазме и ядре.

ІкВα, составляющие <5% от исходных, наблюдались через 25±9 мин после начала стимуляции. При стимуляции М-триДАП деградация ІкВα была менее полной, а минимальный уровень ІкВα наблюдался позже – через 45±26 мин. При сочетанной стимуляции уровень ІкВα достигал минимума в те же сроки, что и при стимуляции ЛПС – через 25±9 мин (табл. 9).

При стимуляции ЛПС уже к 15-й минуте ожидаемо происходило почти полное исчезновение ІкВα в цитоплазме (рис. 13А). Минимальные уровни ІкВα, составляющие <5% от исходных, наблюдались через 25±9 мин после начала стимуляции. При стимуляции М-триДАП деградация ІкВа была менее полной, а минимальный уровень ІкВа наблюдался позже – через 45±26 мин.



Рисунок 13. Кинетика уровней ІкВа в цитоплазме и ядре, исследованная в течение 3,5 часов с интервалами 15 минут после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС. А - уровни ІкВа в цитоплазме, Б - уровни ІкВа в ядре. В – индексы синергизма ядерного ІкВа при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС (М $\pm \sigma$, n = 3). * Отличие ИС от 1 с p < 0,05.

При сочетанной стимуляции уровень ІкВα достигал минимума в те же сроки, что и при стимуляции ЛПС – через 25±9 мин. Как видно на рисунке 13 и 9, период сниженных уровней ІкВа в цитозоле соответствовал периоду быстрого накопления белков NF-кВ в ядре. Таким образом, при сочетанной стимуляции не наблюдается какого-либо дополнительного увеличения деградации ІкВа по сравнению с той, которая происходит при стимуляции ЛПС.

Показатель		1	2	3	р	р	р
		М-триДАП	ЛПС	М-триДАП	(1-2)	(1-3)	(2-3)
				+ЛПС			
ІкВа в	T _{min}	45±26	25±9	25±9	0,137	0,137	0,500
цитоплазме	T _{max}	200±17	210	175±7	0,187	0,045	0,001
ІкВа в ядре	T _{max}	205±9	210	195±15	0,187	0,187	0,079

Таблица 9. Время (в минутах) достижения максимальных (T_{max}) и минимальных (T_{min}) значений ІкВа в ядре и цитоплазме в зависимости от условий стимуляции. М ± σ , n = 3.

После прохождения минимума начиналась фаза ресинтеза ІкВа при всех видах стимуляции, причем уровни ІкВа в цитоплазме, достигнутые к концу эксперимента, были в 1,5-2,5 раза выше базальных (М-триДАП < ЛПС \approx М-триДАП+ЛПС). Ресинтез был обусловлен возрастанием экспрессии мРНК *NFKBIA* (рис. 14А). При сочетанной стимуляции эффекты двух агонистов на экспрессию мРНК *NFKBIA* суммировались, но синергического эффекта не наблюдалось (рис. 14Б).



Б Индексы синергизма

Ген Время	NFKBIA
1 час	0,97±0,27
4 часа	1,37±0,5
9 часов	1,24±0,43

□ без стимуляции 2 М-три ДАП 10 мкг/мл ■ЛПС 10 нг/мл ■М-триДАП + ЛПС

Рисунок 14. А – Относительная экспрессия мРНК *NFKBIA* через 1, 4 и 9 ч после активации макрофагов М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. ОЭ – относительная экпрессия. Б – индексы синергизма для экспрессии мРНК *NFKBIA* после активации макрофагов сочетанием М-триДАП и ЛПС через 1, 4, 9 часов, (M $\pm \sigma$, n = 4). * Отличие от 1 с p < 0,05; ** отличие от 1 с p < 0,01.

Уровни ІкВа в ядре повышались с 90-й минуты, независимо от типа стимула (рис. 13А). В течение этого периода индексы синергизма для ядерного ІкВа составляли около 0,5, что указывает на отсутствие синергического и даже аддитивного ответа на сочетанную стимуляцию М-триДАП и ЛПС (рис. 13Б). AUC_{60–180} для ядерного ІкВа в клетках, стимулированных М-триДАП+ЛПС, были ниже, чем в ЛПС-стимулированных клетках, а значения ИС были ≤ 0,5 (таблица 10), что говорит об ингибирующем влиянии М-триДАП на ЛПС-индуцированную ядерную транслокацию ІкВа. Эти данные позволяют предположить, что в макрофагах, активированных сочетанием агонистов, возможен относительный дефицит ІкВа в ядре.

Таблица 10. Площади под кинетическими кривыми от 60-й до 180-й минуты стимуляции для ядерного ІкВа, нормализованные к ЛПС в каждом эксперименте. ($M \pm \sigma$, n = 4) # p <0,05 по сравнению с ЛПС, + P < 0,05 для отличия ИС от 1.

АUC ₆₀₋₁₈₀ (нормализован по ЛПС)					
	М-триДАП ЛПС М-триДАП+ЛПС ИС				
ІкВα ядерный	0,33±0,25	1	0,45±0,23 [#]	$0,36{\pm}0,22^+$	

При стимуляции М-триДАП, ЛПС и М-триДАП+ЛПС наблюдали также деградацию цитоплазматического ІкВє без последующего восстановления его уровней, по крайней мере на временном отрезке эксперимента (рис. 15А). Сочетанная стимуляция не оказывала синергического эффекта на деградацию ІкВє (рис. 15Б).



Рисунок 15. Кинетика ядерной транслокации ІкВє в течение 3,5 часов с интервалами 15 минут после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС. А - уровни ІкВє в цитоплазме. Б – индексы синергизма ІкВє при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС (М $\pm \sigma$, n = 3). * Отличие ИС от 1 с p < 0,05; ** отличие ИС от 1 с p < 0,01.

Также отмечалось повышение экспрессии мРНК *TNFAIP3* (рис. 16В) и белка A20 (рис. 16А), однако, как и в случае гена *NFKBIA*, синергического эффекта не выявлено (рисунок 16 Б,Г).



Сбер стиму пации. 🛛 М. три ДАТ: 10 мкг/мл. С.У., IC 10 мг/мл. 🔳 М. три/ДАС + ЛНК.

Рисунок 16. Кинетика ядерной транслокации A20 в течение 3,5 часов с интервалами 15 минут после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС и относительная экспрессия мРНК *TNFAIP3* через 1, 4 и 9 ч после активации макрофагов М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. А - уровни A20 в цитоплазме (Вестерн-блоттинг). Б – индексы синергизма A20 при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС, рассчитанные по результатам Вестерн-блоттинга. В - относительная экспрессия мРНК *TNFAIP3*. Г – индексы синергизма *TNFAIP3*. (М ± σ , n = 4). * Отличие от 1 с p < 0,05; ** отличие от 1 с p < 0,01.

В целом, негативные регуляторные элементы NF-кВ-зависимого сигнального пути при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 активируются несинергическим образом.

3.7. Взаимное влияние NOD1- и TLR4-зависимых сигнальных путей

Под «взаимным влиянием» мы понимаем такие механизмы, в которых стимуляция NOD1 повышает экспрессию генов и белков, специфически участвующих в передаче сигналов от TLR4, и наоборот.

Наиболее очевидными кандидатами являются сами рецепторы NOD1 и TLR4, а также их проксимальные адапторы, которые уникальны для каждого из рецепторов.

Мы обнаружили, что экспрессия мРНК *TLR4, NOD1, NOD2, TIRAP и TICAM1 (TRIF)* не менялась ни при одном виде стимуляции (рис.17 А-Д), экспрессия *MYD88* незначительно повышалась при стимуляции М-триДАП+ЛПС (рис.17 3), тогда как экспрессия *TICAM2 (TRAM)* и *RIPK2 (RIP2)* индуцировалась как при раздельной, так и в особенности при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС, хотя и не синергически (рис. 17 Е, Ж).

ТRAM функционирует вместе с TRIF в TRIF-зависимом сигнальном пути от TLR4, поэтому усиление экспрессии *TRAM* в отсутствие повышения экспрессии *TRIF* может не влиять на силу сигнала от TLR4. С другой стороны, повышенная экспрессия RIP2, являющегося единственным адаптером NOD1, может усилить сигнализацию с этого рецептора. Сообщалось, что RIP2 деградирует после активации NOD1 или NOD2, что является механизмом, ограничивающим активационный сигнал от этих рецепторов [24]. Повышение экспрессии *RIP2* при сочетанной стимуляции может уравновесить эту деградацию, приводя к усилению и/или пролонгации сигнализации через рецептор NOD1.



□ без стимуляции 🛛 М-три ДАП 10 мкг/мл 🗉 ЛПС 10 нг/мл 🔳 М-триДАП + ЛПС

Рисунок 17. А-3: Экспрессия мРНК *TLR4*, *NOD1*, *NOD2*, *TIRAP*, *TICAM1* (*TRIF*), *TICAM2* (*TRAM*), *RIPK2* (*RIP2*), *MYD88* через 1, 4 и 9 часов после раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 $H\Gamma/MЛ$ ($M \pm \sigma$, n = 4). * Отличие от единицы с p < 0,05; ** отличие от единицы с p < 0,01.

3.8. Растворимые медиаторы не участвуют в развитии синергического эффекта NOD1-TLR4

Мы проверили еще один возможный механизм развития синергического опосредованный секретируемыми цитокинами. Известно, эффекта: что цитокины, чаще всего TNF, IL-1 и интерфероны I типа, путем действия на клетки-продуценты (аутокринно) или соседние клетки (паракринно) опосредуют некоторые эффекты агонистов ПРР на клетки врожденной иммунной системы [193, 194]. Для нейтрализации этих цитокинов в культуры макрофагов добавляли нейтрализующие антитела к TNF, либо смесь рецепторного антагониста IL-1 (IL-1RA) и нейтрализующих антител к IL-1а и IL-1β, либо смесь нейтрализующих антител к IFN-а и IFN-β, после чего стимулировали клетки М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. Нейтрализация IL-1α/β и IFN-α/β не повлияла на продукцию TNF при всех трех условиях стимуляции и не отменила синергический эффект агонистов (рис. 20 А).

Нейтрализация TNF также не оказала достоверного влияния на развитие синергического эффекта, который в данном случае по экспрессии мPHK *TNF*, *IL6* и *IL1B* (рис. 20 Б). Эти данные говорят против участия TNF, IL-1 α/β и IFN- α/β в формировании синергических эффектов NOD1-TLR4. Несмотря на отрицательный результат этих экспериментов, мы попытались оценить возможный вклад других растворимых молекул в возникновение синергического эффекта.

При этом исходили из предположения, что М-триДАП-стимулированные макрофаги могут секретировать вещества, усиливающие ответ на ЛПС, и наоборот.



Рисунок 20. Оценка вклада секретируемых цитокинов TNF, IL-1 α/β , IFN- α и IFN- β в возникновение синергического эффекта при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 в макрофагах. А – влияние нейтрализации IL-1 α/β и IFN- α/β на продукцию TNF макрофагами. Б – влияние нейтрализации TNF на экспрессию мPHK *TNF*, *IL6* и *IL1B* макрофагами. М ± σ . n=3.

С этой целью мы собрали супернатанты культур макрофагов, стимулированных М-триДАП и ЛПС (стимуляция в течение 1 ч, отмывка и рекультивирование без агонистов в течение 3 ч, затем сбор супернатанта). Эти супернатанты мы добавили вместе с ЛПС или М-триДАП к наивным аутологичным макрофагам. Супернатанты клеток, активированных М-триДАП, не усиливали ответ наивных макрофагов на ЛПС (рис. 21). В то же время супернатанты макрофагов, активированных ЛПС, увеличивали ответ наивных макрофагов на М-триДАП. Однако этот эффект супернатантов от ЛПС-стимулированных макрофагов исчез после добавления антагониста ЛПС – полимиксина В (рис. 21).

Таким образом, усиливающее действие супернатантов ЛПСстимулированных макрофагов на М-триДАП-индуцированную экспрессию цитокинов, вероятно, обусловлено присутствием остаточного ЛПС в этих супернатантах, а не растворимыми молекулами макрофагального происхождения



Рисунок 21. Влияние супернатантов, полученных от М-триДАП- и ЛПСстимулированных макрофагов, на экспрессию мРНК *TNF*, *IL6* и *IL1B* аутологичными макрофагами, стимулированными М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. М ± о. n=3.

