

УДК 612.08[616+615.32]

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИМЕРНОГО ГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ

М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Приведены результаты по изучению эффектов циклического димерного гуанозинмонофосфата c-di-GMP и его структурных аналогов – циклического димерного 2'-арагуанозинмонофосфата (c-di-araGMP) и циклического димерного 2'-дезоксигуанозинмонофосфата (c-di-deoxyGMP) на вне- и внутриклеточную продукцию фактора некроза опухоли альфа, интерферонов 1-го и 2-го типов мононуклеарами периферической крови человека при неспецифической и миелин-специфической стимуляции *in vitro*. Установлено, что циклические динуклеотиды оказывают стимулирующее влияние на продукцию ФНО- α , ИФН- α и ИФН- γ митоген-активированными мононуклеарами периферической крови человека, при одновременном ингибировании c-di-GMP в концентрации 10^{-4} М и 10^{-5} М секреции *in vitro* внеклеточных интерферонов 1-го и 2-го типов при миелин-специфической стимуляции. Полученные результаты открывают широкую перспективу для разработки новых препаратов, направленных на регуляцию противoinфекционного иммунитета и поддержание периферической толерантности иммунной системы по отношению к собственным антигенам организма человека, а также свидетельствуют о важности проведения дальнейших исследований, направленных на изучение эффектов данных соединений при иммунопатологических состояниях.

Ключевые слова: иммуномодуляция; циклический димерный гуанозинмонофосфат; интерферон гамма; интерферон альфа; фактор некроза опухоли альфа.

IMMUNOMODULATING PROPERTIES OF CYCLIC DIMERIC GUANOZINMONOPHOSPHATE AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES

М. М. ZAFRANSKAYA^a

^aBelarusian State University,
International Sakharov Environmental Institute,
Dolgobrodskaya street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

The results of studying the effects of cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) and its structural analogues – cyclic dimeric 2'-araguanosine monophosphate (c-di-araGMP) and cyclic dimeric 2'-deoxyguanasine monophosphate (c-di-deoxyGMP) on the extra- and intracellular production of tumor necrosis factor alfa, type 1 and type 2 interferons by human peripheral blood mononuclear cells during *in vitro* non-specific and myelin-specific stimulation are presented in the paper. Cyclic dinucleotides have been established to have a stimulating effect on the production of TNF- α , IFN- α and IFN- γ by mitogen-activated human peripheral blood mononuclear cells with a simultaneous inhibition

Образец цитирования:

Зафранская М. М. Иммуномодулирующие свойства циклического димерного гуанозинмонофосфата и его структурных аналогов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2018. № 4. С. 84–93.

For citation:

Zafranskaya M. M. Immunomodulating properties of cyclic dimeric guanozinmonophosphate and its structural analogues. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2018. No. 4. P. 84–93 (in Russ.).

Авторы:

Марина Михайловна Зафранская – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии и экологической эпидемиологии.

Authors:

Marina M. Zafranskaya, doctor of sciences (medical), associate professor, head of the department of immunology and environmental epidemiology.
zafranskaya@gmail.com

by c-di-GMP at concentration of 10^{-4} M and 10^{-5} M of extracellular type I and type II interferons during myelin-specific stimulation secretion *in vitro*. The obtained results open up a broad perspective for developing new drugs aimed at regulating anti-infective immunity and maintaining peripheral tolerance of the immune system in relation to the human organism own antigens, and also demonstrate the need in further research for studying the effects of these compounds in immunopathological conditions.

Key words: immunomodulation; cyclic dimeric guanosinmonophosphate; interferon gamma; interferon alfa; tumor necrosis factor alfa.

Введение

Для поиска средств и способов целенаправленного воздействия на развитие иммунологических процессов в условиях различного экологического воздействия необходимо понимание регуляторных механизмов, контролирующих иммуногенез и патогенез на молекулярном уровне. При этом в последнее время огромное внимание уделяется изучению закономерностей функционирования внутриклеточных сигнальных путей, реализующих эффекты биологически активных веществ, неспособных проникать через плазматическую мембрану клеток (гормонов, нейромедиаторов, цитокинов и т. д.). Такими «вторичными» посредниками являются инозитолтрифосфат, фосфатидилинозитол, диацилглицерол, а также циклические димерные пуриннуклеозидмонофосфаты (циклические аденозинмонофосфат и гуанозинмонофосфат) [1].

Система врожденного иммунитета действует как первая линия защиты. Иммунный ответ зависит от своевременного распознавания патогенных структур с участием различных паттерн-распознающих рецепторов (PRRs – Pattern recognition receptors) клеточной поверхности и передачи сигналов с участием адапторных и эффекторных молекул для проявления специфических реакций. PRRs узнают чужеродные структуры – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs – Pathogen-associated molecular patterns), присутствующие у бактерий, вирусов и грибов, а также собственные молекулярные структуры, связанные с повреждениями или гибелью клеток (DAMPs – Damage associated molecular pattern molecules). Они обеспечивают функционирование целого ряда перекрывающихся процессов (активация фактора NF-κB, продукция интерферонов (IFN), созревание цитокинов и клеточная гибель) [2–4]. Первой линией инициации врожденного иммунитета являются четыре основных сигнальных пути, включающие активированные Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), инфламмосомы и сигнальную систему cGAS/STING, которые отличаются своей клеточной локализацией, специфичностью к лигандам и механизмом передачи сигнала [5; 6].

Появление чужеродной двухцепочечной ДНК в цитоплазме клеток млекопитающих служит «сигналом опасности», приводя к связыванию этой ДНК с синтетазой циклического димерного GMP-AMP (cGAS, рис. 1a). Активированная cGAS обладает выраженной иммуномодулирующей активностью, в частности катализирует образование вторичного мессенджера $c[G(2',5')pA(3',5')p]$ с необычной 2',5'-связью, который инициирует последующую активацию пути синтеза интерферонов I типа [5; 7–9]. Несмотря на высокую иммуностимулирующую активность $c[G(2',5')pA(3',5')p]$, его практическое применение затруднено и в значительной степени из-за малой доступности.

