

УДК 571.27; 612.112.3.0.062; 612.112.91

УЧАСТИЕ МАРК И РІЗК В РЕГУЛЯЦИИ СЕКРЕЦИИ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ОТВЕТ НА КОМБИНАЦИЮ ЛПС *Escherichia coli* и гDer p 2

© 2022 А.А. Морозова^{1,2*}, Н.И. Косякова¹, И.Р. Прохоренко²

¹ Федеральное государственное автономное учреждение здравоохранения
Больница Пущинского научного центра Российской академии наук,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: honogikuidi@mail.ru

² Институт фундаментальных проблем биологии – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»,
142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 10.11.2021

После доработки 15.05.2022

Принята к публикации 18.05.2022

Поиск эффективных подходов к терапии острых воспалений, вызванных сочетанием аллергенов и инфекционных агентов, является важной задачей мирового здравоохранения. Клещи домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* – источник аллергенов групп Der p и переносчик бактериальных соединений, в частности, липополисахаридов (ЛПС). ЛПС и Der p 2 вызывают секрецию провоспалительных цитокинов с участием киназ р38 МАРК, МЕК 1/2 и РІЗК. Участие указанных киназ в регуляции ответа клеток на комбинацию ЛПС и Der p 2 недостаточно исследовано. Мы оценивали влияние ингибирования киназ (р38 МАРК, МЕК 1/2 и РІЗК) на синтез цитокинов (ФНО, ИЛ-8 и ИЛ-6) при активации мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) здоровых добровольцев ЛПС *E. coli* и гDer p 2. Нами была выявлена зависимость вклада киназ в регуляцию ответа клеток от природы агента (гDer p 2 и/или ЛПС). Мы обнаружили, что р38 МАРК играет ключевую роль в синтезе ФНО РВМС в ответ на комбинацию ЛПС и гDer p 2. МЕК 1/2-зависимый сигнальный путь является основным для синтеза ФНО и ИЛ-8 в ответ на ЛПС и гDer p 2. РІЗК-зависимая передача сигналов негативно регулирует продукцию ФНО во время активации клеток гDer p 2, но не участвует в ответе на комбинацию ЛПС и гDer p 2. РІЗК-зависимая передача сигналов в регуляции синтеза цитокинов РВМС наиболее выражена в ответ на их активацию гDer p 2. Понимание особенностей ответов иммунных клеток на комбинации воспалительных агентов облегчит поиск новых внутриклеточных мишеней в противовоспалительной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: РВМС, р38 МАРК, МЕК 1/2, РІЗК, Der p 2, липополисахариды, цитокины.

DOI: 10.31857/S0320972522060082, **EDN:** AUROHZ

ВВЕДЕНИЕ

Клещи домашней пыли являются одним из наиболее распространённых источников аллергенов. В ряде регионов аллергены клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* приводят к возникновению ~50% зарегистрированных случаев аллергической астмы [1].

D. pteronyssinus являются источником более двух десятков белков с аллергическими свойствами, различающихся по механизму действия. Основными группами белков-аллергенов клещей являются протеазы и липид-связывающие белки, которые могут облегчать перенос провоспалительных агентов микробной природы к иммунным клеткам [2]. Аллергены с протео-

Принятые сокращения: ИЛ – интерлейкин; ЛПС – липополисахарид; ФНО – фактор некроза опухолей; МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа; MD-2 – фактор миелоидной дифференцировки 2; МЕК1/2 – киназа митоген-активируемой протеинкиназы двойной специфичности 1/2; MyD88 – фактор миелоидной дифференцировки 88; РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови; РІЗК – фосфоинозитид-3-киназа; гDer p 2 – рекомбинантный белок-аллерген из клеща *Dermatophagoides pteronyssinus*; TLR – толл-подобный рецептор.

* Адресат для корреспонденции.

литической активностью вызывают воспаление путём двух механизмов. Первый механизм – протеолитическое нарушение целостности эпителиального барьера альвеол, приводящее к усилению сенсибилизации другими аллергенами. Второй механизм – непротеолитическая активация провоспалительного ответа клеток [3]. Домашняя пыль, естественная среда обитания указанных клещей, содержит большое количество грибков и бактерий, являющихся источником β -глюканов и липополисахаридов (ЛПС) соответственно. Указанные соединения способны активировать врожденную иммунную систему. Их активность может быть усилена за счёт переноса белками-аллергенами [4–6]. Одним из ключевых аллергенов из *D. pteronyssinus* является белок Der p 2 [7].

Классическим механизмом сенсибилизации к аллергенам из *D. pteronyssinus* является избыточная активация CD4⁺ Th2-лимфоцитов, секретирующих ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13. Указанные цитокины активируют синтез IgE, запускают воспалительные ответы эозинофилов, нейтрофилов и макрофагов в лёгких [8]. Аллергены из *D. pteronyssinus*, кроме Th2-зависимого ответа, могут вызывать TLR2/4-зависимый (толл-подобный рецептор, TLR) воспалительный ответ альвеолярных макрофагов [9].

Активация иммунных клеток белком Der p 2 может происходить по TLR4-зависимому и TLR4-независимому механизмам [7, 10]. К TLR4-независимой активации можно отнести Th2-зависимый клеточный ответ на Der p 2, описанный выше [10]. В качестве альтернативных мишеней могут выступать TLR2 и другие молекулы [11]. TLR4-зависимый механизм реализуется за счёт того, что аллерген клеща *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) является миметиком корцептора TLR4, фактора миелоидной дифференцировки 2 (MD-2) [5, 12–14]. Der p 2 способен активировать передачу сигнала внутрь клетки в отсутствие ЛПС, а также усиливать ЛПС-индуцированные TLR4-зависимые ответы [15]. Der p 2 также способен активировать экспрессию MD-2 в мононуклеарных клетках периферической крови (РВМС), тем самым усиливая провоспалительные эффекты ЛПС [13]. Благодаря функциональной гомологии с MD-2, Der p 2 обеспечивает ЛПС-опосредованную активацию TLR4 в отсутствие MD-2 и облегчает ее в присутствии MD-2. Помимо активации врожденного иммунитета, Der p 2 взаимодействует с В-лимфоцитами, вовлекая в ответ адаптивный иммунитет [14]. В литературе

описана способность аллергена Der p 2 активировать фосфорилирование киназ р38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в клетках легких и иммунных клетках человека [14, 16–19]. Активация дальнейших сигнальных событий приводит к синтезу и высвобождению клетками про- и противовоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, CXCL10 и других [14, 19]. ЛПС также вызывает передачу сигнала по сигнальным путям PI3K/Akt, ERK, JNK и р38 MAPK, регулирующих секрецию провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-1 β и ИЛ-6 [20, 21].