В целом, эти данные показывают, что растворимые медиаторы, секретируемые макрофагами, вряд ли вносят значительный вклад в механизмы синергической кооперации NOD1-TLR4.

3.9. Изменения метаболизма глюкозы при стимуляции М-триДАП и ЛПС.

Активация макрофагов агонистами TLR4 и NOD1 сопровождается масштабной перестройкой метаболизма, в частности усилением гликолиза, которое происходит в течение нескольких десятков минут после добавления агонистов к клеткам и не требует экспрессии генов de novo [127, 195, 196]. Мы оценили активацию гликолиза в макрофагах при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4.



Рисунок 22. Интенсификация гликолиза в макрофагах при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС. А – измерение скорости закисления среды (ECAR) в реальном времени в после впрыска (стрелка) среды, М-триДАП, ЛПС и их сочетания (типичные результаты

опыта; показаны M ± σ по 4 повторностям). Б – площади под кривой ECAR (AUCECAR) при стимуляции сочетаниями М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях (средние значения, 5 доноров).

Известно, что в процессе гликолиза глюкоза расщепляется до пирувата, который частично или полностью превращается в лактат. Последний высвобождается из клетки, вызывая закисление внеклеточной среды. Поэтому для оценки гликолиза исследовали: 1) динамику скорости закисления культуральной среды (ECAR) в реальном времени; 2) потребление глюкозы из культуральной среды за 24 ч; 3) высвобождение лактата в культуральную среду за 24 ч.

Таблица11. Индексы синергизма (по скорости закисления внеклеточной среды) при сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях. М ± σ, n = 5. ** Отличие ИС от 1 с p < 0,01; *** отличие ИС от 1 с p < 0,001.

М-триДАП	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл
лпс			
0,1 нг/мл	2,15±0,06***	0,80±0,36	1,07±0,17
1 нг/мл	0,81±0,22	0,74±0,21	0,77±0,20
10 нг/мл	1,02±0,01	0,64±0,17**	0,80±0,04**

Динамику ECAR измеряли в течение примерно 3 ч с момента добавления М-триДАП, ЛПС и их сочетания. Каждый агонист по отдельности вызывал дозозависимое повышение ECAR (рис. 22А, Б). При стимуляции двумя агонистами синергический эффект наблюдался только при сочетании самых низких концентраций (табл. 11). Во всех остальных случаях имела место суммация эффектов либо инфра-аддитивные эффекты (ИС ≤ 1).

Достоверных изменений скорости потребления кислорода клетками за период наблюдения не происходило (данные не показаны).



Рисунок 23. Параметры гликолиза в макрофагах в базальных условиях и при стимуляции М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. А – потребление глюкозы, Б –высвобождение лактата (пмоль/клетку/24 ч). М ± σ , n = 6. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 при сравнении с нестимулированными клетками (ANOVA повторных измерений).

Результаты измерения ECAR согласуются с данными по потреблению глюкозы и высвобождению лактата: прирост этих показателей происходил как при раздельной, так и при сочетанной стимуляции, причем при сочетанной – более выраженный, чем при раздельной, однако синергического эффекта также не наблюдалось (рис. 23 A и Б). ИС для потребления глюкозы составил 0,76±0,3 (рис. 23А), для высвобождения лактата – 1,26±0,56 (рис. 23Б).

3.10. Активация киназ, регулирующих метаболизм

Также мы оценили активацию некоторых сигнальных путей, регулирующих клеточный метаболизм. Так, сигнальный путь Akt – mTOR – p70 отвечает за усиление синтеза белка и интенсификацию гликолиза (переход на аэробный гликолиз) в активированных клетках [197]; [198]. Сигнальные пути p38 – MNK – eIF4E и ERK – MNK – eIF4E участвуют в активации синтеза белка [199]; [143].



Рисунок 24. Относительные уровни фосфо-форм указанных белков при раздельной и сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС в течение 1 и 4 ч (М $\pm \sigma$, n = 4). * Отличие от единицы с p < 0,05; ** отличие от единицы с p < 0,01. Относительные уровни фосфо-форм рассчитывали, как описано в Материалах и Методах.

Уровни фосфорилированных форм Akt, p70, p38, ERK, MNK и eIF4E оценивали с помощью Вестерн-блоттинга через 1 и 4 ч после добавления М-триДАП, ЛПС и их сочетания (рис. 24). Во всех случаях имели место аддитивная или инфра-аддитивная кооперация (ИС ≤ 1); синергических эффектов не наблюдалось.

Мы также изучили экспрессию аконитатдекарбоксилазы 1 (ACOD1), важного метаболического регулятора, сильно индуцируемого ЛПС [200, 201]. Этот ген лишь слабо индуцировался М-триДАП, однако комбинация МтриДАП + ЛПС оказывала сильный синергетический эффект на экспрессию мРНК и белка ACOD1 (рис. 25 A, Б).



Рисунок 25. Экспрессия мРНК (A) и белка (Б) ACOD1 макрофагами, обработанными М-триДАП, ЛПС и М-триДАП + ЛПС в течение указанных периодов времени. Б (M $\pm \sigma$, n = 4), цифры указывают значения ИС (M $\pm \sigma$), * p <0.05 для отличий ИС от 1.

3.11. Связь между наличием/отсутствием синергической индукции экспрессии генов, их базальной экспрессией и индуцибельностью

В ходе данной работы была проанализирована экспрессия мРНК 24 генов; экспрессия 19 из них достоверно повышалась при стимуляции NOD1 и/или TLR4. Однако мы обратили внимание, что только у 7 из этих 19 генов наблюдалась синергическая индукция при сочетанной стимуляции двух рецепторов (ИС > 1, p < 0,05). Это позволило поделить исследованные гены на группу 1 (индуцируемые синергически) и группу 2 (индуцируемые несинергически) (рис. 26).

Как видно из рис. 26А, гены группы 1, по сравнению с генами группы 2, характеризовались более низкой базальной экспрессией, а также более высокой индуцибельностью (отношением индуцированной экспрессии к базальной) при стимуляции М-триДАП+ЛПС.



Рисунок 26. Взаимосвязь между экспрессией базальных генов, их индуцируемостью и синергической индуцируемостью. А - Гены, исследованные в работе, разделены на группу 1 и группу 2 в зависимости от того, достоверно ли их значение ИС в точке 4 ч отличается от 1. Включены только гены, индуцируемые М-триДАП или ЛПС. Значения р относятся к: * отличию от логарифма базальной экспрессии (равна 0); ** отличию от 1; *** различиям между средними значениями генов группы 1 и группы 2. Б и В, корреляция среднего значения индексов синергизма в точке 4 часа со средней базовой экспрессией гена (Б) и средней индукцией экспрессии генов через 4 часа (В). Данные в Б и В являются средними значениями из А. Показаны коэффициенты корреляции по Пирсону.

При корреляционном анализе всех 19 генов было обнаружено, что индексы синергизма в точке 4 ч положительно коррелируют с индексами стимуляции в этой точке и отрицательно – с базальной экспрессией (рис. 26Б, В). Таким образом, синергизм не является универсальным вариантом ответа генов на стимуляцию сочетанием агонистов NOD1 и TLR4.

3.12. Влияние ингибиторов рецепторов и внутриклеточных сигнальных путей на синергический эффект NOD1-TLR4

Известно, что некоторые аспекты активации клеток врожденного иммунитета, развивающиеся в отсроченный период после начала стимуляции, требуют постоянного присутствия агонистов ПРР, тогда как другие этого не требуют [183]. Чтобы проверить, требуется ли длительная стимуляция NOD1 для возникновения синергического эффекта при кооперации NOD1-TLR4, мы ингибировали RIP2 (проксимальный адаптер NOD1) и сам рецептор NOD1, используя, соответственно, вещества SB203580 и ML130/нодинитиб-1 [187, 188].

SB203580 ингибирует как RIP2, так и МАП-киназу p38, однако IC₅₀ в отношении к RIP2 гораздо ниже, чем в отношении p38, что позволяет концентрации использовать низкие SB203580 для специфического ингибирования RIP2 [188]. SB203580 в концентрации 5 мкМ, при его внесении перед внесением агонистов, подавлял ответ макрофагов на М-триДАП, но не на ЛПС, указывая на специфическое ингибирование RIP2, но не p38 (рис. 16А). Интересно, что когда SB203580 вносили через 60 мин после добавления агонистов, он оказывал выраженное ингибирующее действие на экспрессию мРНК *TNF*, индуцированную М-триДАП и М-триДАП+ЛПС, при оценке через 4 ч после начала стимуляции. Также SB203580 почти полностью отменял синергический эффект.

ML130, специфический ингибитор NOD1, оказывал аналогичный эффект при добавлении как до, так и через 1 ч после начала стимуляции (рис. 17А). Однако мы заметили, что ML130 не полностью блокирует М-триДАПиндуцированные ответы и не полностью устраняет синергический эффект, что может быть связано с незначительной активностью М-триДАП в отношении рецептора NOD2 [189], который, как и NOD1, передает сигналы через RIP2 [190]. Поэтому мы повторили эти эксперименты, используя C12-iE-DAP – более специфичный агонист NOD1 [191]. Подобно М-триДАП, C12-iE-DAP проявлял сильный синергизм с ЛПС, и этот синергический эффект полностью отменялся добавлением ML130 как до, так и через 1 ч после добавления агонистов (рис. 18Б).



Рисунок 18: Влияние ингибиторов сигнального пути на синергическую индукцию мРНК *TNF* в макрофагах. А - SB203580 (5 мкМ) или ML130 (10 мкМ) добавляли к макрофагам за 15 мин до или через 60 мин после добавления М-триДАП, ЛПС или их комбинации; экспрессию мРНК *TNF* измеряли через 4 часа после добавления агонистов. В - те же эксперименты, что и в (A), за исключением того, что вместо М-триДАП использовали C12-iE-DAP. М $\pm \sigma$. Количество экспериментов: n = 6 с SB203580, n = 4 с ML130; Таблицы

рядом с каждым графиком показывают индексы синергизма (ИС). *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с клетками, культивируемыми без ингибиторов.

Таким образом, для получения синергического эффекта NOD1-TLR4 необходима непрерывная сигнализация через NOD1-RIP2 между 1 и 4 часами после начала стимуляции.

Мы также проверили, может ли синергический ответ быть отменен путем ингибирования сигнальных путей на более нижележащих уровнях, для чего использовали ингибиторы киназ IKKβ (PF-184), TBK-1/IKKε (амлексанокс) и p38 (VX-745).



Рисунок 19: Влияние ингибиторов сигнальных путей на синергическую индукцию мРНК *TNF* в макрофагах. А - влияние PF-184 (PF, 1 мкМ) и амлексанокса (Aml, 100 мкМ) и Б - влияние VX-745 (10 мкМ) на экспрессию мРНК *TNF* после 4-часового культивирования с агонистами. М ± σ. n=3. Таблицы рядом с каждым графиком показывают индексы 104

синергизма (ИС). *p < 0,05, ** p < 0,01, по сравнению с клетками, культивируемыми без ингибиторов.

Все ингибиторы вносили за 15 минут до внесения агонистов. PF-184 ингибировал экспрессию мPHK *TNF* при анализе через 1 час после добавления агонистов, но не влиял на экспрессию мPHK *TNF* через 4 часа (рис. 19).

Амлексанокс, ингибирующий TRIF-зависимый сигнальный путь ниже TLR4 [192], не влиял на экспрессию *TNF* ни через 1 ч, ни через 4 ч, при стимуляции как отдельными агонистами, так и их комбинацией (рис. 19). VX-745 ингибировал экспрессию мРНК *TNF* через 4 часа после добавления как отдельных агонистов, так и их сочетания (рис. 19). Однако ни один из использованных ингибиторов не оказал влияния на индексы синергизма (рис. 19); иными словами, ответы на комбинацию М-триДАП + ЛПС оставались синергическими несмотря на ингибирование соответствующих сигнальных путей.

Таким образом, хотя NF-кВ и p38 необходимы для оптимальной экспрессии мPHK *TNF*, их активация недостаточна для получения эффекта синергизма.