Аналогичной иммуномодулирующей активностью обладает также циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-di-GMP), который представляет собой внутриклеточный вторичный мессенджер, участвующий в c-di-GMP-зависимых сигнальных путях (рис. 1б), реализуемых только у *Bacteria* и *Archea*.

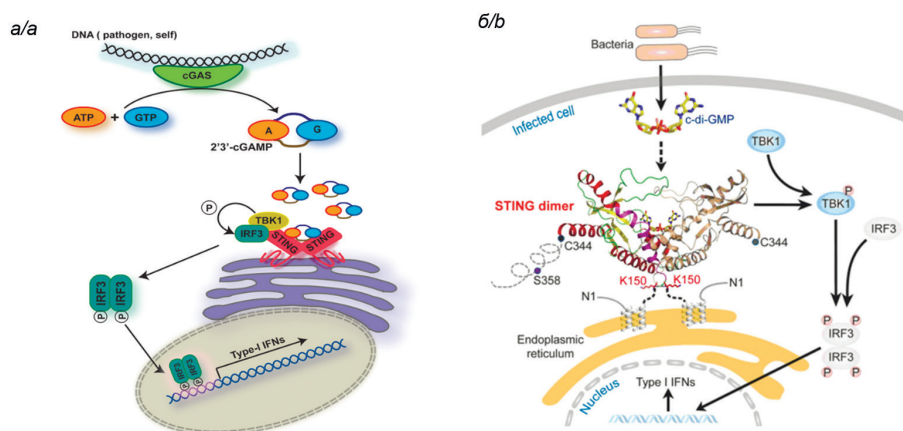


Рис. 1. Сигнальные пути, реализуемые с участием эффектора млекопитающих cGAS (a) и его бактериального аналога c-di-GMP (б) [5].

Fig. 1. Overview of signaling pathways realized with participation of an effector of mammal cGAS (a) and its bacterial analog c-di-GMP (b) [5].

В последнее время сигнальная ось cGAS/STING (синтетаза циклического гуанозинмонофосфат-аденозинмонофосфата/STING) вызывает повышенный интерес исследователей вследствие ее способности так распознавать цитоплазматическую чужеродную ДНК, связанную с бактериальной или вирусной инфекцией, как и появление в цитоплазме собственной ДНК, вызываемое нарушением функции клеток или стрессом. Цитоплазматическая ДНК, происходящая из вторгающихся патогенов или собственных ядерных и митохондриальных геномов, является мощным активатором системы врожденного иммунитета, взаимодействуя с PAMPs и DAMPs [10, 11]. Так, вирусная инфекция вызывает повреждение митохондрий, приводя к высвобождению митохондриальной ДНК, которая также узнается cGAS в качестве DAMP, приводя к активации иммунной системы [12]. Такая активация cGAS/STING сигнальной оси собственной ДНК может индуцировать развитие аутоиммунных болезней [9; 13]. Более того, cGAS/STING сигналинг распознает ДНК опухолевых клеток и стимулирует противоопухолевый иммунитет [14].

Бис-(3',5')-циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-di-GMP) представляет собой внутриклеточный вторичный мессенджер, используемый подавляющим большинством бактерий для регуляции множества биологических процессов, включая подвижность и адгезию бактериальных клеток, межклеточные коммуникации, синтез экзополисахаридов, формирование биопленок и экспрессию генов вирулентности [15; 16].

С другой стороны, c-di-GMP способен действовать как «сигнал опасности» на эукариотические клетки и проявлять выраженную иммуномодулирующую адьювантную активность в отношении различных бактериальных инфекций, в том числе влиять на продукцию ИФН I типа клетками иммунной системы [17; 18]. Некоторыми авторами в экспериментах *in vivo* и *in vitro* продемонстрировано, что введение бактериального c-di-GMP лабораторным мышам приводит к стимуляции как клеток врожденного (моноциты, макрофаги, гранулоциты), так и приобретенного иммунитета (Т-лимфоциты, дендритные клетки) и вызывает развитие полноценного иммунного ответа в организме животных, в том числе синтез ИФН I типа [19–22].

Таким образом, механизмы, ответственные за иммуномодулирующие свойства c-di-GMP, рецепторное связывание c-di-GMP, пути трансляции и трансдукции сигнала в иммунокомпетентных клетках человека до сих пор остаются неизвестными. Показано, что природные и модифицированные аналоги c-di-GMP также обладают способностью стимулировать иммунную систему позвоночных. Они могут быть использованы в качестве терапевтического средства при инфекционных, онкологических и ряда других заболеваний [23]. Детальные исследования иммуномодулирующих свойств c-di-GMP и его аналогов оказались возможными в связи с разработкой в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси эффективного метода биотехнологического получения данного циклического дигуанилата [24] и его 2'-деохи- и 2'-ара-производных в препаративных количествах [25]. В результате чего представляется важным изучение иммуномодулирующей активности данных циклических нуклеотидов, в том числе определение способности инициировать продукцию фактора некроза опухоли альфа, интерферона I и II типов и модулировать неспецифический и специфический Т-клеточный иммунный ответ. В свою очередь, понимание молекулярных основ регуляции иммуногенеза может являться основой поиска более эффективных терапевтических средств направленного действия на нейрохимические структуры иммунокомпетентных клеток и отдельные ключевые звенья сигнальных каскадов, в том числе опосредованных аденилат- и гуанилат-циклазами.

Материалы и методы исследований

Материал исследования: мононуклеары периферической крови (МПК) здоровых доноров (n = 10).

Объект исследования: образцы циклического димерного гуанозинмонофосфата (c-di-GMP) и его структурных аналогов – циклического димерного 2'-арагуанозинмонофосфата (c-di-araGMP) и циклического димерного 2'-дезоксигуанозинмонофосфата (c-di-deoxyGMP), полученные в Институте микробиологии НАН Беларуси и предоставленные А. И. Зинченко, заведующим лабораторией молекулярной биотехнологии, доктором биологических наук, профессором, член-корреспондентом НАН Беларуси.

