

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 615.276.4.015.44

М.В. Пащенко, Б.И. Алхазова, В.Л. Львов, Б.В. Пинегин

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ
В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ И МАКРОФАГАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛТРИПЕПТИДА ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии, Москва

Мурамилпептиды являются мощными активаторами клеток врожденной иммунной системы, однако по неизвестной причине слабо индуцируют выработку провоспалительных цитокинов дендритными клетками (ДК). В настоящей работе показано, что в ДК, стимулированных глюкозаминилмурамилтрипептидом (ГМтри), выделенным из *Salmonella typhi*, повышение уровней мРНК фактора некроза опухолей (TNF) и ряда других провоспалительных цито- и хемокинов имеет более кратковременный характер, чем в ДК, стимулированных липополисахаридом (ЛПС) и в макрофагах (МФ), стимулированных ГМтри или ЛПС. Кроме того, мРНК TNF и хемокина CCL4 в ГМтри-стимулированных ДК транслируются в белок менее эффективно, чем в ЛПС-стимулированных ДК и в ГМтри- или ЛПС-стимулированных МФ. Обнаружено, что МФ секретируют интерлейкин 1 β (IL-1 β) в первые 1–2 ч после начала стимуляции ГМтри, тогда как в супернатантах ГМтри-стимулированных ДК IL-1 β не определяется. Добавление рекомбинантного IL-1 β приводит к повышению продукции TNF ГМтри-стимулированными ДК до уровней, наблюдаемых в ЛПС-стимулированных ДК и в ГМтри-стимулированных МФ. Таким образом, слабая продукция TNF ГМтри-стимулированными ДК связана с их неспособностью секретировать IL-1 β , который является важным аутокринным регулятором ответа клеток на мурамилпептиды.

Ключевые слова: дендритные клетки, макрофаги, фактор некроза опухолей, интерлейкин 1, мурамилпептиды

Pashenkov M.V., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Pinegin B.V.

GLUCOSAMINYL MURAMYL TRIPEPTIDE FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA DIFFERENTIALLY INDUCES
EXPRESSION OF PRO-INFLAMMATORY GENES IN DENDRITIC CELLS AND MACROPHAGES

Muramyl peptides are potent activators of innate immune cells but, for an unknown reason, are weak inducers of pro-inflammatory cytokines in dendritic cells (DCs). Here, we show that in DCs stimulated by glucosaminyl muramyl tripeptide (GMtri) isolated from *S. typhi*, elevation of mRNA coding for tumor necrosis factor (TNF) and several other pro-inflammatory cytokines and chemokines is more short-lived than in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated DCs and in GMtri- or LPS-stimulated macrophages (Mphi). In addition, TNF and CCL4 mRNAs in GMtri-stimulated DCs are translated less efficiently than in LPS-stimulated DCs or in GMtri- or LPS-stimulated Mphi. We found that Mphi, but not DCs, secrete interleukin-1 β (IL-1 β) within first 1-2 h of GMtri stimulation. Addition of recombinant IL-1 β results in an increase of TNF production by GMtri-stimulated DCs up to the levels observed in LPS-stimulated DCs and in GMtri- or LPS-stimulated Mphi. Thus, the weak production of TNF by GMtri-stimulated DCs is likely caused by their inability to secrete IL-1 β , which is an important autocrine regulator of cellular responses to muramyl peptides.

Key words: Dendritic cells; macrophages; tumor necrosis factor; interleukin-1; muramyl peptides

1. Введение

Мурамилпептиды – продукты лизоцимного гидролиза бактериального пептидогликана – представляют собой перспективный класс иммуностимуляторов и адъювантов. Одним из ключевых эффектов мурамилпептидов является их активирующее влияние на антигенпредставляющие клетки, в частности макрофаги (МФ) и дендритные клетки (ДК) [5, 15].

Мурамилпептиды, полученные из пептидогликана грамотрицательных бактерий и содержащие концевой остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, взаимодействуют с рецептором NOD1 [4]. Одним из наиболее мощных агонистов NOD1 является β -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1 \rightarrow 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновая кислота – соединение, известное

также как глюкозаминилмурамилтрипептид (ГМтри) [3]. Недавно мы показали, что ГМтри вызывает мощную выработку провоспалительных цитокинов фактора некроза опухолей (TNF) и интерлейкина (IL) 6 культурами МФ, причем этот эффект ГМтри на МФ сопоставим с эффектом липополисахарида (ЛПС) [12]. Незрелые ДК, напротив, вырабатывают очень малые количества TNF и IL-6 при стимуляции ГМтри. Интересно, что при стимуляции ЛПС оба типа клеток вырабатывают сопоставимые количества TNF и IL-6 [12]. Кроме того, ГМтри вызывает созревание ДК, а также индуцирует в ДК синтез ряда воспалительных хемокинов, в частности IL-8 и CCL4 (MIP-1 β) [12, 15]. Эти данные позволили предположить, что в ДК отсутствуют те компоненты сигнальных путей от рецептора NOD1, которые необходимы для полномасштабной продукции провоспалительных цитокинов.