3.13. Противоопухолевая активность макрофагов, активированных агонистами NOD1, TLR4 и их сочетанием

3.13.1. Характеристика противоопухолевой активности макрофагов, стимулированных М-триДАП, ЛПС и их сочетанием, по отношению к опухолевой клеточной линии К562

Поскольку при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4 наблюдалось синергическое увеличение экспрессии белков, участвующих в противоопухолевом ответе, в частности TNF, на следующем этапе мы исследовали влияние агонистов NOD1 и TLR4 на противоопухолевые свойства

макрофагов. Опухолевые клетки К562 культивировали без макрофагов (контроль), а также с макрофагами в отсутствие агонистов и М-триДАП и ЛПС по отдельности и в комбинации.



Рисунок 27. Противоопухолевая активность макрофагов (МФ), стимулированных МтриДАП, ЛПС и их сочетанием. А и Б — число живых клеток К562 в культурах при оценке через 24 часа (А) и 72 часа (Б) после начала эксперимента. Соотношение МФ:К562 = 50:1. Символы *, ** и *** соответствуют значениям р < 0,05, р < 0,01 и р < 0,001 при сравнении с культурами К562 без МФ, # и ### - р < 0,05 и р < 0,001 – при сравнении с культурами К562+МФ без агонистов. В – индекс синергизма противоопухолевых эффектов М-триДАП и ЛПС для точки 72 ч. Г – число живых клеток К562 после культивирования с МФ в течение 72 ч без агонистов и с сочетанием М-триДАП+ЛПС при различных отношениях эффектор:мишень (количество мишеней на лунку постоянно). М± σ , n = 4. *** p < 0,001 при сравнении стимулированных и нестимулированных культур при данном соотношении эффектор:мишень. Д – количество живых клеток К562 после 72 ч культивирования с М- триДАП и/или ЛПС в отсутствие МФ. На графиках А, Б, В и Д горизонтальными линиями обозначены средние значения, каждая точка – отдельный эксперимент.

Через 24 Ч после начала эксперимента достоверных различий численности клеток К562 в различных условиях культивирования выявлено не было (рис. 27А). Через 72 ч после начала опыта отмечалось достоверное увеличение численности опухолевых клеток в культурах с макрофагами без агонистов по сравнению с контролем, что говорит об усиливающем действии макрофагов рост опухолевых (рис. 27Б). наивных на клеток При культивировании К562 с макрофагами в присутствии отдельно взятых агонистов NOD1 или TLR4 численность опухолевых клеток снижалась примерно до уровня контроля. Если же агонисты NOD1 и TLR4 добавляли в культуры одновременно, то численность опухолевых клеток снижалась в среднем в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 27Б). Судя по индексу синергизма, эффект сочетания агонистов был близок к аддитивному (рис. 27В). Противоопухолевый эффект макрофагов, активированных сочетанием МтриДАП+ЛПС, наблюдался как при соотношении макрофаги:К562 = 50:1 (рис. 27А, Б), так и при более низких соотношениях (рис. 27Г). В отсутствие макрофагов М-триДАП и ЛПС раздельно и в сочетании не влияли на численность клеток К562 (рис. 27Д). Таким образом, комбинация агонистов NOD1 И TLR4 переключает активность человеческих макрофагов с проопухолевой на противоопухолевую.

3.13.2. Роль TNF в противоопухолевой активности макрофагов

Чтобы уточнить механизмы противоопухолевого действия макрофагов, активированных сочетанием М-триДАП+ЛПС, в культуры добавляли нейтрализующие антитела к TNF, к IFN-β или нормальный козий IgG в качестве отрицательного контроля. Антитела к TNF частично ингибировали противоопухолевое действие макрофагов, тогда как антитела к IFN-β достоверного эффекта не оказали (рис. 28А). Иммуноферментный анализ показал, что в супернатантах макрофагов, активированных сочетанием МтриДАП+ЛПС, присутствуют высокие концентрации TNF (рис. 28Б). Рекомбинантный TNF при добавлении в совместные культуры макрофагов и клеток К562 вызывал достоверное снижение численности клеток К562, хотя и менее выраженное, чем при использовании комбинации М-триДАП+ЛПС (рис. 28В). В отсутствие макрофагов рекомбинантный TNF лишь незначительно снижал численность клеток К562 по сравнению с контролем (в 6 экспериментах из 7, рис. 28В). Таким образом, TNF, секретируемый макрофагами при активации М-триДАП+ЛПС, действует как непосредственно на клетки К562, так и – преимущественно – через аутокринное/паракринное усиление противоопухолевой активности самих макрофагов.



Рисунок 28. Роль TNF в противоопухолевой активности макрофагов. А – влияние нейтрализующих антител к TNF и IFN- β на противоопухолевую активность макрофагов, стимулированных сочетанием М-триДАП+ЛПС. *, p < 0,05, ** p < 0,01 при сравнении с культурами без добавления нейтрализующих антител. Б – уровни TNF в супернатантах макрофагов, культивированных без агонистов, с М-триДАП, ЛПС и их сочетанием в течение 24, 48 и 72 ч. В – число живых К562 в культурах после 72 ч культивирования с рекомбинантным человеческим TNF в отсутствие и в присутствии макрофагов. ** p < 0,01 при сравнении с культурами без добавления TNF в отсутствие и в присутствии макрофагов. ** р < 0,01
3.13.3. Роль других растворимых и мембраноассоциированных факторов в противоопухолевой активности макрофагов

Поскольку нейтрализующие антитела к TNF далеко не полностью ингибировали противоопухолевую активность макрофагов, активированных сочетанием М-триДАП+ЛПС (рис. 28А), было очевидно, что эти макрофаги вырабатывают и другие противоопухолевые факторы, которые могут быть как растворимыми, так и ассоциированными с клеточными мембранами. Отметим, ингибирование НАДФН-оксидазы _ фермента, участвующего что В образовании активных форм кислорода, - с помощью апоцинина не оказало противоопухолевый влияния на эффект макрофагов, активированных сочетанием М-триДАП+ЛПС (данные не представлены). Также мы не выявили экспрессию индуцибельной NO-синтазы при раздельной и сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС, что согласуется с литературными данными [202]. В целом, эти данные позволяют исключить роль активных форм кислорода и азота в противоопухолевой активности макрофагов в данной модели.

Чтобы уточнить роль растворимых факторов, макрофаги культивировали в течение 72 ч с М-триДАП+ЛПС, собирали супернатанты и переносили их в культуры аутологичных нестимулированных макрофагов, куда добавляли также клетки К562. Поскольку супернатанты активированных макрофагов могли содержать остаточные количества ЛПС, то их перед добавлением к нестимулированным макрофагам инкубировали с антагонистом ЛПС – полимиксином В. Перенос супернатантов макрофагов, активированных МтриДАП+ЛПС, к нестимулированным макрофагам приводил к выраженному усилению противоопухолевой активности последних, причем этот эффект частично отменялся антителами к TNF (рис. 29А).

Супернатанты макрофагов, активированных М-триДАП+ЛПС, обладали противоопухолевым действием и в отсутствие макрофагов (рис. 29Б). Однако эффект супернатантов в этом случае был гораздо слабее, чем в присутствии макрофагов, и полностью нейтрализовался антителами к TNF (рис. 29Б). Эти позволяют заключить, что растворимые противоопухолевые результаты медиаторы, высвобождаемые макрофагами под действием комбинации МтриДАП+ЛПС, реализуют свою активность как путем прямого воздействия на аутокринное/паракринное опухолевые клетки, так через усиление И противоопухолевой активности самих макрофагов.



Рисунок 29. Роль других растворимых и мембраноассоциированных факторов в противоопухолевой активности макрофагов. А – число живых клеток К562 после 72 ч сокультивирования с неактивированными макрофагами в ПКС или в супернатанте (суп.) от макрофагов, стимулированных М-триДАП+ЛПС. Нейтрализующие антитела к TNF вводили в супернатанты за 30 минут до добавления к макрофагам. Б – влияние супернатантов нестимулированных и М-триДАП+ЛПС-стимулированных макрофагов на жизнеспособность клеток К562 при культивировании в течение 72 ч в отсутствие макрофагов. В – число живых К562 при сокультивировании с макрофагами и М-триДАП+ЛПС в обычных планшетах и в Трансвелл-планшетах. *, p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 по сравнению без агонистов.

Чтобы установить роль мембрано-ассоциированных молекул в механизмах противоопухолевого действия макрофагов, клетки К562 и

мембраной, макрофаги разделяли полупроницаемой помещая ИХ, соответственно, в верхние и нижние камеры Трансвелл-планшетов. В этом случае противоопухолевый эффект активированных макрофагов сохранялся, но был существенно слабее, чем в случае с прямым сокультивированием (рис. 29В). Таким образом, прямые межклеточные контакты между К562 и активированными макрофагами необходимы для полного проявления противоопухолевого действия последних.

3.13.4. Макрофаги, активированные сочетанием агонистов NOD1+TLR4, замедляют пролиферацию клеток К562

Доля погибших (PI^{+}) клеток К562 В течение всего периода сокультивирования с макрофагами была невелика (менее 5% от всех клеток К562). что могло объясняться как быстрым поглощением погибших опухолевых клеток макрофагами, так и замедлением пролиферации опухолевых клеток без увеличения их гибели.

При анализе кинетики роста клеток К562 было установлено, что в в присутствии макрофагов и М-триДАП+ЛПС численность клеток К562 увеличивается по сравнению с исходной, однако скорость роста существенно снижена по сравнению с контролями (рис. 30А).

Мы также обратили внимание, что интенсивность свечения CFSE-метки на клетках K562, сокультивированных с макрофагами в присутствии МтриДАП+ЛПС, существенно выше, чем в контрольных культурах (рис. 30Б). Метка CFSE является невозобновляемой, и ее количество в клетке с каждым клеточным делением уменьшается в 2 раза. Относительное увеличение свечения метки (по сравнению с контрольными клетками K562 в той же точке; рис. 30Б) указывает на замедление пролиферации клеток K562 в присутствии макрофагов, активированных агонистами NOD1+TLR4.



Рисунок 30. Влияние макрофагов, активированных и не активированных агонистами NOD1 и TLR4, на пролиферацию клеток K562. А – абсолютные количества прилипших и неприлипших живых клеток K562 после культивирования в течение 4 ч, 24 ч, 72 ч без макрофагов и с макрофагами в присутствии и в отсутствии М-триДАП+ЛПС ($M \pm \sigma$, n = 4). Б - средняя интенсивность флюоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) клеток K562 по каналу CFSE после культивирования в течение 72 ч без макрофагов и с макрофагами в присутствии M-триДАП+ЛПС. Свечение неприлипших и прилипших клеток K562 показано раздельно. ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с культурами без добавления агонистов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В работе были изучено несколько этапов активации макрофагов при раздельной и сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4: передача сигнала от рецепторов в ядро, экспрессия генов цитокинов и регуляторных молекул, продукция цитокинов, перестройка клеточного метаболизма, активация противоопухолевых эффекторных механизмов. Результаты работы суммированы на схеме (рис. 31).



🔲 - изменения носят несинергический характер

🔲 - синергическая регуляция

Рисунок 31. Обобщение результатов работы. Показаны исследованные в работе процессы, которые при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 регулируются синергическим и несинергическим образом.

Хотя кооперация между NLR и TLR принято считать синергическим, мы увидели, что большая часть изученных нами процессов в макрофагах, стимулированных сочетанием агонистов NOD1 и TLR4, регулируется несинергическим образом. Ниже мы подробнее остановимся на каждом из аспектов активации макрофагов, исследованных в работе.

