

## TLR-ОПОСРЕДОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА НЕЙТРОФИЛАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2018 г. Ю.О. Теселкин, М.В. Хорева, А.В. Веселова, И.В. Бабенкова, А.Н. Осипов, Л.В. Ганковская, Ю.А. Владимиров

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

E-mail: *teselkin-box@mail.ru*

Поступила в редакцию 22.09.17 г.

После доработки 24.10.17 г.

Исследована опосредованная Toll-подобными рецепторами (TLRs) продукция активных форм кислорода нейтрофилами периферической крови здоровых доноров, а также образование фактора некроза опухоли альфа при стимуляции клеток зимозаном – лигандом TLR2/6, пептидогликаном – лигандом TLR2/1 и липополисахаридом – лигандом TLR4. Регистрацию образования активных форм кислорода проводили с использованием методов люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции, концентрацию фактора некроза опухоли альфа определяли с помощью иммуноферментного анализа. Получены концентрационные кривые изменения светосумм люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции для каждого из лигандов, которые по форме представляли собой кривые насыщения. Сравнение светосумм люцигенин-зависимой хемилюминесценции (продукции супероксидного анион-радикала) и люминол-зависимой хемилюминесценции (общей продукции активных форм кислорода) показало, что вклад NADPH-оксидазы в общую TLR-опосредованную продукцию оксидантов может достигать 40–50%. Для сравнения способности лигандов TLRs стимулировать продукцию нейтрофилами активных форм кислорода и фактора некроза опухоли альфа рассчитывали индексы стимуляции. Установлено, что при стимуляции нейтрофилов зимозаном продукция активных форм кислорода преобладала (более чем в восемь раз) над продукцией фактора некроза опухоли альфа. В отличие от зимозана липополисахарид в большей степени (более чем в два раза) стимулировал продукцию фактора некроза опухоли альфа, чем продукцию активных форм кислорода. Пептидогликан занимал промежуточное положение между этими лигандами. Таким образом, продукция эффекторных молекул, активных форм кислорода и фактора некроза опухоли альфа, нейтрофилами периферической крови человека зависит от природы TLR-лиганда.

*Ключевые слова:* нейтрофилы, Toll-подобные рецепторы, лиганды, активные формы кислорода, фактор некроза опухоли альфа, хемилюминесценция.

Известно, что Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors – TLRs) – это ключевые рецепторы врожденного иммунитета [1–3]. В настоящее время у человека обнаружено 10 типов TLRs, которые экспрессируются главным образом на клетках врожденного иммунитета – нейтрофилах, моноцитах, макрофагах, дендритных клетках и др. Из них TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 и TLR-6 расположены на наружной по-

верхности плазматической мембраны, тогда как остальные – TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9 и TLR-10 – являются внутриклеточными [4,5]. TLRs распознают высококонсервативные структуры патогенных микроорганизмов, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (экзогенные лиганды), к которым относятся различные компоненты бактериальной стенки, такие как липополисахарид (ЛПС), пептидогликан (ПГ), флагеллин, а также ДНК микроорганизмов, вирусная РНК и др. Кроме того, установлены эндогенные лиганды TLRs, например белки теплового шока (Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, gp96), фибриноген, гиалуроновая кислота, фибронектин [6–10].

Сокращения: TLRs – Toll-подобные (Toll-like) рецепторы, ЛПС – липополисахарид, ПГ – пептидогликан, ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа, АФК – активные формы кислорода, O $_2^{\bullet-}$  – супероксидный анион-радикал, Люм-ХЛ – люминол-зависимая хемилюминесценция, Люц-ХЛ – люцигенин-зависимая хемилюминесценция, ИС – индексы стимуляции.

Взаимодействие TLRs с лигандами, в ходе которого может иметь место димеризация отдельных рецепторов, например TLR2 и TLR1 или TLR2 и TLR6, с образованием соответствующих гетеродимеров TLR2/1 и TLR2/6, приводит к активации TLR-опосредованных сигнальных путей [6,9,10]. Результатом такой активации является экспрессия генов провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли альфа (ФНО $\alpha$ ), интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12), а также интерферонов I типа, противомикробных пептидов [4,5,8]. Продукты этих генов участвуют в реакциях врожденного иммунитета и направляют развитие адаптивного иммунного ответа. TLR-опосредованная активация клеток врожденного иммунитета, таких как макрофаги и нейтрофилы, приводит также к образованию активных форм кислорода (АФК), которые обладают цитотоксическим действием и являются важной преградой на пути развития инфекции и новообразований [2,7,11]. Нарушения в функционировании TLR-опосредованных сигнальных путей, возникающие на уровне распознавания лигандов, экспрессии TLRs, трансдукции сигнала или выработки эффекторных молекул (АФК, цитокинов), а также полиморфизм генов TLRs могут быть причиной развития инфекционных, воспалительных, аутоиммунных, аллергических, онкологических и других заболеваний [1,4,9,12].