В настоящей работе проведено сравнение кинетики ГМтри-индуцированной экспрессии TNF и ряда других цито- и хемокинов в ДК и МФ. Получены данные, свидетельствующие о роли IL-1 β в регуляции ГМтри-индуцированной выработки провоспалительных цитокинов.

Пащенко Михаил Владимирович – канд. мед. наук, тел. 8(499)617-76-49, e-mail: mv.pashenkov@yandex.ru

Материалы и методы

2.1. *Реактивы.* ГМтри получали, как описано ранее [12]. Актиномицин D (ActD) и ЛПС Escherichia coli (серovar O111:B4) – Sigma (США).

2.2. *Культивирование и стимуляция макрофагов и дендритных клеток.* МФ и незрелые ДК получали культивированием донорских моноцитов с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором и IL-4 соответственно [12, 14]; оба цитокина – Invitrogen (Великобритания). На 7-е сутки МФ и незрелые ДК стимулировали ГМтри (10 мкг/мл) или ЛПС (100 нг/мл); в некоторых опытах стимуляцию проводили в присутствии IL-1β (Invitrogen) в указанных концентрациях. Спустя указанное время собирали супернатант, а клетки лизировали в TRI Reagent ("Sigma") для выделения РНК. В экспериментах с ActD клетки стимулировали ГМтри или ЛПС в течение 1 ч, после чего добавляли ActD до конечной концентрации 10 мкг/мл для остановки синтеза мРНК. Клетки собирали для анализа уровней мРНК перед добавлением ActD, а также через 1 и 3 ч после добавления.

2.3. *Полимеразная цепная реакция обратного транскрипта в реальном времени.* Общую РНК выделяли из клеточных лизатов согласно инструкции, прилагаемой к реактиву TRI Reagent. 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с помощью набора реактивов RevertAid (Fermentas, Литва); использовали олигодезоксириботимидиловый праймер. Праймеры для полимеразной цепной реакции обратного транскрипта в реальном времени конструировали с помощью программы Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>); последовательности указаны в таблице. Амплификацию проводили с использованием смеси реактивов фирмы "Синтол" (Россия) на приборе 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, США). Для амплификации TNF, IL-6, CCL4, CXCL1 и GAPDH использовали следующие условия: начальная денатурация – 95°C 5 мин, затем 40 циклов (95°C/15 с, 60°C/45 с) с детекцией сигнала в конце каждого цикла. При амплификации CXCL8 циклы состояли из трех стадий (95°C/15 с, 60°C/40 с, 83°C/35 с) с детекцией при 83°C, чтобы устранить неспецифический сигнал от димера праймеров. Для детекции ампликонов использовали краситель SYBR Green. Специфичность амплификации подтверждали путем анализа кривых плавления (наличие единственного пика на графике в координатах "температура – первая производная от интенсивности сигнала" в области температур, выше или равной температуре детекции). Относительную экспрессию генов (ОЭ) вычисляли отдельно у каждого донора по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с нормализацией по гену GAPDH:

$$OЭ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{ген\ обр} - Ct_{ген\ контр.\ обр}) - (Ct_{GAPDH\ обр} - Ct_{GAPDH\ контр.\ обр})]}$$

где Ct – пороговый цикл; ген – любой исследуемый ген; обр. – любой образец; контр. обр. – контрольный образец, в котором экспрессия мРНК принимается равной 1; в качестве последнего использовали МФ данного донора в точке 0 ч.

2.4. *Определение уровней цитокинов и хемокинов.* Уровни TNF в культуральных супернатантах определяли с помощью сэндвич-варианта иммуноферментного анализа, используя реактивы фирмы "Цитокин" (Россия), уровни CCL4 и IL-1β – с помощью мультиплексного анализа, используя реактивы и прибор Bio-Plex 200 фирмы Bio-Rad (США).

Результаты

3.1. *Абортивный характер экспрессии гена TNF в ДК, стимулированных ГМтри.*

В предварительных опытах было установлено, что пик экспрессии мРНК TNF как в МФ, так и в ДК наступает через 1 ч после начала стимуляции как ГМтри, так и ЛПС (данные не показаны). Пиковые уровни мРНК TNF во всех четырех случаях были практически одинаковыми (рис. 1, а). В ДК, стимулированных ГМтри, экспрессия TNF возвращалась к базальному уровню уже через 9 ч после начала стимуляции. В МФ, стимулированных ГМтри, уровень мРНК TNF хотя и снижался, но оставался выше базального в течение минимум 24 ч после начала стимуляции (см. рис. 1, а). При стимуляции ЛПС уровень мРНК TNF как в ДК, так и в МФ оставался выше базального как через 9 ч, так и через 24 ч после начала стимуляции (см. рис. 1, а). Таким образом, ГМтри индуцирует экспрессию гена TNF в ДК, однако она является относительно кратковременной, "абортивной". Напротив, ЛПС вызывает пролонгированное повышение уровня мРНК TNF в ДК. В МФ оба стимула вызывают пролонгированную индукцию гена TNF.

