На правах рукописи

Муругина Нина Евгеньевна

КООПЕРАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА NOD1 И TLR4

3.2.7 – аллергология и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук.

МОСКВА

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук **Пащенков Михаил Владимирович**

Официальные оппоненты:
Кадагидзе Заира Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н.Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации;
Козлов Иван Генрихович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Института последипломного образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации**.**

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Защита состоится «___»_____2023 года в _____часов на заседании диссертационного совета 68.1.002.01 на базе ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России по адресу: 115522, г. Москва, ул. Каширское шоссе, д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте https://nrcii.ru/dissertatsionnyy-sovet/dissertatsii-postupivshie-na-rassmotrenie/.

Автореферат разослан «___»_____2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук Гудима Георгий Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

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. Явление синергизма во врожденной иммунной системе может иметь двоякое значение. С одной стороны, неконтролируемая синергическая кооперация 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. 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. Изучение механизма взаимного влияния NOD- и Toll-подобных рецепторов является актуальной проблемой.

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

Цель работы

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.
2. Изучить экспрессию генов, кодирующих цитокины, хемокины и внутриклеточные сигнальные молекулы, при раздельной и сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4.
3. Изучить активацию NF-κB-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 IκB и транслокация белков NF-κB 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-κB- и p38-зависимого 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 противоопухолевой активности макрофагов in vitro, причем эффективность комбинации существенно превышает эффективность каждого отдельного агониста.

Теоретическая и практическая значимость работы

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. 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 могут быть использованы для разработки комбинированных иммуностимуляторов микробной природы. Разработана методика подавления роста опухолевых клеток путем сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4. Сочетание агонистов рецепторов NOD1 и TLR4 может рассматриваться в качестве кандидатного противоопухолевого препарата.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 11 статей в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для опубликования основных научных результатов докторских и кандидатских диссертаций (названия журналов: «Journal of Leukocyte Biology», «Journal of Biological Chemistry», «Journal of Immunology», «Иммунология», «Российский иммунологический журнал»), и 1 публикация в материалах международного конгресса.

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на Объединённом иммунологический форуме – 2019 (24-29 июня 2019 года, г. Новосибирск) и Конгрессе по молекулярной иммунологии и аллергологии IMAC 2021 (2-3 декабря 2021 года, Москва).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, 31 рисунок. Диссертация включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список использованной литературы». Список литературы содержит 208 работ отечественных и зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование макрофагов. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови здоровых доноров в градиенте плотности фиколла. МНК ресуспендировали в среде для адгезии моноцитов и доводили концентрацию до 10 млн/мл. Вносили требуемый объем суспензии МНК в планшеты или чашки Петри. Инкубировали в CO_2-инкубаторе с поддержанием температуры +37°С и концентрации CO_2 5% (Jouan, Франция) 1 час. Неприлипшие клетки удаляли путем отмывки RPMI-1640. Прилипшие МНК (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 суток дифференцированные макрофаги отделяли от пластика трипсинизированием, отмывали и подсчитывали.

Стимуляция клеток. Макрофаги стимулировали М-триДАП (Invivogen, США), ЛПС *E. coli* O111:B4 (Merck Millipore, США) и их сочетаниями. М-триДАП использовали в концентрации 10 мкг/мл, ЛПС – 10 нг/мл.

Выделение ядер и цитозольной фракции макрофагов. Для выделения ядер макрофаги обрабатывали гипотоническим буфером, содержащим коктейль ингибиторов протеаз, инкубировали 30 с Nonidet P-40 (Amresco, США) затем собирали клеточные лизаты. Ядра осаждали путем центрифугирования при 2000 g в охлажденной центрифуге. Цитозольную фракцию и осадок ядер анализировали с помощью Вестерн-блоттинга.

Иммуноферментный анализ. Уровни TNF, IL-6 и IL-1β в супернатантах клеточных культур определяли методом сэндвич-ИФА с использованием наборов реагентов Thermo Fisher / eBioscience.

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), затем 0,5 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора RevertAid (Fermentas, Литва). Анализ экспрессии мРНК в образцах кДНК проводили с использованием специфичных праймеров и красителя SYBRGreen с нормализацией на мРНК GAPDH. Относительную экспрессию рассчитывали по методу Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen 2001). В качестве референс-образца служили нестимулированные клетки в точке 1 ч, относительную экспрессию исследуемых генов в этих образцах принимали за 1.

Вестерн-блоттинг. Белки цитозольной и ядерной фракции макрофагов разделяли путем элекрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и переносили на мембраны из поливинилиден-дифторида Immun-Blot PVDF Membranes for Protein Blotting (Bio-Rad, США). Для детекции целевых белков мембрану последовательно инкубировали с первичными антителами, а затем со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Хемилюминесцентный сигнал выявляли с помощью высокочувствительного

имаджера Amersham Imager 600 (Amersham, Великобритания). Денситометрический анализ делали в программе ImageJ (http://imagej.nih.gov/ij).

Исследование потребления глюкозы и высвобождения лактата. Концентрацию глюкозы в супернатантах и в ПКС определяли на биохимическом анализаторе Synchron CX5 Pro или AU480 (Beckman Coulter, США). Концентрации лактата измеряли колориметрическим методом с помощью набора реактивов фирмы Biovision (США), либо на приборе AU480.

Анализ клеточного метаболизма в реальном времени. Скорость закисления внеклеточной среды (extracellular medium acidification rate или ECAR) и скорость потребления кислорода (oxygen consumption rate или OCR) измеряли на приборе Seahorse XFe96 Analyzer (Agilent Technologies, США). ECAR и OCR измеряли каждые 9 мин (продолжительность измерений – 3 мин). Вычисляли площади под кривыми «время – ответ» (AUC) после добавления стимуляторов.

Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. 8-луночные слайд-флаконы (SPL Life Sciences, Южная Корея) покрывали поли-D-лизином. Макрофаги вносили в лунки по $5*10^4$ клеток/лунку, стимулировали агонистами NOD1 и TLR4. Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, отмывали и пермеабилизировали 95% ледяным этанолом. Затем клетки инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против p65 (Cell SignalingTechnologies, cat. # 8242); отмывали и инкубировали с ослиными антителами к кроличьему IgG, меченными NorthernLights NL493 (R&D Systems, США). 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. Для каждой клетки измеряли среднюю интенсивность окрашивания p65 в цитоплазме и ядре и рассчитывали соотношение интенсивностей ядра и цитоплазмы (nucleus-to-cytoplasm ratio [NCR]).

Оценка противоопухолевых свойств макрофагов. Опухолевые клетки K562 культивировали ч в CO_2-инкубаторе в течение 72 часов без макрофагов (контроль), а также с макрофагами в отсутствие агонистов и с агонистами NOD1 и

TLR4 по отдельности и в комбинации. Нейтрализующие антитела к TNF и IFN-β, контрольный козий IgG и апоцинин вносили за 15 минут до внесения агонистов и клеток К562. Оценивали количество жизнеспособных клеток в культурах на проточном цитометре FACSCalibur (BD Biosciences, США). 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 A – количество живых клеток К562 в культурах с М-триДАП+ЛПС,B – с М-триДАП, C – с ЛПС, D – без агонистов.

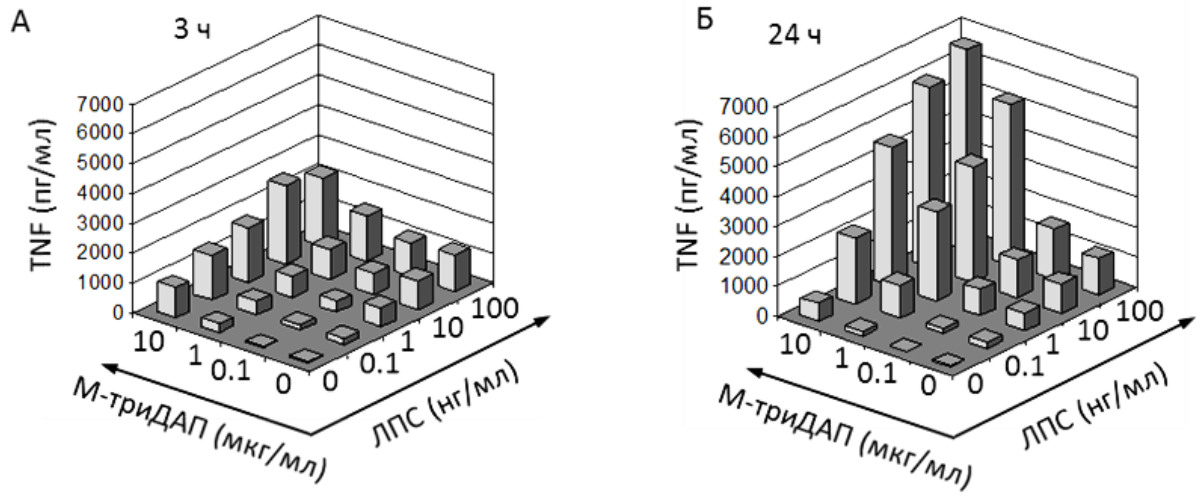
Опыты с переносом супернатантов. Для получения супернатантов макрофаги ($2*10^5$ клеток) культивировали в течение 72 ч без агонистов или с М-триДАП+ЛПС. Для нейтрализации остаточного ЛПС супернатанты инкубировали антагонистом ЛПС – полимиксином B, для нейтрализации TNF – с нейтрализующими антителами к TNF.

Опыты с разобщением макрофагов и клеток К562. Использовали 24-луночные трансвелл-планшеты с полупроницаемыми мембранами (диаметр пор – 8 мкм, Corning, США). Макрофаги и агонисты NOD1 и TLR4 помещали в нижние камеры планшетов, клетки К562 – в верхние. Через 72 ч собирали клетки из верхних камер, анализировали содержание живых К562 с помощью проточного цитометра.

Анализ данных. Для оценки кооперации двух агонистов вычисляли индексы синергизма (ИС) по формуле: ИС = Ответ (C1, C2) / (Ответ (C1) + Ответ (C2)), где Ответ (C1, C2) – ответ клеток на стимуляцию сочетанием агонистов 1 и 2 в концентрациях C1 и C2 соответственно, Ответ (C1) и Ответ (C2) – ответы на стимуляцию агонистом 1 в концентрации C1 и агонистом 2 в концентрации C2. 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). Корреляции между двумя наборами данных анализировали с помощью критерия Пирсона. Данные представлены в виде M±σ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Продукция TNF при сочетанной стимуляции макрофагов агонистами NOD1 и TLR4. На первом этапе изучили продукцию одного из основных провоспалительных цитокинов – TNF. TNF в супернатантах макрофагов определяли через 3 и 24 ч после добавления агонистов в различных концентрациях раздельно и в сочетаниях. При увеличении дозы ЛПС и М-триДАП продукция цитокинов увеличивается по мере увеличения концентрации агонистов и времени инкубации. При этом в ранние сроки (3 ч) имеет место простая суммация эффектов агонистов NOD1 и TLR4, а через 24 часа наблюдается выраженное синергическое увеличение секреции TNF (рис. 1). Далее были использованы концентрации ЛПС - 10 нг/мл, М-триДАП - 10 мкг/мл, дающие выраженный синергический эффект.



В Индексы синергизма TNF

ЛПС \ МтриДАП	3 ч			24 ч		
	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 1. 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. M ± σ, n = 4. * Отличие индексов синергизма (ИС) от 1 с $p < 0,05$; ** отличие ИС от 1 с $p < 0,01$; *** отличие ИС от 1 с $p < 0,001$.