В литературе широко обсуждаются механизмы функционирования TLR-зависимых сигнальных путей [6,8–10]. Однако данных о влиянии различных лигандов TLRs на продукцию фагоцитами крови АФК недостаточно. Мало изучены количественные закономерности продукции АФК нейтрофилами при воздействии этими лигандами. В ряде работ рассматриваются механизмы активации NADPH-оксидазы при стимуляции фагоцитов зимозаном и ЛПС [2,13,14], но в то же время представляется актуальным определение вклада NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\bullet-}$ ) в общую TLR-опосредованную продукцию АФК активированными фагоцитами.

На сегодняшний день доказана важная роль ФНО $\alpha$  в развитии различных воспалительных процессов в организме человека. Продукция этого цитокина осуществляется различными клетками иммунной системы в ответ на инфекцию или асептическое тканевое повреждение. Известно, что ФНО оказывает существенное влияние на продукцию других цитокинов, в связи с чем предложена концепция ФНО-зависимого цитокинового каскада [15]. Кроме того, ФНО $\alpha$  способен потенцировать продукцию

АФК нейтрофилами при их последующей активации различными стимулами [16,17]. Поскольку результатом взаимодействия лиганда с TLR является активация сигнальных путей в клетке, приводящая как к генерации АФК, так и к синтезу ФНО $\alpha$ , представляет интерес сравнение стимулирующей активности одного и того же лиганда в отношении продукции АФК и ФНО $\alpha$ .

Цель работы – исследование концентрационной зависимости продукции АФК нейтрофилами периферической крови человека при их стимуляции некоторыми лигандами TLRs и возможного вклада NADPH-оксидазы в этот процесс, а также сравнительное изучение влияния лигандов TLRs на продукцию нейтрофилами АФК и ФНО $\alpha$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе применяли реактивы: гепарин (Московский эндокринный завод, Россия), раствор Хенкса без фенолового красного (ООО «БиолоТ», Россия), люминол (Fluka, Швейцария), люцигенин, диметилсульфоксид, неорганические соли (Sigma-Aldrich, США).

В исследовании использовали периферическую кровь 15 здоровых доноров (лица мужского пола в возрасте от 30 до 45 лет). От всех доноров было получено информированное согласие на участие в исследовании. Для выделения нейтрофилов гепаринизированную кровь (20 Ед гепарина на 1 мл крови) смешивали с 6%-м раствором декстрана (Dextran 500, Amersham Biosciences, США) в изотоническом растворе натрия хлорида в соотношении 1 : 6 и инкубировали сначала в термостате в течение 30 мин при 37°C, затем в течение 30 мин при комнатной температуре. Плазму крови, обогащенную лейкоцитами, отбирали и наслаивали на раствор для выделения лимфоцитов человека – Lympholyte-H (Cedarlane, Канада). Разделение клеток проводили центрифугированием в течение 45 мин при 400 g и температуре 4°C на центрифуге Eppendorf 5702R (Германия). Кольцо мононуклеаров удаляли, осадок, содержащий нейтрофилы, отбирали, дважды отмывали средой RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, США) с использованием центрифугирования клеток в течение 15 мин при 200 g и температуре 4°C. Выделенные клетки ресуспендировали в 1 мл раствора Хенкса (рН 7,4) и хранили при температуре 4°C в течение не более 4 ч. Жизнеспособность клеток после выделения, определяемая по тесту с трипановым синим, составляла  $94 \pm 2\%$ . Спустя 4 ч хранения на льду количество живых клеток было  $87 \pm 3\%$ .

В качестве лигандов TLRs были выбраны зимозан (*Saccharomyces cerevisiae*, InvivoGen, США), ПГ (*Staphylococcus aureus*, InvivoGen, США) и ЛПС (*E. coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich, США), которые являются лигандами соответственно TLR2/6, TLR2/1 и TLR4 [2,18,19]. Для стимуляции продукции АФК нейтрофилами применяли также опсонизированный зимозан, который готовили по общепринятой методике [20].