Как было сказано выше, аллергены домашней пыли могут включать в себя не только белки самих клещей, но и микробные продукты, модулирующие воспалительных процесс. Таким образом, для обеспечения адекватных подходов к терапии аллергии на домашнюю пыль необходимо исследовать совместные эффекты аллергена Der p 2 и микробных агентов, в частности, ЛПС, на активацию иммунных клеток. Кроме того, существует проблема возникновения инфекции на фоне аллергического воспаления, например, при бронхиальной астме [21]. Понимание особенностей действия агентов аллергической природы и соединений бактериальной природы позволит эффективнее купировать последствия аллергических патологий, совмещённых с инфекционными процессами. Ранее мы обнаружили явление усиления ЛПС-индуцированной секреции цитокинов клетками крови человека в присутствии аллергенов из *D. pteronyssinus* [22]. Мы предположили, что при ответе иммунных клеток на комбинацию агентов возможно изменение вкладов внутриклеточных сигнальных молекул, например, киназ р38 MAPK, MEK1/2 и PI3K. При анализе литературы мы не нашли работ, посвященных исследованию вклада киназ в совместную активацию изолированных иммунных клеток ЛПС и Der p 2.

Исходя из вышесказанного, целью настоящей работы была оценка вклада ключевых киназ р38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в ответ мононуклеарных клеток периферической крови человека на комбинацию аллергена клещей домашней пыли Der p 2 и ЛПС. Воспалительные реакции на ЛПС, в том числе «цитокиновый шторм», начинаются в течение первых 24 ч [23], поэтому настоящее исследование было сосредоточено на относительно быстрых клеточных ответах на аллерген и/или ЛПС в течение первых 16 ч активации. Полученные результаты в будущем позволят выявить возможные общие

точки блокирования воспаления, вызванного сочетанием аллергенов и микробных агентов. Мы исследовали вклад р38 MAPK, MEK1/2 и PI3K в активацию синтеза провоспалительных цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 РВМС, индуцированного ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5, рекомбинантным белком rDer p 2 и их комбинацией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В исследовании были использованы S-гликоформа ЛПС *E. coli* O55:B5 («Sigma-Aldrich», США); рекомбинантный белок-аллерген клеща домашней пыли *D. pteronyssinus* rDer p 2, полученный в дрожжевой культуре с целью исключения загрязнения образца ЛПС («MyBioSource», США); среда RPMI 1640 (25 mM HEPES, NaHCO₃, L-глутамин) («Sigma-Aldrich»), SB 203580 ингибитор р38 MAPK («Sigma-Aldrich»), PD 098059 ингибитор MAPKK (MEK1 и MEK2) («Sigma-Aldrich»), ингибитор PI3K вортманнин («Sigma-Aldrich»), иммуноферментные тест-системы для определения ИЛ-6, ФНО, ИЛ-8 (АО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ).

Изоляция РВМС. Эксперименты выполняли на венозной крови 10 условно здоровых добровольцев (3 женщины, 7 мужчин, возраст 18–30 лет). Протокол исследования соответствовал Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и был одобрен Локальным этическим комитетом Больницы научного центра Пущино (№ 2 от 10.04.2014). Все добровольцы дали письменное согласие на участие в исследовании после того, как были проинформированы о всех предстоящих процедурах. Всем добровольцам перед исследованием выполнялось тестирование на наличие аллергии к домашней пыли. Критерии включения в экспериментальную группу соответствовали требованиям к сдаче крови: отсутствие врожденных нарушений, отсутствие инфекционных заболеваний и контактов с инфицированными больными не менее двух месяцев, отсутствие кожной реакции на аллергены домашней пыли.

РВМС изолировали из венозной крови на градиенте плотности перколла (1,077 г/мл) согласно работе Haslett et al. [24]. Забор венозной крови условно здоровых добровольцев выполнялся сотрудниками Больницы Пущинского научного центра РАН. В качестве антикоагулянта использовали 5%-ный гепарин натрия. Цель-

ную кровь центрифугировали 2 мин при 300 g и удаляли супернатант. Для осаждения эритроцитов к клеткам добавляли 20 мл 6%-ного декстрана (500 кДа) в фосфатно-солевом буфере, перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После осаждения эритроцитов плазму крови отбирали и центрифугировали 6 мин при 275 g для удаления тромбоцитов. Плазму, освобожденную от тромбоцитов, разводили в фосфатно-солевом буфере в соотношении 1 : 4. Ресуспендировали клетки в 8 мл полученной смеси, наслаивали на 3 мл перколла (1,077 г/мл) и центрифугировали 15 мин при 300 g. Фракция РВМС остается на градиенте плотности. Отбирали РВМС, трижды промывали их фосфатно-солевым буфером и центрифугировали 5 мин при 300 g. Клетки окрашивали трипановым синим и определяли жизнеспособность с помощью автоматического счетчика Countess® Automated Cell Counter («Invitrogen», США). Жизнеспособность составляла не менее 90%. РВМС разводили RPMI-1640 до 1×10^6 клеток/мл и разносили в 48-луночные планшеты. Инкубацию клеток с исследуемыми агентами выполняли в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и концентрации CO₂ 5%. Статистически значимых изменений жизнеспособности РВМС после стимуляции 40 нг/мл ЛПС и 0,5 мкг/мл rDer p 2 мы не обнаружили.

Активация РВМС человека к продукции цитокинов. РВМС (10^6 клеток/мл в каждом образце) инкубировали 1 ч с ингибиторами SB 203580 (10 мкМ), PD 098059 (50 мкМ), вортманнин (100 нМ) в CO₂-инкубаторе («Jouan», Франция) при температуре 37 °С и концентрации CO₂ 5%. В контрольные пробы добавляли соответствующее количество стерильного фосфатно-солевого буфера. После инкубации с ингибиторами в соответствующие образцы добавляли ЛПС *E. coli* (40 нг/мл) и/или rDer p 2 (0,5–3 мкг/мл) и инкубировали в течение 6 и 16 ч в CO₂-инкубаторе. Далее клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Полученные супернатанты отбирали и хранили при –20 °С до определения содержания цитокинов. После 6 ч инкубации оценивали концентрации ФНО, после инкубации 16 ч – ИЛ-6 и ИЛ-8. Концентрации ЛПС были выбраны на основе литературных данных [25, 26]. Концентрация rDer p 2 была подобрана по данным литературы [14, 27] и результатам предварительных экспериментов (рис. 1). Время инкубации для каждого цитокина было выбрано на основе литературных данных для РВМС человека [17, 27].

Определение содержания цитокинов. Определение концентрации цитокинов в образцах проводили с помощью иммуноферментных наборов по методике, предложенной производителем. Оптическую плотность регистрировали с помощью иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 («Awareness Technology, Inc», США) при длине волны 450 нм. Количественную оценку результатов проводили с использованием калибровочной кривой, отражающей зависимость оптической плотности образца от концентрации цитокина.

