© Коллектив авторов, 2021

Николаева А.М.^{1,2}, Максимчик П.В.², Пашенков М.В.¹

Сравнительная характеристика макрофагов, толерантных к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. В клетках врожденного иммунитета, активированных через паттерн-распознающий рецептор (ПРР), развивается преходящее состояние толерантности, проявляющееся отсутствием выработки провоспалительных цитокинов при повторной стимуляции того же рецептора. Феномен толерантности может быть использован для повышения резистентности против патогенных микроорганизмов. Однако данные о механизмах толерантности к агонистам различных ПРР противоречивы.

Цель работы – сопоставить транскриптомные и метаболические характеристики макрофагов человека, толерантных к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4, при рестимуляции тем же агонистом и при перекрестной стимуляции.

Материал и методы. Макрофаги получали путем культивирования моноцитов крови здоровых доноров с гранулоцитарно-макрофагальным колониестимулирующим фактором. Макрофаги стимулировали 24 ч агонистом NOD1 или TLR4 для индукции толерантности, после чего подвергали рестимуляции тем же агонистом или перекрестной стимуляции. Экспрессию 17 генов иммунного ответа оценивали с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, продукцию фактора некроза опухоли – с помощью иммуоферментного анализа, интенсивность гликолиза – с помощью мониторинга скорости закисления внеклеточной среды.

Результаты. Макрофаги, толеризованные к агонисту NOD1, характеризуются более полным ингибированием транскрипционного ответа на рестимуляцию тем же агонистом, чем толеризованные липополисахаридом (ЛПС) макрофаги при рестимуляции ЛПС. Не выявлено значимого кросс-толеризирующего действия агонистов NOD1 и TLR4 на экспрессию генов. Впервые показано, что в макрофагах, толеризованных к агонистам NOD1 и TLR4, ингибируется активационное усиление гликолиза: при рестимуляции тем же агонистом – полностью, при перекрестной стимуляции – частично.

Заключение. Полученные результаты обсуждаются в свете основных теорий иммунной толерантности (рецепторной, эпигенетической).

Ключевые слова: врожденный иммунный ответ; иммунная толерантность; макрофаги; липополисахарид; TLR4; мурамилпептиды; NOD1; цитокины

Статья получена 10.12.2020. Принята в печать 15.01.2021.

Для цитирования: Николаева А.М., Максимчик П.В., Пашенков М.В. Сравнительная характеристика макрофагов, толерантных к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4. Иммунология. 2021; 42 (2): 102–111. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-102-111>

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 19-015-00256.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Пашенков Михаил Владимирович –
доктор медицинских наук,
и.о. заведующего лабораторией
клинической иммунологии
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, Москва,
Российская Федерация
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Nikolaeva A.M.^{1,2}, Maksimchik P.V.², Pashenkov M.V.¹

A comparative characterization of macrophages tolerant to NOD1 and TLR4 receptor agonists

¹ National Research Center – Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency, 115522, Moscow, Russian Federation

² Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. Innate immune cells activated through a pattern recognition receptor develop a transient state of tolerance, i.e. lack of pro-inflammatory cytokine production upon repeated stimulation of the same receptor. The phenomenon of tolerance can be used to enhance resistance against pathogens. However, data about mechanisms of tolerance are contradictory.

Aim of the study – to compare transcriptomic and metabolic characteristics of human macrophages tolerant to NOD1 and TLR4 receptor agonists upon restimulation with the same agonist and cross-stimulation.

Material and methods. Macrophages were obtained by culturing blood monocytes from healthy donors with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Macrophages were stimulated for 24 h by a NOD1 or a TLR4 agonist to induce tolerance, whereafter restimulated with the same or the other agonist. Expression of 17 immune-response-related genes was assessed by reverse-transcription real-time PCR, TNF production by ELISA, intensity of glycolysis by real-time monitoring of extracellular medium acidification rate.

Results. Macrophages tolerant to a NOD1 agonist are characterized by a more complete inhibition of the transcriptional response to restimulation with the same agonist, as compared to LPS-tolerated macrophages restimulated with LPS. We did not observe significant cross-tolerizing effects of NOD1 and TLR4 agonists on gene expression. We also show that in macrophages tolerant to NOD1 or TLR4 agonists, there is a complete inhibition of activation-induced enhancement of glycolysis upon restimulation with the same agonist, and partial inhibition upon cross-stimulation.

Conclusion. These data are discussed in light of main theories of immune tolerance (receptor-based, epigenetic).

Keywords: innate immune response; immune tolerance; macrophages; lipopolysaccharide; TLR4; muramyl peptides; NOD1; cytokines

Received 10.12.2020. Accepted 15.01.2021.

For citation: Nikolaeva A.M., Maksimchik P.V., Pashenkov M.V. A comparative characterization of macrophages tolerant to NOD1 and TLR4 receptor agonists. *Immunologiya*. 2021, 42 (2): 102–111. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-2-102-111> (in Russian)

Funding. The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant 19-015-00256.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

For correspondence
Mikhail V. Pashenkov – MD, PhD,
Acting Head of the Laboratory
of Clinical Immunology,
NRC Institute of Immunology
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Введение

Распознавание патогенов клетками врожденного иммунитета основано на взаимодействии типовых микробных структур, или патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), с паттерн-распознающими рецепторами (ПРР). Это взаимодействие приводит к запуску врожденного иммунного ответа, в том числе к повышению экспрессии генов, кодирующих медиаторы воспаления и микробицидные эффекторные молекулы.