Экспрессия мРНК цитокинов и хемокинов при сочетанной стимуляции агонистами NOD1 и TLR4. Чтобы подробнее охарактеризовать ответ макрофагов на сочетанную стимуляцию агонистами NOD1 и TLR4, была изучена экспрессия мРНК ряда цитокинов и хемокинов (*TNF, IL6, IL1B, IL12B, IL23A, MX1, CCL3, CCL4*). Через 1 ч после добавления стимуляторов синергическая индукция мРНК еще отсутствует, наблюдается простая суммация эффектов двух агонистов. Однако в более поздних точках – 4 и 9 ч – наблюдается синергическое взаимодействие агонистов. Таким образом, синергический эффект формируется на уровне экспрессии мРНК между 1 и 4 ч после начала стимуляции (табл. 1).

Анализ кинетики экспрессии мРНК TNF и IL6 при стимуляции М-триДАП и ЛПС. Чтобы уточнить временные рамки развития синергического эффекта, была исследована кинетика экспрессии мРНК *TNF* и *IL6* в первые 4 часа после раздельной и сочетанной стимуляции ЛПС и М-триДАП. При сочетанной стимуляции индексы синергизма становились достоверно выше единицы начиная со 150-й минуты и продолжали нарастать к 240 минутам после начала стимуляции (рис. 2).

Таблица 1. 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 (М ± σ, n = 5).

Время / Ген	1 час	4 часа	9 часов
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	1,14±0,39	2,71±2,53	2,85±1,51

* Отличие индексов синергизма (ИС) от единицы с $p < 0,05$; ** отличие ИС от единицы с $p < 0,01$.

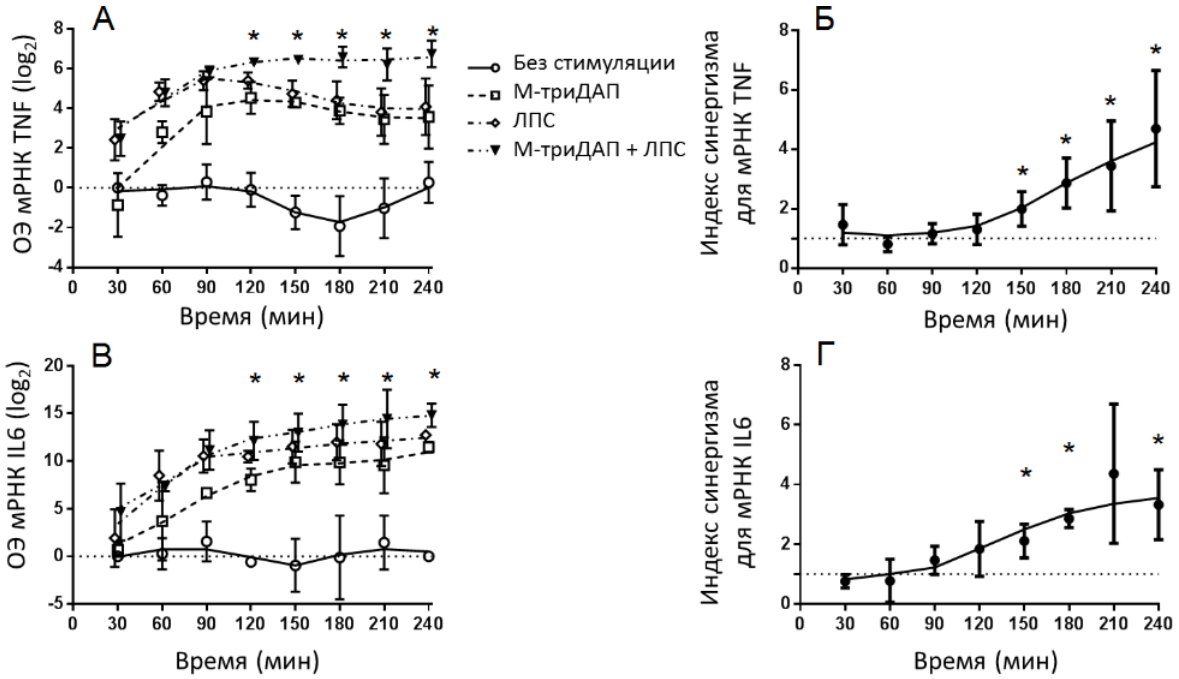


Рисунок 2. Кинетика экспрессии и индексы синергизма мРНК *TNF* и *IL6* в течение первых 4 часов после стимуляции клеток М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (10 нг/мл) и их сочетанием. А, В – log-трансформированные значения ОЭ (относительной экспрессии) *TNF* и *IL6*, Б и Г - соответствующие значения индексов синергизма (M ± σ, 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.

Анализ кинетики ядерной транслокации NF-κB с помощью Вестерн-блоттинга. Мы проанализировали кинетику ядерной транслокации белков NF-κB. Сигнализация через NF-κB – это не разовое событие, а колебательный процесс с чередующимися фазами переноса NF-κB в ядро и из ядра. Эти колебания концентрации NF-κB в ядре наиболее типичны для сигнализации через рецепторы TNF, но могут наблюдаться также при стимуляции TLR (Kellogg et al. 2017; Zambrano et al. 2016; Tay et al. 2010). Учитывая сказанное, кинетику уровней белков RelA (p65), c-Rel и p50 в ядре исследовали с интервалами 15 минут в течение первых 210 минут после активации макрофагов. При сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 происходило наложение кинетик ядерной транслокации c-Rel, p65 и p50, индуцированной каждым из двух рецепторов, однако синергического эффекта не наблюдалось: индексы синергизма были примерно равны или меньше 1 (рис. 3). Аналогичные данные были получены при изучении ядерной транслокации p65 в единичных клетках методом иммунофлюоресценции: накопление p65 в ядре при стимуляции сочетанием агонистов не является синергическим.