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 (настройка AtteStat) и SigmaPlot 12.5 («Systas Software», США). Гипотезу о нормальности распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выборочные распределения отличались от нормального распределения, поэтому мы применили методы

непараметрической статистики. Экспериментальные данные представляли в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Статистическую значимость различий выборочных медианных значений оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

rDer p 2 дозозависимо активирует секрецию ФНО РВМС. rDer p 2 в концентрации 0,5 мкг/мл и выше вызывал увеличение секреции ФНО РВМС человека (рис. 1).

Увеличение концентрации rDer p 2 вызывало увеличение секреции ФНО РВМС человека. Мы ожидали синергического эффекта между rDer p 2 и ЛПС, но не обнаружили его. Тем не менее это не исключает различия вкладов разных сигнальных путей в ответ клеток на эти стимулы. В дальнейшем мы исследовали

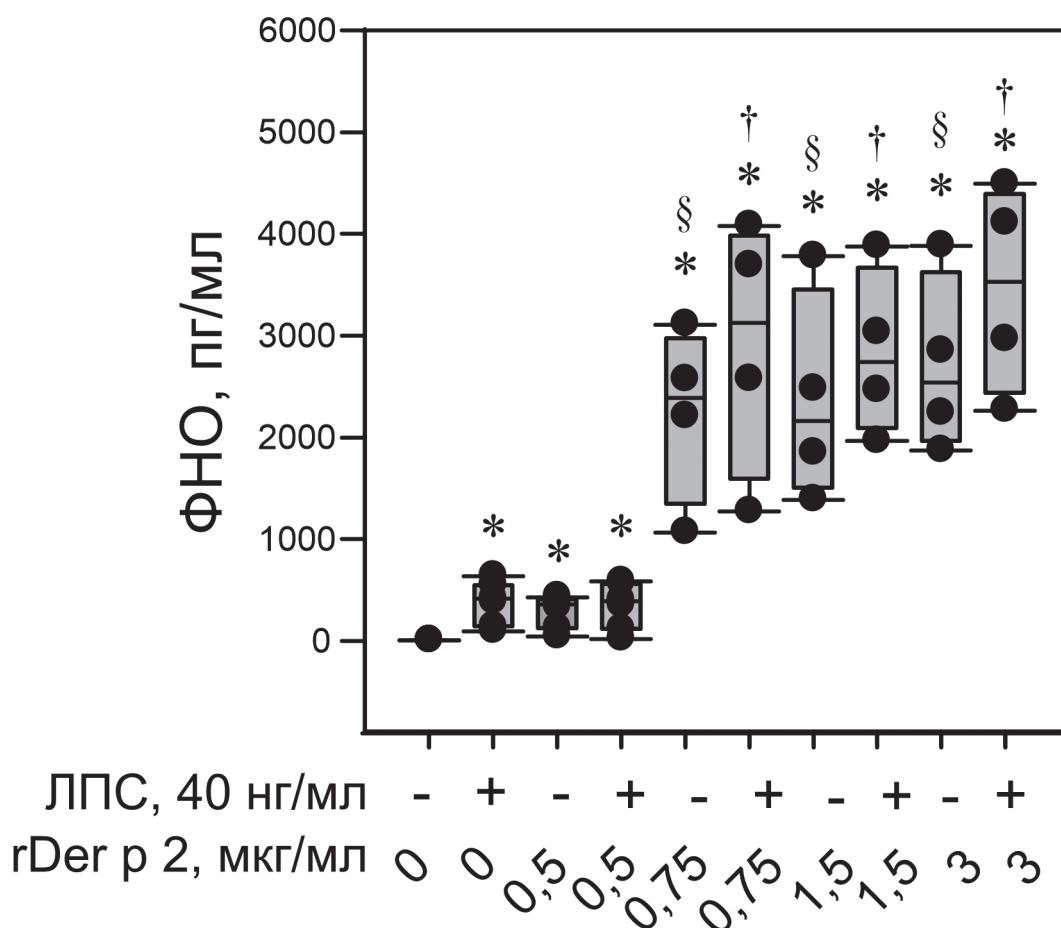


Рис. 1. Концентрации ФНО, высвобождаемого РВМС человека в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию после 6 ч инкубации ($n = 4$). Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие с контролем, § $< 0,05$ – статистически достоверное различие с действием 0,5 мкг/мл rDer p 2, † $< 0,05$ – статистически достоверное различие с действием комбинации 0,5 мкг/мл и 40 нг/мл ЛПС

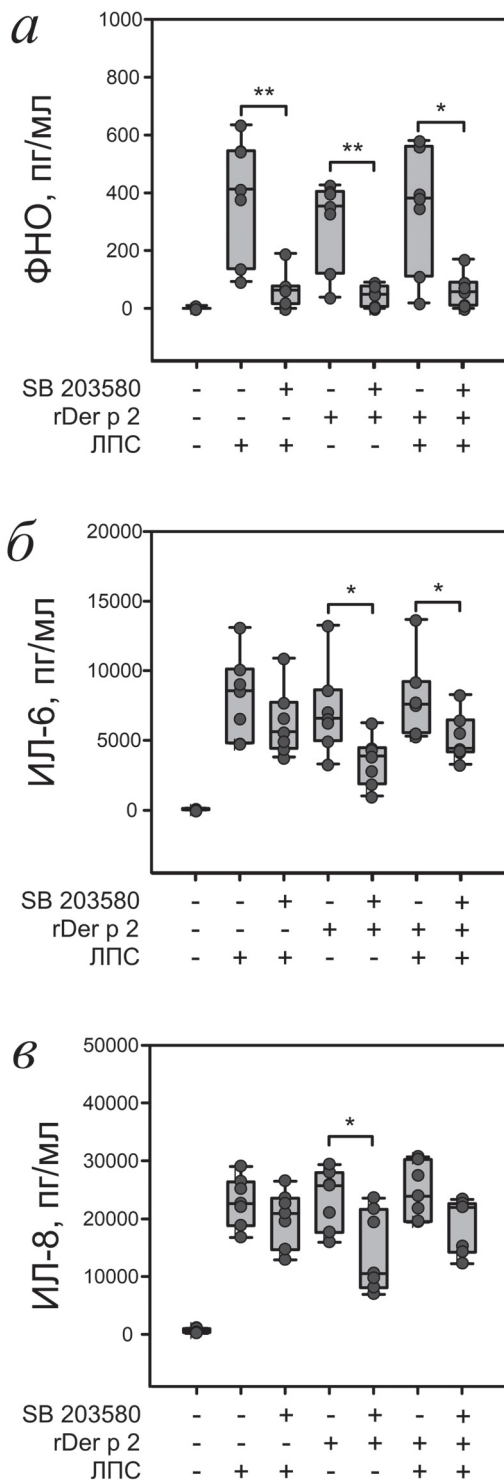


Рис. 2. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании р38 MAPK. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Концентрация SB 203580 – 10 μ М. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