В клетках врожденного иммунитета, активированных через ПРР, развивается преходящее состояние толерантности, которое состоит в отсутствии продукции провоспалительных цитокинов при повторной стимуляции того же ПРР. Наиболее подробно описана толерантность к липополисахариду (ЛПС), который распознается рецептором TLR4 [1, 2], однако аналогичное состояние формируется и после стимуляции других ПРР [3–5]. Интересно, что у мышей, получивших сублетальную дозу агониста ПРР, повышается резистентность к ряду патогенов, несмотря на угнетение выработки провоспалительных цитокинов в ответ на повторное введение того же агониста [6–8]. Таким образом, то-

лерантность представляет собой не отсутствие ответа, а состояние измененной отвечаемости, благоприятное для организма.

S.L. Foster и соавт. обнаружили, что гены, индуцируемые в макрофагах мыши при стимуляции ЛПС *in vitro*, при рестимуляции тем же агонистом делятся на 2 группы [9]. Гены 1-й группы (толеризируемые) не отвечают на повторную стимуляцию или отвечают слабее, чем на 1-ю. Гены 2-й группы (нетолеризируемые) индуцируются при повторной стимуляции сильнее, чем при 1-й. Поскольку в 1-й группе присутствуют гены провоспалительных цитокинов, а во 2-й – гены антимикробных пептидов, толерантность в данной работе раскрывается как способ борьбы с патогенами, основанный на минимизации воспаления при одновременном усилении прямых микробицидных механизмов. Эта концепция согласуется с вышеупомянутыми работами о повышенной антимикробной резистентности мышей, у которых вызвана толерантность к агонистам ПРР. Индукция толерантности к агонистам ПРР рассматривается как один из возможных способов профилактики сепсиса, септического шока и других угрожающих жизни состояний, вызванных избыточным врожденным иммунным ответом на микроорганизмы [10].

Под кросс-толерантностью (перекрестной или гетерологической толерантностью) понимают ингибирование ответа на агонист одного PPP после предварительной стимуляции другого PPP. По данным А. Bagchi и соавт., кросс-толерантность между двумя PPP из группы Toll-подобных рецепторов (TLR) наблюдается в тех случаях, когда оба используют один и тот же проксимальный адаптер (например, MyD88) [3]. Если же у двух рецепторов общими являются только дистальные части сигнальных путей (например, факторы транскрипции), вместо кросс-толерантности может наблюдаться кросс-прайминг, т. е. усиление ответа [3].

В настоящее время не создано общепринятой теории толерантности к агонистам PPP. Ряд исследователей полагает, что первопричиной толерантности является деградация PPP и/или ингибирование проксимальных звеньев сигнальных путей [3, 4, 11]. Эта теория позволяет объяснить наблюдаемые закономерности кросс-толерантности [3], но не объясняет существование нетолеризируемых генов, описанных S.L. Foster и соавт. [9] и другими авторами [5], поскольку для индукции таких генов требуется сохранение активности сигнального пути. В свою очередь, S.L. Foster и соавт. полагают, что в основе толерантности лежит ремоделирование промоторов толеризируемых генов, исключающее активацию их экспрессии при повторной стимуляции PPP (и, соответственно, отсутствие такого ремоделирования в промоторах нетолеризируемых генов) [9]. Однако из этого следует, что стимуляция любого PPP должна вызывать неизбирательную кросс-толерантность к агонистам других PPP, а это не согласуется с экспериментальными наблюдениями, по крайней мере по кросс-толерантности между различными TLR [3].

В этой связи интерес представляет взаимное влияние NOD-подобных рецепторов NOD1 и NOD2 с одной стороны и Toll-подобного рецептора TLR4 с другой. Агонистами NOD1 и NOD2 являются мурамилпептиды – мономерные фрагменты пептидогликана бактерий, причем NOD1 избирательно распознает мурамилпептиды грам-отрицательных бактерий, содержащие остаток *мезо*-диаминопимелиновой кислоты (*мезо*-ДАП), а NOD2 – также мурамилпептиды грам-положительных бактерий [12–14]. TLR4 распознает ЛПС грам-отрицательных бактерий [15]. NOD-рецепторы и TLR4 играют ключевую роль во врожденном иммунном ответе на грам-отрицательные бактерии – наиболее частый этиологический фактор сепсиса [5]. NOD1 и NOD2 используют схожие сигнальные пути; адаптером для обоих рецепторов служит белок RIP2 [16, 17]. TLR4 передает сигнал через адаптеры MyD88 и TRIF [18, 19]. Таким образом, проксимальные звенья сигнальных путей NOD-рецепторов и TLR4 различаются, тогда как дистальные звенья во многом схожи; в частности, оба вида рецепторов активируют факторы транскрипции NF-κB [20, 21]. ЛПС и агонисты NOD1/NOD2, вводимые животным *in vivo* или добавляемые в культуры *in vitro* с интервалом 6–24 ч в любой последовательности, как правило, обладают кросс-праймирующим

действием [5, 22–25], что согласуется с концепцией А. Bagchi и соавт. [3]. Тем не менее, в ряде работ сообщается об ингибирующем действии агонистов NOD2 на ответы, индуцированные ЛПС [26–28]. Например, по данным М. Hedl и соавт., культивирование макрофагов человека с агонистом NOD2 – мурамилдипептидом (МДП) – в течение 24–48 ч приводит к полному подавлению продукции факторов некроза опухоли (ФНО), интерлейкина (ИЛ)-1β и ИЛ-8 при последующем добавлении ЛПС [28].

Чтобы уточнить механизмы толерантности к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4, мы индуцировали состояние толерантности в макрофагах человека *in vitro* путем культивирования с агонистом TLR4 (ЛПС) или с агонистом NOD1 [N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамил-*мезо*-диаминопимелиновой кислотой (М-триДАП)] в течение 24 ч и затем изучили ответ таких макрофагов на рестимуляцию тем же агонистом и на перекрестную стимуляцию. Ответ оценивали по продукции цитокинов, экспрессии генов иммунного ответа и усилению гликолиза.