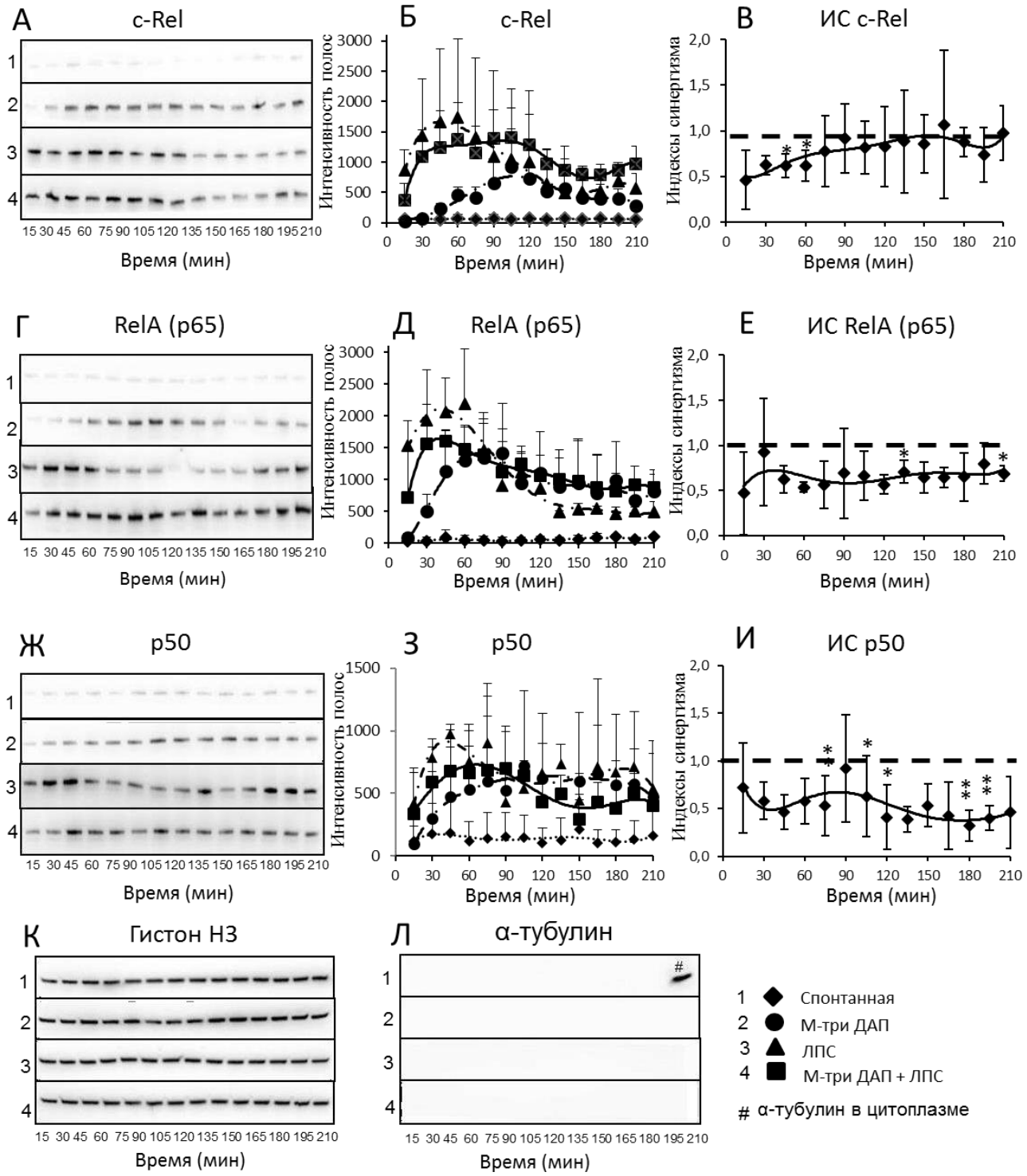


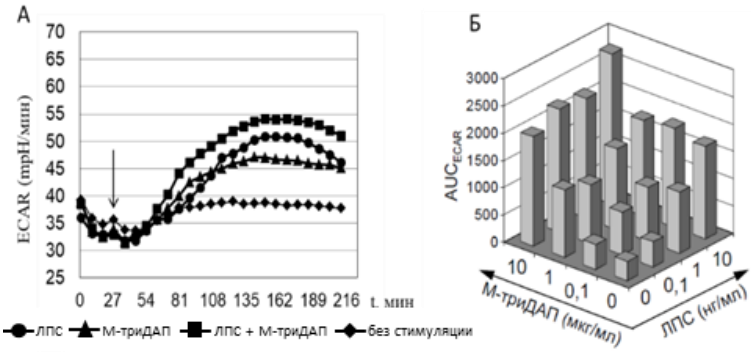
Рисунок 3. Кинетика ядерной транслокации белков NF-κB раздельной и сочетанной стимуляции макрофагов М-триДАП и ЛПС в концентрациях, соответственно, 10 мкг/мл и 10 нг/мл. Уровни c-Rel, RelA (p65), p50, гистона Н3 и α-тубулина в ядрах оценивали в течение 3,5 часов с интервалами 15 минут. А, Г, Ж – изображения, полученные при Вестерн-блоттинге (репрезентативный опыт). Б, Д, З – результаты денситометрии изображений, полученных при Вестерн-блоттинге. В, Е, И – индексы синергизма c-Rel, RelA (p65), p50, рассчитанные по результатам денситометрии. * Отличие ИС от единицы с $p < 0,05$; ** отличие ИС от единицы с $p < 0,01$. К, Л – результаты Вестерн-блоттинга с антителами к гистону Н3 и α-тубулину, подтверждающие чистоту ядерной фракции. # на графике Л – образец цитоплазматической фракции в качестве положительного контроля.

Анализ механизмов позитивной регуляции NF-κB-зависимого сигнального пути. В ходе активации клетки может увеличиваться экспрессия генов, кодирующих сами белки семейства NF-κB. Мы проанализировали экспрессию мРНК пяти генов этого семейства. Экспрессия генов *NFKB1 [p105/p50], NFKB2 [p100/p52], NFKB3 [p65/RelA], REL [c-Rel]* и *RELB* была повышена через 4 ч стимуляции. Сочетанная стимуляция NOD1 и TLR4 приводила к аддитивному, но не синергическому увеличению экспрессии этих генов. Повышенная экспрессия генов, кодирующих белки NF-κB, индуцированная комбинацией агонистов, может способствовать более устойчивой передаче сигналов через NF-κB.

Взаимное влияние NOD1- и TLR4-зависимых сигнальных путей.

