

## ИНДУКЦИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА К ЛИПОПОЛИСАХАРИДУ И МУРАМИЛПЕПТИДАМ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2012 г. М.В. Пашенков, Б.И. Алхазова, В.Л. Львов, Б.В. Пинегин

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия

Поступила: 13.06.2012. Принята: 20.08.2012

Индукция временной толерантности макрофагов к компонентам бактерий, в частности к липополисахариду (ЛПС) и мурамилпептидам, рассматривается как один из способов профилактики септического шока. В опытах *in vitro* изучена способность ЛПС и мурамилпептидов грамотрицательных бактерий вызывать толерантность макрофагов к этим же соединениям и перекрестную толерантность. Мурамилпептиды – агонисты рецепторов NOD1 и NOD2 – в оптимальных и субоптимальных концентрациях вызывали перекрестную толерантность друг к другу, но не к ЛПС, а также не влияли на ЛПС-индуцированную толерантность к ЛПС. В свою очередь, ЛПС в оптимальных и субоптимальных концентрациях не вызывал перекрестную толерантность к мурамилпептидам и не влиял на мурамилпептид-индуцированную толерантность к мурамилпептидам. Таким образом, мурамилпептиды и ЛПС могут применяться как независимые, взаимно дополняющие друг друга средства профилактики септического шока.

*Ключевые слова:* макрофаги, мурамилпептиды, ЛПС, толерантность, фактор некроза опухолей

### ВВЕДЕНИЕ

Септический шок – угрожающее жизни осложнение инфекций, вызванных, как правило, грамотрицательными бактериями, которое проявляется тяжелыми нарушениями гемодинамики и полиорганной недостаточностью [1]. Одним из основных триггеров септического шока является бактериальный липополисахарид (ЛПС), парентеральное введение которого животным и человеку воспроизводит многие симптомы шока [2, 3]. С точки зрения патогенеза, септический шок представляет собой крайнее проявление системного воспалительного ответа, вызванного ЛПС и другими компонентами бактерий [4]. Предотвращение такого ответа является одной из основных задач в профилактике септического шока [5–7].

Один из подходов к решению этой задачи основан на использовании феномена эндо-

токсина толерантности, т.е. временной (до 8 сут.) нечувствительности клеток и организма к ЛПС, наступающей после одно- или многократного введения ЛПС [8]. На клеточном уровне толерантность проявляется как неспособность клеток врожденной иммунной системы, в первую очередь макрофагов (МФ), вырабатывать провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухолей (TNF), при повторной стимуляции ЛПС [7, 9]. Молекулярные механизмы эндотоксина толерантности изучены недостаточно, однако наиболее вероятно постактиваационное ингибирование внутриклеточного сигнального пути от TLR4 – рецептора к ЛПС. Вещества микробного происхождения, активирующие этот же сигнальный путь (MyD88-зависимый), вызывают перекрестную толерантность друг к другу и к ЛПС, причем даже в тех случаях, когда они взаимодействуют с разными рецепторами [10].

Для профилактики септического шока возможно использование низких доз ЛПС, не вызывающих шок. Однако и эти дозы ЛПС обладают существенным побочным действи-

Адрес: 115478, Москва, Каширское шоссе, д. 24, корпус 2, Институт иммунологии, лаборатория клинической иммунологии. E-mail: mvpashenkov@yandex.ru

ем [11]. Кроме того, клинические испытания антагонистов ЛПС показывают, что ингибирование эффектов одного только ЛПС недостаточно для профилактики и лечения шока [12]. Поэтому оправдан поиск соединений, которые обладали бы меньшими побочными эффектами, но вызывали бы толерантность и перекрестную толерантность к более широкому кругу веществ бактериальной природы.