4.1. Закономерности экспрессии генов при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4

В работе установлено, что далеко не все гены, индуцируемые при стимуляции NOD1 или TLR4, регулируются синергически при сочетанной стимуляции. Синергически регулируемая подгруппа генов включает в себя гены, кодирующие провоспалительные цитокины, такие как TNF, IL1B, IL6, *IL12В* и *IL23А* (последние два кодируют субъединицы р40 и р19 интерлейкина-23) (рис. 6). «Синергические» гены, как правило, имеют более низкую базальную экспрессию и более высокую индуцибельность по сравнению с теми, которые отвечают несинергически (рис. 26). Группа «синергических» генов гетерогенна с точки зрения кинетики и особенностей регуляции экспрессии. Например, *TNF* является геном первичного ответа и его экспрессия в стимулированных ЛПС мышиных макрофагах не зависит от синтеза белка de novo, тогда как IL6, IL12B и IL23A являются генами вторичного ответа, которые требуют синтеза белка de novo для достижения максимальной экспрессии [203, 204]. В то же время различные гены, регулируемые NF-кB, могут регулироваться как синергически (например, *TNF*), так и несинергически (например, NFKBIA и TNFAIP3) (рис. 14, 16).

Синергическое усиление экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* в нашей системе развивается примерно после 150-й минуты стимуляции и в полной мере выражено к 4 часам после начала стимуляции (рис. 7). Для развития синергического эффекта необходима продолжающаяся сигнализация через NOD1: подавление активности NOD1 или его адаптера RIP2 спустя 1 час после

начала стимуляции (с помощью ML130 и SB203580, соответственно) приводит к полной отмене синергического эффекта при оценке через 4 ч после начала стимуляции (рис. 17).

4.2. Активация проксимальных компонентов NOD1- и TLR4зависимых сигнальных путей

Наши результаты согласуются с принципами перекрестного взаимодействия между ПРР, описанными Bagchi и соавт. [4]. Эти авторы показали, что синергизм между двумя TLR имеет место в тех случаях, когда два рецептора используют разные проксимальные адаптеры (MyD88 или TRIF), но имеют общие дистальные части сигнальных путей. Аналогичный принцип может применяться и к NOD1 и TLR4, которые используют разные проксимальные адаптеры (RIP2 в случае NOD1, MyD88 и TRIF в случае TLR4). В данном случае TLR4-зависимые сигналы вызывают повышение экспрессии мРНК RIP2 (рис. 16), что может предотвращать потерю белка RIP2 после стимуляции NOD1 и пролонгировать передачу сигналов от NOD1 [118]. Непрямым доказательством этого служит отмена синергического эффекта NOD1-TLR4 при добавлении ингибитора RIP2 через 1 час после начала стимуляции (см. выше).

4.3. Роль факторов транскрипции NF-кВ в развитии синергического эффекта при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4

Анализ факторов транскрипции семейства NF-кВ показал, что транслокация белков NF-кВ в ядро в период, когда развивается синергическое усиление экспрессии *TNF*, *IL6* и других NF-кВ-зависимых генов, носит несинергический характер. Для ядерной транслокации с-Rel мы наблюдали суммацию эффектов двух агонистов, для р65 и р50 эффект сочетания агонистов был инфра-аддитивным (рис. 9). Представляется, что каждый из двух рецепторов, видимо, активирует «свою» часть общего пула сигнальных белков

в клетке. Как следствие, вплоть до поступления активационного сигнала в ядро сигналы от двух рецепторов суммируются, но не взаимно усиливаются (аддитивная кооперация). Некоторые этапы NF-кВ-зависимого сигнального пути максимально активируются уже при стимуляции какого-либо одного рецептора; в таком случае отсутствует даже суммация сигналов, что наблюдалось в случае деградации ІкВа и ядерной транслокации р50 (рис. 9, 13). Хотя на этапе активации NF-кВ синергический эффект отсутствует, все же при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 в ядре поддерживаются более высокие концентрации p65 и c-Rel, чем при стимуляции каждым агонистом по отдельности (рис. 9). Это может приводить к более полному и длительному занятию данными факторами транскрипции сайтов связывания В соответствующих промоторах.

При сочетанной активации NOD1 и TLR4 меняется не только амплитуда, но и временные характеристики транслокации NF-кВ в ядро. Так, мы наблюдали укорочение времени достижения пиковых концентраций р65 в ядре при сочетанной стимуляции по сравнению со стимуляцией ЛПС или МтриДАП по отдельности (рис. 9, таб. 6). В этой связи интересна работа Багаева и соавторов, где показано, что скорость ядерной транслокации р65 при стимуляции мышиных макрофагов ЛПС положительно коррелирует с предактивационным уровнем p65 в ядре [176]. Поскольку NOD1 и TLR4 находятся в разных компартментах клетки, то при одновременном добавлении агонистов активация NOD1 отстает от активации TLR4. Поэтому сигнал от NOD1 приходит в ядро в тот момент, когда там уже имеются повышенные уровни p65 вследствие активации TLR4, что может вести к ускорению NOD1зависимой транслокации р65 и к более раннему достижению пиковой концентрации. Однако вклад этого механизма в развитие синергического эффекта требует дальнейшего изучения.

Кроме того, в процессе активации клеток мы наблюдали увеличение экспрессии генов, кодирующих белки NF-кВ и факторы транскрипции, взаимодействующие с NF-кВ, спустя 4 ч после начала активации. Так, было обнаружено синергическое увеличение экспрессии С/ЕВРб (рис. 12), который контролирует продолжительность транскрипции мРНК цитокинов, индуцированной ЛПС [183]. Экспрессия генов, кодирующих белки NF-кВ, увеличивалась несинергическим образом (рис. 12, таб. 8). Этот механизм может способствовать усилению экспрессии NF-кВ-зависимых генов на относительно поздних этапах активации клетки.

Способствовать развитию синергического ответа может также недостаток негативной регуляции NF-кВ-зависимого сигналинга. Возможным проявлением этого механизма является относительный дефицит ІкВа в ядре, который по времени совпадает с периодом синергического нарастания экспрессии мРНК *TNF*, *IL6* при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 (рис. 7, 13, таб. 9). Этот фактор, наряду с повышением уровней с-Rel и р65 в ядре, может способствовать более стойкому взаимодействию белков NF-кВ с промотерами NF-кВ-зависимых генов и способствовать увеличению транскрипции мРНК этих генов.

Хотя белки семейства NF-кB, безусловно, играют важнейшую роль в активации экспрессии провоспалительных генов, наши данные показывают, что активация только лишь NF-кB недостаточна для развития синергического эффекта. Как упомянуто выше, экспрессия некоторых из исследованных нами NF-кB-зависимых генов – *NFKBIA*, *TNFAIP3* и др. – при сочетанной стимуляции индуцировались несинергическим образом (рис. 12, 14, 16), что согласуется с несинергическим характером активации самого NF-кB. Кроме того, хотя ингибитор киназы IKKβ и подавлял экспрессию мPHK *TNF*, он не отменял синергический эффект (рис. 19).

Таким образом, активация факторов транскрипции NF-кВ при сочетанной активации NOD1 и TLR4 носит несинергический характер, что не позволяет адекватно объяснить синергическое усиление экспрессии подгруппы NF-кВ-зависимых генов, кодирующих провоспалительные цитокины. Вероятно, для синергической индукции экспрессии этих генов необходимы дополнительные сигнальные пути и факторы транскрипции.

4.4. Активация других сигнальных путей

В работе была исследована активация еще нескольких сигнальных путей, участвующих в реализации биологических эффектов NOD1 и TLR4: МАП-киназных (p38/ERK – MNK1 – eIF4E), PI3K-зависимого (Akt – mTORC1 – p70) (рис. 24). Все они, как и NF-кВ-зависимый путь, активировались не синергически, а аддитивно, что согласуется с данными А.И.Тухватулина и соавт., касающимися кооперации рецепторов NOD2 и TLR4 [53].

Кроме этого, мы исключили роль ауто- и паракринных факторов и соответствующих сигнальных путей в развитии синергических эффектов при сочетанной активации NOD1 и TLR4 (рис. 21). В частности, против участия интерферонов I типа в развитии синергических эффектов NOD1-TLR4 говорят три обстоятельства: 1) амлексанокс – ингибитор TRIF-зависимого сигнального пути, индуцирующего экспрессию IFN- β – не повлиял на развитие синергического эффекта (рис. 20А); 2) нейтрализация IFN - α/β с помощью антител не повлияла на синергическое усиление экспрессии *TNF* и *IL6* (рис. 20Б); 3) ген *MX1*, являющийся классическим IFN-индуцибельным геном, индуцировался при стимуляции ЛПС, но не М-триДАП, а при стимуляции М-триДАП+ЛПС экспрессия этого гена была не выше, чем при стимуляции ЛПС (рис. 6). Также не было получено данных в пользу участия секретируемых TNF и IL-1 α/β в развитии синергических эффектов (рис. 21).

4.5. Изменения метаболизма при раздельной и сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4

Врожденный иммунный ответ реализуется в первую очередь через синтез белковых молекул (цитокинов, антимикробных белков и т.д.), для чего требуется усиление анаболических процессов. Агонисты NOD1 и TLR4 индуцируют масштабное метаболическое репрограммирование макрофагов, в частности стимулируют аэробный гликолиз, который является поставщиком энергии и метаболитов для синтеза белка и фосфолипидных мембран [205]. Однако при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4 синергического усиления гликолиза в макрофагах не происходит, имеет место аддитивная или инфра-аддитивная кооперация (т.е. ответ на сочетание агонистов равен или ниже суммы ответов на каждый агонист по отдельности) (рис. 22, 23). Эти результаты можно объяснить исходя из предположения, что у клеток имеется определенный метаболический «потолок», который не может быть превышен, причем этот «потолок» практически достигается уже при раздельной стимуляции. Синергические эффекты отсутствуют и на уровне сигнальных путей, регулирующих гликолиз и обмен белка (рис. 24). Из совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что метаболическая перестройка поддерживает увеличение синтеза цитокинов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, однако носит несинергический характер.

4.6. Активация эффекторных механизмов при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4: перепрограммирование активности макрофагов с проопухолевой на противоопухолевую

Активация эффекторных механизмов, в частности противоопухолевой активности, интегрирует результаты многих процессов, рассмотренных выше.

Опухоль-ассоциированные макрофаги являются одним из главных клеточных компонетов злокачественной опухоли, формирующих так называемое опухолевое микроокружение. Взаимодействие макрофагов и опухолевых клеток является двунаправленным и, как правило, способствует опухолевой прогрессии. Тем не менее, как в экспериментальных работах, так и в клинических испытаниях показано, что инфекционные агенты и агонисты паттерн-распознающих рецепторов могут переключать активность макрофагов с проопухолевой на противоопухолевую, тем самым способствуя регрессу злокачественной опухоли [165, 166, 167, 168]. Например, мифамуртид – агонист рецептора NOD2 – синтетический одобрен к клиническому применению при неметастазирующей остеосаркоме, агонисты TLR7 – при TLR9 обладает некоторых формах рака кожи, агонист достоверной клинической эффективностью при меланоме и немелкоклеточном раке легкого [165, 206].

В данной работе впервые продемонстрирована противоопухолевая активность макрофагов, активированных комбинацией агонистов NOD1 и TLR4. Если нестимулированные макрофаги поддерживают рост клеток K562, а стимуляция NOD1 и TLR4 по отдельности лишь отменяет эту проопухолевую активность макрофагов, то при одновременной стимуляции двух рецепторов макрофаги приобретают выраженную противоопухолевую активность (рис. 26). Интересно, что эта активность макрофагов частично реализуется через продукцию TNF, который действует на клетки-продуценты ауто- или паракринно (рис. 28). Помимо TNF, в реализации противоопухолевых эффектов макрофагов, активированных сочетанием агонистов NOD1+TLR4, участвуют и другие растворимые и мембрано-ассоциированные молекулы (рис. 29). Их природа в данной работе не была установлена, но является предметом будущих исследований. В используемой в данной работе модели, не подтвердился вклад активных форм азота и кислорода в реализацию противоопухолевого ответа макрофагов. Роль оксида азота в противоопухолевой активности макрофагов в настоящее время остается спорной, NO может оказывать, как про- так и противоопухолевый эффект [207]. NO-синтаза — фермент, катализирующий

образование оксида азота. Данные об экспрессии NO-синтазы макрофагами человека, в отличие от макрофагов мыши, противоречивы [202, 208]. Наши результаты согласуется с литературными данными об отстутствии продукции форм кислорода и экспресии NO-синтазы при стимуляции активных человеческих макрофагов ГМ-КСФ [202]. Также наши результаты показали, что одним из компонентов противоопухолевой активности макрофагов, активированных сочетанием агонистов NOD1 И TLR4, является антипролиферативный эффект (рис. 30). Следует отметить, что эффект сочетания агонистов на противоопухолевую активность макрофагов является несинергическим (аддитивным) (рис. 27В).