Материал и методы

Реактивы. Реактив М-триДАП (агонист NOD1 с небольшой активностью в отношении NOD2) произведен фирмой «Invivogen» (США). ЛПС *E.coli* O111:B4, производство «Merck Millipore» (США), был проверен на отсутствие значимых примесей агонистов NOD-рецепторов с помощью тест-системы, описанной ранее [29]. Оба агониста разводили на свободной от эндотоксина воде. Рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) человека произведен фирмой «Milenyi Biotec» (ФРГ). Полная культуральная среда (ПКС) представляла собой RPMI-1640 (Life Technologies, Великобритания) с добавлением 2 мМ L-глутамин (Life Technologies) и 10 % фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия).

Культивирование и стимуляция макрофагов. Исследование одобрено Комитетом по этике Института иммунологии (протокол № 10/2017). Макрофаги получали путем культивирования моноцитов крови здоровых доноров с ГМ-КСФ в течение 6 сут [30]. Для индукции толерантности макрофаги культивировали в течение 24 ч в ПКС в присутствии М-триДАП (10 мкг/мл), ЛПС (100 нг/мл) или без агонистов. Указанные концентрации агонистов были определены в предшествующих работах как наименьшие концентрации, при которых ответ макрофагов достигает верхнего плато (по продукции ФНО) [31]. Затем удаляли среду, осторожно отмывали клетки теплой RPMI-1640 (2 раза), после чего заполняли лунки свежей ПКС. Через 30 мин вновь вносили агонисты в тех же концентрациях, в контрольные лунки агонисты не добавляли. Через 3 и 24 ч после повторного внесения агонистов собирали супернатанты для анализа цитокинов, через 4 ч – клеточные лизаты для анализа экспрессии генов [9]. Супернатанты и лизаты хранили при -70 °С.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Уровни ФНО и ИЛ-6 в супернатантах клеточных культур определяли с помощью наборов фирмы «eBioscience/Thermo Fisher» (США).

Исследование экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ). В макрофагах от 3 различных доноров исследовали экспрессию 17 генов из следующих категорий: гены провоспалительных цитокинов (*IL1B*, *IL6*, *IL12B*, *IL23A*, *TNF*), гены противовоспалительных цитокинов (*IL10*), гены маркеров интерфероновой реакции (*MX1*), гены рецепторов мурамилпептидов и их адаптера [*NLR1* (*NOD1*), *NLR2* (*NOD2*), *RIPK2* (*RIP2*)], гены факторов транскрипции семейства NF- κ B [*NFKB1* (*NFKB-p50*), *RELA* (*p65*)], гены негативных регуляторов NF- κ B-сигналинга [*NFKBIA* (*IKBA*), *TNFAIP3* (*A20*)], нетолеризуемые гены из работы S.L. Foster и соавт. [9] (ген рецептора формилпептидов *FPR1*, ген простагландин-Е-синтазы *PTGES*), гены возможных медиаторов ЛПС-толерантности (*WNT5A* [32]). Условия ОТ-ПЦР-РВ были описаны ранее [30, 33]. Относительную экспрессию (ОЭ) генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ с нормализацией на экспрессию *GAPDH* и на экспрессию данного гена в контрольном образце (нестимулированные клетки данного донора). Значимыми считали различия ОЭ более чем в 2 раза.

Все изучаемые гены классифицировали по их индуцибельности при первичной стимуляции и рестимуляции, для чего использовали критерии, приведенные в табл. 1. Гены считали индуцибельными, если их экспрессия при первичной стимуляции возрастала в 2 раза и более по сравнению с нестимулированными макрофагами. Индуцибельные гены классифицировали на толеризуемые, гипо-, нормо- и гипериндуцибельные. В отличие от предыдущих работ [5, 9], экспрессию каждого гена в толеризованных макрофагах через 4 ч после рестимуляции (агонист 1 $\rightarrow$ агонист 2) сравнивали не только с экспрессией этого же гена в наивных макрофагах (0 $\rightarrow$ агонист 2), но и с экспрессией в толеризованных макрофагах после рекультивирования без агонистов (агонист 1 $\rightarrow$ 0). Это позволило отличить ответ гена на рестимуляцию от продолжающегося ответа на первичную стимуляцию. Классификацию строили для

каждой последовательности стимулов (М-триДАП $\rightarrow$ М-триДАП, ЛПС $\rightarrow$ ЛПС, М-триДАП $\rightarrow$ ЛПС, ЛПС $\rightarrow$ М-триДАП).

Анализ клеточного метаболизма в реальном времени. Скорость закисления внеклеточной среды (extracellular acidification rate, ECAR) измеряли на приборе «Seahorse XFe96 Analyzer» (Agilent Technologies, США), как описано ранее [33]. Вкратце, макрофаги высевали в планшеты Seahorse XF96 (Agilent Technologies, США) по 16 000 клеток на лунку в 80 мкл ПКС. Давали клеткам прикрепиться, после чего вносили требуемые агонисты (1-я стимуляция). Через 24 ч клетки отмывали 2 раза средой XF base medium (Agilent Technologies, США) с добавлением 2 mM L-глутамин, 11 mM D-глюкозы (Sigma) и 10 % фетальной телячьей сыворотки и заполняли лунки 80 мкл той же среды. Выполняли 3 измерения ECAR, затем впрыскивали агонисты и делали еще 22 измерения. Вычисляли площади под кривыми «время-ответ» (AUC) после добавления агонистов.