Измерение люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции (Люм-ХЛ и Люц-ХЛ) нейтрофилов проводили на хемилюминометре Lum-5773 (ООО «ДиСофт», Россия) с программным обеспечением PowerGraph 3,3 Professional. Реакционная среда содержала  $2 \cdot 10^5$  нейтрофилов/мл, 100 мкМ люминола или 100 мкМ люцигенина в растворе Хенкса (рН 7,4). Рабочие растворы люминола (20 мМ) и люцигенина (10 мМ) готовили соответственно на диметилсульфоксиде и фосфатном буфере (136,7 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8,1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7,4) и хранили в замороженном состоянии при  $-30^\circ\text{C}$  до проведения эксперимента. Хемилюминесценцию нейтрофилов регистрировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в полистироловой кювете, при постоянном перемешивании. Для этого к суспензии клеток добавляли один из стимулирующих агентов – зимозан, опсонизированный зимозан, ПГ, ЛПС – и определяли светосумму хемилюминесценции за 45 мин ( $S$ ). В отдельном эксперименте измеряли светосумму спонтанного свечения клеток (без стимула) за аналогичный интервал времени ( $S_{\text{сп}}$ ). Светосумму индуцированного свечения ( $S_{\text{инд}}$ ) вычисляли как разность между  $S$  и  $S_{\text{сп}}$ .

Для исследования продукции ФНО $\alpha$  свежeweделенные нейтрофилы культивировали в присутствии лигандов TLRs в течение 6 ч в среде RPMI 1640, содержащей 100 мкг/мл гентамицина сульфата (ОАО «Дальхимфарм», Россия) и 2 мМ глутамин (Sigma-Aldrich, США), в концентрации  $2 \cdot 10^5$  клеток/мл в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе Galaxy CO-170R (New Brunswick Scientific, Великобритания) при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Концентрации лигандов TLRs: зимозан – 2 мкг/мл, ПГ – 2,5 мкг/мл, ЛПС – 0,1 мкг/мл. Контролем служили нейтрофилы, культивированные только в среде RPMI 1640. После культивирования клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 400 g и температуре  $4^\circ\text{C}$ , супернатанты собирали и хранили при  $-60^\circ\text{C}$ . Концентрацию ФНО $\alpha$  в супернатантах определяли с помощью коммерческого набора для иммуноферментного анализа (eBioscience, США). Концентрацию ФНО $\alpha$  в контрольных

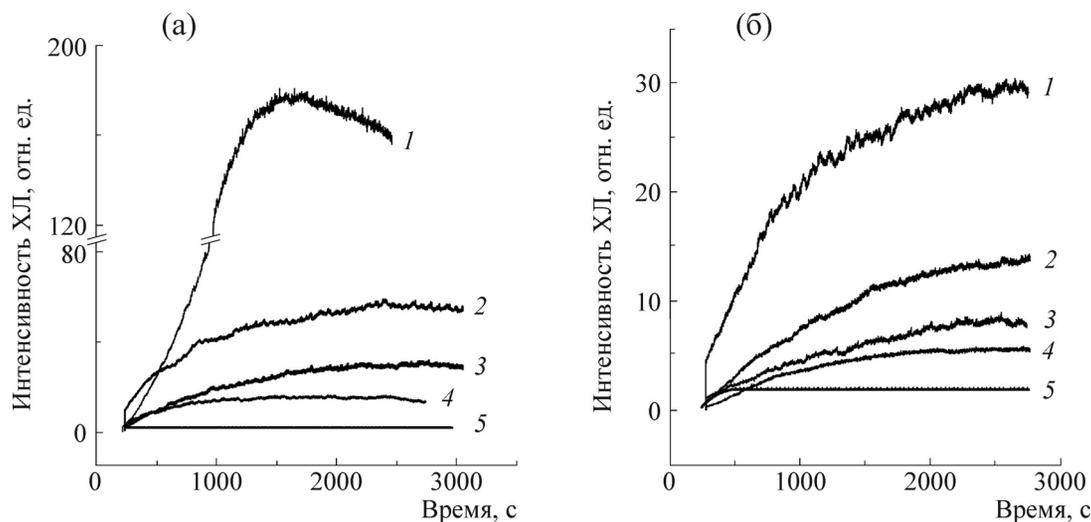
образцах, без стимулирующего агента, обозначали как  $S_{\text{сп}}$  (спонтанная продукция), в опытных образцах, в присутствии стимулирующего агента –  $S_{\text{инд}}$  (индуцированная продукция).

Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики и представлены как средняя величина  $\pm$  стандартная ошибка средней ( $M \pm m$ ). Оценку достоверности различий между сравниваемыми показателями проводили с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

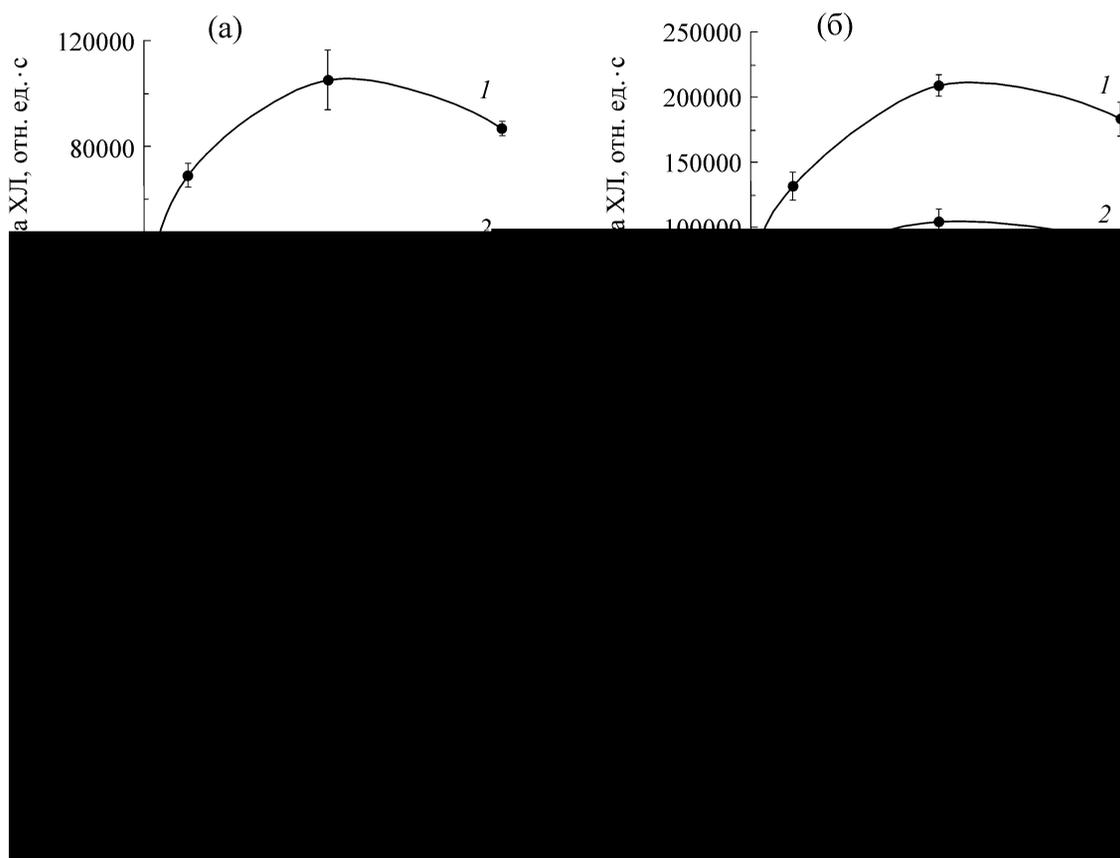
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Регистрацию продукции АФК нейтрофилами периферической крови здоровых доноров при стимуляции их лигандами, взаимодействующими с TLRs, осуществляли с помощью методов Люм-ХЛ и Люц-ХЛ. На рис. 1а,б показаны типичные кинетики Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов, стимулированных зимозаном, ПГ и ЛПС – лигандами TLRs, а также опсонизированным зимозаном, который часто применяется для оценки функциональной активности фагоцитов [20–22]. Известно, что, в отличие от зимозана, ПГ и ЛПС, нейтрофилы взаимодействуют с опсонизированным зимозаном посредством рецепторов к Fc-фрагментам иммуноглобулинов и некоторым компонентам компонента, выступающим в роли опсонина [3,20]. Видно, что кривые хемилюминесценции нейтрофилов в присутствии исследованных стимулирующих агентов практически не отличались по форме, но различались по интенсивности свечения. Амплитуда Люм-ХЛ нейтрофилов в присутствии соответствующего стимулирующего агента была в три–шесть раз выше, чем амплитуда Люц-ХЛ. Это можно объяснить тем, что Люм-ХЛ активированных нейтрофилов обусловлена продукцией ими различных АФК –  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гидроксильного радикала ( $\bullet\text{OH}$ ), хлорноватистой кислоты ( $\text{HOCl}$ ), частично представленной в форме гипохлорит-аниона ( $\text{HOCl}^-$ ), тогда как Люц-ХЛ связана с продукцией только  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , которая происходит при участии NADPH-оксидазы [23].