В целом, комбинация агонистов NOD1 и TLR4 является эффективным активатором противоопухолевой активности человеческих макрофагов *in vitro*. Полученные результаты позволяют рассматривать данную комбинацию в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

4.7. Заключение

Подытоживая результаты работы, можно отметить, что большинство исследованных процессов в макрофагах, стимулированных сочетанием агонистов NOD1 и TLR4, активировалось несинергически (аддитивно или инфра-аддитивно). Это относится к событиям, предшествующим или не требующим экспрессии мРНК (активация сигнальных путей, быстрая активация противоопухолевых эффекторных гликолиза, активация механизмов), а также к экспрессии мРНК большинства исследованных генов. Эффект синергизма, судя по всему, ограничен сравнительно небольшой подгруппой генов, кодирующих провоспалительные цитокины. Сигнальные пути и факторы транскрипции, обеспечивающие синергическую индукцию экспрессии провоспалительных цитокинов, в данной работе установить не удалось. Можно лишь утверждать, что активация NF-кВ и ряда других сигнальных путей недостаточна для развития синергических эффектов. По-

видимому, синергическая кооперация в паре NOD1-TLR4 (а возможно, и в других парах NOD-TLR) является результатом многих перекрывающихся процессов, которые включают усиление позитивных регуляторных событий и дефицит негативных регуляторных механизмов.

выводы

1. При сочетанной стимуляции рецепторов NOD1 и TLR4 в макрофагах человека наблюдается синергическое усиление продукции фактора некроза опухолей и экспрессии и провоспалительных цитокинов: фактора некроза опухолей, интерлейкина-1β, интерлейкина-6, интерлейкина-23. Синергический эффект формируется на этапе экспрессии мPHK цитокинов в период между 1 и 4 часами после начала стимуляции.

2. Экспрессия генов, кодирующих белки-участники сигнальных путей, при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 увеличивается несинергическим образом.

3. Гены, индуцируемые синергически при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4, отличаются от несинергически индуцируемых генов более низкой базальной экспрессией и более высокими индексами стимуляции.

4. Сигнальные события, которые предшествуют или не требуют транскрипции мРНК, такие как ядерная транслокация NF-кB, активация PI3Kзависимого и МАП-киназного сигнальных путей, быстрое усиление гликолиза, при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 суммируются, но не усиливаются синергически.

5. Факторы транскрипции семейства NF-кВ необходимы для экспрессии генов провоспалительных цитокинов, но недостаточны для формирования синергического эффекта.

6. Аутокринные и паракринные механизмы с участием секретируемых цитокинов (фактора некроза опухоли, интерлейкина-1α, интерлейкина-1β, интерферонов I типа) не участвуют в формировании синергического эффекта при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4.

7. Сочетание агонистов NOD1 и TLR4 эффективно перепрограммирует активность макрофагов человека с проопухолевой на противоопухолевую.

Список использованной литературы

1. Pashenkov M. V., Murugina N.E., Budikhina A.S., et al. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. J. Leukoc. Biol. 2019; 105 (4): 669–680. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R

2. Broz P., Monack D.M. Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. Nat. Rev. Immunol. 2013; 13 (8): 551–565. DOI: https://doi.org/10.1038/nri3479

3. Pålsson-McDermott E.M., O'Neill L.A.J. Building an immune system from nine domains. Biochem. Soc. Trans. 2007; 35 (6): 1437–1444. DOI: https://doi.org/10.1042/BST0351437

4. Loos B.G., Fiebig A., Nothnagel M., et al. NOD1 gene polymorphisms in relation to aggressive periodontitis. Innate Immun. 2009; 15 (4): 225–232. DOI: https://doi.org/10.1177/1753425909103739 PMID: 19587002

5. Yao Q. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2: Structure, function, and diseases. Semin. Arthritis Rheum. 2013; 43 (1): 125–130. DOI: https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2012.12.005

6. Magnuson G., Khan P., Yuan H., et al. High Throughput Screening Assays for NOD1 Inhibitors - Probe 1. 2010;

7. Inohara N., Nuñez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3 (5): 371–382. DOI: https://doi.org/10.1038/nri1086

8. Inohara N., Koseki T., Peso L. del, et al. Nod1, an Apaf-1-like Activator of Caspase-9 and Nuclear Factor-κB. J. Biol. Chem. 1999; 274 (21): 14560–14567. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14560 PMID: 10329646

9. Correa R.G., Milutinovic S., Reed J.C. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2

(NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. Biosci. Rep. 2012; 32 (6): 597–608. DOI: https://doi.org/10.1042/BSR20120055 PMID: 22908883

10. Silva G.K., Gutierrez F.R.S., Guedes P.M.M., et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against Trypanosoma cruzi Infection . J. Immunol. 2010; DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902254 PMID: 20042586

11. Irving A.T., Mimuro H., Kufer T.A., et al. The Immune Receptor NOD1 and Kinase RIP2 Interact with Bacterial Peptidoglycan on Early Endosomes to Promote Autophagy and Inflammatory Signaling. Cell Host Microbe. 2014; 15 (5): 623–635. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.04.001

12. Schertzer J.D., Tamrakar A.K., Magalhães J.G., et al. NOD1 Activators Link Innate Immunity to Insulin Resistance. Diabetes. 2011; 60 (9): 2206–2215. DOI: https://doi.org/10.2337/db11-0004

13. Kaparakis-Liaskos M. The intracellular location, mechanisms and outcomes of NOD1 signaling. Cytokine. 2015; 74 (2): 207–212. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.018

14. Kim Y.-G., Kamada N., Shaw M.H., et al. The Nod2 Sensor Promotes Intestinal Pathogen Eradication via the Chemokine CCL2-Dependent Recruitment of Inflammatory Monocytes. Immunity. 2011; 34 (5): 769–780. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.04.013 PMID: 21565531

15. Chamaillard M., Girardin S.E., Viala J., et al. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. Cell. Microbiol. 2003; 5 (9): 581–592. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00304.x

16. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. J. Biol. Chem. 2003; 278 (11): 8869–8872. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200 PMID: 12527755

17. Chamaillard M., Hashimoto M., Horie Y., et al. An essential role for

NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. Nat. Immunol. 2003; 4 (7): 702–707. DOI: https://doi.org/10.1038/ni945 PMID: 12796777

 Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A.M., et al. Nod1 Detects a Unique Muropeptide from Gram-Negative Bacterial Peptidoglycan. Science (80-.). 2003;
 (5625): 1584–1587. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1084677 PMID: 12791997

 Girardin S.E., Jéhanno M., Mengin-Lecreulx D., et al. Identification of the Critical Residues Involved in Peptidoglycan Detection by Nod1. J. Biol. Chem. 2005;
 (46): 38648–38656. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M509537200 PMID: 16172124

20. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. J. Biol. Chem. 2003; 278 (11): 8869–8872. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200

21. Tanabe T., Chamaillard M., Ogura Y., et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. EMBO J. 2004; 23 (7): 1587–1597. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600175 PMID: 15044951

22. Maekawa S., Ohto U., Shibata T., et al. Crystal structure of NOD2 and its implications in human disease. Nat. Commun. 2016; 7 (1): 11813. DOI: https://doi.org/10.1038/ncomms11813 PMID: 27283905

23. Pashenkov M. V., Dagil Y.A., Pinegin B. V. NOD1 and NOD2: Molecular targets in prevention and treatment of infectious diseases. Int. Immunopharmacol. 2018; 54 385–400. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.036

24. Inohara N., Koseki T., Lin J., et al. An Induced Proximity Model for NFκB Activation in the Nod1/RICK and RIP Signaling Pathways. J. Biol. Chem. 2000; 275 (36): 27823–27831. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M003415200

25. Wang G., Gao Y., Li L., et al. K63-Linked Ubiquitination in Kinase Activation and Cancer. Front. Oncol. 2012; 2 (JAN): 5. DOI:

https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00005

26. Alkalay I., Yaron A., Hatzubai A., et al. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995; 92 (23): 10599–603. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10599 PMID: 7479848

27. Baeuerle P.A., Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-κB transcription factor. Cell. 1988; 53 (2): 211–217. DOI: https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90382-0

28. Humphries F., Yang S., Wang B., et al. RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. Cell Death Differ. 2015; 22 (2): 225–236. DOI: https://doi.org/10.1038/cdd.2014.126

29. Girardin S.E., Tournebize R., Mavris M., et al. CARD4/Nod1 mediates NF-κB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. EMBO Rep. 2001; 2 (8): 736–742. DOI: https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve155

30. Allison C.C., Kufer T.A., Kremmer E., et al. Helicobacter pylori Induces MAPK Phosphorylation and AP-1 Activation via a NOD1-Dependent Mechanism. J. Immunol. 2009; 183 (12): 8099–8109. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900664

31. Watanabe T., Asano N., Fichtner-Feigl S., et al. NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. J. Clin. Invest. 2010; 120 (5): 1645–1662. DOI: https://doi.org/10.1172/JCI39481 PMID: 20389019

32. Watanabe T., Asano N., Fichtner-Feigl S., et al. NOD1 contributes to mouse host defense against Helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. J. Clin. Invest. 2010; 120 (5): 1645–1662. DOI: https://doi.org/10.1172/JCI39481

33. Kawai T., Akira S. TLR signaling. Cell Death Differ. 2006; 13 (5): 816– 825. DOI: https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850 PMID: 16410796 34. Marongiu L., Gornati L., Artuso I., et al. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. J. Leukoc. Biol. 2019; 106 (1): 147–160. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1218-483RR PMID: 30900780

35. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat. Immunol. 2004; 5 (10): 987–995. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1112 PMID: 15454922

36. Alonso-Pérez A., Franco-Trepat E., Guillán-Fresco M., et al. Role of tolllike receptor 4 on osteoblast metabolism and function. Front. Physiol. 2018; 9 (MAY): 1–12. DOI: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00504

37. Raetz C.R.H., Whitfield C. Lipopolysaccharide Endotoxins. Annu. Rev.Biochem.2002;71(1):635–700.DOI:https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414PMID: 12045108

38. Barton G.M., Medzhitov R. Toll-Like Receptors and Their Ligands. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2002; 81–92. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4_5 PMID: 12467245

39. Keshava Prasad T.S., Goel R., Kandasamy K., et al. Human Protein Reference Database--2009 update. Nucleic Acids Res. 2009; 37 (Database): D767– D772. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkn892

40. Napetschnig J., Wu H. Molecular Basis of NF-κB Signaling. Annu. Rev. Biophys. 2013; 42 (1): 443–468. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130338

41. Akira S., Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 2004; 4 (7): 499–511. DOI: https://doi.org/10.1038/nri1391

42. Shimazu R., Akashi S., Ogata H., et al. MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. J. Exp. Med. 1999; 189 (11): 1777–1782. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777 PMID: 10359581

43. Valkov E., Stamp A., DiMaio F., et al. Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and

disease protection. Proc. Natl. Acad. Sci. 2011; 108 (36): 14879–14884. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1104780108 PMID: 21873236

44. Kagan J.C., Su T., Horng T., et al. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-β. Nat. Immunol. 2008; 9 (4): 361–368. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1569 PMID: 18297073

45. Gangloff M. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification? Trends Biochem. Sci. 2012; 37 (3): 92–98. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.003

46. Kollewe C., Mackensen A.-C., Neumann D., et al. Sequential Autophosphorylation Steps in the Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 Regulate its Availability as an Adapter in Interleukin-1 Signaling. J. Biol. Chem. 2004; 279 (7): 5227–5236. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M309251200 PMID: 14625308

47. Burns K., Janssens S., Brissoni B., et al. Inhibition of Interleukin 1 Receptor/Toll-like Receptor Signaling through the Alternatively Spliced, Short Form of MyD88 Is Due to Its Failure to Recruit IRAK-4. J. Exp. Med. 2003; 197 (2): 263– 268. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.20021790 PMID: 12538665

48. Barton G.M., Medzhitov R. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. Science (80-.). 2003; 300 (5625): 1524–1525. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1085536 PMID: 25309543