Далее изучили механизмы взаимного влияния NOD1- и TLR4-зависимых сигнальных путей, предположив, что стимуляция NOD1 может повышать экспрессию генов и белков, специфически участвующих в передаче сигналов от TLR4, и наоборот. Для этого мы измерили экспрессию генов самих рецепторов NOD1 и TLR4, а также их проксимальных адапторов. Экспрессия генов, кодирующих адаптерные белки *TICAM2 (TRAM)* и *RIPK2 (RIP2)* индуцировалась как при раздельной, так и в особенности при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС, хотя и не синергически. Повышение экспрессии этих генов может вносить вклад в усиление активационного сигнала при сочетанной стимуляции. Экспрессия мРНК *TLR4, NOD1, NOD2, TIRAP, TICAM1 (TRIF) и MYD88* не менялась ни при одном виде стимуляции.

Изменения метаболизма глюкозы при стимуляции М-триДАП и ЛПС. Активация макрофагов агонистами TLR4 и NOD1 сопровождается масштабной перестройкой метаболизма, в частности усилением гликолиза (Tan and Kagan 2019; Murugina et al. 2020). Мы оценили активацию гликолиза в макрофагах при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4. 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. Каждый агонист по отдельности вызывал дозозависимое повышение ECAR (рис. 4 А, Б).



В

М-риДАП / ЛПС	0,1 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл
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**

Рисунок 4. Интенсификация гликолиза в макрофагах при сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС. А – измерение скорости закисления среды (ECAR) в реальном времени после впрыска (стрелка) среды, М-триДАП, ЛПС и их сочетания (типичные результаты опыта; показаны М ± σ по 4 повторностям). Б – площади под кривой ECAR (AUC_{ECAR}) при стимуляции сочетаниями М-триДАП и ЛПС в указанных концентрациях (средние значения, 5 доноров). В - 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 $p < 0,001$.

При стимуляции двумя агонистами синергический эффект наблюдался только при сочетании низких концентраций (рис. 4В). Во всех остальных случаях имела место суммация эффектов либо инфра-аддитивные эффекты (ИС ≤ 1).

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. 5 А и Б).

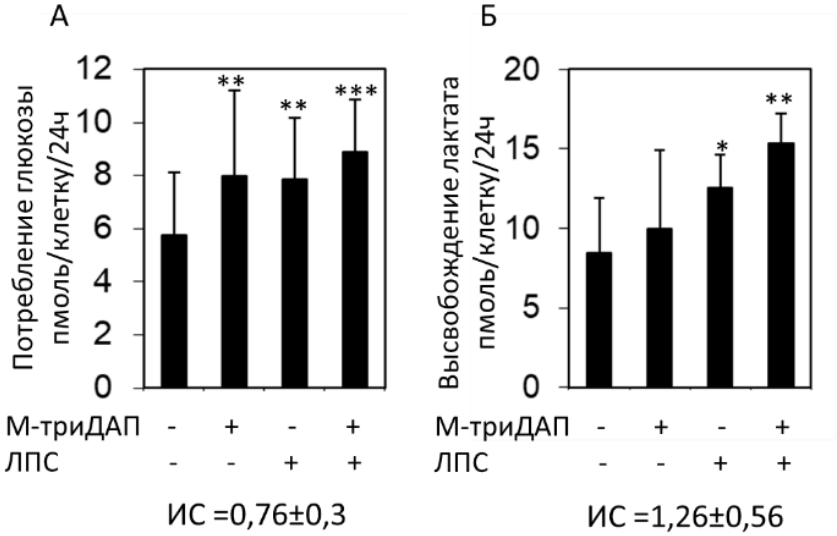


Рисунок 5. Параметры гликолиза в макрофагах в базальных условиях и при стимуляции М-триДАП, ЛПС и их сочетанием. А – потребление глюкозы, Б –высвобождение лактата (пмоль/клетку/24 ч). М ± σ, n = 6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ при сравнении с нестимулированными клетками (ANOVA повторных измерений).

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 (Pan et al. 2006). Сигнальные пути p38 – MNK – eIF4E и ERK – MNK – eIF4E участвуют в активации синтеза белка (Mulero et al. 2019). 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. 6). Во всех случаях имели место аддитивная или инфра-аддитивная кооперация (ИС ≤ 1); синергических эффектов не наблюдалось.

Связь между наличием/отсутствием синергической индукции экспрессии генов, их базальной экспрессией и индуцибельностью. Как следует из представленных данных, большая часть исследованных нами событий при сочетанной активации рецепторов NOD1 и TLR4 в макрофагах регулируется несинергически. В частности, из 24 исследованных нами индуцибельных генов лишь у 7 наблюдалось синергическое увеличение экспрессии. Эти гены, кодирующие провоспалительные цитокины и хемокины, характеризовались более низкой базальной экспрессией и более высоким индексом стимуляции по сравнению с генами, отвечающими несинергически (рис. 7).