Для выяснения количественных закономерностей образования АФК при взаимодействии нейтрофилов с указанными выше лигандами было изучено изменение светосумм Люм-ХЛ и Люц-ХЛ ( $S_{\text{инд}}$ ) в зависимости от концентрации исследуемого лиганда (рис. 2). Обнаружено, что с увеличением концентрации каждого из лигандов происходило постепенное увеличение светосумм обоих свечений, которые достигали



**Рис. 1.** Типичные кинетики Люм-ХЛ (а) и Люц-ХЛ (б) нейтрофилов периферической крови здоровых доноров при активации клеток различными стимулирующими агентами: 1 – опсонизированный зимозан (2 мкг/мл); 2 – зимозан (2 мкг/мл); 3 – ПГ (2,5 мкг/мл); 4 – ЛПС (0,1 мкг/мл). Цифрой 5 отмечен уровень спонтанного свечения (в отсутствие стимула).



**Рис. 2.** Влияние зимозана (а), опсонизированного зимозана (б), ПГ (в) и ЛПС (г) на светосуммы Люм-ХЛ и Люц-ХЛ ( $S_{инд}$ ) нейтрофилов периферической крови здоровых доноров ( $n = 15$ ): 1 – Люм-ХЛ; 2 – Люц-ХЛ.

некоторого постоянного уровня. Дальнейшее увеличение концентрации лиганда к существенным изменениям светосуммы хемилюминесцен-

ции не приводило, что, по-видимому, было обусловлено отсутствием свободных рецепторов в условиях избытка лиганда. Как видно из

Значения индексов стимуляции продукции АФК и ФНО $\alpha$  нейтрофилами периферической крови здоровых доноров ( $n = 15$ ) в присутствии зимозана, ПГ и ЛПС ( $M \pm m$ )

Лиганд	ИС Люм-ХЛ	ИС Люц-ХЛ	ИС ФНО $\alpha$
Зимозан (2 мкг/мл)	27,09 $\pm$ 2,65* $\wedge$	15,39 $\pm$ 1,31 $\wedge$	1,77 $\pm$ 0,62
ПГ (2,5 мкг/мл)	17,85 $\pm$ 1,83*	10,48 $\pm$ 1,06 $\wedge$	17,35 $\pm$ 3,41
ЛПС (0,1 мкг/мл)	13,06 $\pm$ 1,40* $\wedge$	5,93 $\pm$ 0,84 $\wedge$	26,74 $\pm$ 4,35

Примечание. \* –  $p < 0,05$  по отношению к значению ИС Люц-ХЛ при воздействии на клетки соответствующего лиганда;  $\wedge$  –  $p < 0,05$  по отношению к значению ИС ФНО $\alpha$  при воздействии на клетки соответствующего лиганда.

рис. 2, максимальные значения  $S_{\text{инд}}$  Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов наблюдались при добавлении к ним лигандов TLRs в следующем диапазоне концентраций: зимозан – 100–200 мкг/мл, ПГ – 10–100 мкг/мл, ЛПС – 50–100 мкг/мл. Для опсонизированного зимозана, который в настоящей работе использовали в качестве лиганда сравнения, этот диапазон концентраций составил 100–200 мкг/мл. Однако в этом случае сигнальные пути, приводящие к активации нейтрофилов, будут иные, чем при стимуляции их лигандами TLRs [3]. Следует отметить, что максимальная  $S_{\text{инд}}$  Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов и, следовательно, максимальная продукция АФК при стимуляции их опсонизированным зимозаном была значительно выше (в два–три раза), чем при стимуляции TLR-лигандами ( $p < 0,05$ ), что согласуется с результатами других авторов [14].