49. Alkalay I., Yaron A., Hatzubai A., et al. In vivo stimulation of I kappa B phosphorylation is not sufficient to activate NF-kappa B. Mol. Cell. Biol. 1995; 15 (3): 1294–1301. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.15.3.1294

50. Zhang F.X., Kirschning C.J., Mancinelli R., et al. Bacterial Lipopolysaccharide Activates Nuclear Factor-κB through Interleukin-1 Signaling Mediators in Cultured Human Dermal Endothelial Cells and Mononuclear Phagocytes. J. Biol. Chem. 1999; 274 (12): 7611–7614. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7611

51. C T., H H., M G. The role of mammalian MAPK signaling in regulation of cytokine mRNA stability and translation. J. Interferon Cytokine Res. 2014; 34 (4): 220–232. DOI: https://doi.org/10.1089/JIR.2013.0146 PMID: 24697200

52. Ferwerda G., Kramer M., Jong D. de, et al. Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1β mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1β. Eur. J. Immunol. 2008; 38 (1): 184–191. DOI: https://doi.org/10.1002/eji.200737103

53. Tukhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., et al. Powerful Complex Immunoadjuvant Based on Synergistic Effect of Combined TLR4 and NOD2 Activation Significantly Enhances Magnitude of Humoral and Cellular Adaptive Immune Responses. PLoS One. 2016; 11 (5): e0155650. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650

54. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System. Annu. Rev. Immunol. 2009; 27 (1): 693–733. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641 PMID: 19302050

55. IM V., JK S., EM S., et al. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev. 1995; 9 (22): 2723–2735. DOI: https://doi.org/10.1101/GAD.9.22.2723 PMID: 7590248

56. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu. Rev. Immunol. 2000; 18 621–63. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621 PMID: 10837071

57. Ghosh G., Wang V.Y.-F., Huang D.-B., et al. NF-κB regulation: lessons from structures. Immunol. Rev. 2012; 246 (1): 36–58. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01097.x

58. Hansen S.K., Baeuerle P.A., Blasi F. Purification, reconstitution, and I kappa B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. Mol. Cell. Biol. 1994; 14 (4): 2593–2603. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.14.4.2593

59. Li Q., Verma I.M. NF-κB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2002; 2 (10): 725–734. DOI: https://doi.org/10.1038/nri910 PMID: 12360211

60. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and Function of NF-κB Transcription Factors in the Immune System. Annu. Rev. Immunol. 2009; 27 (1): 693–733. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641

61. Baeuerle P.A., Baltimore D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. Cell. 1988; 53 (2): 211–7. DOI: https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90382-0 PMID: 3129195

62. Mitchell S., Vargas J., Hoffmann A. Signaling via the <scp>NFκB</scp> system. WIREs Syst. Biol. Med. 2016; 8 (3): 227–241. DOI: https://doi.org/10.1002/wsbm.1331

63. Tay S., Hughey J.J., Lee T.K., et al. Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. Nature. 2010; 466 (7303): 267–71. DOI: https://doi.org/10.1038/nature09145 PMID: 20581820

64. Covert M.W., Leung T.H., Gaston J.E., et al. Achieving Stability of Lipopolysaccharide-Induced NF-κB Activation. Science (80-.). 2005; 309 (5742): 1854–1857. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1112304

65. Sun S.C., Ganchi P.A., Ballard D.W., et al. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science. 1993; 259 (5103): 1912–5. DOI: https://doi.org/10.1126/science.8096091 PMID: 8096091

66. Arenzana-Seisdedos F., Thompson J., Rodriguez M.S., et al. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. Mol. Cell. Biol. 1995; 15 (5): 2689–2696. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2689

67. Krikos A., Laherty C.D., Dixit V.M. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa

B elements. J. Biol. Chem. 1992; 267 (25): 17971-6. PMID: 1381359

68. Boone D.L., Turer E.E., Lee E.G., et al. The ubiquitin-modifying enzyme
A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. Nat. Immunol. 2004;
5 (10): 1052–1060. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1110 PMID: 15334086

69. Mauro C., Pacifico F., Lavorgna A., et al. ABIN-1 Binds to NEMO/IKKγ and Co-operates with A20 in Inhibiting NF-κB. J. Biol. Chem. 2006; 281 (27): 18482–18488. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M601502200

70. Wertz I.E., O'Rourke K.M., Zhou H., et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-κB signalling. Nature. 2004; 430 (7000): 694–699. DOI: https://doi.org/10.1038/nature02794 PMID: 15258597

71. Trinchieri G., Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. Nat. Rev. Immunol. 2007; 7 (3): 179–190. DOI: https://doi.org/10.1038/nri2038

72. Heel D.A. van, Ghosh S., Butler M., et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. Eur. J. Immunol. 2005; 35 (8): 2471–2476. DOI: https://doi.org/10.1002/eji.200526296

73. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2- activating agonists. Eur. J. Immunol. 2005; 35 (8): 2459–2470. DOI: https://doi.org/10.1002/eji.200526286

74. Pashenkov M. V., Murugina N.E., Budikhina A.S., et al. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. J. Leukoc. Biol. 2019; 105 (4): 669–680. DOI: https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R

75. Tada H., Aiba S., Shibata K.I., et al. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. Infect. Immun. 2005; 73 (12): 7967–7976. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.7967-7976.2005

76. Pashenkov M. V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., et al. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. Int. Immunopharmacol. 2010; 10 (8): 875–882. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.04.025

77. Voss E., Wehkamp J., Wehkamp K., et al. NOD2/CARD15 Mediates Induction of the Antimicrobial Peptide Human Beta-defensin-2. J. Biol. Chem. 2006; 281 (4): 2005–2011. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M511044200

78. Uehara A., Fujimoto Y., Fukase K., et al. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. Mol. Immunol. 2007; 44 (12): 3100–3111. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.02.007

79. Netea M.G., Ferwerda G., Jong D.J. de, et al. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-2 Modulates Specific TLR Pathways for the Induction of Cytokine Release. J. Immunol. 2005; 174 (10): 6518–6523. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6518

80. Wang J.E., Jørgensen P.F., Ellingsen E.A., et al. PEPTIDOGLYCAN PRIMES FOR LPS-INDUCED RELEASE OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN WHOLE HUMAN BLOOD. Shock. 2001; 16 (3): 178–182. DOI: https://doi.org/10.1097/00024382-200116030-00002

81. Пичугин А.В., Багаев А.В., Лебедева Е.С., Чулкина М. А.Р.. Синергическая продукция цитокинов дендритными клетками в ответ на одновременную активацию парами агонистов различных рецепторов врожденного иммунитета. Иммунология. 2017; 38 (1): 118–123. DOI: https://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-2-118-123

82. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., et al. The Cytosolic Sensors Nod1 and Nod2 Are Critical for Bacterial Recognition and Host Defense after Exposure to Tolllike Receptor Ligands. Immunity. 2008; 28 (2): 246–257. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.012 83. Volz T., Nega M., Buschmann J., et al. Natural Staphylococcus aureus - derived peptidoglycan fragments activate NOD2 and act as potent costimulators of the innate immune system exclusively in the presence of TLR signals. FASEB J. 2010; 24 (10): 4089–4102. DOI: https://doi.org/10.1096/fj.09-151001

84. Schäffler H., Demircioglu D.D., Kühner D., et al. NOD2 stimulation by Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan is boosted by toll-like receptor 2 costimulation with lipoproteins in dendritic cells. Infect. Immun. 2014; 82 (11): 4681–4688. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.02043-14

85. Kim H.J., Yang J.S., Woo S.S., et al. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. J. Leukoc. Biol. 2007; 81 (4): 983–989. DOI: https://doi.org/10.1189/jlb.0906588

86. Tukhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D. V., et al. Combined stimulation of toll-like receptor 5 and nod1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to salmonella enterica serovar typhimurium infection. Infect. Immun. 2013; 81 (10): 3855–3864. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.00525-13

87. Uehara A., Yang S., Fujimoto Y., et al. Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. Cell. Microbiol. 2005; 7 (1): 53–61. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00433.x

88. Лебедева Е.С., Багаев А.В., Чулкина М.М., Пичугин А.В. А.Р.И. Синергическое усиление транскрипции генов интерферонов 1-го типа и цитокинов при активации макрофагов и дендритных клеток сочетанием двух агонистов PRR. Иммунология. 2017; 38 (1): 64–71. DOI: https://doi.org/10.18821/0206-4952-2017-38-1-64-71

89. Uehara A., Takada H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. J. Dent. Res. 2008; 87 (7): 682–686. DOI: https://doi.org/10.1177/154405910808700709

90. Kang M.-J., Heo S.-K., Song E.-J., et al. Activation of Nod1 and Nod2 induces innate immune responses of prostate epithelial cells. Prostate. 2012; 72 (12): 1351–1358. DOI: https://doi.org/10.1002/pros.22483

91. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., et al. MURAMYL DIPEPTIDE ENHANCES THE RESPONSE TO ENDOTOXIN TO CAUSE MULTIPLE ORGAN INJURY IN THE ANESTHETIZED RAT. Shock. 2008; 29 (3): 388–394. DOI: https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181453e59

92. Takada H., Galanos C. Enhancement of endotoxin lethality and generation of anaphylactoid reactions by lipopolysaccharides in muramyl-dipeptide-treated mice. Infect. Immun. 1987; 55 (2): 409–413. DOI: https://doi.org/10.1128/iai.55.2.409-413.1987

93. Carlsen H., Moskaug J.Ø., Fromm S.H., et al. In Vivo Imaging of NF-κB Activity. J. Immunol. 2002; 168 (3): 1441–1446. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1441

94. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., et al. MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathways in Synergy, Priming, and Tolerance between TLR Agonists. J. Immunol. 2007; 178 (2): 1164–1171. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164

95. Kim Y.G., Park J.H., Reimer T., et al. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. Cell Host Microbe. 2011; 9 (6): 496–507. DOI: https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.05.006

96. Hiemstra I.H., Bouma G., Geerts D., et al. Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. Mol. Immunol. 2012; 52 (3–4): 264–272. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.06.007

97. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., et al. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. Int. Immunopharmacol. 2001; 1 (9–10): 1857–1865. DOI: https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00111-4

98. Shikama Y., Kuroishi T., Nagai Y., et al. Muramyldipeptide augments the actions of lipopolysaccharide in mice by stimulating macrophages to produce pro-IL-1 β and by down-regulation of the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). Innate Immun. 2011; 17 (1): 3–15. DOI: https://doi.org/10.1177/1753425909347508

99. Dahiya Y., Pandey R.K., Sodhi A. Nod2 Downregulates TLR2/1 Mediated IL1β Gene Expression in Mouse Peritoneal Macrophages. PLoS One. 2011; 6 (11): e27828. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027828

100. Watanabe T., Kitani A., Murray P.J., et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2–mediated T helper type 1 responses. Nat. Immunol. 2004; 5 (8): 800–808. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1092

101. Borm M.E.A., Bodegraven A.A. van, Mulder C.J.J., et al. The effect of NOD2 activation on TLR2-mediated cytokine responses is dependent on activation dose and NOD2 genotype. Genes Immun. 2008; 9 (3): 274–278. DOI: https://doi.org/10.1038/gene.2008.9

102. Hedl M., Li J., Cho J.H., et al. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. Proc. Natl. Acad. Sci. 2007; 104 (49): 19440–19445. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104 PMID: 18032608

103. Kullberg B.J., Ferwerda G., Jong D.J. de, et al. Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. Immunology. 2008; 123 (4): 600–605. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02735.x

104. Watanabe T., Asano N., Murray P.J., et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. J. Clin. Invest. 2008; 118 (2): 545–59. DOI: https://doi.org/10.1172/JCI33145

PMID: 18188453

105. Tsai W.-H., Huang D.-Y., Yu Y.-H., et al. Dual roles of NOD2 in TLR4mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages. Cell. Microbiol. 2011; 13 (5): 717–730. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01567.x

106. Udden S.M.N., Peng L., Gan J.-L., et al. NOD2 Suppresses Colorectal Tumorigenesis via Downregulation of the TLR Pathways. Cell Rep. 2017; 19 (13): 2756–2770. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.084