Статистический анализ. Достоверность различий между группами оценивали с помощью парного *t*-теста. Различия долей анализировали с помощью теста χ^2 .

Результаты

Продукция ФНО и ИЛ-6 наивными и толеризованными макрофагами

Основным проявлением толерантности является блокировка выработки провоспалительных медиаторов в ответ на повторную стимуляцию данным агонистом. Наивные макрофаги отвечают выраженной секрецией ФНО при стимуляции М-триДАП и ЛПС (0 $\rightarrow$ М-триДАП, 0 $\rightarrow$ ЛПС). Макрофаги, простимулированные агонистами в течение 24 ч, отмывые и рекультивированные 3 ч без агонистов (М-триДАП $\rightarrow$ 0, ЛПС $\rightarrow$ 0), высвобождают небольшое, но более высокое количество ФНО, чем нестимулированные клетки (0 $\rightarrow$ 0), что указывает на продолжающуюся экспрессию гена *TNF*, вызванную первичной стимуляцией (рис. 1А, Б). Макрофаги, простимулированные 24 ч М-триДАП или ЛПС и рекультивированные 3 или 24 ч с тем же агонистом (М-триДАП $\rightarrow$ М-триДАП, ЛПС $\rightarrow$ ЛПС), вырабатывают такое же количество ФНО, что и при рекультивировании без агонистов, а это говорит о наступлении гомологичной

Таблица 1. Критерии классификации генов по соотношениям экспрессии (по данным ОТ-ПЦР-РВ)*

Показатель	Отношения экспрессии		
	<u>0 $\rightarrow$ агонист 2</u> 0 $\rightarrow$ 0	<u>Агонист 1 $\rightarrow$ агонист 2</u> Агонист 1 $\rightarrow$ 0	<u>Агонист 1 $\rightarrow$ агонист 2</u> 0 $\rightarrow$ агонист 2
Неиндуцибельные	≤ 2	≤ 2	Любое
Толеризуемые	> 2	≤ 2	Любое
Гипоиндуцибельные	> 2	> 2	$< 0,5$
Нормоиндуцибельные	> 2	> 2	$\geq 0,5$, но ≤ 2
Гипериндуцибельные	> 2	> 2	> 2
Индукция <i>de novo</i>	≤ 2	> 2	> 2

Примечание. * – Агонист 1 добавляли на 24 ч для индукции толерантности, агонист 2 – на 4 ч для рестимуляции; агонисты 1 и 2 могут совпадать; 0 – культивирование без агонистов.

Рис. 1. Продукция ФНО и ИЛ-6 наивными, М-триДАП-толеризованными и ЛПС-толеризованными макрофагами

Для индукции иммунной толерантности клетки культивировали без агонистов, с М-триДАП или с ЛПС в течение 24 ч (1-я стимуляция). Затем клетки рестиमुлировали в течение 3 ч (А) или 24 ч (Б, В), после чего оценивали продукцию ФНО (А, Б) и ИЛ-6 (В) с помощью ИФА. Результаты нормализованы по ответу наивных макрофагов на ЛПС (100 %). М ± σ, количество экспериментов: А – 7, Б – 5, В – 3. * – $p < 0,05$.

толерантности (толерантности к тому же агонисту). Отсутствие ответа на рестимуляцию не обусловлено снижением жизнеспособности макрофагов: при подсчете с трипановым синим доля погибших клеток после 24 ч культивирования с ЛПС, М-триДАП или без агонистов составила $< 1\%$. В то же время у ЛПС-толеризованных клеток достоверно усилен ответ на М-триДАП (ЛПС → М-триДАП) при оценке через 3 ч после рестимуляции, тогда как у М-триДАП-толеризованных макрофагов ответ на ЛПС в точке 3 ч после рестимуляции не изменен по сравнению с ответом наивных макрофагов, а в точке 24 ч – усилен (см. рис. 1А, Б). Это указывает на отсутствие кросс-толерантности и наличие кросс-праймаинга между агонистами NOD1 и TLR4 по данному параметру (продукция ФНО).

Схожая картина наблюдалась и по секреции ИЛ-6, с тем исключением, что ЛПС-толеризованные макро-

фаги при рестимуляции ЛПС вырабатывали существенные количества этого цитокина ($40 \pm 29\%$ от продукции наивными ЛПС-стимулированными макрофагами; рис. 1В).

Экспрессия генов в наивных и толеризованных макрофагах

М-триДАП при 4-часовой стимуляции наивных макрофагов индуцировал экспрессию 14 генов из 17 исследованных. При рестимуляции М-триДАП все эти гены вели себя как толеризуемые: их экспрессия не возрастала сверх той, которая была достигнута в результате первичной стимуляции к моменту времени $24 + 4$ ч (в культурах М-триДАП → 0). Единственное исключение составил ген *IL12B* в опыте 1, который оказался гипоиндуцибельным (рис. 2, табл. 2).

Таблица 2. Результаты классификации генов на основе критериев, приведенных в табл. 1*

Гены	Стимуляция			
	М-триДАП → М-триДАП	ЛПС → ЛПС	ЛПС → М-триДАП	М-триДАП → ЛПС
Неиндуцибельные	14	3	12	3
Толеризуемые	36	28	3	3
Гипоиндуцибельные	1	12	0	9
Нормоиндуцибельные	0	6	7	32
Гипериндуцибельные	0	2	27	4
Индукция <i>de novo</i>	0	0	2	0

Примечание. * – количество генов суммировано по 3 экспериментам (см. рис. 2); достоверность различий между 4 последовательностями стимуляции – $p < 0,0001$ в тесте χ^2 .