Следующим этапом исследования было сравнение стимулирующего влияния различных лигандов TLRs на продукцию нейтрофилами АФК с их влиянием на продукцию ФНО $\alpha$ . При этом были выбраны следующие концентрации TLR-лигандов: зимозан – 2 мкг/мл, ПГ – 2,5 мкг/мл и ЛПС – 0,1 мкг/мл (эти концентрации использовались для индукции продукции ФНО $\alpha$ ). Как видно из рис. 2, при указанных концентрациях лигандов регистрируемые значения светосумм Люм-ХЛ и Люц-ХЛ находятся на начальных, близких к линейным участкам кривых (когда не все TLRs заняты лигандом). Для изучаемых концентраций лигандов были рассчитаны индексы стимуляции (ИС) продукции АФК нейтрофилами, которые вычисляли как отношение светосуммы индуцированной Люм-ХЛ или Люц-ХЛ к светосумме спонтанного свечения –  $S_{\text{инд}}/S_{\text{сп}}$  (таблица). Видно, что способность исследованных лигандов стимулировать хемилюминесценцию нейтрофилов (или продукцию АФК) при этих условиях убывала в ряду: зимозан > ПГ > ЛПС.

В настоящее время уделяется большое внимание изучению механизмов, приводящих к продукции прооксидантов при стимуляции фа-

гоцитов лигандами TLRs. В частности, обсуждаются механизмы активации NADPH-оксидазы фагоцитов при их TLR-опосредованной стимуляции и генерация ими  $O_2^{\cdot-}$  [2,13,14]. Однако возможный вклад продукции  $O_2^{\cdot-}$  в общую продукцию прооксидантов не обсуждается. В нашей работе была предпринята попытка проведения такой оценки с использованием методов Люм-ХЛ и Люц-ХЛ, несмотря на то что механизмы окисления люминола и люцигенина достаточно сложны [23]. Используемые нами концентрации люминола и люцигенина при измерении хемилюминесценции клеток были одинаковыми и составляли 100 мкМ. При этих концентрациях интенсивность свечения нейтрофилов не зависит от концентрации активаторов и обусловлена только количеством продуцируемых клетками прооксидантов, запускающих окисление люминола или люцигенина (данные не приводятся). Поскольку люминол и люцигенин имеют близкие квантовые выходы хемилюминесценции [20], то, по приближительной оценке, можно считать, что в этих условиях регистрируемая светосумма свечения в первую очередь будет определяться количеством образующихся возбужденных продуктов окисления каждого из активаторов. Сравнение результатов измерения Люм-ХЛ и Люц-ХЛ фагоцитов, стимулированных соответствующим TLR-лигандом, показало, что наблюдаемый максимальный уровень светосуммы Люм-ХЛ был в 2–2,5 раза выше, чем аналогичный показатель Люц-ХЛ ( $p < 0,05$ ). Сходные различия, в 1,7–2,2 раза ( $p < 0,05$ ), зарегистрированы и для ИС Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов. Полученные результаты позволяют предположить, что вклад NADPH-оксидазы в общую продукцию оксидантов, оцениваемую с помощью Люм-ХЛ, может достигать 40–50%, т.е.  $O_2^{\cdot-}$  играет важную роль в развитии TLR-опосредованной Люм-ХЛ нейтрофилов. Для сравнения, при стимуляции нейтрофилов крови водорастворимым стимулом форболмирилатацетатом, который активирует непосредственно протеин киназу  $c$  [24],

в качестве основного оксиданта, окисляющего люминол, рассматривается НОС/НОСГ [25].

Продукция ФНО $\alpha$  нейтрофилами при их стимуляции зимозаном, ПГ и ЛПС увеличивалась по сравнению со спонтанной продукцией, которая составила  $25,30 \pm 3,23$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). Максимальное образование ФНО $\alpha$  наблюдалось в результате стимуляции клеток ЛПС –  $621,94 \pm 42,23$  пг/мл. Продукция ФНО $\alpha$ , вызванная действием ПГ и зимозана, составила  $436,15 \pm 58,92$  пг/мл и  $43,12 \pm 9,34$  пг/мл соответственно.