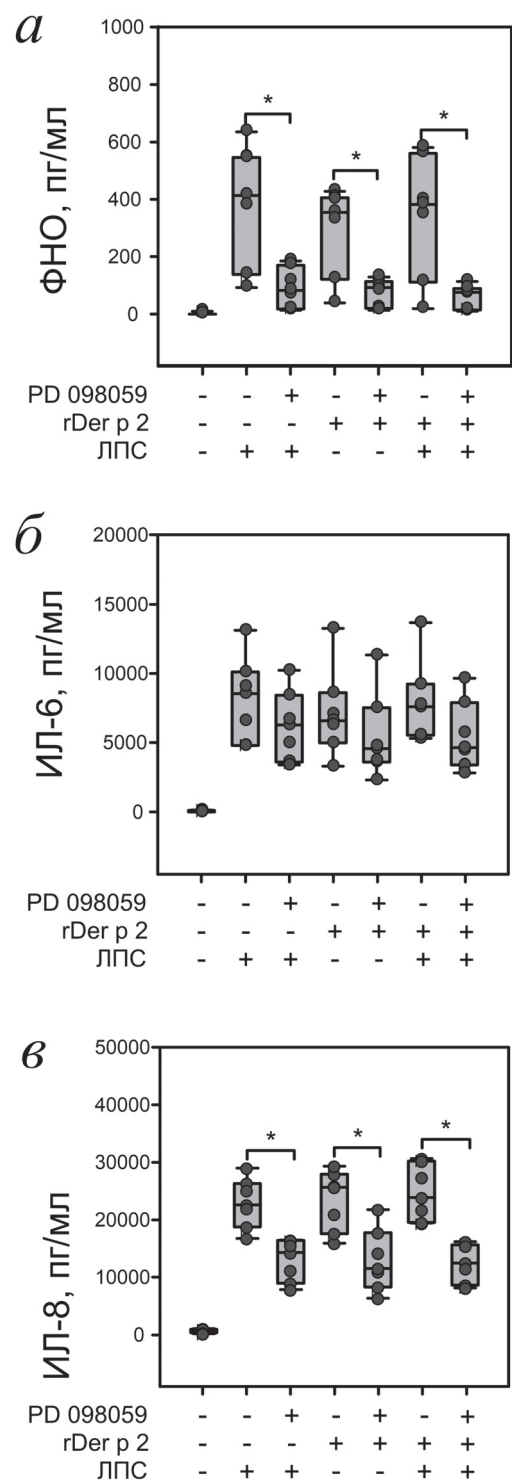


Рис. 3. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании MEK1/2. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Концентрация PD 098059 – 50 μ М. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

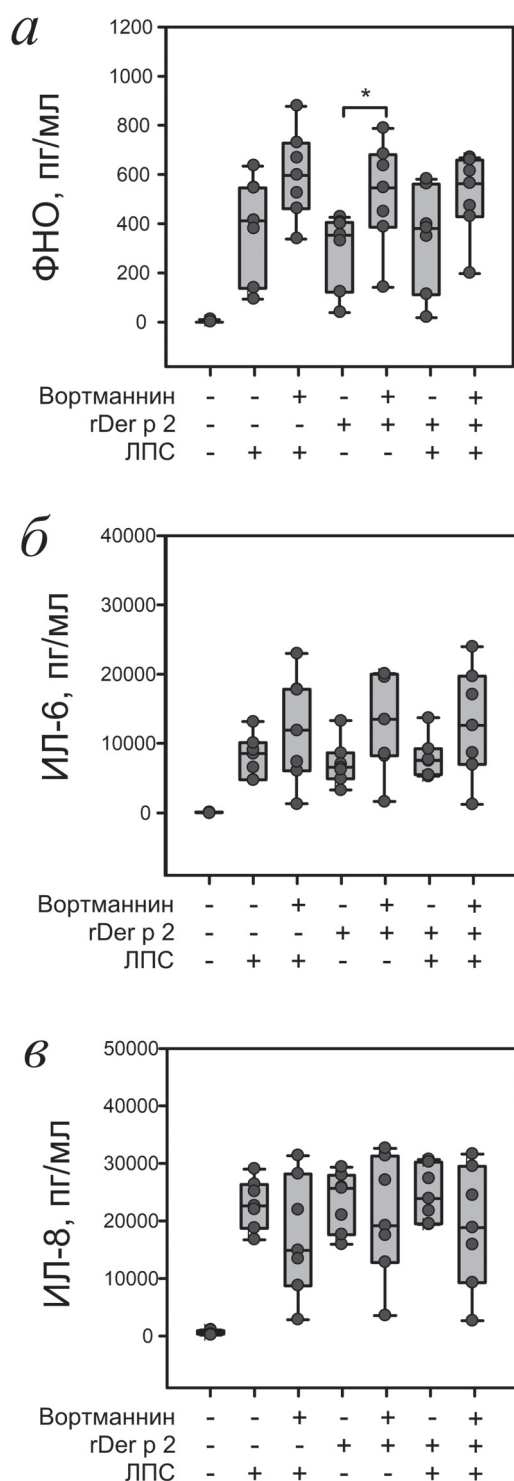


Рис. 4. Концентрации цитокинов, секретированных РВМС в ответ на ЛПС, rDer p 2 или их комбинацию при ингибировании РІЗК. *а* – Концентрация ФНО после 6 ч инкубации, *б* – концентрация ИЛ-6 после 16 ч инкубации, *в* – концентрация ИЛ-8 после 16 ч инкубации. Данные представлены в виде медиан и перцентилей 10, 25, 75 и 90%. Концентрация вортманнина – 100 нМ. * $p < 0,05$ – статистически достоверное различие между выборками, обозначенными скобками

ответы клеток на rDer p 2 в концентрации 0,5 мкг/мл – наименьшей из достаточных для активации РВМС.

p38 MAPK играет ключевую роль в синтезе ФНО РВМС в ответ на ЛПС и/или rDer p 2. При активации РВМС при действии ЛПС и rDer p 2 содержание ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 достоверно увеличивалось по сравнению с контролем (рис. 2). Их комбинация не усиливала секрецию цитокинов по сравнению с агентами, внесенными по отдельности. Ингибитор p38 MAPK SB 203580 снижал секрецию ФНО в ответ на ЛПС (рис. 2, *а*), но не влиял на ЛПС-индуцированную секрецию ИЛ-6 и ИЛ-8 (рис. 2, *б, в*). SB 203580 ингибировал секрецию всех исследуемых цитокинов в ответ на rDer p 2 (рис. 2), что указывает на участие p38 MAPK в регуляции синтеза ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на аллерген. Ингибирование p38 MAPK снижало секрецию ФНО и ИЛ-6 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, что указывает на сохранение вклада p38 MAPK в регуляцию секреции данных цитокинов при комбинированном действии rDer p 2 и ЛПС. Секреция ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС при ингибировании p38 MAPK не изменялась. На основании полученных данных мы предположили, что при сочетанном действии rDer p 2 и ЛПС секреция ФНО и ИЛ-6 регулируется с участием p38 MAPK, а основным фактором выступает Der p 2. Секреция ИЛ-8 в ответ на комбинацию агентов не зависит от участия p38 MAPK и обеспечивается за счёт ЛПС.