ЛПС индуцировал экспрессию всех 17 исследованных генов в наивных макрофагах. При рестимуляции ЛПС большинство из них вели себя как толеризуемые, однако примерно треть генов классифицировалась как гипо- и нормоиндуцибельные (см. рис. 2, табл. 2). В частности, ген *IL6* обладал свойствами гипоиндуцибельного в 3 опытах из 3, что согласуется с результатами ИФА, показавшими продукцию ИЛ-6 ЛПС-толери́зованными клетками при рестимуляции ЛПС (см. рис. 1Б). В то же время гены *FPR1* и *PTGES* (представители «нетолеризуемых» генов из работы S.L. Foster и соавт. [9]) оказались либо неиндуцибельными, либо толеризуемыми. Гипериндуцибельность в условиях ЛПС → ЛПС наблюдалась лишь для гена *WNT5A* (у доноров 2 и 3; у донора 1 этот ген был нормоиндуцибельным; см. рис. 2 и табл. 2).

Другая картина наблюдалась при перекрестной стимуляции. Так, если макрофаги обрабатывали ЛПС в течение 24 ч, а потом стимулировали М-триДАП (ЛПС → М-триДАП), то большинство М-триДАП-индуцибельных генов вели себя как гипериндуцибельные. Лишь в редких случаях наблюдалась толеризация, не было ни одного случая гипоиндуцибельности (см. рис. 2). Интересно, что во всех 3 экспериментах наблюдалась гипериндуцибельность гена *RIPK2*, кодирующего адаптер для рецепторов NOD1 и NOD2, что может частично объяснять гиперответ ЛПС-толери́зованных клеток на М-триДАП.

При обратной последовательности стимулов (М-триДАП → ЛПС) большинство ЛПС-индуцибельных генов вели себя как нормоиндуцибельные; случаи толеризации и гипериндуцибельности были редки (см. рис. 2). Таким образом, при перекрестной стимуляции наблюдается либо кросс-праймирующее влияние, либо отсутствие взаимного влияния рецепторов NOD1 и TLR4, тогда как кросс-толеризация не характерна.

Скорость закисления внеклеточной среды наивными и толеризованными макрофагами

Повышение скорости закисления внеклеточной среды отражает ранние этапы перехода клеток на гликолитический тип метаболизма и является универсальным ответом макрофагов на стимуляцию различными PPP [33, 34]. Базальные показатели ECAR у наивных и толеризованных макрофагов существенно не различались (рис. 3А, Б). После добавления агонистов NOD1 или TLR4 к наивным макрофагам наблюдался характерный подъем ECAR с выходом на максимум примерно через 2 ч (см. рис. 3А). У клеток, прокультивированных 24 ч с М-триДАП и с ЛПС, отмечалось полное отсутствие ответа на те же агонисты, что говорит о наступлении гомологичной толерантности (см. рис. 3А, Б). При перекрестной стимуляции наблюдалось частичное ингибирование ответа: у М-триДАП-толери́зованных клеток был снижен ответ на ЛПС, тогда как у ЛПС-толери́зованных макрофагов был снижен ответ на М-триДАП (см. рис. 3А, Б). Таким образом, имеет место кросс-толери́зующее влияние агонистов NOD1 и TLR4 на активацию гликолиза.

Агонист 1	М-триДАП			ЛПС			ЛПС			М-триДАП		
Агонист 2	М-триДАП			ЛПС			М-триДАП			ЛПС		
Опыт №	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>IL1B</i>												
<i>IL6</i>												
<i>IL12B</i>												
<i>IL23A</i>												
<i>TNF</i>												
<i>IL10</i>												
<i>MX1</i>		*						*	*	*		
<i>NLR1</i>												
<i>NLR2</i>								*	*			
<i>RIPK2</i>												
<i>NFKB1</i>												
<i>RELA</i>												
<i>NFKBIA</i>												
<i>TNFAIP3</i>												
<i>FPR1</i>					*			*	*	*		
<i>PTGES</i>												
<i>WNT5A</i>

Рис. 2. Классификация генов по их экспрессии после индукции иммунной толерантности агонистом 1 (24 ч) и рестимуляции агонистом 2 (4 ч)

Критерии классификации приведены в табл. 1. Эксперименты были поставлены на макрофагах от 3 различных доноров. * – экспрессия этих генов не индуцируется в наивных макрофагах в точке 4 ч (0 → агонист 2), но повышена в толеризованных макрофагах в точке 24 + 4 ч (агонист 1 → 0); при рестимуляции агонистом 2 экспрессия не возрастает [(агонист 1 → агонист 2) / (агонист 1 → 0) < 2].

Обсуждение

Постактивационная толерантность – одно из фундаментальных свойств врожденной иммунной системы, которое может быть использовано в терапевтических целях для повышения резистентности против патогенных микроорганизмов [7]. В данной работе впервые сопоставлены свойства макрофагов человека, толеризованных к агонистам рецепторов NOD1 и TLR4. В обоих случаях наблюдалась полная блокировка некоторых видов ответов макрофагов при рестимуляции тем же агонистом: отсутствовала продукция ФНО, не происходило усиление гликолиза (см. рис. 1, 3). Однако выявлены и различия. В макрофагах, толеризованных к М-триДАП, практически полностью отсутствовал транскрипционный ответ на повторную стимуляцию М-триДАП

(см. рис. 2). Однако в ЛПС-толеризованных макрофагах некоторые гены сохраняли способность отвечать на ЛПС. Наличие гипо-, нормо- и даже гипериндуцибельных генов при стимуляции ЛПС → ЛПС указывает на сохраняющуюся функциональную активность рецептора TLR4 в ЛПС-толеризованных клетках. Таким образом, частично подтверждены результаты предыдущей работы [9], где сообщалось о наличии «нетолеризуемых» генов в ЛПС-толеризованных макрофагах. Однако в предыдущих работах [5, 9] для выявления таких генов использовались довольно мягкие критерии: нетолеризуемыми считались гены, у которых при повторной стимуляции данным агонистом экспрессия была выше, чем при первичной стимуляции ([ЛПС → ЛПС] / [0 → ЛПС] > 1). Данный подход не позволял отличить ответ на повторную стимуляцию от продолжающегося ответа на первичную стимуляцию. При применении более строгих критериев (см. табл. 1) два «нетолеризуемых» гена, указанных в работе [9], оказались толеризуемыми (см. рис. 2).