Выделение мононуклеаров периферической крови. Мононуклеары (МПК) выделяли из периферической крови центрифугированием на градиенте плотности (гистопак, $\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, «Sigma», Германия) при 1500 об/мин, 6 °С в течение 30 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо дважды промывали центрифугированием (10 мин, 1500 об/мин) в фосфатно-буферном растворе с добавлением 5 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС).

Культуральный метод. Выделенные МПК в концентрации 2×10^6 клеток/мл культивировали в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии/отсутствии c-di-GMP или его аналогов. Полная культуральная среда включала питательную среду RPMI-1640 («Lonza», Бельгия), 10 % ЭТС («HyClone», Великобритания), 2 мМ глутамин («Lonza», Бельгия) и комплекс антибиотиков (100 Ед/мл

бензилпеницилин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата и 100 Ед/мл неомицин сульфата, «Gibco», США). Для неспецифической стимуляции МПК использовали поликлональные миготены фитогемагглютинин (ФГА/РНА, «Sigma», Германия) в концентрации 2,5 мкг/мл, Pookweed mitogen (PWM, «Sigma», Германия) в концентрации 5 мкг/мл и липополисахарид (LPS, «Sigma», Германия) в концентрации 5 мкг/мл. Для специфической стимуляции использовали рекомбинантный миелин-олигодендроцитарный гликопротеин с аминокислотной последовательностью 1–125 (pMOG, РНПЦ ТиМБ, Беларусь) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Культивирование осуществляли при 37 °С в атмосфере с 5 % содержанием CO₂.

Для оценки иммуномодулирующего действия c-di-GMP и его структурных аналогов в пробы с нестимулированными или митоген/антиген-активированными МПК добавляли исследуемые вещества в концентрациях 10⁻⁴М, 10⁻⁵М, 10⁻⁶М.

Метод проточной цитометрии. Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции цитокинов ИФН-γ или ФНО-α за 12 ч до окончания культивирования к МПК добавляли форбол 12-миристат 13-ацетата (10 нг/мл) («Sigma», Германия), иономицин кальциевую соль (1 мкг/мл) («Invitrogen», Великобритания) и блокатор внутриклеточного транспорта белков – брэфелдин А (10 мкг/мл) («Invitrogen», Великобритания) с последующим окрашиванием клеток моноклональными антителами к CD3-PC7 («Beckman Coulter», США). Далее клетки фиксировали 4 % раствором параформальдегида («Carl Roth», Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Пермеабиллизация МПК проводилась с использованием 2 % раствора Тритон X-100 («Sigma», Германия, 30 мин), после чего клетки инкубировали с мечеными фикоэритрином (PE) моноклональными антителами к ИФН-γ или ФНО-α. После каждого из этапов окрашивания осуществляли отмывание клеточных культур путем их двукратного центрифугирования в фосфатно-буферном растворе с 0,05 % Твин-20 в течение 5 мин при 1500 об/мин. Учет результатов проводили на проточном цитометре FC500 («Beckman Coulter», США) на 50 тыс. клеточных событий.

Иммуноферментный анализ. Концентрации ИФН-γ и ИФН-α определяли в супернатантах от нестимулированных и митоген/антиген-активированных МПК, культивируемых в присутствии/отсутствии c-di-GMP или его аналогов. Для этого клетки осаждали центрифугированием, супернатант переносили в полипропиленовые пробирки и замораживали при –70 °С для дальнейшего определения концентрации цитокинов с использованием коммерческих тест-систем производства Вектор-Бест (РФ). Результаты регистрировали на спектрофотометре «ThermoScientific» (Германия) при длинах волн (λ) 450–620 нм.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных проводили с использованием стандартного пакета прикладной программы Statistica 8.0 непараметрическим критерием Вилкоксона. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы (25 %–75 % процентиля).

Результаты исследований и их обсуждения

Влияние c-di-GMP на спонтанную и митоген/антиген-стимулированную внеклеточную продукцию интерферона-α и интерферона-γ мононуклеарами периферической крови. Спонтанная нестимулированная продукция интерферона-альфа (ИФН-α) в культурах МПК составила 18,2(5,9–24,5) нг/л. Добавление различных концентраций c-di-GMP к нестимулированным клеточным культурам не оказывало статистически значимого влияния на продукцию ИФН-α. В условиях митогенной/неспецифической стимуляции МПК наблюдалось повышение продукции ИФН-α до 26,0(22,2–33,9) нг/л, $p = 0,02$. При этом добавление к митоген-стимулированным культурам МПК c-di-GMP в различных концентрациях приводило к статистически значимому дозозависимому повышению продукции ИФН-α, $p = 0,03$ (рис. 2а).

В присутствии специфического миелинового аутоантигена pMOG не наблюдалось статистически значимого изменения продукции ИФН-α. Добавление c-di-GMP к pMOG-активированным МПК приводило к повышению продукции ИФН-α только в случае использования в конечной концентрации 10⁻⁶М, $p = 0,03$ (рис. 2б).

Индукция экспрессии генов ИФН I типа является ключевым событием в иницировании противоинфекционного иммунного ответа. Передача сигнала от ИФН I типа с участием активатора транскрипции STAT1 параллельно стимулирует экспрессию генов ИФН II типа (ИФН-γ), который участвует в регуляции механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, клеточного цикла, процессов апоптоза и воспалительной реакции посредством контроля транскрипции широкого спектра генов [26].

Результаты определения концентраций интерферона-гамма (ИФН-γ) в супернатантах нестимулированных и митоген/антиген-активированных МПК, культивируемых в присутствии/отсутствии c-di-GMP, представлены в табл. 1 и на рис. 3. Концентрация ИФН-γ в нестимулированных МПК составила 14,3(13,0–15,6) нг/л и статистически значимо повышалась в условиях митогенной стимуляции ФГА (994(368–1621) нг/л. Добавление различных концентраций c-di-GMP к нестимулированным приводило к дозозависимому повышению продукции ИФН-γ.