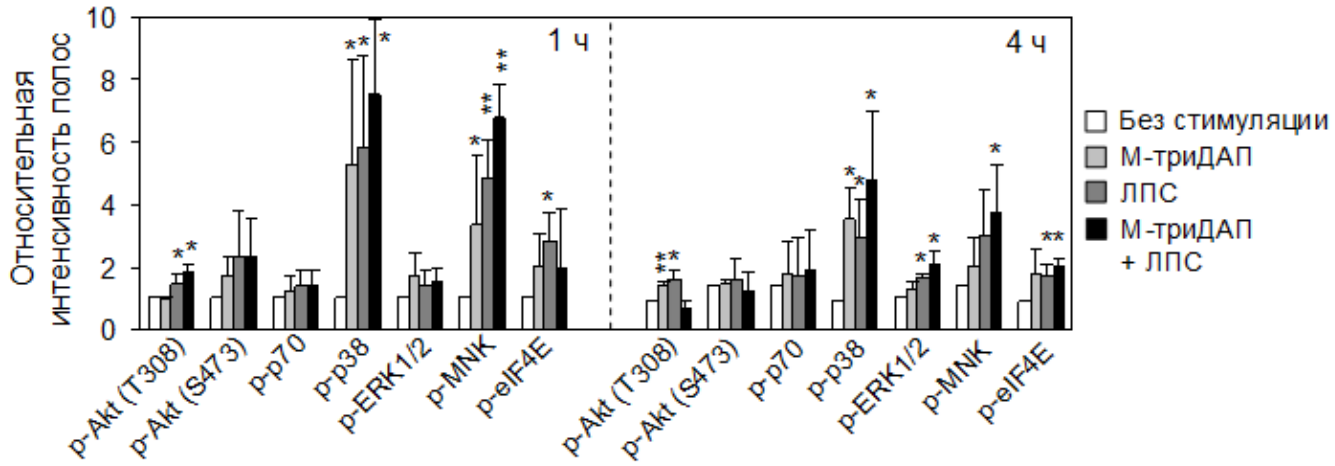


Рисунок 6. Относительные уровни фосфо-форм указанных белков при раздельной и сочетанной стимуляции М-триДАП и ЛПС в течение 1 и 4 ч (M ± σ, n = 4). * Отличие от единицы с $p < 0,05$; ** отличие от единицы с $p < 0,01$. Относительные уровни фосфо-форм рассчитывали, как описано в Материалах и Методах.

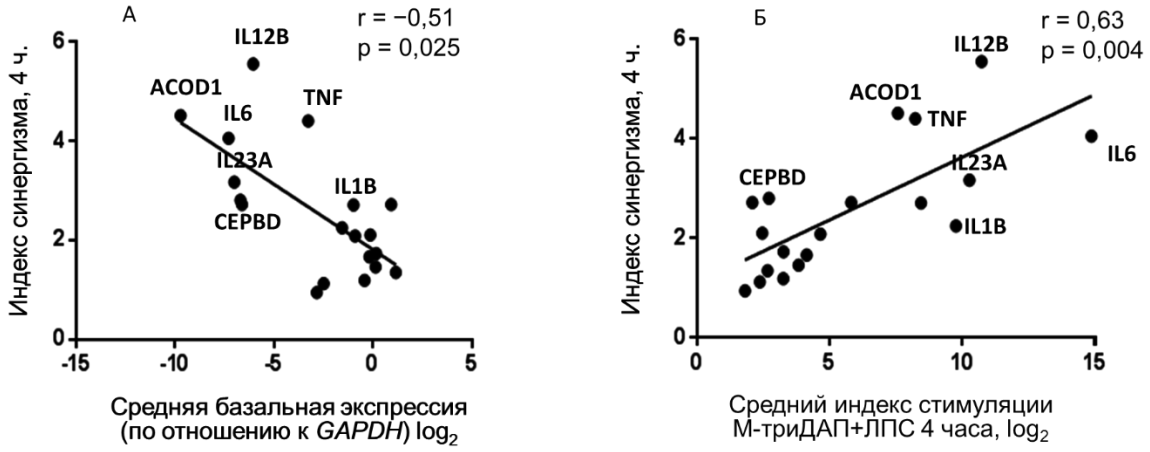
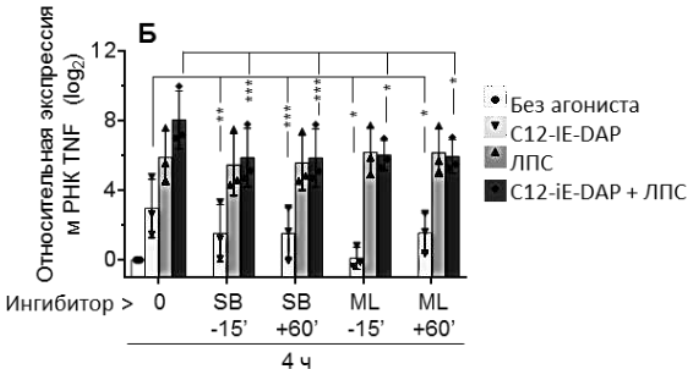


Рисунок 7. Взаимосвязь между экспрессией базальных генов, их индуцируемостью и синергической индуцируемостью. Корреляция среднего значения индексов синергизма в точке 4 часа со средней базовой экспрессией гена (А) и средней индукцией экспрессии генов через 4 часа (Б). На рисунке обозначены гены, индуцируемые синергически. Показаны коэффициенты корреляции по Пирсону.

Возможности фармакологической коррекции синергических эффектов. Далее были изучены возможности фармакологического ингибирования синергической экспрессии провоспалительных цитокинов.

Ингибирование NOD1-RIP2 – сигнального пути. В первой серии экспериментов ингибировали рецептор NOD1 с помощью вещества ML130 и RIP2 (адаптер NOD1) с помощью вещества SB203580. Оба ингибитора подавляли ответ макрофагов на агонист NOD1 – C12-iE-DAP – и почти полностью отменяли синергический эффект при добавлении за 15 минут до стимуляции (рис. 9).

Относительная экспрессия TNF



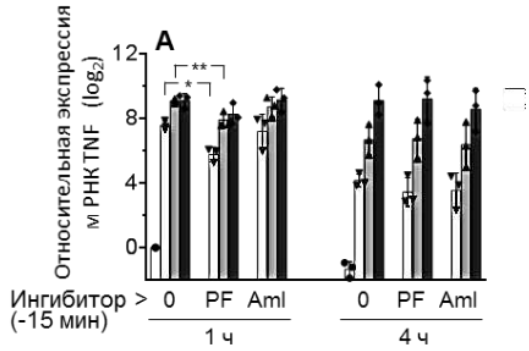
Индексы синергизма

Ингибитор	Время добавления (мин)	ИС
Без ингибитора	–	4.16±1.33
SB203580	-15	1.31±0.33*
SB203580	+60	1.18±0.23*
ML130	-15	0.94±0.35*
ML130	+60	0.88±0.36*