Единственным нетолеризуемым (гипериндуцибельным) геном при стимуляции ЛПС → ЛПС в нашей работе оказался *WNT5A*. Этот ген был гипериндуцибельным и при других последовательностях стимуляции, кроме М-триДАП → М-триДАП (см. рис. 2). *WNT5A* относится к семейству генов *WNT*, играющих важную роль в эмбриональном развитии, онко- и патогенезе воспалительных заболеваний [35]. Белковые продукты генов *WNT* представляют собой секретируемые липогликопротеины, которые связываются с рецепторами семейства Frizzled и ряда других [36] и действуют преимущественно ауто- и паракринно. По некоторым данным, белок *WNT5A* также является лигандом рецепторов TLR2 и TLR4 [32]. Связывание *WNT5A* с TLR4 и/или TLR2 вызывает активацию неканонического сигнального пути, приводящего к повышению продукции ИЛ-10 и ИЛ-6 и ингибированию продукции ФНО [32, 37, 38]. Роль *WNT5A* в механизмах толерантности заслуживает дальнейшего изучения.

S.L. Foster и соавт. предположили, что толеризация экспрессии генов в результате стимуляции ЛПС обусловлена инактивирующими модификациями хроматина в промоторных областях (эпигенетическая теория толерантности) [9]. Наши данные не подтверждают эту теорию: гены, не отвечающие на рестимуляцию тем же агонистом (М-триДАП → М-триДАП, ЛПС → ЛПС), при рестимуляции другим агонистом сохраняют индуцибельность (М-триДАП → ЛПС) или становятся гипериндуцибельными (ЛПС → М-триДАП), причем данные закономерности наблюдаются для генов различных функциональных групп с разными механизмами регуляции (см. рис. 2). Сохранение индуцибельности генов было бы невозможно при инактивации промоторов. Эти данные указывают, что феномен толерантности связан с ингибированием передачи сигнала от конкретных ПРР, что согласуется с выводами упомянутой выше работы А. Bagchi и соавт. [3].

При активации макрофагов через ПРР происходит быстрое усиление гликолиза, которое связывают с перераспределением молекул гексокиназы-II из цитозоля на наружную мембрану митохондрий [39, 40]. Данный вид ответа не требует экспрессии генов *de novo* [34], поэтому его полное ингибирование в толеризованных макрофагах при рестимуляции тем же агонистом (см. рис. 3А, Б) тоже свидетельствует в пользу рецепторно-сигнальной, а не эпигенетической теории толерантности. Интересно, что данный вид ответа час-

точно ингибировался при перекрестной стимуляции М-триДАП → ЛПС и ЛПС → М-триДАП (см. рис. 3А, Б). Быстрое усиление гликолиза при стимуляции ПРР регулируется сигнальным путем PI-3K – Akt [33, 40, 41]. Можно предположить, что в М-триДАП- и ЛПС-толеризованных макрофагах имеет место общее снижение активности этого пути, однако это предположение требует экспериментальной проверки.

Таким образом, М-триДАП-толеризованные макрофаги характеризуются более полным ингибированием транскрипционного ответа на рестимуляцию М-триДАП, чем ЛПС-толеризованные макрофаги при рестимуляции ЛПС. Не выявлено значимого кросс-толерирующего действия агонистов NOD1 и TLR4 на экспрессию генов. Впервые показано, что в макрофагах, толеризованных к агонистам NOD1 и TLR4, ингибируется активационное усиление гликолиза: при воздействии тем же агонистом – полностью, при перекрестном воздействии – частично. Полученные данные объясняются в рамках рецепторно-сигнальной теории толерантности.

Вклад авторов

Постановка экспериментов, анализ результатов – Николаева А.М.; участие в анализе метаболизма макрофагов в реальном времени на приборе «Seahorse XFe96 Analyzer» – Максимчик П.В.; постановка экспериментов, анализ результатов, написание статьи – Пашенков М.В.

Литература

1. Beeson P.B., Roberts E. Tolerance to bacterial pyrogens: I. factors influencing its development. *J. Exp. Med.* 1947; 86 (1): 29–38.
2. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101 (1): 107–19.
3. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.-S., Valentine C. et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178 (2): 1164–71.
4. Lee K.H., Biswas A., Liu Y.J., Kobayashi K.S. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (47): 39 800–11.
5. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Núñez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2008; 28 (2): 246–57.
6. Lehner M.D., Ittner J., Bundschuh D.S., Van Rooijen N., Wendel A., Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect. Immun.* 2001; 69 (1): 463–71.
7. Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: Is there a clinical relevance? *J. Endotoxin Res.* 2003; 9 (2): 101–7.
8. Пашенков М.В., Попилук С.Ф., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Феденко Е.С., Хаитов Р.М. и др. Иммунобиологические свойства мурамилпептидных фрагментов пептидогликана грамотрицательных бактерий. *Иммунология.* 2010; 31 (3): 119–25.
9. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007; 447 (7147): 972–8.
10. Пинегин Б.В., Пашенков М.В., Пинегин В.Б., Хаитов Р.М. Эпителиальные клетки слизистых оболочек и новые подходы к иммунопрофилактике и иммунотерапии инфекционных заболеваний. *Иммунология.* 2020; 41 (6): 12–26.
11. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101 (1): 107–19.
12. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of mucopeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160784>
13. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.
14. Girardin S.E., Travassos L.H., Hervé M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
15. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282 (5396): 2085–8.
16. Park J.-H., Kim Y.-G., McDonald C., Kanneganti T.-D., Hasegawa M., Body-Malapel M. et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J. Immunol.* 2007; 178 (4): 2380–6.
17. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.* 2014; 4 (12): e140178. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.140178>
18. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H. et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003; 301 (5633): 640–3.
19. Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999; 11 (1): 115–22.
20. Abbott D.W., Yang Y., Hutt J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.
21. Windheim M., Lang C., Pegg M., Plater L.A., Cohen P. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem. J.* 2007; 404 (2): 179–90.

22. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.
23. Shikama Y., Kuroishi T., Nagai Y., Iwakura Y., Shimachi H., Takada H. et al. Muramyl dipeptide augments the actions of lipopolysaccharide in mice by stimulating macrophages to produce pro-IL-1 β and by down-regulation of the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *Innate Immun.* 2011; 17 (1): 3–15.
24. Hiemstra I.H., Bouma G., Geerts D., Kraal G., de Haan J.M.M. Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol. Immunol.* 2012; 52 (3–4): 264–72.
25. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiernemann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.
26. Watanabe T., Asano N., Murray P.J., Ozato K., Tailor P., Fuss I.J. et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (2): 545–59.
27. Kullberg B.J., Ferwerda G., De Jong D.J., Drenth J.P.H., Joosten L.A.B., Van Der Meer J.W.M. et al. Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology.* 2008; 123 (4): 600–5.
28. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (49): 19 440–5.
29. Dagil Y.A., Sharova V.S., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. A cell-based test system for the assessment of pharmacokinetics of NOD1 and NOD2 receptor agonists. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 63: 94–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.037>
30. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600467>.
31. Пашенков М.В., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Пинегин Б.В. Индукция толерантности макрофагов человека к липополисахариду и мурамилпептидам грамотрицательных бактерий. *Российский иммунологический журнал.* 2012; 6 (3): 246–52.
32. Mehmeti M., Bergenfelz C., Källberg E., Millrud C.R., Björk P., Ivars F. et al. Wnt5a is a TLR2/4-ligand that induces tolerance in human myeloid cells. *Commun. Biol.* 2019; 2: 176. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0432-4>
33. Murugina N.E., Budikhina A.S., Dagil Y.A., Maximchik P.V., Balyasova L.S., Murugin V.V. et al. Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No association with proinflammatory cytokine production in normoxia. *J. Biol. Chem.* 2020; 295 (10): 3099–114.
34. Tan Y., Kagan J.C. Innate immune signaling organelles display natural and programmable signaling flexibility. *Cell.* 2019; 177 (2): 384–98.e11.
35. Clevers H., Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012; 149 (6): 1192–205.
36. Gordon M.D., Nusse R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (32): 22 429–33.
37. Bergenfelz C., Medrek C., Ekström E., Jirstrom K., Janols H., Wullt M. et al. Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J. Immunol.* 2012; 188 (11): 5448–58.
38. Dong S., Wu C., Hu J., Wang Q., Chen S., Wang Z. et al. Wnt5a promotes cytokines production and cell proliferation in human hepatic stellate cells independent of canonical Wnt pathway. *Clin. Lab.* 2015; 61 (5–6): 537–47.
39. John S., Weiss J.N., Ribalet B. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17674. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017674>
40. Everts B., Amiel E., Huang S.C.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y. et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.
41. Miyamoto S., Murphy A.N., Brown J.H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (3): 521–9.

■ References

1. Beeson P.B., Roberts E. Tolerance to bacterial pyrogens: I. factors influencing its development. *J. Exp. Med.* 1947; 86 (1): 29–38.
2. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101 (1): 107–19.
3. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.-S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178 (2): 1164–71.
4. Lee K.H., Biswas A., Liu Y.J., Kobayashi K.S. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (47): 39 800–11.
5. Kim Y.G., Park J.H., Shaw M.H., Franchi L., Inohara N., Núñez G. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2008; 28 (2): 246–57.
6. Lehner M.D., Ittner J., Bundschuh D.S., Van Rooijen N., Wendel A., Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect. Immun.* 2001; 69 (1): 463–71.
7. Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: Is there a clinical relevance? *J. Endotoxin Res.* 2003; 9 (2): 101–7.
8. Pashenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Fedenko E.S., Khaikov R.M., et al. Immunobiological properties of muropeptide fragments of peptidoglycan of Gram-negative bacteria. *Immunologiya.* 2010; 31 (3): 119–25. (in Russian)
9. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature.* 2007; 447 (7147): 972–8.
10. Pinegin B.V., Pashenkov M.V., Pinegin V.B., Khaikov R.M. Mucosal epithelial cells and novel approaches to immunoprophylaxis and immunotherapy of infectious diseases. *Immunologiya.* 2020; 41 (6): 12–26. (in Russian)
11. Seeley J.J., Ghosh S. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J. Leukoc. Biol.* 2017; 101 (1): 107–19.
12. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of muropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160784>
13. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.
14. Girardin S.E., Travassos L.H., Hervé M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
15. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998; 282 (5396): 2085–8.
16. Park J.-H., Kim Y.-G., McDonald C., Kanneganti T.-D., Hasegawa M., Body-Malapel M., et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J. Immunol.* 2007; 178 (4): 2380–6.
17. Boyle J.P., Parkhouse R., Monie T.P. Insights into the molecular basis of the NOD2 signalling pathway. *Open Biol.* 2014; 4 (12): e140178. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.140178>
18. Yamamoto M., Sato S., Hemmi H., Hoshino K., Kaisho T., Sanjo H., et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003; 301 (5633): 640–3.
19. Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999; 11 (1): 115–22.
20. Abbott D.W., Yang Y., Hutt J.E., Madhavarapu S., Kelliher M.A., Cantley L.C. Coordinated regulation of Toll-like

receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol. Cell. Biol.* 2007; 27 (17): 6012–25.