3.2. *Раннее прекращение транскрипции гена TNF в ДК, стимулированных ГМтри.*

"Абортивная" экспрессия TNF в ГМтри-стимулированных ДК может быть обусловлена двумя причинами: недостаточной стабильностью мРНК TNF при стимуляции; ранним прекращением транскрипции гена TNF. Чтобы проверить первое предположение, ДК и МФ стимулировали ГМтри или ЛПС, через 1 ч после начала стимуляции добавляли ActD для остановки транскрипции, еще через 1 и 3 ч анализировали остаточные уровни мРНК TNF. На рис. 1, б видно, что в ДК, стимулированных ГМтри и ЛПС, убыв мРНК TNF после добавления ActD происходит с одинаковой скоростью. В МФ уровень мРНК TNF снижался даже несколько быстрее, чем в ДК; различий между ГМтри- и ЛПС-стимулированными МФ также не было. Таким образом, "абортивная" экспрессия TNF в ГМтри-стимулированных ДК обусловлена не сниженной стабильностью мРНК TNF, а ранним прекращением транскрипции гена TNF.

3.3. *Низкая эффективность трансляции мРНК TNF в ГМтри-стимулированных ДК.*

Уровень TNF в супернатантах ГМтри-стимулированных ДК достигал максимума через 3 ч после начала стимуляции (спустя 2 ч после пика мРНК, (рис. 2). Поскольку содержание мРНК TNF в ГМтри-стимулированных ДК после 1-го часа стимуляции быстро идет на убыль (см. рис. 1, а), то можно полагать, что концентрация TNF в супернатанте, достигнутая к 3 ч, непосредственно отражает уровень мРНК TNF, достигнутый к 1 ч. Хотя уровни мРНК TNF в ГМтри- и ЛПС-стимулированных ДК через 1 ч после начала опыта были практически одинаковыми, концентрация TNF в супернатантах ЛПС-стимулированных ДК через 3 ч после начала опыта была в 4,4 раза выше, чем при стимуляции ГМтри (см. рис. 2, левый фрагмент). Диссоциация между уровнем мРНК и секретированного TNF в ГМтри-стимулированных ДК могла быть обусловлена неэффективностью трансляции мРНК

Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер	Последовательность (5' → 3')	Ампли-кон, п.о.
TNF	Прямой	TCGGCCCCAGAGGGAAGAG	157
	Обратный	CGGCGGTTACCCACTGGAG	
IL6	Прямой	CCGCCACACAGACAGCC	140
	Обратный	TGCCAGTCCCTTTGCTGC	
CCL4	Прямой	GCTGCCTTCTGCTCTCCAGCG	243
	Обратный	AGCAGCTCAGTTCAGTTCAGGTC	
CXCL1	Прямой	GCGCCAAACCGAAGTCATAGC	252
	Обратный	СТАAGCGATGCTCAAACACATTAGGCA	
CXCL8	Прямой	TTGGCAGCCTTCTGTATTCTGC	212
	Обратный	GGGTCCAGACAGAGCTCTCTTCC	
GAPDH	Прямой	CAGCCTCCCGTTCGCTCTC	143
	Обратный	ACCAGGCGCCCAATACGACC	

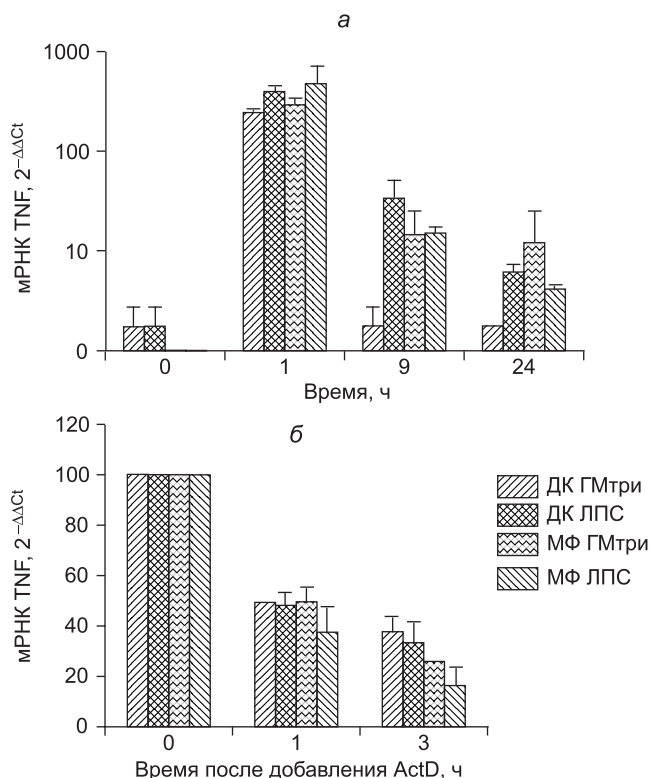


Рис. 1. Экспрессия мРНК TNF МФ и ДК. *а* – кинетика экспрессии мРНК TNF МФ и ДК при стимуляции ГМтри (10 мкг/мл) и ЛПС (0,1 мкг/мл). Показана относительная экспрессия; уровень мРНК TNF в МФ в точке "0 ч" принят за 1 ($M \pm \sigma, n = 4$); *б* – кинетика убыви мРНК TNF в МФ и ДК, стимулированных ГМтри или ЛПС, после остановки транскрипции с помощью ActD. ActD добавляли через 1 ч после начала стимуляции ГМтри или ЛПС. Уровень мРНК TNF, достигнутый в этой точке в данном типе клеток при данной стимуляции, принят за 100%, исходный уровень мРНК в нестимулированных клетках того же типа – за 0% ($M \pm \sigma, n = 3$).