МЕК1/2-зависимый путь передачи сигнала является основным при синтезе ФНО и ИЛ-8 РВМС в ответ на ЛПС и/или rDer p 2. PD 098059, ингибитор МЕК1/2, не влиял на ЛПС- и rDer p 2-индуцированную секрецию ИЛ-6, но уменьшал секрецию ФНО и ИЛ-8 во всех вариантах эксперимента (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что МЕК1/2 участвует в регуляции секреции ФНО и ИЛ-8, вызванной ЛПС и аллергеном, но не влияет на секрецию ИЛ-6. При ингибировании МЕК1/2 секреция ФНО в ответ на ЛПС, rDer p 2 и их комбинацию была снижена относительно соответствующих образцов без ингибиторов (рис. 3, *а*). Следовательно, МЕК1/2 играет критическую роль в регуляции секреции ФНО при сочетанном действии ЛПС и rDer p 2.

Мы предполагаем, что вклады ЛПС или rDer p 2 в индукцию ответа на их комбинацию сопоставимы. Блокирование МЕК1/2 не влияло на секрецию ИЛ-6 РВМС человека в ответ на комбинацию ЛПС и rDer p 2 и её отдельные

компоненты (рис. 3, б). Наши данные указывают на то, что путь регуляции секреции ИЛ-6 в ответ на ЛПС и Der p 2 не зависит от MEK1/2. Ингибирование MEK1/2 снижало секрецию ИЛ-8 на комбинацию ЛПС + rDer p 2, а также её отдельные компоненты (рис. 3, в), что указывает на критическую роль MEK1/2 в ответах клеток человека на аллерген и ЛПС. Мы предположили, что вклады ЛПС или rDer p 2 в регуляцию секреции ИЛ-8, как в случае ФНО, сопоставимы.

PI3K негативно регулирует продукцию ФНО при активации клеток rDer p 2. Ингибирование PI3K не влияло на секрецию ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС и отдельное действие веществ (рис. 4, б, в), что указывает на то, что секреция данных цитокинов РВМС в ответ на rDer p 2 и/или ЛПС не зависит от PI3K. Блокирование PI3K не влияло на ЛПС-индуцированную секрецию ФНО (рис. 4, а), но увеличивало секрецию ФНО в ответ на rDer p 2. При действии комбинацией rDer p 2 и ЛПС достоверного увеличения секреции ФНО на фоне блокирования PI3K не наблюдалось. Следовательно, PI3K регулирует секрецию ФНО по механизму отрицательной обратной связи в ответ на rDer p 2, но не ЛПС или их комбинацию.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы исследовали вклады MAP-киназ в регуляцию секреции провоспалительных цитокинов РВМС человека в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, а также указанные агенты по отдельности. Мы обнаружили, что низкие концентрации rDer p 2 (0,5 мкг/мл) достаточны для активации клеток к продукции цитокинов (рис. 1). Мы не обнаружили статистически значимых изменений жизнеспособности РВМС после инкубации с исследуемыми агентами (данные не представлены). Это согласуется с литературными данными, полученными при стимуляции клеток при помощи ЛПС и Der p 2 в концентрациях, сопоставимых или превышающих используемые в настоящей работе [28, 29], следовательно, изменения секреции цитокинов вызваны специфическим действием rDer p 2 и ЛПС, а не изменением жизнеспособности клеток.

Комбинация rDer p 2 и ЛПС усиливала секрецию ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 РВМС человека, что согласуется с литературными данными [30]. Мы предполагали наличие синергического эффекта rDer p 2 и ЛПС на секрецию цито-

кинов, как нами было показано в предыдущем исследовании на цельной крови [23], однако в случае РВМС синергического эффекта не наблюдалось.

Стоит также отметить значительное различие концентраций секретируемых цитокинов РВМС и клетками цельной крови, что вызвано различием объектов исследования. В статье Radzyukevich et al. исследования выполнялись на цельной крови *ex vivo*: образец содержал все форменные элементы крови и 10%-ную сыворотку донора. Такой подход позволяет получить приближенный к *in vivo* ответ клеток, но не дает возможности оценить вклад отдельных элементов системы (в нашем случае, клеток крови). Для оценки вклада мононуклеарной фракции клеток крови (моноциты и лимфоциты) мы исследовали ответ изолированных РВМС человека на комбинацию rDer p 2 и ЛПС.

В случае исследования, выполненного на РВМС, в образце отсутствуют форменные элементы, способные модифицировать цитокиновый ответ на ЛПС и/или Der p 2: другие типы клеток (в частности, нейтрофилы) и белки сыворотки крови (в частности, sMD-2) [7, 31].

Для оценки вклада киназ в активацию РВМС человека мы применяли специфические ингибиторы киназ: SB 203580 – ингибитор p38 MAPK, PD 098059 – ингибитор MAPKK (MEK1 и MEK2), вортманнин – ингибитор PI3K [32, 33]. Ингибиторы MAPK можно рассматривать как потенциальные терапевтические противовоспалительные агенты [34]. Мы оценили потенциальную противовоспалительную активность ингибиторов SB 203580 и PD 098059 в отношении комбинации rDer p 2 и ЛПС. Нами было обнаружено, что оба ингибитора могут оказывать потенциальное противовоспалительное действие в отношении секреции ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-8 в ответ на комбинацию rDer p 2 и ЛПС, а также её отдельных компонентов (рис. 1, 2). Следовательно, ингибиторы MAPK можно рассматривать как потенциальные агенты для терапии воспаления, вызванного комбинацией аллергии и инфекции.

Нами показано, что РВМС человека синтезируют ФНО преимущественно по MAPK-зависимому пути во всех вариантах эксперимента (рис. 5), что согласуется с литературными данными [35]. Ингибирование p38 MAPK в случае активации клеток rDer p 2 также влияло на продукцию ИЛ-6.