107. Abbott D.W., Yang Y., Hutti J.E., et al. Coordinated Regulation of Toll-Like Receptor and NOD2 Signaling by K63-Linked Polyubiquitin Chains. Mol. Cell. Biol. 2007; 27 (17): 6012–6025. DOI: https://doi.org/10.1128/mcb.00270-07

108. Wahlstrom K., Bellingham J., Rodriguez J.L., et al. INHIBITORY KBα CONTROL OF NUCLEAR FACTOR-KB IS DYSREGULATED IN ENDOTOXIN TOLERANT MACROPHAGES. Shock. 1999; 11 (4): 242–247. DOI: https://doi.org/10.1097/00024382-199904000-00003

109. Beelen A.J. van, Zelinkova Z., Taanman-Kueter E.W., et al. Stimulation of the Intracellular Bacterial Sensor NOD2 Programs Dendritic Cells to Promote Interleukin-17 Production in Human Memory T Cells. Immunity. 2007; 27 (4): 660–669. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.013

110. Jin F., Li Y., Ren B., et al. PU.1 and C/EBP α synergistically program distinct response to NF- κ B activation through establishing monocyte specific enhancers. Proc. Natl. Acad. Sci. 2011; 108 (13): 5290–5295. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1017214108

111. Biggin M.D. Animal Transcription Networks as Highly Connected, Quantitative Continua. Dev. Cell. 2011; 21 (4): 611–626. DOI: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.008

112. Wolfert M.A., Murray T.F., Boons G.-J., et al. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. J. Biol.

Chem. 2002; 277 (42): 39179–86. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M204885200 PMID: 12151399

113. Gutierrez O., Pipaon C., Inohara N., et al. Induction of Nod2 in Myelomonocytic and Intestinal Epithelial Cells via Nuclear Factor-κB Activation. J.
Biol. Chem. 2002; 277 (44): 41701–41705. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M206473200

114. Chen X., Xiao Z., Xie X., et al. TNF-α-Induced NOD2 and RIP2 Contribute to the Up-Regulation of Cytokines Induced by MDP in Monocytic THP-1 Cells. J. Cell. Biochem. 2018; 119 (7): 5072–5081. DOI: https://doi.org/10.1002/jcb.26227 PMID: 28639322

115. Ospelt C., Brentano F., Jüngel A., et al. Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2009; 60 (2): 355–363. DOI: https://doi.org/10.1002/art.24226

116. Keller J.-F., Carrouel F., Staquet M.-J., et al. Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic acid-stimulated odontoblast-like cells. Innate Immun. 2011; 17 (1): 29–34. DOI: https://doi.org/10.1177/1753425909348527

117. TAKAHASHI Y., ISUZUGAWA K., MURASE Y., et al. Up-Regulation of NOD1 and NOD2 through TLR4 and TNF-.ALPHA. in LPS-treated Murine Macrophages. J. Vet. Med. Sci. 2006; 68 (5): 471–478. DOI: https://doi.org/10.1292/jvms.68.471

118. Lee K.-H., Biswas A., Liu Y.-J., et al. Proteasomal Degradation of Nod2
Protein Mediates Tolerance to Bacterial Cell Wall Components. J. Biol. Chem. 2012;
287 (47): 39800–39811. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.410027

119. Vissers M., Remijn T., Oosting M., et al. Respiratory syncytial virus infection augments NOD2 signaling in an IFN- β -dependent manner in human primary cells. Eur. J. Immunol. 2012; 42 (10): 2727–2735. DOI:

https://doi.org/10.1002/eji.201242396

120. Yang S., Tamai R., Akashi S., et al. Synergistic Effect of Muramyldipeptide with Lipopolysaccharide or Lipoteichoic Acid To Induce Inflammatory Cytokines in Human Monocytic Cells in Culture. Infect. Immun. 2001; 69 (4): 2045–2053. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.69.4.2045-2053.2001

121. Marina-García N., Franchi L., Kim Y.-G., et al. Pannexin-1-Mediated Intracellular Delivery of Muramyl Dipeptide Induces Caspase-1 Activation via Cryopyrin/NLRP3 Independently of Nod2. J. Immunol. 2008; 180 (6): 4050–4057. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4050

122. Kagan J.C., Su T., Horng T., et al. TRAM couples endocytosis of Tolllike receptor 4 to the induction of interferon- β . Nat. Immunol. 2008; 9 (4): 361–368. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1569

123. Wang Y., Chen T., Han C., et al. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. Blood. 2007; DOI: https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066027

124. Chuang T.-H., Ulevitch R.J. Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. Nat. Immunol. 2004; 5 (5): 495–502. DOI: https://doi.org/10.1038/ni1066

125. Y T., JC K. Innate Immune Signaling Organelles Display Natural and Programmable Signaling Flexibility. Cell. 2019; 177 (2): 384-398.e11. DOI: https://doi.org/10.1016/J.CELL.2019.01.039 PMID: 30853218

126. B E., E A., SC H., et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. Nat. Immunol. 2014; 15 (4): 323–332. DOI: https://doi.org/10.1038/NI.2833 PMID: 24562310

127. Murugina N.E., Budikhina A.S., Dagil Y.A., et al. Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No

association with proinflammatory cytokine production in normoxia. J. Biol. Chem. 2020; 295 (10): 3099–3114. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010589 PMID: 32005665

128. O'Neill L.A.J., Pearce E.J. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. J. Exp. Med. 2016; 213 (1): 15–23. DOI: https://doi.org/10.1084/jem.20151570 PMID: 26694970

129. Huang W., Gou F., Long Y., et al. High Glucose and Lipopolysaccharide Activate NOD1- RICK-NF-κB Inflammatory Signaling in Mesangial Cells. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 2016; 124 (8): 512–517. DOI: https://doi.org/10.1055/s-0042-105641

130. Zom G.G., Willems M.M.J.H.P., Meeuwenoord N.J., et al. Dual Synthetic Peptide Conjugate Vaccine Simultaneously Triggers TLR2 and NOD2 and Activates Human Dendritic Cells. Bioconjug. Chem. 2019; 30 (4): 1150–1161. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00087 PMID: 30865430

131. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016; 315 (8): 801. DOI: https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287 PMID: 26903338

132. Cecconi M., Evans L., Levy M., et al. Sepsis and septic shock. Lancet. 2018; 392 (10141): 75–87. DOI: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30696-2 PMID: 25292001

133. Hotchkiss R.S., Karl I.E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis.N.Engl.J.Med.2003;348(2):138–150.DOI:https://doi.org/10.1056/NEJMra021333 PMID:12519925

134. Arwyn-Jones J., Brent A.J. Sepsis. Surg. 2019; 37 (1): 1–8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2018.11.007

135. Opal S.M., Laterre P.F., Francois B., et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: The ACCESS randomized trial. JAMA - J. Am. Med. Assoc. 2013; DOI:

https://doi.org/10.1001/jama.2013.2194 PMID: 23512062

136. Rice T.W., Wheeler A.P., Bernard G.R., et al. A randomized, doubleblind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis*. Crit. Care Med. 2010; 38 (8): 1685–1694. DOI: https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181e7c5c9

137. Kobayashi T., Tani T., Yokota T., et al. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000; 28 (1): 49–53. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01456.x

138. Oh S.J., Kim J.H., Chung D.H. NOD2-mediated Suppression of CD55 on Neutrophils Enhances C5a Generation During Polymicrobial Sepsis. PLoS Pathog. 2013; 9 (5): e1003351. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003351

139. Kim Y.-G., Kamada N., Shaw M.H., et al. The Nod2 Sensor Promotes Intestinal Pathogen Eradication via the Chemokine CCL2-Dependent Recruitment of Inflammatory Monocytes. Immunity. 2011; 34 (5): 769–780. DOI: https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.04.013

140. Keček Plešec K., Urbančič D., Gobec M., et al. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. Bioorganic Med. Chem. 2016; DOI: https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.08.044

141. Rickard D.J., Sehon C.A., Kasparcova V., et al. Identification of Benzimidazole Diamides as Selective Inhibitors of the Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 (NOD2) Signaling Pathway. PLoS One. 2013; 8 (8): e69619. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069619

142. Wang S., Yang J., Li X., et al. Discovery of 1,4-Benzodiazepine-2,5dione (BZD) Derivatives as Dual Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing 1/2 (NOD1/NOD2) Antagonists Sensitizing Paclitaxel (PTX) To Suppress Lewis Lung Carcinoma (LLC) Growth in Vivo. J. Med. Chem. 2017; 60 (12): 5162–5192. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00608 143. Coldewey S.M., Rogazzo M., Collino M., et al. Inhibition of IκB kinase reduces the multiple organ dysfunction caused by sepsis in the mouse. Dis. Model. Mech. 2013; DOI: https://doi.org/10.1242/dmm.012435

144. Li H., Han W., Polosukhin V., et al. NF-κB inhibition after cecal ligation and puncture reduces sepsis-associated lung injury without altering bacterial host defense. Mediators Inflamm. 2013; 2013 503213. DOI: https://doi.org/10.1155/2013/503213 PMID: 24347827

145. Choi J.H., Park S.H., Jung J.-K., et al. Caffeic Acid Cyclohexylamide Rescues Lethal Inflammation in Septic Mice through Inhibition of IκB Kinase in Innate Immune Process. Sci. Rep. 2017; 7 (1): 41180. DOI: https://doi.org/10.1038/srep41180

146. Chen J., Kieswich J.E., Chiazza F., et al. IκB Kinase Inhibitor Attenuates Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction in CKD. J. Am. Soc. Nephrol. 2017; 28 (1): 94– 105. DOI: https://doi.org/10.1681/ASN.2015060670

147. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. Nature. 2007; 447 (7147): 972–978. DOI: https://doi.org/10.1038/nature05836

148. Cavaillon J.-M., Adrie C., Fitting C., et al. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? J. Endotoxin Res. 2003; 9 (2): 101–107. DOI: https://doi.org/10.1179/096805103125001487

149. Onozuka K., Saito-Taki T., Nakano M. Augmentation of protective and antibacterial activity induced by muramyl dipeptides in CBA/N defective mice with X-linked immunodeficiency for Salmonella enteritidis infection. Infect. Immun. 1984; 45 (2): 424–427. DOI: https://doi.org/10.1128/iai.45.2.424-427.1984

150. Lehner M.D., Ittner J., Bundschuh D.S., et al. Improved Innate Immunity of Endotoxin-Tolerant Mice Increases Resistance to Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection despite Attenuated Cytokine Response. Infect. Immun. 2001; 69 (1): 463–471. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.463-471.2001 151. Khan N., Pahari S., Vidyarthi A., et al. NOD-2 and TLR-4 Signaling Reinforces the Efficacy of Dendritic Cells and Reduces the Dose of TB Drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. J. Innate Immun. 2016; 8 (3): 228–242. DOI: https://doi.org/10.1159/000439591

152. Tamura R., Tanaka T., Yamamoto Y., et al. Dual role of macrophage in tumor immunity. Immunotherapy. 2018; 10 (10): 899–909. DOI: https://doi.org/10.2217/imt-2018-0006 PMID: 30073897

153. Pyonteck S.M., Akkari L., Schuhmacher A.J., et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression HHS Public Access Author manuscript. Nat Med. 2013; 19 (10): 1264–1272. DOI: https://doi.org/10.1038/nm.3337.CSF-1R

154. Bronte V., Murray P.J. Understanding local macrophage phenotypes in disease: Modulating macrophage function to treat cancer. Nat. Med. 2015; 21 (2): 117–119. DOI: https://doi.org/10.1038/nm.3794 PMID: 25654601

155. Zhang L., Zhu H., Lun Y., et al. Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. Cell. Mol. Immunol. 2007; 4 (5): 359–367. PMID: 17976316

156. Pozzi L.-A.M., Maciaszek J.W., Rock K.L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. J. Immunol. 2005; 175 (4): 2071–2081. DOI: https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.175.4.2071 PMID: 16081773

157. Wynn T.A., Freund Y.R., Paulnock D.M. TNF-alpha differentially regulates Ia antigen expression and macrophage tumoricidal activity in two murine macrophage cell lines. Cell. Immunol. 1992; 140 (1): 184–196. DOI: https://doi.org/10.1016/0008-8749(92)90186-S PMID: 1310901