Одним из кандидатов на роль таких соединений являются мурамилпептиды — фрагменты бактериального пептидогликана (ПГ), которые взаимодействуют с рецепторами NOD1 и NOD2 [13, 14]. NOD1 распознает фрагменты ПГ грамотрицательных бактерий, содержащие остаток мезо-диаминопимелиновой кислоты, тогда как NOD2 распознает мурамилдипептид (МДП) — минимальный иммунологически активный фрагмент ПГ всех бактерий [13, 14]. Сообщалось, что МДП вызывает перекрестную толерантность МФ к ЛПС *in vitro* [15]. Однако МДП не предотвращает эндотоксиновый шок *in vivo* [16] и обладает побочным действием, напоминающим действие ЛПС. В то же время другой мурамилпептидный иммуномодулятор — мифамуртид — при введении за 24 ч. до инъекции ЛПС в несколько раз уменьшает летальность свиней от эндотоксинового шока при гораздо более мягких побочных эффектах [2].

Противошоковая активность специфических агонистов NOD1, в том числе их способность индуцировать перекрестную толерантность к ЛПС, не изучена. Однако известно, что высокие дозы вещества FK-565 — агониста мышинного NOD1 — вызывают у мышей ряд гемодинамических и органных нарушений, характерных для шока [17]. Поэтому индукция толерантности к агонистам NOD1, в дополнение к ЛПС-толерантности, может повысить эффективность профилактики септического шока.

В настоящей работе изучена способность мурамилпептидов, полученных из ПГ грамотрицательной бактерии (*Salmonella typhi*), вызывать толерантность и перекрестную толерантность МФ к агонистам рецепторов NOD1, NOD2 и TLR4 *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реактивы

Использовали следующие мурамилпептиды и их производные, полученные из *S. typhi*: 1)  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1→4)-N-аце-

тил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновую кислоту (ГМтри); 2)  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1→4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-D-аланин (ГМтетра); 3) димер ГМтетра (диГМтетра), в котором мономерные остатки ГМтетра соединены амидной связью между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка ГМтетра и  $\omega$ -аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого остатка ГМтетра; 4) лактоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновую кислоту (ЛАКтри), полученную путем щелочной обработки ГМтри. Методика получения всех соединений описана ранее [18]. ЛПС *E. coli* (серovar O111:B4) и  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1→4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил (ГМди) были закуплены у Sigma (США).

### Стимуляция МФ

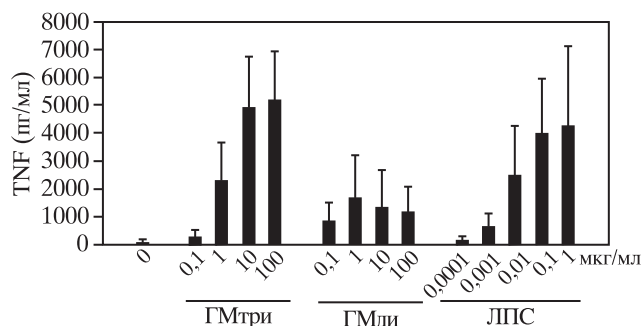
Человеческие МФ получали, как описано ранее [18], и высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты по  $4 \times 10^4$  клеток на лунку. Клеткам давали прикрепиться к пластику, после чего добавляли ГМтри, ГМтетра, диГМтетра, ЛАКтри, ГМди или ЛПС в указанных ниже концентрациях. Через 24 ч. собирали супернатант.

### Индукция толерантности МФ

МФ культивировали с индукторами толерантности в указанных ниже концентрациях и сочетаниях в течение 24 ч. В контрольные лунки индукторы толерантности не добавляли («нетолеризованные» МФ). Через 24 ч. удаляли супернатант, каждую лунку дважды промывали 300 мкл теплой среды RPMI-1640 и заполняли 200 мкл свежей культуральной среды (RPMI-1640, 2 мМ L-глутамин, 10% фетальная телячья сыворотка, все — РАА, Австрия). Затем в лунки добавляли ЛПС, ГМтри или ГМди в разрешающих концентрациях. В лунки отрицательного контроля не вносили ни индукторы толерантности, ни разрешающие стимулы (оценка спонтанной продукции TNF). Супернатант собирали еще через 24 ч.

### Исследование уровней TNF

Уровни TNF в супернатантах определяли путем иммуноферментного анализа с помощью наборов реактивов фирмы Цитокин (Россия). Эффект индукторов толерантности выражали в виде остаточной продукции TNF



**Рис. 1.** Уровни TNF в супернатантах МФ после однократной 24-часовой стимуляции указанными веществами ( $M \pm \sigma$ ;  $n = 6$ ).

