

## Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 612.017.1

**Влияние лигандов Toll-like, NOD-like рецепторов и IL-4 на продукцию IL-10 и IL-1 $\beta$  моноцитами периферической крови человека****А.Г.Сукиасян, Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексанян**

*Научно-исследовательский институт эпидемиологии,  
вирусологии и медицинской  
паразитологии им. А.Б.Алексаняна  
0060, Ереван, ул. Худякова, 1  
Исследовательский центр "Арменикум"  
0084, Ереван, ул. Шерами, 2*

**Ключевые слова:** моноциты периферической крови человека, Toll-like рецепторы (TLR1, TLR2), NOD-like рецепторы (NOD1, NOD2), IL-10, IL-1 $\beta$ , MDP (мурамил-дипептид), PGN (пептидогликан из *E.coli*), Pam3CSK4 (синтетический бактериальный липопроtein)

Под понятием "иммунитет" часто понимают защиту организма от инфекции. Однако в более широком биологическом смысле – это реакция организма на все биологическое "чужеродное", которое попадает в организм из внешней среды или возникает в самом организме вследствие мутационного процесса, постоянно протекающего в соматических клетках. Поэтому считается, что генеральная функция иммунной системы – поддержание морфофункциональной целостности организма. Защита от инфекций осуществляется с помощью двух систем – неспецифического (врожденного) и специфического (приобретенного) иммунитета. Неспецифический иммунитет выступает как первая линия защиты, а система приобретенного иммунитета выполняет функции специфического распознавания "чужеродного", формирования иммунологической памяти и регуляции индукции врожденного иммунитета. Система врожденного иммунитета действует на основе воспаления и фагоцитоза. Сложная система приобретенного иммунитета основана на специфических функциях лимфоцитов, распознающих чужеродные макромолекулы и реагирующих на них либо непосредственно, либо выработкой защитных специфических белковых молекул – антител [1,2].

Пептидогликан – важнейший компонент клеточной стенки бакте-



рий, выполняющий механические функции осмотической защиты клетки и обладающий антигенными свойствами [5]. MDP представляет собой активный фрагмент бактериальных клеточных стенок, ответственный за иммуностимулирующий эффект целых бактерий. Доказано, что MDP является природным регулятором иммунитета, выработанным в процессе эволюции. Клетками-мишенями для действия MDP в организме являются моноциты/макрофаги. В этих клетках MDP усиливает фагоцитоз, противовирусный эффект, синтез некоторых цитокинов [4,9]. Таким образом, MDP стимулирует фагоцитоз, клеточный и гуморальный иммунитет.

Моноциты обладают выраженной фагоцитарной функцией. Это самые крупные клетки периферической крови. Они могут поглощать относительно крупные частицы и клетки и, как правило, не погибают после фагоцитоза. Этим они отличаются от нейтрофилов и эозинофилов, способных поглощать лишь относительно небольшие частицы и, как правило, погибающих после фагоцитоза. Моноциты способны фагоцитировать микробы в кислой среде, в то время как нейтрофилы неактивны [1,2,7].

В развитии межклеточного взаимодействия на фоне антигенной стимуляции важно отметить роль цитокинов, таких как IL-10 и IL-1 $\beta$ , которые регулируют межклеточные и межсистемные взаимодействия, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокринной и нервной систем как в нормальных условиях, так и при воздействии патологических факторов [2,3,6,8].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния PGN, MDP, Pam3CSK4 и IL-4 на продукцию IL-10 и IL-1 $\beta$  моноцитами периферической крови человека.

## Материал и методы

Была использована гепаринизированная периферическая кровь здоровых доноров возрастной группы от 29 до 43 лет. Мононуклеары (моноциты) периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности *histopaque* (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo), при 1500 об/мин в течение 45 мин при 25°C. Мононуклеары промывали 2 раза PBS (фосфатно-буферный раствор) и добавляли 1 мл питательной среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), 2mM L-глутамина, 1mM пирувата натрия, 100U/ml пенициллина и 100  $\mu$ g/ml стрептомицина. Затем пробирки инкубировали в термостате при 37°C в течение 1.5 часа. После окончания инкубации удаляли не адгезирующие на пластик лимфоциты, а к клеткам добавляли либо по 2.5  $\mu$ g/ml PGN,



либо по 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Pam3CSK4, либо по 5  $\mu\text{g/ml}$  MDP, а в качестве контроля добавляли питательную среду и инкубировали в течение 3 дней. Собирали супернатанты и хранили в холодильнике при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Пробирки с клетками отмывали PBS, рестимулировали противовоспалительными молекулами IL-4 и в качестве контроля добавляли питательную среду и инкубировали в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 3 дней, после чего снова собирали супернатанты и хранили в холодильнике при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Концентрацию IL-1 $\beta$  и IL-10 исследовали методом иммуноферментного анализа, используя тест SET-Go (eBioscience).