Для оценки стимулирующего влияния лигандов TLRs на продукцию нейтрофилами изучаемого провоспалительного цитокина использовали ИС ФНО $\alpha$ , который рассчитывали как отношение индуцированной продукции ФНО $\alpha$  к его спонтанной продукции ( $C_{\text{инд}}/C_{\text{сп}}$ ). Способность изучаемых лигандов индуцировать выработку ФНО $\alpha$  убывала в ряду: ЛПС > ПГ > зимозан (таблица). Способность ПГ и зимозана стимулировать продукцию ФНО $\alpha$  была соответственно в 1,5 и 15,1 раза меньше, чем у ЛПС ( $p < 0,05$ ). Таким образом, наибольшим стимулирующим действием в этих экспериментах обладал ЛПС, а не зимозан, как в случае регистрации продукции АФК.

Наблюдаемые различия в действии исследуемых лигандов на индукцию синтеза ФНО $\alpha$ , по-видимому, связаны с тем, что, несмотря на схожее строение TLR-опосредованных сигнальных путей и активацию одинаковых транскрипционных факторов, в трансдукции сигнала участвует большое количество адаптерных молекул [6,8–10].

Большой интерес представляет сравнение TLR-опосредованной продукции АФК и цитокинов клетками фагоцитарного звена. В настоящей работе для каждого из исследованных лигандов TLRs было проведено сравнение ИС продукции нейтрофилами АФК, рассчитанных по данным измерения хемилюминесценции, с соответствующим ИС, который вычисляли на основании определения продукции ФНО $\alpha$ . Установлено, что способность зимозана стимулировать продукцию АФК достоверно выше его способности стимулировать продукцию ФНО $\alpha$  (таблица). При стимуляции нейтрофилов этим лигандом значения ИС Люм-ХЛ и Люц-ХЛ были выше значения ИС ФНО $\alpha$  в 15,3 и 8,7 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). При добавлении пептидогликана ИС Люм-ХЛ не отличался от ИС продукции ФНО $\alpha$ , тогда как ИС Люц-ХЛ был в 1,7 раза ниже ( $p < 0,05$ ). В случае стимуляции клеток ЛПС значения ИС Люм-ХЛ и Люц-ХЛ

были ниже значения ИС ФНО $\alpha$  в 2,1 и 4,5 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты показывают, что при стимуляции нейтрофилов зимозаном, лигандом TLR2/6, наблюдается более выраженная продукция АФК по сравнению с продукцией ФНО $\alpha$ . В отличие от зимозана ЛПС, лиганд TLR4, стимулирует продукцию ФНО $\alpha$  нейтрофилами в большей степени, чем АФК. Что касается ПГ, лиганда TLR2/1, то он занимает некоторое промежуточное положение между этими лигандами.

Преобладание продукции АФК нейтрофилами периферической крови по сравнению с продукцией ФНО $\alpha$  при стимуляции их зимозаном можно объяснить тем, что в распознавании зимозана клетками принимают участие также лектины С-типа, в частности рецептор дектин-1, который, как известно, играет важную роль в воспалительном ответе [3,26]. Полагают, что распознавание фагоцитами зимозана и последующая продукция АФК может осуществляться за счет кооперации TLR2 с дектином-1 [14,27]. Нельзя исключить, что синергизм этих рецепторов является одной из причин более высоких значений ИС Люм-ХЛ и Люц-ХЛ нейтрофилов по сравнению со значением ИС ФНО $\alpha$  при стимуляции клеток частицами зимозана.

Таким образом, продукция эффекторных молекул, АФК и ФНО $\alpha$ , нейтрофилами периферической крови человека зависит от природы лиганда TLR и взаимодействующего с ним рецептора. Определение стимулирующего влияния различных TLR-лигандов на выработку эффекторных молекул (АФК и цитокинов) может иметь важное значение для выявления нарушений TLR-опосредованных сигнальных путей при развитии различных патологических состояний.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. N. Cook, D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz, *Nat. Immunol.* **5**, 975 (2004).
2. C. Kohchi, H. Inagawa, T. Nishizawa, and G. Soma, *Anticancer Res.* **29**, 817 (2009).
3. K. Futosi, S. Fodor, and A. Mocsai, *Int. Immunopharmacol.* **17**, 638 (2013).
4. J. Cannova, S. J. P. Breslin, and J. Zhang, *Front. Med.* **9**, 288 (2015).
5. M. S. Abdul-Cader, A. Amarasinghe, and M. F. Abdul-Careem, *Arch. Virol.* **161**, 2075 (2016).
6. W. Chao, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**, H1 (2009).
7. M. Xiang, J. Fan, and J. Fan, *Mediators Inflamm.* **2010**, pii: 916425 (2010).