в процентах; за 0% принимали спонтанную продукцию TNF, за 100% — продукцию TNF нетолеризованными МФ данного донора при использовании данного разрешающего стимула. Толерантность считали «практически полной» при подавлении продукции TNF на 95% и более.

#### Статистическая обработка данных

Парные измерения сравнивали с помощью непараметрического теста Уилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Определение рабочих концентраций ГМтри, ГМди и ЛПС

ГМтри, ГМди и ЛПС являются специфическими агонистами, соответственно, NOD1, NOD2 и TLR4 [19, 20]. Вначале определяли концентрации этих агонистов, достаточные для максимальной выработки TNF макрофагами (**рис. 1**). Максимальный ответ МФ на ГМтри достигался при 10 мкг/мл, далее отмечался выход на плато. Для ЛПС то же наблюдалось при 0,1 мкг/мл. ГМди вызывал максимальную выработку TNF при 1 мкг/мл. Указанные концентрации ГМтри, ГМди и ЛПС затем использовали в качестве разрешающих.

### Индукция толерантности и перекрестной толерантности МФ к ГМтри, ГМди и ЛПС

ГМтри и ГМди в концентрациях 1–100 мкг/мл вызывали практически полную толерантность МФ к повторной стимуляции теми же агонистами (**рис. 2**). ЛПС в исследованном диапазоне концентраций дозозависимо подавлял ответ МФ на повторную стимуляцию тем же агентом; при концентрациях

0,001–0,1 мкг/мл толерантность была практически полной (**рис. 2**). Толерогенное действие субоптимальных концентраций ЛПС и ГМтри (**рис. 2**) превосходило способность тех же концентраций индуцировать выработку TNF нетолеризованными МФ (**рис. 1**). Так, ЛПС в концентрациях 0,0001, 0,001 и 0,01 мкг/мл вызывал продукцию TNF, составляющую, соответственно, 2,3, 13,8 и 58,1% от максимальной, однако при повторной (разрешающей) стимуляции ЛПС выработка TNF теми же клетками была подавлена, соответственно, на 72, 95 и 96% по сравнению с нетолеризованными МФ. ГМтри в концентрации 1 мкг/мл вызывал выработку TNF, составляющую 43% от максимальной, но при повторной стимуляции этих же клеток разрешающей концентрацией ГМтри выработка TNF была подавлена на 96%.

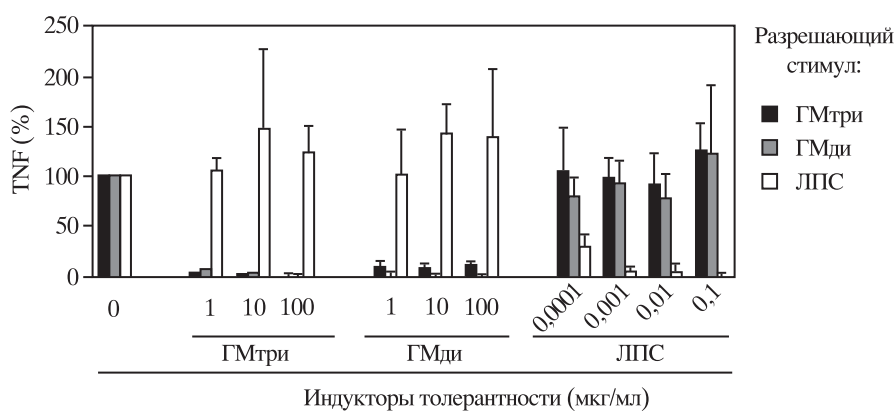
ГМтри индуцировал полную перекрестную толерантность к ГМди (**рис. 2**). Однако ГМди даже в концентрации 100 мкг/мл не вызывал полную толерантность к ГМтри, подавляя ГМтри-стимулированную продукцию TNF лишь примерно на 90% (**рис. 2**). И ГМтри, и ГМди в концентрациях 10–100 мкг/мл несколько усиливали чувствительность МФ к ЛПС, однако эффект не был статистически достоверным (**рис. 2**). ЛПС в концентрации 0,1 мкг/мл также несколько усиливал ответ МФ на ГМтри и ГМди, однако и этот эффект не был достоверным (**рис. 2**).