Данные статистически обрабатывали методом компьютерной программы GraphPad, с использованием параметрических и непараметрических методов.

## Результаты и обсуждение

Как показали результаты проведенных исследований (рис.1), стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN статистически достоверно повысила продукцию IL-10 по сравнению с Pam3CSK4-стимулированными и нестимулированными моноцитами. NOD2 лиганд MDP значительно индуцирует продукцию IL-10, тогда как стимуляция TLR2-TLR1 рецепторов – лигандом Pam3CSK4 приводит к снижению продукции синтеза IL-10.

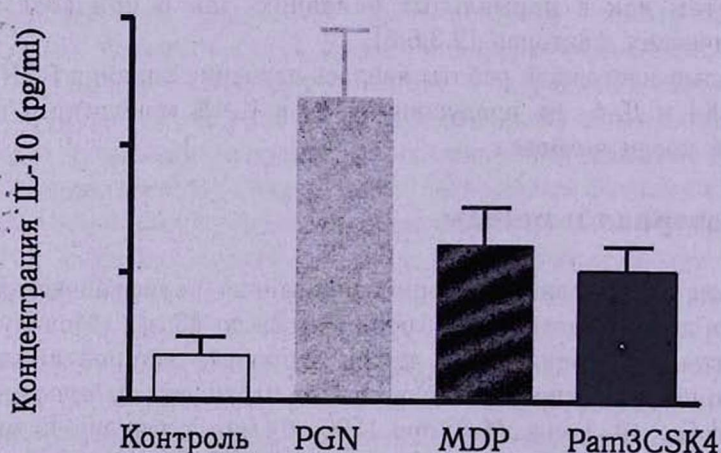


Рис.1. Продукция IL-10 нестимулированными, PGN-, MDP- и Pam3CSK4-стимулированными моноцитами человека

Синтез IL-1 $\beta$  PGN-, Pam3CSK4- или MDP-стимулированными моноцитами значительно не отличается от синтеза IL-10, причем, лиганд



NOD2 рецептора MDP индуцировал низкий уровень синтеза IL-1 $\beta$  культивируемыми моноцитами (рис.2).

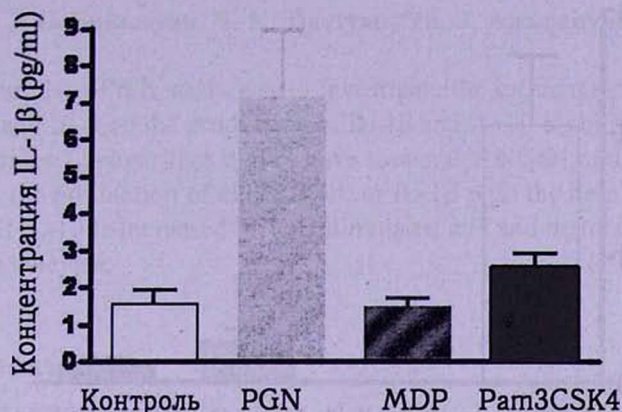


Рис.2. Продукция IL-1 $\beta$  нестимулированными, PGN-, MDP- и Pam3CSK4-стимулированными моноцитами

Как видно из приведенных данных, стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN статистически достоверно повышает синтез как IL-10, так и продукцию IL-1 $\beta$ , в то время как стимуляция TLR2-TLR1 рецепторов Pam3CSK4 и NOD2 рецептора MDP приводит к снижению продукции синтеза IL-10 и IL-1 $\beta$ .

С целью исследования пластичности синтеза цитокинов лигандами моноциты, стимулированные PGN, Pam3CSK4 и MDP, рестимулировали рекомбинантным IL-4 в течение 3 дней. Результаты проведенных исследований показали, что моноциты, первоначально стимулированные PGN, а в дальнейшем проинкубированные с IL-4, не продуцируют одинаковый уровень IL-1 $\beta$ . Такой же результат мы получили, исследуя синтез IL-1 $\beta$  первоначально стимулированными Pam3CSK4, а затем проинкубированными с IL-4 моноцитами (рис.3).

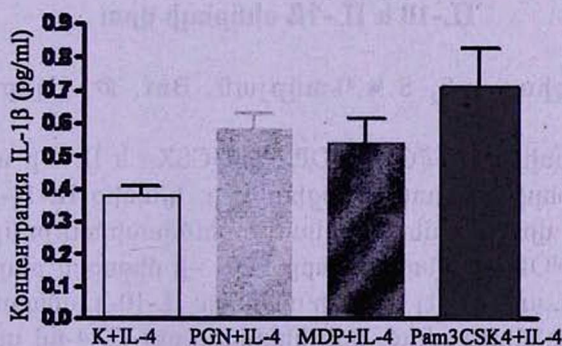


Рис.3. Синтез IL-1 $\beta$  рестимулированными IL-4 моноцитами

Необходимо отметить, что первоначально уровень IL-10 повысился лишь в условиях инкубации нестимулированных клеток с IL-4 (рис.4).