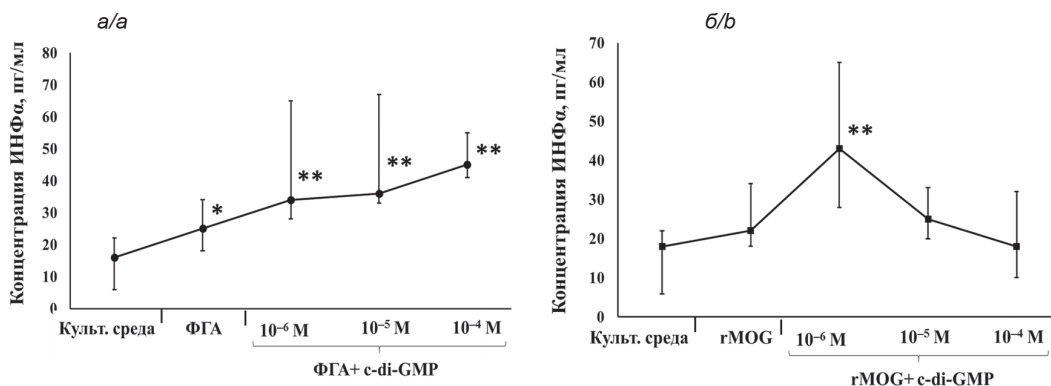


Рис. 2. Концентрация ИНФ-α в супернатантах митоген- (а) и антиген- (б) стимулированных культур МПК, пг/мл

Fig. 2. Concentration of IFN-α in supernatants of mitogen- (a) and antigen- (b) stimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), pg/ml

Таблица 1

Концентрация ИНФ-γ в супернатантах от нестимулированных /митоген-стимулированных МПК, культивируемых в присутствии/отсутствии c-di-GMP, пг/мл

Table 1

IFN-γ concentration in supernatants of non-stimulated/mitogen-stimulated PBMCs cultivated in presence/absence with c-di-GMP, pg/ml

	Концентрация c-di-GMP			
	—	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁴ М
Нестимулированные МПК	14,3 (13,0÷15,6)	22,6 * (17,4÷27,8)	79,1 * (76,0÷82,1)	175,6 * (140,0÷211,0)

* – $p < 0,05$ по сравнению с МПК, культивируемыми при отсутствии c-di-GMP.

Добавление c-di-GMP в митоген-активированных культурах МПК в низких концентрациях (10^{-6} М и 10^{-5} М) не оказывало влияние на синтез ИНФ-γ, тогда как при концентрации 10^{-4} М наблюдалось статистически значимое повышение продукции цитокина, $p = 0,03$ (рис. 3а).

Культивирование МПК в условиях миелиновой стимуляции сопровождалось статистически значимым увеличением антиген-специфической продукции ИНФ-γ (66,4(40,0÷92,9) пг/мл) по сравнению со спонтанным синтезом (28,3(20,0÷36,5) пг/мл).

При добавлении c-di-GMP в культуру миелин-стимулированных МПК отмечалось статистически значимое снижение внеклеточной секреции цитокина, независимо от концентрации c-di-GMP (рис. 3б).

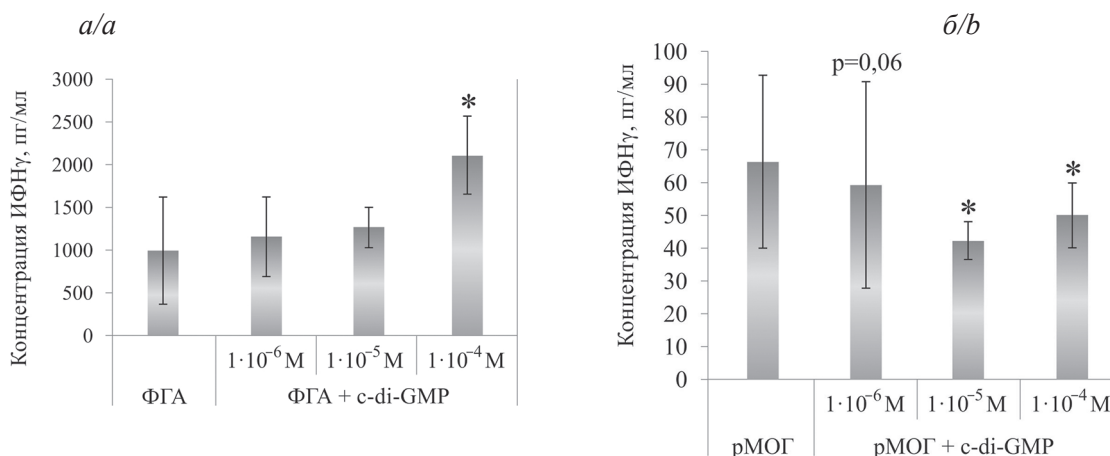


Рис. 3. Внеклеточная продукция ИНФ-γ (пг/мл) в митоген-стимулированных (а) и миелин-стимулированных (б) культурах МПК в присутствии различных концентраций c-di-GMP

Fig. 3. IFN-γ extracellular production (pg/ml) in mitogen-stimulated (a) and myelin-stimulated (b) PBMC cultures in the presence of c-di-GMP various concentrations

Согласно литературным источникам, в культуре клеток в ответ на стимуляцию аутоантигеном пролиферируют лишь потенциально аутореактивные Т-лимфоциты, Т-клеточный рецептор которых способен распознавать антигенную детерминанту рМОГ. К таким лимфоцитам относятся как CD3⁺CD4⁺Т-хелперы, так и цитотоксические CD3⁺CD8⁺Т-клетки. При этом и те, и другие обладают способностью к секреции ИФН-γ, который, в свою очередь, склонен проявлять не только иммуномодулирующее действие, но и инициировать иммунопатологические реакции аутоиммунного характера.

Внутриклеточная продукция интерферона-γ в мононуклеарах периферической крови, культивируемых в присутствии/отсутствии c-di-GMP и его аналогов. Следует отметить, что в нестимулированных культурах МПК основными клетками-продуцентами ИФН-γ являлись не экспрессирующие Т-клеточный маркер CD3 популяции, к которым относят натуральные киллеры (НК-клетки), НКТ-клетки, В-лимфоциты и специализированные антиген-презентирующие клетки. Так, в отсутствие c-di-GMP количество CD3-негативных клеток, синтезирующих внутриклеточный ИФНγ, в 21,4 раза превышало аналогичный показатель в субпопуляции CD3⁺Т-лимфоцитов (табл. 2).