8. S. M. Smith, World J. Gastrointest. Pathophysiol. **5**, 133 (2014).
9. A. Acheh, D. Yesudhas, and S. Choi, Arch. Pharm. Res. **39**, 1032 (2016).
10. S. Goulopoulou, C. G. McCarthy, and R. C. Webb, Pharmacol. Rev. **68**, 142 (2016).
11. B. Beutler, Mol. Immunol. **40**, 845 (2004).
12. A. Fleer and T. G. Krediet, Neonatology **92**, 145 (2007).
13. H. S. Park, H. Y. Jung, E. Y. Park, et al., J. Immunol. **173**, 3589 (2004).
14. K. Makni-Maalej, M. Chiandotto, M. Hurtado-Nedelec, et al., Biochem. Pharmacol. **85**, 92 (2013).
15. I. Udalova, C. Monaco, J. Nanchahal, and M. Feldmann, Microbiol. Spectr. **4** (4), (2016). doi: 10.1128/microbiolspec.MCHD-0022-2015.
16. T. Itou, Y. Shoji, R. Shiraishi, et al., Dev. Comp. Immunol. **26** (7), 675 (2002).
17. L. Zhu and P. He, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. **290** (1), H365 (2006).
18. F. Hayashi, T. K. Means, and A. D. Luster, Blood. **102**, 2660 (2003).
19. Y. Dahiya, R. K. Pandey, and A. Sodhi, PLoS One **6**, e27828 (2011).
20. R. C. Allen, Methods Enzymol. **133**, 449 (1986).
21. L. M. Kabeya, C. N. Fuzissaki, S. H. Taleb-Contini, et al., Chem. Biol. Interact. **206**, 63 (2013).
22. A. P. Piryazev, A. P. Azizova, A. V. Aseichev, and V. I. Sergienko, Bull. Exp. Biol. Med. **157**, 341 (2014).
23. Y. A. Vladimirov and E. V. Proskurnina, Biochemistry (Mosc) **74**, 1545 (2009).
24. F. R. Sheppard, M. R. Kelher, E. E. Moore, et al., J. Leukoc. Biol. **78**, 1025 (2005).
25. D. I. Roshchupkin, N. S. Belakina, and M. A. Murina, Biofizika **51**, 99 (2006).
26. A. Plato, J. A. Willment, and G. D. Brown, Int. Rev. Immunol. **32**, 134 (2013).
27. B. N. Gantner, R. M. Simmons, S. J. Canavera, et al., J. Exp. Med. **197**, 1107 (2003).

## TLRs-Mediated Production of Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor-alpha by Human Peripheral Blood Neutrophils

**Yu.O. Teselkin, M.V. Khoreva, A.V. Veselova, I.V. Babenkova, A.N. Osipov, L.V. Gankovskaya, and Yu.A. Vladimirov**

*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia*

This paper presents a study on TLRs-mediated production of reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood neutrophils in healthy donors stimulated with zymosan (TLR2/6 ligand), peptidoglycan (TLR2/1 ligand) and lipopolysaccharide (TLR4 ligand). Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence was used to detect reactive oxygen species production. The concentration of tumor necrosis factor-alpha was measured by enzyme immunoassay. The plots of dependences of the sum of light emission of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence on concentration of each ligand were viewed as saturation curves. Comparison of the sum of light emission of lucigenin-dependent chemiluminescence (production of superoxide anion radical) and the the sum of light emission of luminol-dependent chemiluminescence (total production of reactive oxygen species) showed that the contribution of NADPH-oxidase to the total TLRs-mediated production of oxidants can reach 40–50%. To compare the ability of ligands of TLRs stimulate the production of reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha by neutrophils, stimulation indices were calculated. It has been established that activation of neutrophils with zymosan leads to higher production of reactive oxygen species (8-fold higher) rather than tumor necrosis factor-alpha production. Unlike zymosan, lipopolysaccharide stimulated in a greater degree (2-fold higher) the production of tumor necrosis factor-alpha than reactive oxygen species production. Peptidoglycan is intermediate in position between these ligands. Thus, the production of effector molecules, reactive oxygen species and tumor necrosis factor-alpha, by human peripheral blood neutrophils depends on the nature of the TLR ligand.

*Keywords: neutrophils, Toll-like receptors, ligands, reactive oxygen species, tumor necrosis factor-alpha, chemiluminescence*