TNF; недостаточным процессингом мембраносвязанного предшественника TNF. Вторым вариантом представляется маловероятным, так как ГМ-КСФ и IL-4, используемые для культивирования ДК, являются мощными индукторами фермента TACE, отвечающего за процессинг TNF [7]. Таким образом, низкая секреция TNF ДК при стимуляции ГМтри, вероятно, обусловлена неэффективностью трансляции мРНК TNF.

Концентрация TNF в культурах ГМтри-стимулированных ДК оставалась на плато между 3 и 9 ч, а к 24 ч снижалась

примерно в 2 раза по сравнению с уровнем плато (см. рис. 2, левый фрагмент). В супернатантах ЛПС-стимулированных ДК концентрация TNF между 3 и 6 ч дополнительно нарастала и далее до конца опыта практически не менялась (см. рис. 2, *а*). Эти различия в кинетике секреции TNF, возможно, обусловлены пролонгированной транскрипцией гена TNF в ЛПС-стимулированных ДК и отсутствием таковой в ГМтри-стимулированных ДК (см. рис. 1, *а*).

В супернатантах МФ концентрация TNF достигала максимума через 3 ч после начала стимуляции и в дальнейшем постепенно снижалась (см. рис. 2). Кинетика уровней TNF при стимуляции ГМтри и ЛПС была практически идентичной (рис. 2), диссоциации между транскрипцией и трансляцией в ГМтри-стимулированных МФ не наблюдалось. Максимальный уровень TNF в супернатантах ГМтри-стимулированных МФ (через 3 ч после начала стимуляции) был в 15 раз выше, чем в супернатантах ГМтри-стимулированных ДК в этой же точке, несмотря на практически одинаковое содержание мРНК TNF через 1 ч после начала стимуляции (см. рис. 1, *а*). Таким образом, эффективность трансляции и секреции TNF в ГМтри-стимулированных МФ гораздо выше, чем в ГМтри-стимулированных ДК.

3.4. Кинетика экспрессии других провоспалительных генов в ДК и МФ.

Чтобы оценить, являются ли описанные выше закономерности уникальными для TNF или имеют более общий характер, была исследована кинетика экспрессии еще четырех провоспалительных цито- и хемокинов: IL-6, CCL4, CXCL1, CXCL8 (рис. 3). Кинетика экспрессии мРНК этих генов была в целом сходна с таковой для TNF. В ГМтри-стимулированных ДК наблюдался подъем экспрессии всех четырех генов с возвратом к базальному уровню к 9 ч после начала стимуляции (CCL4 – к 24 ч). В ЛПС-стимулированных ДК, а также в МФ независимо от типа стимула наблюдалось более длительное повышение уровней мРНК исследованных генов (см. рис. 3).

Кинетика уровней хемокина CCL4 (MIP-1 β) в супернатантах в целом повторяла кинетику TNF с той разницей, что выход на максимальные уровни происходил несколько позже (рис. 4, сравнить с рис. 2). Хотя максимальные уровни мРНК CCL4 в ГМтри- и ЛПС-стимулированных ДК существенно не различались (см. рис. 3), максимальные уровни CCL4, достигнутые в супернатантах ГМтри-стимулированных ДК, были в 10–20 раз ниже, чем в супернатантах ЛПС-стимулированных ДК (см. рис. 4). В супернатантах ГМтри- и ЛПС-стимулированных МФ достигались приблизительно одинаковые уровни CCL4 (см. рис. 4). Максимальные концентрации CCL4 в супернатантах МФ были сопоставимы с таковыми в супернатантах ЛПС-стимулированных ДК.

Следует отметить, что концентрации CCL4 в супернатантах как МФ, так и ДК были приблизительно на 2 порядка выше, чем концентрации TNF в тех же условиях. Применен-