rDer p 2 + ЛПС

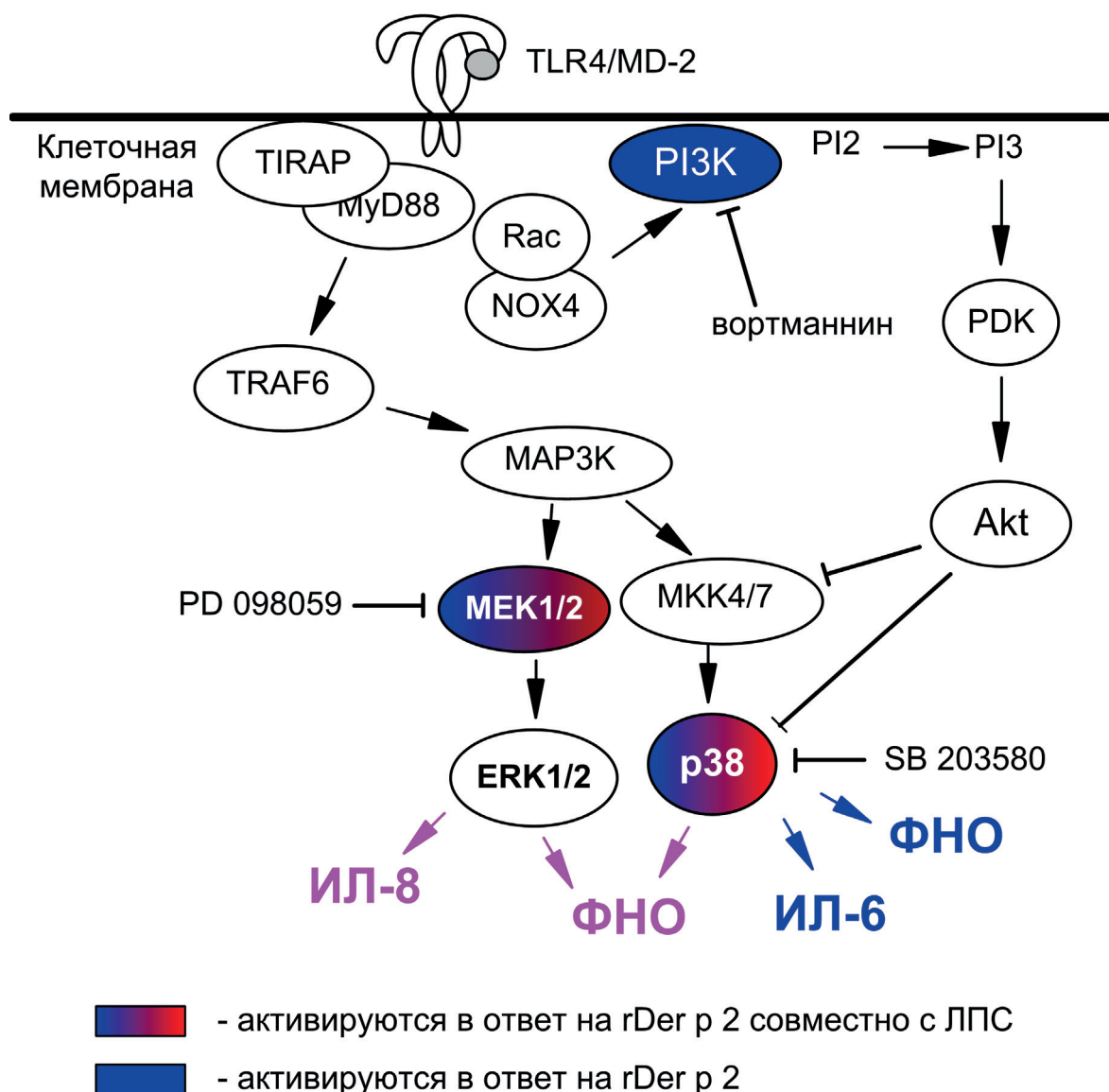


Рис. 5. Схематическое представление вклада исследуемых киназ в регуляцию секреции цитокинов человека в ответ на комбинацию rDer p 2 + ЛПС (пояснения в тексте). Схемы сигнальных путей изображены на основе литературных данных [35–39]

Ингибирование MEK1/2-зависимого сигнального пути имело наиболее выраженное влияние на синтез ИЛ-8, в случае ответа на оба агента. Ингибирование PI3K не влияло на продукцию этого цитокина, что указывает на значительную роль MEK1/2 в регуляции секреции ИЛ-8.

В предыдущих работах мы показали, что ингибитор p38 MAPK снижал секрецию ФНО клетками цельной крови человека в ответ на

ЛПС, общую фракцию аллергенов домашней пыли из *D. pteronyssinus* и их комбинацию [40]. Результаты настоящей работы согласуются с данными, полученными на цельной крови человека, и указывают на участие РВМС в ЛПС- и аллерген-индуцированной секреции цитокинов.

PI3K играет роль отрицательного регулятора при передаче сигналов через TLR4. Согласно литературным данным, ингиби-

рование РІЗК вызывает активацию NFκB, ERK1/2, p38 MAPK и JNK и увеличение секреции ФНО, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12 [20, 41–44]. На основании данных об участии РІЗК-зависимых сигнальных путей в негативной регуляции синтеза провоспалительных цитокинов в ответ на ЛПС мы исследовали влияние ингибирования РІЗК на наработку ФНО, ИЛ-6, ИЛ-8 при активации РВМС ЛПС, гDer p 2 или их комбинацией. При ингибировании РІЗК наблюдалась тенденция к увеличению синтеза ФНО и ИЛ-6 во всех вариантах эксперимента. Однако достоверное изменение уровня цитокина наблюдалось только в случае активации клеток гDer p 2 и продукции ФНО (рис. 2). Таким образом, РІЗК участвует в отрицательной регуляции секреции ФНО РВМС человека в ответ на действие гDer p 2. Насколько нам известно, указанное явление описано впервые в настоящей работе. Отличия с известными данными литературы могут быть объяснены различием в используемых нами и авторами других работ серотипами ЛПС.

Нами показано, что присутствие гDer p 2 не усиливает экспрессию цитокинов клетками в ответ на ЛПС. Наши данные указывают на то, что при активации РВМС гDer p 2 проявляет в большей степени свойства холестерин-связывающего белка, чем миметика MD-2 [45].

В настоящей работе были обнаружены различия вкладов киназ ERK1/2, p38 MAPK и РІЗК в зависимости от активирующего агента (белок-аллерген и/или ЛПС). Основным регулятором синтеза ФНО при активации РВМС аллергеном являются MAPK-зависимые сигнальные пути. Вклад MEK1/2 и РІЗК

в регуляцию синтеза цитокинов РВМС наиболее выражен ответ на гDer p 2.

Различия между внутриклеточными сигнальными путями, регулируемыми секрецию цитокинов в ответ на Der p 2 и ЛПС, могут быть вызваны различием рецепторов, распознающих ЛПС и Der p 2. В частности, распознавание комбинации Der p 2 + ЛПС может происходить с участием TLR4, как это описано при аллергической астме [46, 47]. Der p 2 могут распознаваться РВМС человека через TLR2, как это описано для других типов клеток [11, 48]. Экспериментальная проверка данного предположения является задачей будущих исследований.