При добавлении c-di-GMP к культурам МПК в концентрациях 10⁻⁶–10⁻⁴ М обнаружена тенденция к увеличению внутриклеточной продукции ИФН-γ CD3-негативными клетками в 1,29 (1,25÷1,3) раза (по медиане), в то время как удельное содержание CD3⁺ИФНγ⁺Т-лимфоцитов повышалось в 2,9 (2,5÷3,3) раза (по медиане).

Таблица 2

Уровень внутриклеточной продукции ИФН-γ нестимулированными CD3⁺ и CD3⁻ популяциями лимфоцитов, культивируемых в отсутствии/присутствии c-di-GMP, %

Table 2

Intracellular IFN-γ production by non-stimulated CD3⁺ and CD3⁻ lymphocyte populations cultivated in absence/presence of c-di-GMP, %

Фенотип клеток	Культуральная среда	c-di-GMP		
		10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁵ М	10 ⁻⁴ М
CD3 ⁺ ИФНγ ⁺	1,14 (0,9÷1,3)	3,78 (2,9÷4,2)	2,84 (2,6÷4,5)	3,36 (3,1÷4,9)
CD3 ⁻ ИФНγ ⁺	24,4 (18,9÷26,2)	31,7 (28,7÷35,4)	30,5 (29,2÷36,1)	31,5 (28,3÷35,9)

К Т-лимфоцитам, активно синтезирующим ИФН-γ, относят цитотоксические CD3⁺CD8⁺ Т-клетки, γδТ-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁻CD8⁻ и некоторые популяции CD3⁺CD4⁺ Т-клеток. Полученные данные соответствуют результатам, полученным при определении концентрации ИФН-γ в супернатантах от МНК, культивируемых в присутствии/отсутствии c-di-GMP. Однако дозозависимого влияния исследуемого циклического нуклеотида на уровень внутриклеточной продукции ИФН-γ не выявлено (табл. 2).

Для определения внутриклеточной продукции ИФН-γ популяциями Т-лимфоцитов проведено культивирование МПК с циклическим нуклеотидом c-di-GMP и его аналогами c-di-araGMP и c-di-deoxyGMP (в конечных концентрациях 10⁻⁶ М, 10⁻⁵ М, 10⁻⁴ М) в условиях стимуляции поликлональным Т-клеточным (РНА) и В-клеточным (LPS) митогенами.

Установлено, что внутриклеточная продукция ИФН-γ CD3⁺Т-лимфоцитами повышалась в 5,3 и 6,4 раза, соответственно, в условиях РНА- и LPS-индуцированной стимуляции (p < 0,01). Добавление c-di-GMP в концентрациях 10⁻⁵ – 10⁻⁴ М, а также c-di-araGMP и c-di-deoxyGMP в концентрациях 10⁻⁶ – 10⁻⁴ М в культуру мононуклеаров периферической крови приводило к статистически значимому повышению митоген-индуцированного синтеза ИФН-γ CD3⁺Т-лимфоцитами и их основными субпопуляциями (рис. 4). При этом преимущественная продукция ИФН-γ отмечалась в субпопуляции цитотоксических CD3⁺CD8⁺Т-лимфоцитов и варьировала от 11,7 до 27,7 %. В РНА- и LPS-стимулированных культурах при добавлении c-di-GMP регистрировался дозозависимый цитокин-стимулирующий эффект циклического нуклеотида по отношению ко всем исследуемым субпопуляциям Т-лимфоцитов.

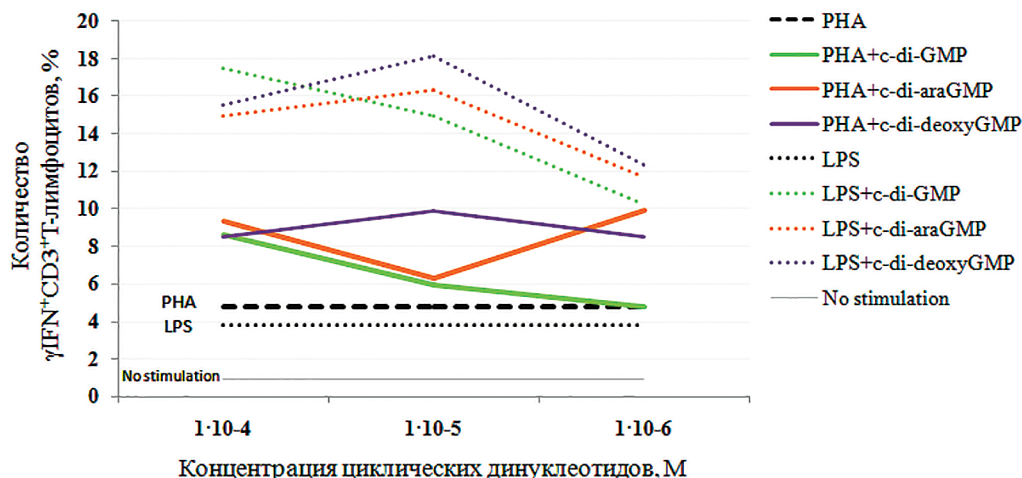


Рис. 4. Количество ИФН-γ-позитивных CD3⁺T-лимфоцитов при стимуляции поликлональными митогенами при культивировании с c-di-GMP и его структурными аналогами c-di-araGMP и c-di-deoxyGMP, %

Fig. 4. Number of IFN-γ-positive CD3⁺T-lymphocytes cultivated with c-di-GMP and its structural analogues c-di-araGMP and c-di-deoxyGMP during polyclonal mitogens stimulation, %

Выявлено, что c-di-deoxyGMP в наибольшей степени стимулировал митоген-индуцированную внутриклеточную продукцию ИФН-γ по сравнению с другими циклическими нуклеотидами: максимальный РНА- и LPS-стимулированный синтез цитокина регистрировались при культивировании с c-di-deoxyGMP в концентрациях 10⁻⁴ М и 10⁻⁵ М соответственно.