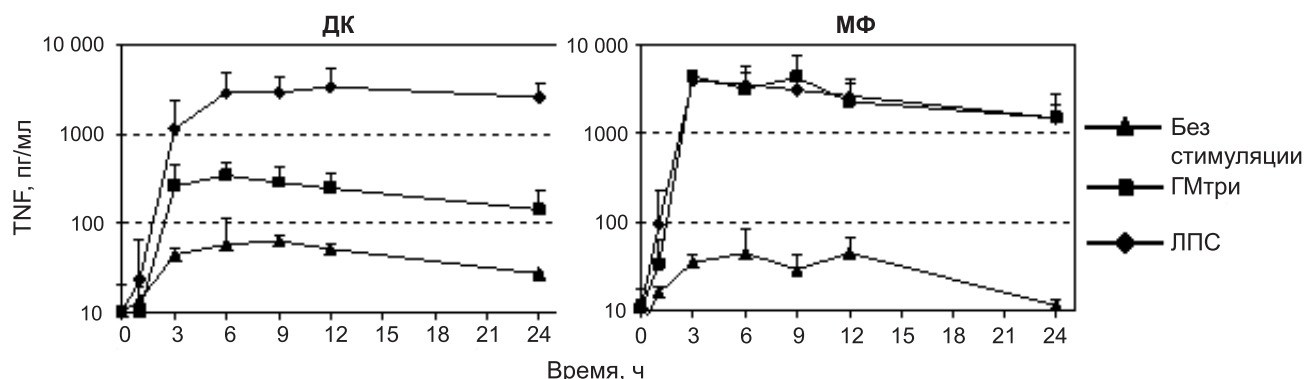


Рис. 2. Кинетика уровней TNF в супернатантах МФ и ДК, инкубированных без стимуляции либо в присутствии ГМтри (10 мкг/мл) или ЛПС (0,1 мкг/мл; $M \pm \sigma, n = 4$).

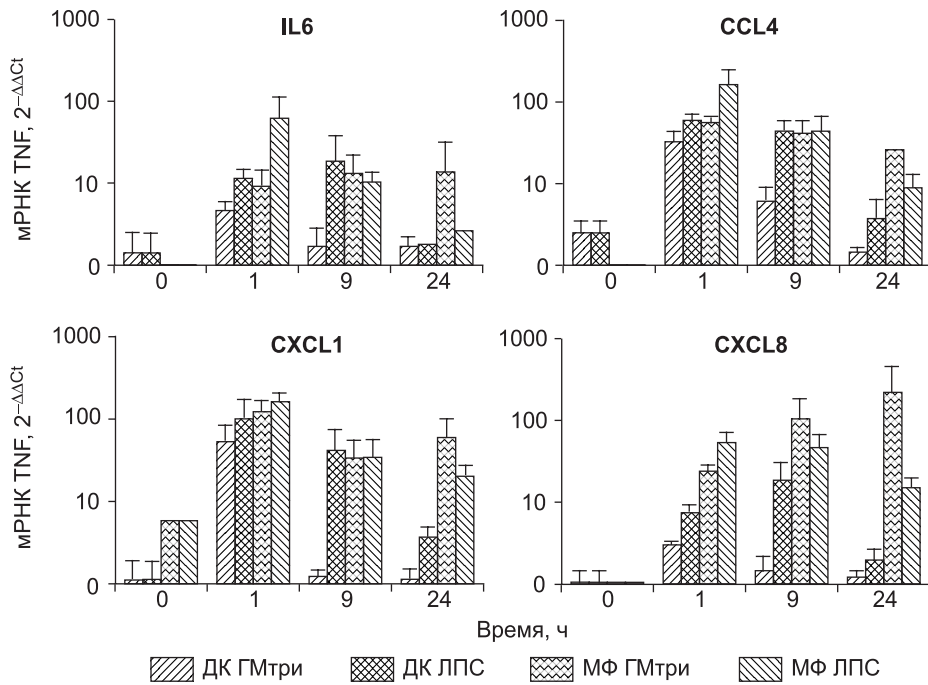


Рис. 3. Кинетика экспрессии мРНК IL-6, CCL4, CXCL1 и CXCL8 МФ и ДК при стимуляции ГМтри (10 мкг/мл) и ЛПС (0,1 мкг/мл).

Показана относительная экспрессия; уровень мРНК в МФ в точке "0 ч" принят за 1 ($M \pm \sigma, n = 4$).

ные в работе подходы не позволяют заключить, чем обусловлено это различие между TNF и CCL4 (количеством копий мРНК на клетку, эффективностью трансляции мРНК и т.д.).

3.5. Роль IL-1β в ГМтри-индуцированной продукции TNF.

Классическим мурамилпептидным соединением является мурамилдипептид (МДП), который взаимодействует с рецептором NOD2. Недавно было показано, что МДП в отличие от ЛПС не способен прямо активировать митогенактивируемую протеинкиназу p38 в МФ [5]. Активация p38 в МДП-стимулированных МФ происходит опосредованно, под действием IL-1β, который секретируется МФ в ранние сроки после начала стимуляции МДП и активирует p38 путем аутокринного воздействия через IL-1R. Киназа p38 и ее мишени необходимы для оптимальной трансляции ряда цитокинов, в том числе TNF [2, 16]. Мы предположили, что низкая эффективность трансляции TNF в ДК, стимулированные ГМтри, обусловлена их неспособностью вырабатывать IL-1β. Действительно, при стимуляции ГМтри и

стадия ГМтри-индуцированной экспрессии гена TNF (до 1 ч включительно) в ДК и в МФ протекает одинаково и проявляется резким повышением уровня мРНК TNF (см. рис. 1, а). В ДК уровень мРНК TNF возвращается к исходному через 9 ч после начала стимуляции ГМтри. В МФ, напротив, наблюдается довольно протяженная поздняя фаза экспрессии гена TNF, которая проявляется сохранением повышенных уровней мРНК TNF в течение минимум 24 ч после начала стимуляции ГМтри (см. рис. 1, а). Эти различия в кинетике мРНК TNF обусловлены ранним прекращением транскрипции гена TNF в ДК, стимулированных ГМтри (см. рис. 1, б). Кроме того, мРНК TNF, синтезируемая в ГМтри-стимулированных ДК, по-видимому, недостаточно эффективно транслируется в белок. Эти два фактора – раннее прекращение транскрипции и неэффективность трансляции, вероятно, являются основными причинами гораздо более низкой продукции TNF ГМтри-стимулированными ДК по сравнению с ГМтри-