158. Sun L., Kees T., Almeida A.S., et al. Activating a collaborative innateadaptive immune response to control metastasis. Cancer Cell. 2021; 39 (10): 1361-1374.e9. DOI: https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2021.08.005 PMID: 34478639 159. Singh M., Khong H., Dai Z., et al. Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation. J. Immunol. 2014; 193 (9): 4722–4731. DOI: https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1401160 PMID: 25252955

160. Hedl M., Yan J., Witt H., et al. IRF5 Is Required for Bacterial Clearance in Human M1-Polarized Macrophages, and IRF5 Immune-Mediated Disease Risk Variants Modulate This Outcome. J. Immunol. 2019; 202 (3): 920–930. DOI: https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1800226 PMID: 30593537

161. Nikonova A.A., Pichugin A. V., Chulkina M.M., et al. The TLR4 Agonist Immunomax Affects the Phenotype of Mouse Lung Macrophages during Respiratory Syncytial Virus Infection. Acta Naturae. 2018; 10 (4): 95. DOI: https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-95-99 PMID: 30713767

162. Chi H., Li C., Zhao F.S., et al. Anti-tumor Activity of Toll-Like Receptor7Agonists.Front.Pharmacol.2017;8(MAY):DOI:https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00304PMID: 28620298

163. Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. Immunotherapy.2009; 1 (6): 949–964. DOI: https://doi.org/10.2217/IMT.09.70 PMID: 20563267

164. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., et al. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax®, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. J. Transl. Med. 2014; 12 (1): 322. DOI: https://doi.org/10.1186/s12967-014-0322-y PMID: 25432242

165. Rodell C.B., Arlauckas S.P., Cuccarese M.F., et al. TLR7/8-agonistloaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. Nat. Biomed. Eng. 2018; 2 (8): 578–588. DOI: https://doi.org/10.1038/S41551-018-0236-8 PMID: 31015631

166. Ackerman S.E., Pearson C.I., Gregorio J.D., et al. Immune-stimulating antibody conjugates elicit robust myeloid activation and durable antitumor immunity. Nat. cancer. 2021; 2 (1): 18–33. DOI: https://doi.org/10.1038/S43018-020-00136-X
PMID: 35121890

167. Zhu P., Hou Y., Tang M., et al. The role of HIF-1α in BCG-stimulated macrophages polarization and their tumoricidal effects in vitro. Med. Microbiol. Immunol. 2021; 210 (2–3): 149–156. DOI: https://doi.org/10.1007/S00430-021-00708-3 PMID: 33974122

168. Kumar P., Tyagi R., Das G., et al. Mycobacterium indicus pranii and Mycobacterium bovis BCG lead to differential macrophage activation in Toll-like receptor-dependent manner. Immunology. 2014; 143 (2): 258–268. DOI: https://doi.org/10.1111/IMM.12306 PMID: 24766519

169. Suarez G., Romero-Gallo J., Piazuelo M.B., et al. Nod1 Imprints Inflammatory and Carcinogenic Responses toward the Gastric Pathogen Helicobacter pylori. Cancer Res. 2019; 79 (7): 1600–1611. DOI: https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2651 PMID: 30696658

170. Punzo F., Bellini G., Tortora C., et al. Mifamurtide and TAM-like macrophages: effect on proliferation, migration and differentiation of osteosarcoma cells. Oncotarget. 2020; 11 (7): 687–698. DOI: https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27479 PMID: 32133045

171. Ando K., Mori K., Corradini N., et al. Mifamurtide for the treatment of nonmetastatic osteosarcoma. Expert Opin. Pharmacother. 2011; 12 (2): 285–292. DOI: https://doi.org/10.1517/14656566.2011.543129 PMID: 21226638

172. Ушакова Е.И., Лебедева Е.С., Багаев А.В., Пичугин А.В. А.Р.И. Комбинированная иммунотерапия метастатической карциномы у лабораторных мышей путем резекции первичного опухолевого узла и последующего перепрограммирования макрофагов и дендритных клеток с помощью агониста TLR4. Иммунология. 2021; 42 (5): 490–501. DOI: https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-5-490-501

173. Bagaev A.V., Rybinets A.S., Fedorova A.A., et al. Synergism of TLR3 and TLR4 agonists during macrophage reprogramming into an antitumor state.

Immunologiya. 2021; 42 (6): 615–630. DOI: https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-6-615-630

174. Däbritz J., Weinhage T., Varga G., et al. Reprogramming of Monocytes by GM-CSF Contributes to Regulatory Immune Functions during Intestinal Inflammation. J. Immunol. 2015; 194 (5): 2424–2438. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401482

175. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2-\Delta\Delta$ CT Method. Methods. 2001; 25 (4): 402–408. DOI: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262 PMID: 11846609

176. Bagaev A. V., Garaeva A.Y., Lebedeva E.S., et al. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- κ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- κ B into the cell nucleus. Sci. Rep. 2019; 9 (1): DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-018-36052-5 PMID: 30872589

177. Lalonde E., Ha K.C.H., Wang Z., et al. RNA sequencing reveals the role of splicing polymorphisms in regulating human gene expression. Genome Res. 2011; 21 (4): 545–554. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.111211.110

178. Hao S., Baltimore D. RNA splicing regulates the temporal order of TNF-induced gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013; 110 (29): 11934–11939.DOI:https://doi.org/10.1073/PNAS.1309990110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201309990SI.PDF PMID: 23812748

179. Luo Y., Zheng S.G. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. Front. Immunol. 2016; 7 DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00604

180. Shebzukhov Y. V., Kuprash D. V. Transcriptional regulation of TNF/LT locus in immune cells. Mol. Biol. 2011; 45 (1): 47–57. DOI: https://doi.org/10.1134/S0026893311010110

181. Kellogg R.A., Tian C., Etzrodt M., et al. Cellular Decision Making by Non-Integrative Processing of TLR Inputs. Cell Rep. 2017; 19 (1): 125–135. DOI:

https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.027 PMID: 28380352

182. Zambrano S., Toma I. De, Piffer A., et al. NF-κB oscillations translate into functionally related patterns of gene expression. Elife. 2016; 5 e09100. DOI: https://doi.org/10.7554/eLife.09100 PMID: 26765569

183. Litvak V., Ramsey S.A., Rust A.G., et al. Function of C/EBPdelta in a regulatory circuit that discriminates between transient and persistent TLR4-induced signals. Nat. Immunol. 2009; 10 (4): 437–43. DOI: https://doi.org/10.1038/ni.1721 PMID: 19270711

184. Takaoka A., Yanai H., Kondo S., et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature. 2005; 434 (7030): 243–9. DOI: https://doi.org/10.1038/nature03308 PMID: 15665823

185. Krausgruber T., Saliba D., Ryzhakov G., et al. IRF5 is required for latephase TNF secretion by human dendritic cells. Blood. 2010; 115 (22): 4421–4430. DOI: https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-263020

186. Lu Y.-C., Kim I., Lye E., et al. Differential Role for c-Rel and C/EBPβ/δ
in TLR-Mediated Induction of Proinflammatory Cytokines. J. Immunol. 2009; 182
(11): 7212–7221. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802971 PMID: 19454718

187. Correa R.G., Khan P.M., Askari N., et al. Discovery and characterization of 2-aminobenzimidazole derivatives as selective NOD1 inhibitors. Chem. Biol. 2011; 18 (7): 825–832. DOI: https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2011.06.009 PMID: 21802003

188. Godl K., Wissing J., Kurtenbach A., et al. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003; 100 (26): 15434–9. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.2535024100 PMID: 14668439

189. Dagil Y.A., Sharova V.S., Pinegin B. V., et al. A cell-based test systemfor the assessment of pharmacokinetics of NOD1 and NOD2 receptor agonists. Int.Immunopharmacol.2018;6394–100.DOI:

https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2018.07.037 PMID: 30077058

190. Park J.-H., Kim Y.-G., McDonald C., et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. J. Immunol. 2007; 178 (4): 2380–2386. DOI: https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.178.4.2380 PMID: 17277144

191. Hasegawa M., Kawasaki A., Yang K., et al. A role of lipophilic peptidoglycan-related molecules in induction of Nod1-mediated immune responses.
J. Biol. Chem. 2007; 282 (16): 11757–11764. DOI: https://doi.org/10.1074/JBC.M700846200 PMID: 17322292

192. Reilly S.M., Chiang S.H., Decker S.J., et al. An inhibitor of the protein kinases TBK1 and IKK-ε improves obesity-related metabolic dysfunctions in mice. Nat. Med. 2013; 19 (3): 313–321. DOI: https://doi.org/10.1038/NM.3082 PMID: 23396211

193. Gidon A., Louet C., Røst L.M., et al. The Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 6 Auto-paracrine Signaling Loop Controls Mycobacterium avium Infection via Induction of IRF1/IRG1 in Human Primary Macrophages. MBio. 2021; 12 (5): DOI: https://doi.org/10.1128/MBIO.02121-21 PMID: 34607464

194. Kunze A., Förster U., Oehrl S., et al. Autocrine TNF-α and IL-1β prime 6sulfo LacNAc+ dendritic cells for high-level production of IL-23. Exp. Dermatol. 2017; 26 (4): 314–316. DOI: https://doi.org/10.1111/EXD.13134 PMID: 27315572

195. Everts B., Amiel E., Huang S.C.-C., et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation. Nat. Immunol. 2014; 15 (4): 323–32. DOI: https://doi.org/10.1038/ni.2833 PMID: 24562310

196. Tan Y., Kagan J.C. Innate Immune Signaling Organelles Display Natural and Programmable Signaling Flexibility. Cell. 2019; 177 (2): 384-398.e11. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.039 PMID: 30853218

197. Pan Q., Kravchenko V., Katz A., et al. NF-ĸB-Inducing Kinase Regulates

Selected Gene Expression in the Nod2 Signaling Pathway. Infect. Immun. 2006; 74 (4): 2121–2127. DOI: https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2121-2127.2006 PMID: 16552041

198. Wang C., Deng L., Hong M., et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature. 2001; 412 (6844): 346–51. DOI: https://doi.org/10.1038/35085597 PMID: 11460167

199. Mulero M.C., Wang V.Y.-F., Huxford T., et al. Genome reading by the NF-κB transcription factors. Nucleic Acids Res. 2019; 47 (19): 9967–9989. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkz739 PMID: 31501881

200. Michelucci A., Cordes T., Ghelfi J., et al. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013; 110 (19): 7820–7825. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1218599110 PMID: 23610393

201. Lampropoulou V., Sergushichev A., Bambouskova M., et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. Cell Metab. 2016; 24 (1): 158–166. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.004 PMID: 27374498

202. Bryson B.D., Rosebrock T.R., Tafesse F.G., et al. Heterogeneous GM-CSF signaling in macrophages is associated with control of Mycobacterium tuberculosis. Nat. Commun. 2019; 10 (1): 2329. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-019-10065-8

203. Ramirez-Carrozzi V.R., Braas D., Bhatt D.M., et al. A Unifying Model for the Selective Regulation of Inducible Transcription by CpG Islands and Nucleosome Remodeling. Cell. 2009; 138 (1): 114–128. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.020 PMID: 19596239

204. Hargreaves D.C., Horng T., Medzhitov R. Control of Inducible Gene Expression by Signal-Dependent Transcriptional Elongation. Cell. 2009; 138 (1): 129–145. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.047 PMID: 19596240

205. Heiden M.G. Vander, Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science (80-.). 2009; 324 (5930): 1029–1033. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1160809 PMID: 19460998

206. Murad Y.M., Clay T.M., Lyerly H.K., et al. CPG-7909 (PF-3512676, ProMune): toll-like receptor-9 agonist in cancer therapy. Expert Opin. Biol. Ther. 2007; 7 (8): 1257–1266. DOI: https://doi.org/10.1517/14712598.7.8.1257 PMID: 17696823

207. Vannini F., Kashfi K., Nath N. The dual role of iNOS in cancer. Redox Biol. 2015; 6 334–343. DOI: https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009

208. Sun L., Kees T., Almeida A.S., et al. Activating a collaborative innateadaptive immune response to control metastasis. Cancer Cell. 2021; 39 (10): 1361-1374.e9. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.08.005