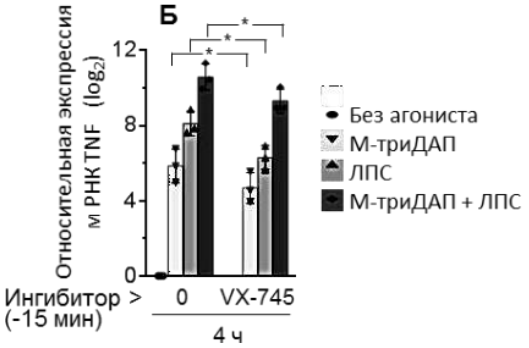
Рисунок 9. Влияние ингибиторов сигнального пути на синергическую индукцию мРНК TNF в макрофагах. SB203580 (5 мкМ) или ML130 (10 мкМ) добавляли к макрофагам за 15 мин до или через 60 мин после добавления C12-iE-DAP, ЛПС или их комбинации; экспрессию мРНК *TNF* измеряли через 4 часа после добавления агонистов. М ± σ. Количество экспериментов: n = 6 с SB203580, n = 4 с ML130; Таблица показывает индексы синергизма (ИС). *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с клетками, культивируемыми без ингибиторов.

Интересно, что отмена синергического эффекта наблюдалась и при добавлении ингибиторов через час после стимуляции. Эти данные показывают, что для развития синергического эффекта NOD1-TLR4 необходима непрерывная сигнализации через NOD1 и RIP2 между 1 и 4 ч после начала стимуляции (рис 9).

Ингибирование киназ IKKβ, TBK-1/IKKε и p38. Чтобы узнать, может ли синергический ответ быть отменен путем ингибирования сигнальных путей на более нижележащих уровнях, были использованы ингибиторы киназ IKKβ (PF-184), амлексанокс для TBK-1/IKKε и VX-745 для p38. PF-184 ингибировал экспрессию мРНК *TNF* через 1 ч после добавления агонистов, но не влиял на экспрессию мРНК *TNF* через 4 ч. Амлексанокс, ингибирующий TRIF-зависимый сигнальный путь ниже TLR4, не влиял на экспрессию *TNF*. VX-745 ингибировал экспрессию мРНК *TNF* через 4 ч после добавления как отдельных агонистов, так и их сочетания. Ни один из ингибиторов не оказал влияния на ИС (рис.10). Таким образом, хотя NF-κB и p38 необходимы для оптимальной экспрессии мРНК *TNF*, их активация недостаточна для получения эффекта синергизма.



Ингибитор	Время стимуляции (ч)	ИС
Без ингибитора	1	0.76±0.14
PF-184	1	1.06±0.15
Amlexanox	1	0.99±0.08
None	4	4.59±0.29
PF-184	4	5.14±1.20
Amlexanox	4	4.12±0.63



Ингибитор	Время стимуляции (ч)	ИС
Без ингибитора	4	4.44±0.35
VX-745	4	5.95±1.27

Рисунок 10. 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. M ± σ. n=3. Таблицы рядом с каждым графиком показывают индексы синергизма (ИС). *p < 0,05, ** p < 0,01, по сравнению с клетками, культивируемыми без ингибиторов.

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, 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 с М-триДАП и ЛПС по отдельности и в комбинации. Неактивированные макрофаги усиливали рост опухолевых клеток по сравнению с контролем. При активации макрофагов