Таким образом, циклический нуклеотид c-di-GMP и его аналоги c-di-araGMP и c-di-deoxyGMP могут быть использованы для стимуляции эффекторных механизмов Т-клеточной цитотоксичности посредством стимуляции синтеза ИФН-γ.

Внутриклеточная продукция фактора некроза опухоли альфа мононуклеарами периферической крови, культивируемые в присутствии/отсутствии c-di-GMP и его аналогов. Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α) – многофункциональный провоспалительный цитокин, оказывающий регулирующее влияние и на многие процессы в организме, тесно связанные с воспалительной реакцией и иммунным ответом. Системные проявления ответной реакции организма обусловлены кооперативным взаимодействием ФНО и других биологически активных веществ, которые могут выступать как синергисты или модуляторы его эффектов.

При оценке влияния c-di-GMP и его аналогов на внутриклеточный синтез ФНО-α Т-лимфоцитами в условиях *in vitro* поликлональной стимуляции установлено, что при неспецифической стимуляции РНА и LPS наблюдалась тенденция к увеличению продукции ФНО-α в Т-лимфоцитах при культивировании с c-di-GMP и его аналогами в концентрациях 10⁻⁵ М. Наиболее выраженный стимулирующий эффект на продукцию ФНО-α CD3⁺T-лимфоцитами проявлялся при культивировании клеточных культур в присутствии LPS (рис. 5).

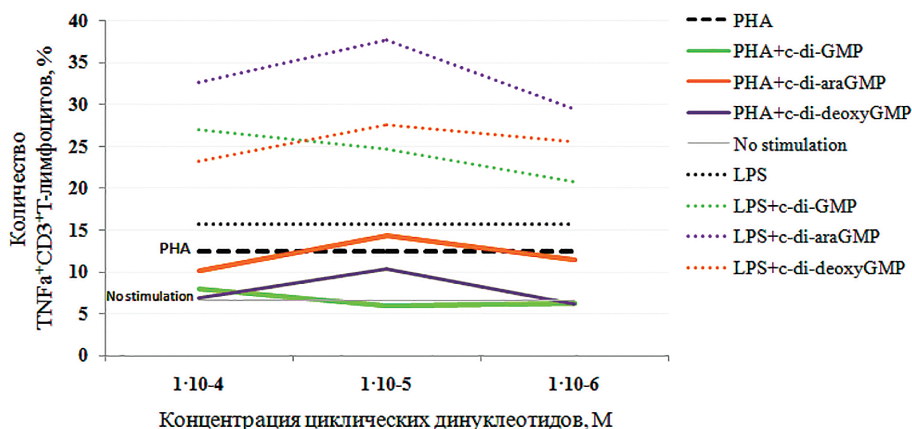


Рис. 5. Количество ФНО-α-позитивных CD3⁺T-лимфоцитов при стимуляции поликлональными митогенами при культивировании с c-di-GMP и его структурными аналогами c-di-araGMP и c-di-deoxyGMP, %

Fig. 5. Number of TNF-α-positive CD3⁺T-lymphocytes cultivated with c-di-GMP and its structural analogues c-di-araGMP and c-di-deoxyGMP during polyclonal mitogens stimulation, %

При этом статистически значимые различия в количестве $CD3^+ \text{ФНО-}\alpha^+$ LPS-стимулированных Т-клеток, по сравнению с РНА-стимулированными культурами, наблюдались при использовании всех изучаемых концентраций динуклеотидов. Так, при 10^{-5} М, количество ФНО- α -позитивных Т-лимфоцитов составило: РНА+c-di-GMP – 6,0(4,5÷7,2) % и LPS+c-di-GMP – 24,6(19,8÷29,3) %, $p < 0,05$ соответственно; РНА+c-di-araGMP – 14,3(11,6÷17,5) % и LPS+c-di-araGMP – 37,7(31,8÷42,4) %, $p < 0,05$ соответственно; РНА+c-di-deoxyGMP – 10,3(8,7÷12,6) % и LPS+c-di-deoxyGMP – 27,5(24,8÷29,2) %, $p < 0,05$ соответственно.

Известно, что LPS является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий. В ответ на LPS в организме хозяина происходит экспрессия провоспалительных цитокинов (ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-12, ИФН- β) и белков (индуцибельная NO-синтаза) [27]. Распознавание LPS опосредовано тремя продуктами различных генов CD14, TLR4 и MD2. Однако первым белком, участвующим в распознавании LPS, является LPS, связывающий белок (LBP), вырабатываемый в печени как белок острой фазы. При помощи LBP облегчается взаимодействие тройного комплекса с CD14, что дает возможность перенести LPS на LPS-рецепторный комплекс (CD14-TLR4-MD2) и индуцировать димеризацию TLR4. Активированный TLR4 привлекает адапторный белок MyD88, ассоциированный с IRAK (серинтреониновая протеинкиназа, к IL-1 рецептор-ассоциированной киназе). IRAK в дальнейшем аутофосфорилируется и взаимодействует с TRAF6 адапторным белком (TNF-рецептор-ассоциированный фактор 6). Данные киназы фосфорилируют 1-kB по остаткам серина с последующей деградацией и высвобождением AP-1 и NF- κ B, которые перемещаются в ядро и стимулируют транскрипцию различных генов воспалительного иммунного ответа (рис. 6).