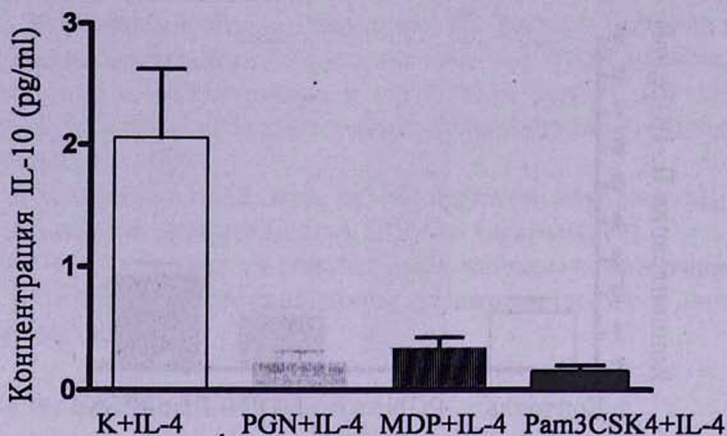


Рис.4. Синтез IL-10 рестимулированными IL-4 моноцитами

Таким образом, сравнительное изучение действия разных агонистов на синтез IL-10 и IL-1 $\beta$  показало, что стимуляция NOD1 и NOD2 рецепторов с помощью PGN повышает синтез как IL-10, так и IL-1 $\beta$  по сравнению с другими агонистами. Результаты показали также, что продукция IL-10 нестимулированными, а в дальнейшем IL-4 стимулированными моноцитами повышается.

Поступила 17.01.11

### **Toll-like, NOD-like նեցեպտորների լիգանդների և IL-4-ի ազդեցությունը մարդու պերիֆերիկ արյան մոնոցիտների կողմից IL-10 և IL-1 $\beta$ սինթեզի վրա**

Ա.Գ.Սուրիսյան, Տ.Կ.Դավթյան, Յու. Թ. Ալեքսանյան

Ուսումնասիրվել է PGN, MDP, Pam3CSK4 և IL-4-ի ազդեցությունը մարդու պերիֆերիկ արյան մոնոցիտների կողմից IL-10-ի և IL-1 $\beta$ -ի պրոդուկցիայի վրա: Համեմատական ուսումնասիրությունը ցույց տվեց, որ NOD1 և NOD2 նեցեպտորները PGN -ի միջոցով բարձրացնում են ինչպես IL-10-ի, այնպես էլ IL-1 $\beta$ -ի սինթեզը: IL-10-ի պրոդուկցիան բարձրանում է ոչ ստիմուլացված, իսկ հետագայում IL-4-ով ստիմուլացված մոնոցիտների միջոցով:



## The influence of ligands of Toll-like, NOD-like receptors and IL-4 on the production of IL-10 and IL-1 $\beta$ by human peripheral blood monocytes

A.G. Sukiasyan, T. K. Davtyan, Yu. T. Aleksanyan

The purpose of this study was to investigate the influence of PGN, MDP, Pam3CSK4 and IL-4 on the production of IL-10 and IL-1 $\beta$  by human peripheral blood monocytes. Comparative studies have shown that NOD1 and NOD2 receptors enhance the production of either IL-10 or IL-1 $\beta$  with the help of PGN. The production of IL-10 is increased by non-stimulated and then later on by IL-4 stimulated monocytes.

### Литература

1. Абелев Г.И. Основы иммунитета, М., 1996.
2. Галактионов В.Г. Иммунология, М., 1998.
3. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции воспаления и иммунитета. Иммунология, 1995, 3, с.30-44.
4. Степанова Е.Н., Кашкин К.П., Китаева М.Н., Абашев Ю.П. Иммунология, 1985, 3, с. 37-40.
5. Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия, пер с англ. М., 1984.
6. David Male, Roitt I, et al. Immunology (7th ed.). London: Mosby, 2006.
7. Jeneway Ch.A., Travers P. Immunology, 1994.
8. Roitt's Essential Immunology, 11th Edition, Wiley-Blackwell, 2006.
9. Vongthip Souvannavong, Spencer Brown and Arlette Adam, Service de Cytométrie, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France, Institut de Biochimie, Université Paris-Sud, Bât.432, 91405 Orsay, France, 1995.