### Индукция толерантности субоптимальными агонистами NOD1

Мурамилпептиды ГМтетра и диГМтетра, а также ЛАКтри (производное ГМтри) являются агонистами NOD1 ([19]; наши неопубликованные данные). Все три соединения являются менее мощными индукторами синтеза TNF в МФ, чем ГМтри (**рис. 3А**). Однако все три вещества в концентрации 10 мкг/мл индуцировали полную толерантность МФ к ГМтри и ГМди (**рис. 3Б**). Толерантность к ЛПС не наступала. Таким образом, толеризирующая активность ГМтетра, диГМтетра и ЛАКтри сопоставима с таковой у ГМтри.

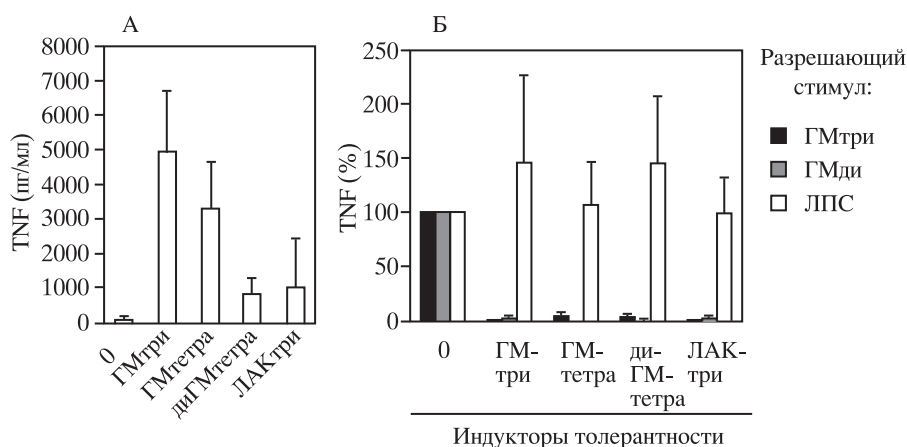
### Индукция толерантности с помощью комбинации ГМтри и ЛПС

Хотя использованные агонисты NOD1 и NOD2 не индуцируют перекрестную толерантность к ЛПС, остается возможность индукции сочетанной толерантности к мур-



**Рис. 2.** Индукция толерантности и перекрестной толерантности МФ к повторному воздействию ГМтри, ГМди и ЛПС.

МФ культивировали 24 ч. с индукторами толерантности в указанных концентрациях, отмывали и культивировали еще 24 ч. с разрешающими стимулами – ГМтри (10 мкг/мл), ГМди (1 мкг/мл) или ЛПС (0,1 мкг/мл), после чего анализировали уровни TNF в супернатантах. Последние выражали в процентах от выработки TNF нетолеризованными МФ при действии того же разрешающего стимула ( $M \pm \sigma$ ;  $n = 10$ ).