ЛПС IL-1β определялся только в супернатантах МФ, но не в супернатантах ДК (рис. 5, а). В супернатантах ГМтри-стимулированных МФ IL-1β появлялся через 1 ч после начала опыта и выходил на плато через 2 ч, т.е. раньше, чем уровень TNF в супернатантах тех же клеток (см. рис. 2). В супернатантах ЛПС-стимулированных МФ IL-1β появлялся несколько позже – через 2 ч – со снижением к 3 ч.

При этом добавление рекомбинантного IL-1β дозозависимо усиливало ГМтри-индуцированную продукцию TNF ДК (рис. 5, б). При концентрации IL-1β от 1 до 10 нг/мл ГМтри-индуцированная продукция TNF была сравнима с ЛПС-индуцированной. Сам по себе IL-1β практически не индуцировал выработку TNF. Таким образом, восполнение дефицита IL-1β устраняет дефект ГМтри-индуцированной выработки TNF ДК.

Обсуждение

В работе исследованы особенности индукции провоспалительных генов в ДК и МФ при воздействии мурамилпептида ГМтри – агониста рецептора NOD1. Показано, что ГМтри индуцирует экспрессию гена TNF как в ДК, так и в МФ. Ранняя

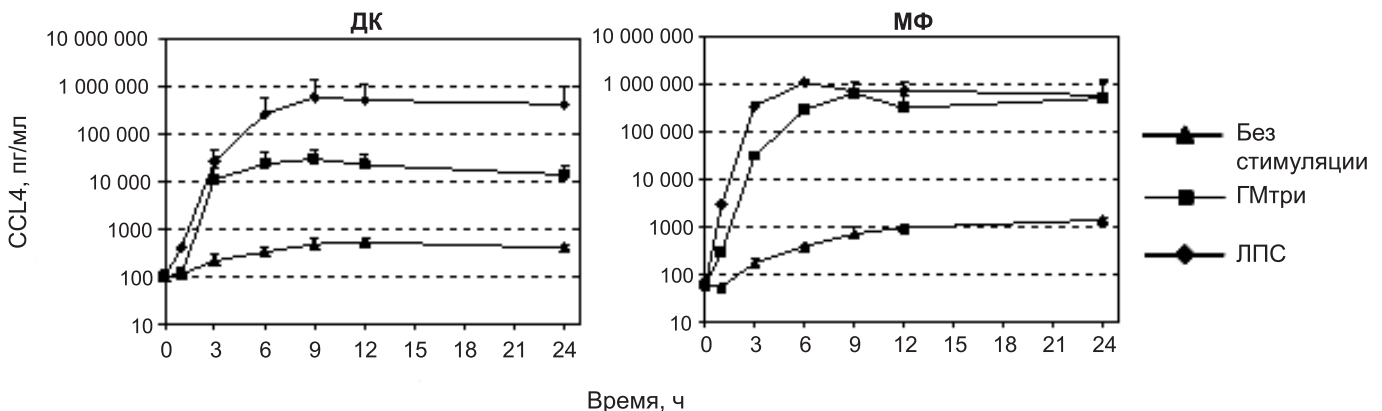


Рис. 4. Кинетика уровней CCL4 в супернатантах МФ и ДК, инкубированных без стимуляции либо в присутствии ГМтри (10 мкг/мл) или ЛПС (0,1 мкг/мл; $M \pm \sigma, n = 3$).

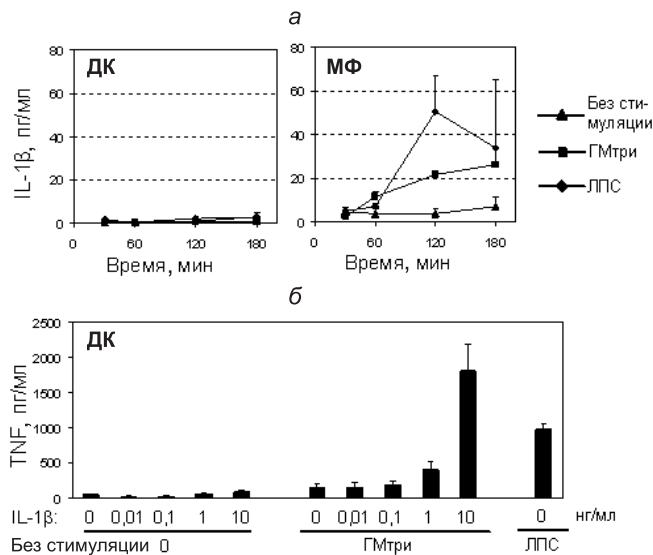


Рис. 5. Роль IL-1 β в индукции выработки TNF ГМтри-стимулированными МФ и ДК.