21. Windheim M., Lang C., Pegg M., Plater L.A., Cohen P. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem. J.* 2007; 404 (2): 179–90.

22. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1 (9–10): 1857–65.

23. Shikama Y., Kuroishi T., Nagai Y., Iwakura Y., Shimauchi H., Takada H., et al. Muramyl dipeptide augments the actions of lipopolysaccharide in mice by stimulating macrophages to produce pro-IL-1 β and by down-regulation of the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). *Innate Immun.* 2011; 17 (1): 3–15.

24. Hiemstra I.H., Bouma G., Geerts D., Kraal G., de Haan J.M.M. Nod2 improves barrier function of intestinal epithelial cells via enhancement of TLR responses. *Mol. Immunol.* 2012; 52 (3–4): 264–72.

25. Murch O., Abdelrahman M., Kapoor A., Thiemeermann C. Muramyl dipeptide enhances the response to endotoxin to cause multiple organ injury in the anesthetized rat. *Shock.* 2008; 29 (3): 388–94.

26. Watanabe T., Asano N., Murray P.J., Ozato K., Tailor P., Fuss I.J., et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J. Clin. Invest.* 2008; 118 (2): 545–59.

27. Kullberg B.J., Ferwerda G., De Jong D.J., Drenth J.P.H., Joosten L.A.B., Van Der Meer J.W.M., et al. Crohn's disease patients homozygous for the 3020insC NOD2 mutation have a defective NOD2/TLR4 cross-tolerance to intestinal stimuli. *Immunology.* 2008; 123 (4): 600–5.

28. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007; 104 (49): 19 440–5.

29. Dagil Y.A., Sharova V.S., Pinegin B.V., Pashenkov M.V. A cell-based test system for the assessment of pharmacokinetics of NOD1 and NOD2 receptor agonists. *Int. Immunopharmacol.* 2018; 63: 94–100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.037>

30. Pashenkov M.V., Balyasova L.S., Dagil Y.A., Pinegin B.V. The role of the p38-MNK-eIF4E signaling axis in TNF production downstream of the NOD1 receptor. *J. Immunol.* 2017; 198 (4): 1638–48. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600467>.

31. Pashenkov M.V., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Pinegin B.V. Induction of tolerance of human macrophages to lipopolysaccharide and muramyl peptides from gram-negative bacteria. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal.* 2012; 6 (3): 246–52. (in Russian)

32. Mehmeti M., Bergenfelz C., Källberg E., Millrud C.R., Björk P., Ivars F., et al. Wnt5a is a TLR2/4-ligand that induces tolerance in human myeloid cells. *Commun. Biol.* 2019; 2: 176. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0432-4>

33. Murugina N.E., Budikhina A.S., Dagil Y.A., Maximchik P.V., Balyasova L.S., Murugin V.V., et al. Glycolytic reprogramming of macrophages activated by NOD1 and TLR4 agonists: No association with proinflammatory cytokine production in normoxia. *J. Biol. Chem.* 2020; 295 (10): 3099–114.

34. Tan Y., Kagan J.C. Innate immune signaling organelles display natural and programmable signaling flexibility. *Cell.* 2019; 177 (2): 384–98.e11.

35. Clevers H., Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012; 149 (6): 1192–205.

36. Gordon M.D., Nusse R. Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J. Biol. Chem.* 2006; 281 (32): 22 429–33.

37. Bergenfelz C., Medrek C., Ekström E., Jirström K., Janols H., Wullt M., et al. Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J. Immunol.* 2012; 188 (11): 5448–58.

38. Dong S., Wu C., Hu J., Wang Q., Chen S., Wang Z., et al. Wnt5a promotes cytokines production and cell proliferation in human hepatic stellate cells independent of canonical Wnt pathway. *Clin. Lab.* 2015; 61 (5–6): 537–47.

39. John S., Weiss J.N., Ribalet B. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17674. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017674>

40. Everts B., Amiel E., Huang S.C.C., Smith A.M., Chang C.H., Lam W.Y., et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* 2014; 15 (4): 323–32.

41. Miyamoto S., Murphy A.N., Brown J.H. Akt mediates mitochondrial protection in cardiomyocytes through phosphorylation of mitochondrial hexokinase-II. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (3): 521–9.

Сведения об авторах

Николаева Анна Михайловна – студентка VI курса биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: annanikolaeva.msu@gmail.com

Максимчик Полина Валентиновна – аспирант лаборатории изучения механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация
E-mail: pollymaxbox@gmail.com

Пашенков Михаил Владимирович – д-р мед. наук, и.о. зав. лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Authors' information

Anna M. Nikolaeva – Student of the 6th year, Biological Faculty, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation
E-mail: annanikolaeva.msu@gmail.com

Polina V. Maksimchik – Postgraduate Student of the Laboratory of Investigation of Mechanisms of Apoptosis, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov MSU, Moscow, Russian Federation
E-mail: pollymaxbox@gmail.com

Mikhail V. Pashenkov – MD, PhD, Acting Head of the Laboratory of Clinical Immunology of the NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>