Благодарности. Авторы выражают свою благодарность сотрудникам БПНЦ РАН Акимовой Ольге Николаевне (за забор биоматериала для обследования) и Банниковой Надежде Павловне (за помощь в организации исследования).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики, были одобрены Локальным этическим комитетом Больницы научного центра Пушино (№ 2 от 10.04.2014). От каждого из добровольцев было получено информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas, W. R., Hales, B. J., Smith, W. A (2010) House dust mite allergens in asthma and allergy, *Trends Mol. Med.*, **16**, 321-328, doi: 10.1016/j.molmed.2010.04.008.
2. Gregory, L. G., and Lloyd, C. M. (2011) Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung, *Trends Immunol.*, **32**, 402-411, doi: 10.1016/j.it.2011.06.006.
3. Post, S., Nawijn, M. C., Hackett, T. L., Baranowska, M., Gras, R., et al. (2012) The composition of house dust mite is critical for mucosal barrier dysfunction and allergic sensitization, *Thorax*, **67**, 488-495, doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-200606.
4. Reithofer, M., and Jahn-Schmid, B. (2017) Allergens with protease activity from house dust mites, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1368, doi: 10.3390/ijms18071368
5. Douwes, J., Zuidhof, A., Doekes, G., van der Zee, S. C., Wouters, I., et al. (2000) (1-->3)-beta-D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **162** (4 Pt 1), 1348-1354, doi: 10.1164/ajrccm.162.4.9909118.

6. Jacquet, A. (2013) Innate immune responses in house dust mite allergy, *ISRN Allergy*, 735031, doi: 10.1155/2013/735031.
7. Keber, M. M., Gradisar, H., and Jerala, R. (2005) MD2 and Der p 2 - a tale of two cousins or distant relatives? *J. Endotoxin Res.*, **11**, 186-192, doi: 10.1179/096805105X35206.
8. Cohn, L., Elias, J. A., and Chupp, G. L. (2004) Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression, *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 789-815, doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104716.
9. Liu, C. F., Drocourt, D., Puzo, G., Wang, J. Y., and Riviere, M. (2013) Innate immune response of alveolar macrophage to house dust mite allergen is mediated through TLR2/-4 co-activation, *PLoS One*, **8**, e75983, doi: 10.1371/journal.pone.0075983.
10. Stremnitzer, C., Manzano-Szalai, K., Starkl, P., Willensdorfer, A., Schrom, S., et al. (2014) Epicutaneously applied Der p 2 induces a strong TH 2-biased antibody response in C57BL/6 mice, independent of functional TLR4, *Allergy*, **69**, 741-51, doi: 10.1111/all.12399.
11. Chiou, Y. L., and Lin, C. Y. (2009) Der p 2 activates airway smooth muscle cells in a TLR2/MyD88-dependent manner to induce an inflammatory response, *J. Cell. Physiol.*, **220**, 311-318.
12. Yin, S. C., Liao, E. C., Chiu, C. L., Chang, C. Y., and Tsai, J. J. (2015) Der p 2 Internalization by epithelium synergistically augments toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **7**, 393-403.
13. Liao, E. C., Hsieh, C. W., Chang, C. Y., Yu, S. J., Sheu, M. L., et al. (2015) Enhanced allergic inflammation of Der p 2 affected by polymorphisms of MD2 promoter, *Allergy Asthma Immunol. Res.*, **7**, 497-506, doi: 10.4168/aa.2015.7.5.497.
14. Tsai, J. J., Liu, S. H., Yin, S. C., Yang, C. N., Hsu, H. S., et al. (2011) Mite allergen Der-p2 triggers human B lymphocyte activation and Toll-like receptor-4 induction, *PLoS One*, **6**, e23249, doi: 10.1371/journal.pone.0023249.
15. Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R. S., et al. (2009) Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein, *Nature*, **457**, 585-588.
16. Kim, D. H., Choi, E., Lee, J. S., Lee, N. R., Baek, S. Y., et al. (2015) House dust mite allergen regulates constitutive apoptosis of normal and asthmatic neutrophils via toll-like receptor 4, *PLoS One*, **10**, e0125983, doi: 10.1371/journal.pone.0125983
17. Lin, C. H., Lin, H. H., Kuo, C. Y., and Kao, S. H. (2017) Aeroallergen Der p 2 promotes motility of human non-small cell lung cancer cells via toll-like receptor-mediated up-regulation of urokinase-type plasminogen activator and integrin/focal adhesion kinase signaling, *Oncotarget*, **14**, 11316-11328, doi: 10.18632/oncotarget.14514.
18. Wang, W. C., Tsai, J. J., Kuo, C. Y., Chen, H. M., and Kao, S. H. (2011) Non-proteolytic house dust mite allergen, Der p 2, upregulated expression of tight junction molecule claudin-2 associated with Akt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway, *J. Cell Biochem.*, **112**, 1544-1551, doi: 10.1002/jcb.23067.
19. Lee, N. R., Baek, S. Y., Gu, A., Kim, D. H., Kim, S. Y., et al. (2016) House dust mite allergen suppresses neutrophil apoptosis by cytokine release via PAR2 in normal and allergic lymphocytes, *Immunol. Res.*, **64**, 123-132, doi: 10.1007/s12026-015-8730-5.
20. Zhou, B., Weng, G., Huang, Z., Liu, T., and Dai, F. (2018) Arctiin prevents LPS-induced acute lung injury via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in mice, *Inflammation*, **41**, 2129-2135, doi: 10.1007/s10753-018-0856-x.
21. Scherle, P. A., Jones, E. A., Favata, M. F., Daulerio, A. J., Covington, M. B., et al. (1998) Inhibition of MAP kinase kinase prevents cytokine and prostaglandin E2 production in lipopolysaccharide-stimulated monocytes, *J. Immunol.*, **161**, 5681-5686.
22. Earl, C. S., An, S. Q., and Ryan, R. P. (2015) The changing face of asthma and its relation with microbes, *Trends Microbiol.*, **23**, 408-418.
23. Radzyukevich, Y. V., Kosyakova, N. I., and Prokhorenko, I. R. (2018) Synergistic effect of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen and *Escherichia coli* lipopolysaccharide on human blood cells, *PLoS One*, **13**, e0207311, doi: 10.1371/journal.pone.0207311.
24. Koch, L., Frommhold, D., Buschmann, K., Kuss, N., Poeschl, J., et al. (2014) LPS- and LTA-induced expression of IL-6 and TNF- α in neonatal and adult blood: role of MAPKs and NF- κ B, *Mediators Inflamm.*, 283126, doi: 10.1155/2014/283126.
25. Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B., and Henson, P. M. (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide, *Am. J. Pathol.*, **119**, 101-110.
26. Wibowo, H., Harbuwono, D. S., Tahapary, D. L., Kartika, R., Pradipta, S., et al. (2021) Impact of sodium butyrate treatment in LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells of poorly controlled type 2 DM, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **12**, 652942, doi: 10.3389/fendo.2021.652942.
27. Jansky, L., Reymanova, P., and Kopecky, J. (2003) Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*, *Physiol. Res.*, **52**, 593-598.
28. Schildberger, A., Rossmannith, E., Eichhorn, T., Strassl, K., and Weber, V. (2013) Monocytes,

- peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide, *Mediators Inflamm.*, **2013**, 697972, doi: 10.1155/2013/697972.
29. Park, B. S., Lee, N. R., Kim, M. J., Kim, S. Y., and Kim, I. S. (2015) Interaction of Der p 2 with Toll-like receptor 4 and its effect on cytokine secretion, *Biomed. Sci. Lett.*, **21**, 152-159.
 30. Matera, G., Quirino, A., Giancotti, A., Pulicari, M. C., Rametti, L., et al. (2012) Procalcitonin neutralizes bacterial LPS and reduces LPS-induced cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells, *BMC Microbiol.*, **12**, 68, doi: 10.1186/1471-2180-12-68.
 31. Pei, Z., and Wang, J. (2014) Propofol attenuates LPS-induced tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and nitric oxide expression in canine peripheral blood mononuclear cells possibly through down-regulation of nuclear factor (NF)- κ B activation, *J. Vet. Med. Sci.*, **77**, 139-145, doi: 10.1292/jvms.14-0212
 32. Kim, I. S., Lee, N. R., and Lee, J. S. (2016) Suppressive effect of Der p 2 on constitutive neutrophil apoptosis by cytokine secretion of normal and allergic lymphocytes, *Kor. J. Clin. Lab. Sci.*, **48**, 102-108.
 33. Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J. C. (2003) p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 717.
 34. Simon, C., Hicks, M. J., Nemechek, A. J., Mehta, R., O'Malley, B. W. Jr., Goepfert, H., et al. (1999) PD 098059, an inhibitor of ERK1 activation, attenuates the in vivo invasiveness of head and neck squamous cell carcinoma, *Br. J. Cancer*, **80**, 1412-1419, doi: 10.1038/sj.bjc.6690537.
 35. Brunn, G. J., Williams, J., Sabers, C., Wiederrecht, G., Lawrence, J. C. Jr., et al. (1996) Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, *EMBO J.*, **15**, 5256-5267.
 36. Newton, R., Cambridge, L., Hart, L. A., Stevens, D. A., Lindsay, M. A., et al. (2000) The MAP kinase inhibitors, PD098059, UO126 and SB203580, inhibit IL-1 β -dependent PGE(2) release via mechanistically distinct processes, *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1353-1361, doi: 10.1038/sj.bjp.0703431.
 37. Fehr, S., Unger, A., Schaeffeler, E., Herrmann, S., Laufer, S., et al. (2015) Impact of p38 MAP kinase inhibitors on LPS-induced release of TNF- α in whole blood and primary Cells from different species, *Cell Physiol. Biochem.*, **36**, 2237-2249, doi: 10.1159/000430188.
 38. Tong, W., Chen, X., Song, X., Chen, Y., Jia, R., et al. (2020) Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4NF- κ B/MAPKs/IRF3, *Exp. Ther. Med.*, **19**, 1824-1834, doi: 10.3892/etm.2019.8396.
 39. Fukao, T., and Koyasu, S. (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling, *Trends Immunol.*, **24**, 358-363.
 40. Косякова Н. И., Радзюкевич Я. В., Морозова А. А., Прохоренко И. Р. (2019) Активация клеток крови ЛПС и ДрЕ: роль sMD-2 и p38 MAPK в развитии аллергического воспаления, *Росс. Аллергол. Журн.*, **16**, 81-84.
 41. Guha, M., and Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.*, **13**(2), 85-94, doi: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2.
 42. Yin, S. C., Liao, E. C., Ye, C. X., Chang, C. Y., and Tsai, J. J. (2018) Effect of mite allergenic components on innate immune response: Synergy of protease (Group 1 & 3) and non-protease (Group 2 & 7) allergens, *Immunobiology*, **223**, 443-448, doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.032.
 43. Kramer, P. R., Winger, V., and Reuben, J. (2009) PI3K limits TNF- α production in CD16-activated monocytes, *Eur. J. Immunol.*, **39**, 561-570, doi: 10.1002/eji.200838801.
 44. Luyendyk, J. P., Schabbauer, G. A., Tencati, M., Holscher, T., Pawlinski, R., et al. (2008) Genetic analysis of the role of the PI3K-Akt pathway in lipopolysaccharide-induced cytokine and tissue factor gene expression in monocytes/macrophages, *J. Immunol.*, **180**, 4218-4226, doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4218.
 45. Reginald, K., and Chew, F. T. (2019) The major allergen Der p 2 is a cholesterol binding protein, *Sci. Rep.*, **9**, 1556, doi: 10.1038/s41598-018-38313-9.
 46. Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Goriely, S., et al. (2010) Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **126**, 836-844.e13, doi: 10.1016/j.jaci.2010.06.009.
 47. Ryu, J. H., Yoo, J. Y., Kim, M. J., Hwang, S. G., Ahn, K. C., et al. (2013) Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **131**, 549-561, doi: 10.1016/j.jaci.2012.07.050.
 48. Tanyaratrisakul, S., Jirapongsananuruk, O., Thomas, W. R., Piboonpocanun, S., Voelke, D. R. (2012) Der p 2 stimulate inflammatory responses from lung epithelial cells and macrophages through the TLR2 and MAPK pathway, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **129**, AB140, doi: 10.1016/j.jaci.2011.12.469.

**PARTICIPATION OF MAPK AND PI3K
IN THE REGULATION OF CYTOKINE SECRETION
BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
IN RESPONSE TO *Escherichia coli* LPS AND rDer p 2 COMBINATION**

A. A. Morozova^{1,2*}, N. I. Kosyakova¹, and I. R. Prokhorenko²

¹ Hospital of Pushchino Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: honorikvudi@mail.ru

² Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

Search for the effective approaches to treat acute inflammation caused by combination of allergens and infectious agents is an important task for public health worldwide. House dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* are the source of allergens of the Der p groups and of microbial compounds, in particular, lipopolysaccharides (LPS). LPS and Der p 2 induce secretion of pro-inflammatory cytokines via activation of kinases p38 MAPK, MEK 1/2, and PI3K. Participation of these kinases in the regulation of cells response to combined exposure to LPS and Der p 2 has not been sufficiently studied. We studied the effects of kinases (p38 MAPK, MEK 1/2, and PI3K) inhibition on secretion of cytokines (TNF, IL-8, and IL-6) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers in response to *E. coli* LPS and rDer p 2. Contribution of kinases to the regulation of cell response to different agents (rDer p 2 and/or LPS) was revealed. It was found that p38 MAPK plays a key role in the regulation of secretion TNF by PBMC in response to the combination of LPS and rDer p 2. MEK 1/2-dependent signaling is the main pathway for the synthesis of TNF and IL-8 in response to LPS and rDer p 2. PI3K-dependent signaling negatively regulates TNF production during rDer p 2-induced cell activation, but is not involved in the response to the combination of LPS and rDer p 2. PI3K-dependent signaling in the regulation of PBMC cytokine synthesis is most pronounced in response to their activation by rDer p 2. Understanding the mechanisms of immune cell responses to combinations of inflammatory agents could facilitate the search for new intracellular targets for anti-inflammatory therapy.

Keywords: PBMC, p38 MAPK, MEK 1/2, PI3K, Der p 2, lipopolysaccharides, cytokines