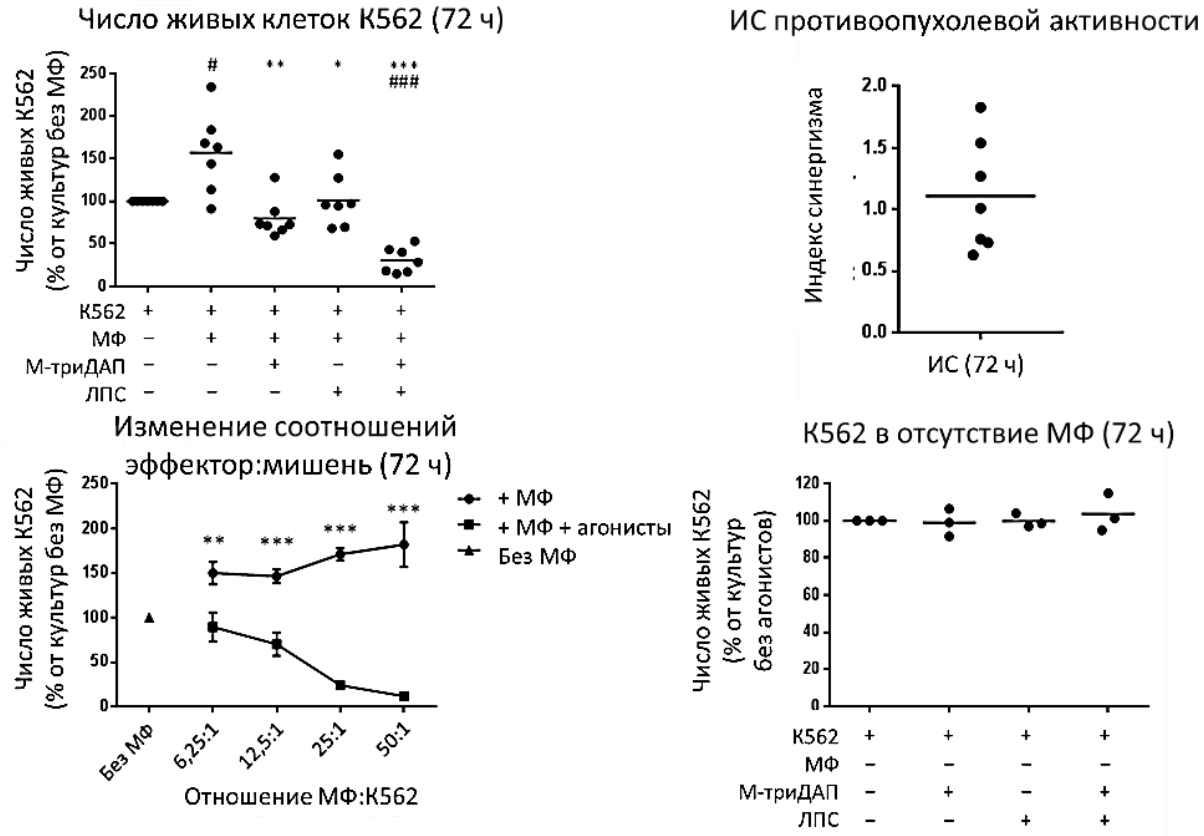


Рисунок 11. Противоопухолевая активность макрофагов. А - число живых клеток К562 в культурах при оценке через 72 часа после начала эксперимента. Соотношение МФ:К562 = 50:1. Символы *, ** и *** соответствуют значениям $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ при сравнении с культурами К562 без МФ, # и ### - $p < 0,05$ и $p < 0,001$ – при сравнении с культурами К562+МФ без агонистов. Б – индекс синергизма противоопухолевых эффектов М-триДАП и ЛПС для точки 72 ч. В – 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. Г – количество живых клеток К562 после 72 ч культивирования с М-триДАП и/или ЛПС в отсутствие МФ. На графиках А, Б, и Г горизонтальными линиями обозначены средние значения, каждая точка – отдельный эксперимент.

отдельно взятыми агонистами численность опухолевых клеток уменьшалась примерно до уровня контроля. Однако при одновременном добавлении агонистов NOD1 и TLR4 численность опухолевых клеток снижалась в среднем в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 11А). Судя по ИС, эффект сочетания агонистов был близок к аддитивному (рис. 11Б). Противоопухолевый эффект макрофагов, активированных сочетанием М-триДАП+ЛПС, наблюдался как при соотношении МФ:К562 = 50:1, так и при более низких соотношениях (рис. 11В). В отсутствие макрофагов М-триДАП и ЛПС раздельно и в сочетании не влияли на численность клеток К562 (рис. 11Г). Таким образом, комбинация агонистов NOD1 и TLR4 переключает активность человеческих МФ с про- на противоопухолевую.

Роль TNF и других растворимых и мембранно-ассоциированных факторов в противоопухолевой активности макрофагов. Чтобы уточнить механизмы противоопухолевого действия макрофагов, активированных сочетанием агонистов NOD1 и TLR4, в культуры добавляли нейтрализующие антитела к TNF, к IFN-β или нормальный козий IgG в качестве отрицательного контроля.

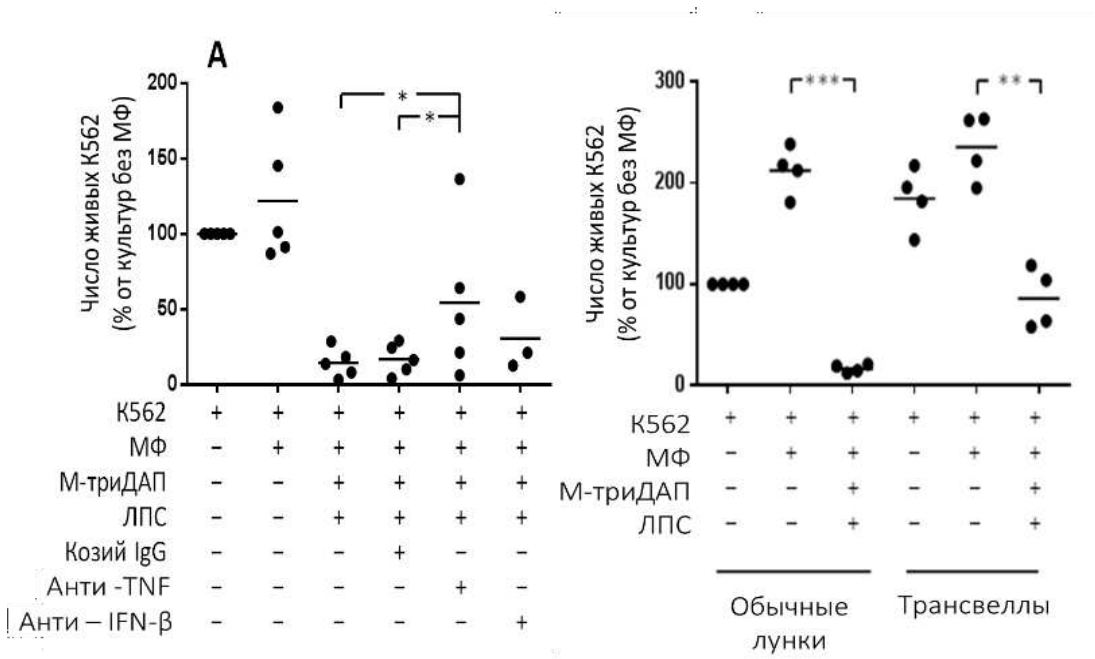


Рисунок 12. Роль TNF и других растворимых и мембранно-ассоциированных факторов в противоопухолевой активности макрофагов. А - влияние нейтрализующих антител к TNF и IFN-β на противоопухолевую активность макрофагов, стимулированных сочетанием М-триДАП+ЛПС. *, $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ при сравнении с культурами без добавления нейтрализующих антител. Б - – 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.

Антитела к TNF частично ингибировали противоопухолевое действие макрофагов, тогда как антитела к IFN-β достоверного эффекта не оказалиь (рис. 12А). Чтобы установить роль мембранно-ассоциированных молекул в механизмах противоопухолевого действия макрофагов, клетки К562 и макрофаги разделяли полупроницаемой мембраной, 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. Таким образом, для полного проявления противоопухолевого действия макрофагов необходимы прямые межклеточные контакты между макрофагами и опухолевыми клетками (рис. 12Б).

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 гликолиза, активация противоопухолевых эффекторных 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-κB 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. 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.

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 мРНК 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-κB, активация PI3K-зависимого и МАП-киназного сигнальных путей, быстрое усиление гликолиза, при сочетанной стимуляции NOD1 и TLR4 суммируются, но не усиливаются синергически.
5. Факторы транскрипции семейства NF-κB 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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-κB 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 / **Н.Е. Муругина**, В.В. Муругин, М.В. Пащенков // Иммунология. – 2022. – т.43. - №5. – С.548-557. 3(5): 548-557.