а – кинетика уровней IL-1 β в супернатантах МФ и ДК, инкубированных без стимуляции либо в присутствии ГМтри (10 мкг/мл) или ЛПС (0,1 мкг/мл; $M \pm \sigma$, $n = 3$); б – уровни TNF в супернатантах ДК, стимулированных в течение 3 ч в присутствии ГМтри (10 мкг/мл), ЛПС (0,1 мкг/мл) и указанных концентраций рекомбинантного человеческого IL-1 β ($M \pm \sigma$, $n = 3$).

стимулированными МФ (см. рис. 2). При стимуляции контрольным препаратом – ЛПС – кинетика экспрессии и секреции TNF в МФ и ДК была сопоставимой и аналогична таковой в ГМтри-стимулированных МФ (см. рис. 1 и 2). Сходные закономерности были показаны для ряда других провоспалительных генов (см. рис. 3 и 4).

О неэффективной трансляции мРНК TNF при стимуляции мурамилпептидами впервые сообщили М. Wolfert и соавт. [17], которые использовали в качестве клеточной модели перевиваемую моноцитарно-макрофагальную линию Mono Mac 6, а в качестве стимулятора – МДП (агонист рецептора NOD2). Наша работа показывает, что диссоциация между транскрипцией и трансляцией TNF возможна также при стимуляции агонистами NOD1, причем этот феномен наблюдается в естественных ДК человека.

Экспрессия TNF регулируется несколькими механизмами, которые действуют как на стадии транскрипции, так и на стадии трансляции. Транскрипция гена TNF индуцируется фактором NF- κ B [1], тогда как трансляция мРНК TNF регулируется серин-треониновой киназой МК-2, которая в свою очередь активируется киназой p38 [2, 8, 13, 16]. Сигнальные пути от толл-подобного рецептора (TLR) 4 – рецептора ЛПС – непосредственно активируют оба этих механизма: MyD88-зависимый сигнальный путь от TLR4 запускает NF- κ B-зависимую транскрипцию TNF [10], TRIF-зависимый сигнальный путь – p38-зависимую трансляцию TNF [2, 16]. Сигнальные пути, идущие от рецептора NOD2, непосредственно активируют только NF- κ B-зависимую транскрипцию TNF, тогда как активация p38 имеет опосредованный характер [6]. Известно, что МДП, помимо NOD2, взаимодействует также с рецептором NLRP3 (NALP3), что приводит к сборке инфламасомы и активации каспазы-1 – фермента, превращающего про-IL-1 β в биологически активный секретируемый IL-1 β [9, 11]. Поскольку МФ содержат депо про-IL-1 β , то активация каспазы-1 приводит к быстрому высвобождению активного IL-1 β . Последний путем аутокринного воздействия на IL-1-рецепторы клетки-продукта вызывает активацию p38, которая активирует киназу МК-2. Последняя усиливает трансляцию мРНК многих цитокинов, в том числе TNF и самого IL-1 β

[6]. Блокада IL-1-рецепторов с помощью антител приводит к резкому подавлению продукции TNF, IL-6, IL-8 и ряда других цитокинов МДП-стимулированными МФ [6].

Мы полагаем, что неодинаковая эффективность трансляции TNF в ГМтри-стимулированных МФ и ДК обусловлена различием в их способности секретировать IL-1 β в первые 1–2 ч после начала стимуляции (см. рис. 5, а). Это различие может быть обусловлено наличием депо про-IL-1 β в МФ и отсутствием такового в ДК; различиями в экспрессии и/или активности рецептора NLRP3 и других компонентов инфламасомы. При стимуляции ЛПС депо эти факторы не играют роли, так как IL-1 β в этом случае не нужен для активации киназ p38 и МК-2; поэтому ДК и МФ при стимуляции ЛПС вырабатывают сопоставимые количества TNF (см. рис. 2).

Предположение о роли IL-1 β подтверждается и тем, что добавление экзогенного IL-1 β полностью устраняет дефект выработки TNF ГМтри-стимулированными ДК (см. рис. 5, б). Интересно, что уровни IL-1 β в супернатантах ГМтри-стимулированных МФ на 2 порядка ниже, чем концентрации рекомбинантного IL-1 β , которые необходимы для усиления выработки TNF ГМтри-стимулированными ДК (см. рис. 5). Эта диссоциация может быть обусловлена следующим. Концентрация секретированного IL-1 β , создаваемая на мембране МФ, может быть значительно выше, чем в супернатанте, в том числе благодаря быстрому связыванию IL-1 β с рецептором при аутокринном механизме действия. МФ могут быть более чувствительны к действию IL-1 β , чем ДК, например вследствие более высокой экспрессии рецептора к IL-1 или компонентов сигнального пути от этого рецептора. Рекомбинантный IL-1 β не обладает всеми необходимыми посттрансляционными модификациями и поэтому связывается с рецептором с меньшей аффинностью, чем естественный IL-1 β .