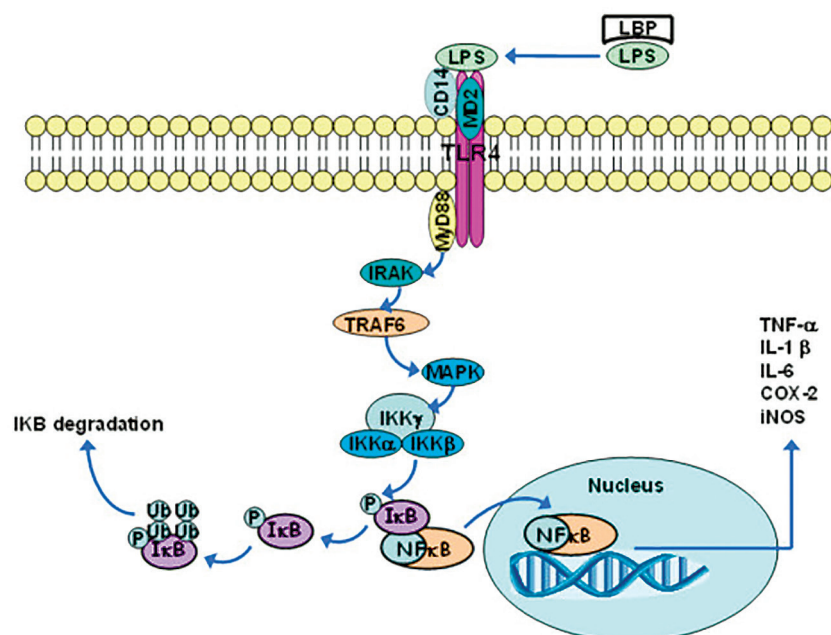


Рис. 6. Сигнальный путь, реализуемый с участием LPS и TLR4 [27]

Fig. 6. Overview of LPS and TLR4 signaling pathway [27]

Таким образом, предварительные результаты по изучению эффектов c-di-GMP и его аналогов на внутриклеточный синтез ФНО- α Т-лимфоцитами в условиях *in vitro* поликлональной неспецифической стимуляции свидетельствуют о влиянии циклических динуклеотидов (преимущественно) на клетки врожденного иммунитета, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов, возможно, через механизмы внутриклеточного сигналинга от PRRs, к которым относятся TLRs.

Заключение

Таким образом, бис-(3',5')-циклический димерный гуанозинмонофосфат (c-di-GMP) и его структурные аналоги оказывают стимулирующее влияние на продукцию ФНО- α , ИФН- α и ИФН- γ митоген-активированными мононуклеарами периферической крови человека, при одновременном ингибировании c-di-GMP в концентрации 10^{-4} М и 10^{-5} М секреции *in vitro* внеклеточных интерферонов 1-го и 2-го типов клетками при миелин-специфической стимуляции.

Полученные результаты характеризуют, с одной стороны, физиологические регуляторные механизмы иммунной системы при воспалительных реакциях и, с другой стороны, открывают перспективу разработки новых препаратов для поддержания периферической толерантности иммунной системы по отношению к собственным антигенам организма человека.

Библиографические ссылки

1. Shaw N., Ouyang S., Liu Z. J. Binding of bacterial secondary messenger molecule c di-GMP is a STING operation // *Protein Cell*. 2013. Vol. 4, issue 2. P. 117–129. DOI 10.1007/s13238-012-2071-0.
2. Pandey S., Kawai T., Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. Vol. 7, N 1:a016246. DOI: 10.1101/cshperspect.a016246.
3. Wu J., Chen Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids // *Annu. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 32. P. 461–488. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156.
4. Goubau D., Deddouch S., Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses // *Immunity*. 2013. Vol. 38, No 5. P. 855–869. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.007.
5. Yin Q., Fu T. M., Li J., et al. Structural biology of innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 33. P. 393–416. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112258.
6. Vajjhala P. R., Ve T., Bentham A., et al. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways // *Mol. Immunol.* 2017. Vol. 86. P. 23–37. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.02.012.
7. Li X. D., Wu J., Gao D., et al. Pivotal roles of cGAS–cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects // *Science*. 2013. Vol. 341, No 6152. P. 1390–1394. DOI: 10.1126/science.1244040.
8. Ablasser A., Goldeck M., Cavlar T., et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING // *Nature*. 2013. Vol. 498, No 7454. P. 380–384. DOI: 10.1038/nature12306.
9. Gray E. E., Treuting P. M., Woodward J.J., et al. Cutting edge: cGAS is required for lethal autoimmune disease in the Trex1-deficient mouse model of Aicardi-Gouti`eres syndrome // *J. Immunol.* 2015. Vol. 195, No 5. P. 1939–1043. DOI: 10.4049/jimmunol.1500969.
10. O'Neill L. A. Sensing the dark side of DNA // *Science*. 2013. Vol. 339, No 6121. P. 763–764. DOI: 10.1126/science.1234724.
11. Barbalat R., Ewald S. E., Mouchess M. L., et al. Nucleic acid recognition by the innate immune system // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 29. P. 185–214. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101340.
12. West A. P., Khoury-Hanold W., Staron M., et al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response // *Nature*. 2015. Vol. 520, No 7548. P. 553–557. DOI: 10.1038/nature14156.
13. Gao D., Li T., Li X. D., et al. Activation of cyclic GMP–AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 112, No 42. E5699–5705. DOI: 10.1073/pnas.1516465112.
14. Barber G. N. STING: infection, inflammation and cancer // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 15, No 12. P. 760–770. DOI: 10.1038/nri3921.
15. Römling U., Galperin M. Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 years of a universal bacterial second messenger // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. Vol. 77, No 1. P. 1–52. DOI: 10.1128/MMBR.00043-12.
16. Kalia D., Mery G., Nakayama S., et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42. P. 305–341. DOI: 10.1039/c2cs35206k.
17. Gray P. M., Forrest G., Wisniewski T., et al. Evidence for cyclic diguanylate as a vaccine adjuvant with novel immunostimulatory activities // *Cell Immunol.* 2012. Vol. 278. P. 113–119. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.07.006.
18. Burdette D. L., Monroe K. M., Sotelo-Troha K., et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP // *Nature*. 2011. Vol. 478, No 7370. P. 515–518. DOI: 10.1038/nature10429.
19. Karaolis D. K., Newstead M. W., Zeng X., et al. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia // *Infect. Immun.* 2007. Vol. 75, issue 10. P. 4942–4950.
20. Karaolis D. K., Means T. K., Yang D., et al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, No 4. P. 2171–2181.
21. Ebensen T., Schulze K., Riese P., et al. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant // *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. Vol. 14, issue 8. P. 952–958.
22. Ebensen T., Schulze K., Riese P., et al. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties // *Vaccine*. 2007. Vol. 25, issue 8. P. 1464–1469.
23. Hyodo M., Hayakawa Y. Synthesis, chemical properties and biological activities of cyclic bis (3'-5') diguanylic acid (c-di-GMP) and its analogues // Herdewijn P. (ed.), *Modified Nucleosides: In Biochemistry, Biotechnology and Medicine*. Weinheim. 2008. P. 343–363.
24. Korovashkina A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., et al. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase // *J. Biotechnol.* 2012. Vol. 164, No 2. P. 276–280. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.006.
25. Shchokolova A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., et al. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2015. Vol. 34. P. 416–423. DOI: 10.1080/15257770.2015.1006775.
26. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions // *J. Leukoc. Biol.* 2004. Vol. 75. P. 163–189.
27. Rogero M. M., Calder P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids // *Nutrients*. 2018. Vol. 10(4). pii: E432. DOI: 10.3390/nu10040432.

References

1. Shaw N., Ouyang S., Liu Z. J. Binding of bacterial secondary messenger molecule c di-GMP is a STING operation. *Protein Cell*. 2013. Vol. 4, issue (2). P. 117–129. DOI 10.1007/s13238-012-2071-0.

2. Pandey S., Kawai T., Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. Vol. 7, No. 1: a016246. DOI: 10.1101/cshperspect.a016246.
3. Wu J., Chen Z. J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 32. P. 461–488. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120156.
4. Goubau D., Deddouche S., Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity.* 2013. Vol. 38, No. 5. P. 855–869. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.007.
5. Yin Q., Fu T. M., Li J., et. al. Structural biology of innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 33. P. 393–416. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112258.
6. Vajjhala P. R., Ve T., Bentham A., et. al. The molecular mechanisms of signaling by cooperative assembly formation in innate immunity pathways/ *Mol. Immunol.* 2017. Vol. 86. P. 23–37. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.02.012.
7. Li X. D., Wu J., Gao D., et. al. Pivotal roles of cGAS–cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects. *Science.* 2013. Vol. 341, No. 6152. – P. 1390–1394. DOI: 10.1126/science.1244040.
8. Ablasser A., Goldeck M., Cavlar T., et. al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING // *Nature.* 2013. Vol. 498, No. 7454. P. 380–384. DOI: 10.1038/nature12306.
9. Gray E. E., Treuting P. M., Woodward J. J., et. al. Cutting edge: cGAS is required for lethal autoimmune disease in the Trex1-deficient mouse model of Aicardi-Gouti'eres syndrome. *J. Immunol.* 2015. Vol. 195, No. 5. P. 1939–1043. DOI: 10.4049/jimmunol.1500969.
10. O'Neill L. A. Sensing the dark side of DNA. *Science.* 2013. Vol. 339, No. 6121. P. 763–764. DOI: 10.1126/science.1234724.
11. Barbalat R., Ewald S. E., Mouchess M. L., et. al. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 2011. Vol. 29. P. 185–214. DOI: 10.1146/annurev-immunol-031210-101340.
12. West A. P., Houry-Hanold W., Staron M., et. al. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* 2015. Vol. 520, No. 7548. P. 553–557. DOI: 10.1038/nature14156.
13. Gao D., Li T., Li X. D., et. al. Activation of cyclic GMP–AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. Vol. 112, No. 42. – E5699–5705. DOI: 10.1073/pnas.1516465112.
14. Barber G. N. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2015. Vol. 15, No. 12. P. 760–770. DOI: 10.1038/nri3921.
15. Römling U., Galperin M. Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. Vol. 77, No. 1. P. 1–52. DOI: 10.1128/MMBR.00043-12.
16. Kalia D., Meroy G., Nakayama S., et. al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42. P. 305–341. DOI: 10.1039/c2cs35206k.
17. Gray P. M., Forrest G., Wisniewski T., et. al. Evidence for cyclic diguanylate as a vaccine adjuvant with novel immunostimulatory activities. *Cell Immunol.* 2012. Vol. 278. P. 113–119. DOI: 10.1016/j.cellimm.2012.07.006.
18. Burdette D. L., Monroe K. M., Sotelo-Troha K., et. al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature.* 2011. Vol. 478, No. 7370. P. 515–518. DOI: 10.1038/nature10429.
19. Karaolis D. K., Newstead M. W., Zeng X., et. al. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 2007. Vol. 75, issue 10. P. 4942–4950.
20. Karaolis D. K., Means T. K., Yang D., et. al. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, No. 4. P. 2171–2181.
21. Ebensen T., Schulze K., Riese P., et. al. The bacterial second messenger cdiGMP exhibits promising activity as a mucosal adjuvant. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007. Vol. 14, issue 8. P. 952–958.
22. Ebensen T., Schulze K., Riese P., et. al. The bacterial second messenger cyclic diGMP exhibits potent adjuvant properties. *Vaccine.* 2007. Vol. 25, issue 8. P. 1464–1469.
23. Hyodo M., Hayakawa Y. Synthesis, chemical properties and biological activities of cyclic bis (3'-5') diguanylic acid (c-di-GMP) and its analogues. Herdewijn P. (ed.) in *Modified Nucleosides: In Biochemistry, Biotechnology and Medicine.* Weinheim. 2008. P. 343–363.
24. Korovashkina A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., et. al. Enzymatic synthesis of c-di-GMP using inclusion bodies of *Thermotoga maritima* full-length diguanylate cyclase. *J. Biotechnol.* 2012. Vol. 164, No. 2. P. 276–280. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.006.
25. Shchokolova A. S., Rymko A. N., Kvach S. V., et. al. Enzymatic synthesis of 2'-ara and 2'-deoxy analogues of c-di-GMP. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2015. Vol. 34. P. 416–423. DOI: 10.1080/15257770.2015.1006775.
26. Schroder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004. Vol. 75. P. 163–189.
27. Rogero M. M., Calder P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients.* 2018. Vol. 10(4). pii: E432. DOI: 10.3390/nu10040432.

Статья поступила в редколлегию 26.06.2018
Received by editorial board 26.06.2018