Таким образом, в работе показана роль IL-1 β в регуляции выработки TNF, индуцированной агонистами NOD1. Слабая выработка TNF ДК при стимуляции ГМтри коррелирует с неспособностью ДК секретировать IL-1 β . Восполнение дефицита IL-1 β приводит к повышению ГМтри-индуцированной продукции TNF ДК до уровня, наблюдаемого в МФ.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen Z. J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway // *Nature Cell Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 758–765.
- Gais P., Tiedje C., Altmayr F. et al. TRIF signaling stimulates translation of TNF-alpha mRNA via prolonged activation of MK2 // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184. – P. 5842–5848.
- Girardin S. E., Boneca I. G., Carneiro L. A. et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan // *Science.* – 2003. – Vol. 300. – P. 1584–1587.
- Girardin S. E., Travassos L. H., Herve M. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 41702–41708.
- Hedl M., Li J., Cho J. H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products // *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* – 2007. – Vol. 104. – P. 19440–19445.
- Hedl M., Abraham C. Distinct roles for Nod2 protein and autocrine interleukin-1beta in muramyl dipeptide-induced mitogen-activated protein kinase activation and cytokine secretion in human macrophages // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 26440–26449.
- Hiasa M., Abe M., Nakano A. et al. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE) // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 4517–4526.
- Hitti E., Iakovleva T., Brook M. et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element // *Mol. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2399–2407.

9. Kanneganti T. D., Lamkanfi M., Kim Y. G. et al. Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling // *Immunity*. – 2007. – Vol. 26. – P. 433–443.
10. Kawai T., Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors // *Curr. Opin. Immunol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 338–344.
11. Marina-Garcia 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. – Vol. 180. – P. 4050–4057.
12. Pashenkov M. V., Popilyuk S. F., Alkhozova B. I. et al. Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells // *Int. Immunopharmacol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 875–882.
13. Ronkina N., Kotlyarov A., Dittrich-Breiholz O. et al. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – Vol. 27. – P. 170–181.
14. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 1109–1118.
15. Tada H., Aiba S., Shibata K. 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. and Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 7967–7976.
16. Wang L., Trebicka E., Fu Y. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced translation of tumor necrosis factor- α by the toll-like receptor 4 adaptor protein TRAM // *J. Innate Immun.* – 2011. – Vol. 3. – P. 437–446.
17. Wolfert M. A., Murray T. F., Boons G. J., Moore J. N. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 39179–39186.

Поступила 01.10.12

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© Н. В. ЯГЛОВА, С. С. ОБЕРНИХИН, 2013

УДК 618.2-092:612.017.1]-07

Н.В. Яглова, С.С. Обернихин

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТИМУСА У ПОТОМСТВА МЫШЕЙ В ПЕРИОД ПОЛОВОГО СОЗРЕВАНИЯ И У ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА МАТЕРИНСКИЙ ОРГАНИЗМ В РАННИЕ СРОКИ БЕРЕМЕННОСТИ

Лаборатория развития эндокринной системы, лаборатория клеточной иммунопатологии и биотехнологии ФГБУ НИИ морфологии человека РАМН (117418, г. Москва, ул. Цюрупы, д. 3)

Цель настоящего исследования – изучение морфофункционального состояния тимуса в период полового созревания и после его наступления у потомства мышей, подвергшихся однократному иммуностимулирующему воздействию конканавалина А на раннем сроке беременности до начала формирования тимуса у плода. Выявлены стойкие изменения морфофункционального состояния тимуса у потомства на поздних сроках постнатального развития, что выражалось в задержке возрастных инволютивных изменений и повышенной пролиферативной активности тимоцитов у половозрелых мышей.

Ключевые слова: тимус, пренатальное воздействие, конканавалин А, инволюция

N.V. Yaglova, S.S. Obernikhin

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THYMIC OFFSPRING OF MICE IN THE PERIOD OF PUBERTY AND IN ADULTS AFTER A SINGLE IMMUNOSTIMULATORY EFFECTS OF THE PARENT ORGANISM IN THE EARLY STAGES OF PREGNANCY

The aim of this research was the study of morphofunctional state of thymus in puberty and after its occurrence in the offspring of mice exposed to a single immunostimulatory effects of concanavalin early in pregnancy prior to the formation of thymus in the fetus. Identified persistent changes morphofunctional state of thymus in the offspring in the later stages of postnatal development, expressed in the delay of the age of involutive changes and increased proliferative activity thymocytes at adult mice.

Key words: thymus, prenatal exposure, concanavalin A, involution

Одной из малоизученных и актуальных проблем биологии и медицины является изучение влияния реакций иммунной системы материнского организма на развитие иммунной системы плода. Существуют данные, подтверждающие связь между функциональными изменениями иммунной системы

потомства после различных воздействий на иммунную систему матери во время беременности [1, 14], но механизмы этих изменений не ясны. По различным данным, изменения органов иммунной системы в пре- и постнатальном развитии организма могут быть как значительными, так и отсутствовать даже при внутриутробной гибели плода [2, 10].

Цель настоящего исследования – изучить морфофункциональное состояние тимуса в период полового созревания и после его наступления у потомства мышей, подвергшихся

Яглова Наталья Валентиновна – д-р мед. наук, зав. лаб., тел. 8(499)120-80-65, e-mail: morfolhum@mail.ru