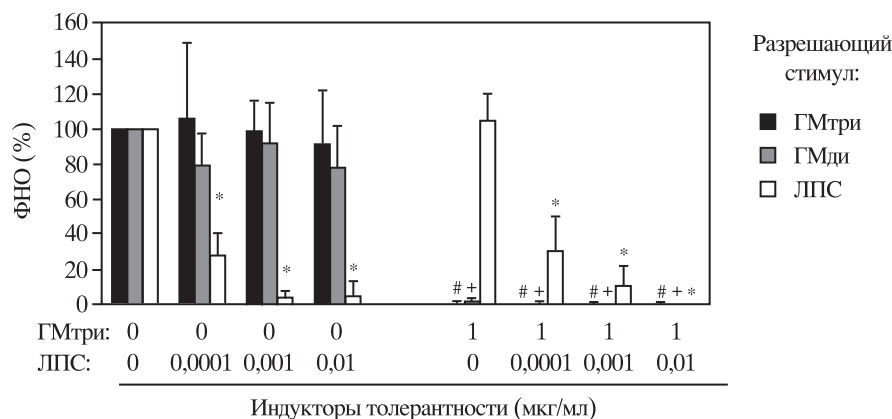


**Рис. 3.** Стимулирующая и толерогенная активность субоптимальных агонистов рецептора NOD1. **А** – Уровни TNF в супернатантах МФ, стимулированных ГМтри, ГМтетра, диГМтетра и ЛАКтри (10 мкг/мл) однократно в течение 24 ч ( $M \pm \sigma$ ;  $n = 7$ ). **Б** – индукция толерантности и перекрестной толерантности МФ к ГМтри, ГМди и ЛПС с помощью ГМтри, ГМтетра, диГМтетра и ЛАКтри (все в концентрации 10 мкг/мл) ( $M \pm \sigma$ ;  $n = 5$ ).

амилпептидам и ЛПС путем одновременного или последовательного применения малых доз агонистов NOD1 и TLR4. Мы исследовали способность комбинации ГМтри и ЛПС в субоптимальных концентрациях вызывать толерантность МФ к последующей стимуляции ГМтри, ГМди и ЛПС. Комбинация ГМтри + ЛПС вызывала толерантность МФ ко всем трем разрешающим агентам (**рис. 4**). Какого-либо взаимного усиления или ослабления толерогенных эффектов ГМтри и ЛПС не наблюдалось: присутствие ЛПС не влияло на индукцию толерантности к ГМтри и ГМди, тогда как комбинация ГМтри + ЛПС вызывала такую же толерантность к ЛПС, как и только ЛПС в той же концентрации (**рис. 4**).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Создание временной толерантности к ЛПС и другим компонентам бактерий в эксперименте позволяет предотвратить развитие эндотоксического и септического шока [5–7]. В качестве возражения против данного подхода приводится то обстоятельство, что рецепторы к ЛПС и другим патоген-ассоциированным молекулярным паттернам обеспечивают естественную резистентность к патогенам. В частности, пациенты и лабораторные животные с мутациями TLR4 более подвержены бактериальным инфекциям [4]. Эти две точки зрения можно «помирить», исходя из данных Foster et al. [21], которые показали,



**Рис. 4.** Индукция толерантности и перекрестной толерантности МФ к ГМтри, ГМДП и ЛПС с помощью ЛПС и комбинации ГМтри + ЛПС ( $M \pm \sigma$ ;  $n = 5$ ).

#, +, \* обозначают отличие с  $p < 0,05$  от продукции TNF нетолеризованными МФ при действии разрешающей концентрации ГМтри, ГМди и ЛПС, соответственно.

что феномен ЛПС-толерантности распространяется только на гены с провоспалительной активностью (*TNF*, *IL6* и т.д.). Напротив, экспрессия белков с прямым антимикробным действием в «ЛПС-толерантных» МФ не только не подавляется, но даже усиливается при повторной стимуляции ЛПС [21]. У мышей, получивших ЛПС *S. typhimurium*, несмотря на развитие ЛПС-толерантности, наблюдалось повышение бактерицидной активности фагоцитов против *S. typhimurium* и улучшение выживаемости при заражении тем же микроорганизмом [6]. Наша группа ранее показала, что у мышей, получивших повторные инъекции комплекса мурамилпептидов (ГМтри + ГМтетра + диГМтетра), продукция TNF и интерлейкина-6 в ответ на этот стимул подавлена, однако бактерицидная активность клеток перитонеального экссудата и выживаемость при заражении летальной дозой бактерий повышены в несколько раз [22]. Таким образом, временное состояние толерантности рецептора не эквивалентно выключению данного рецептора в результате мутации.

Оптимальный индуктор толерантности должен обладать невысокой токсичностью и, желательно, перекрестно «толеризовать» сразу несколько рецепторов, ответственных за распознавание компонентов бактерий [5]. По данным Hedl M. с соавторами, агонист NOD2 – МДП вызывает перекрестную толерантность МФ к МДП и агонисту TLR4 – ЛПС [15]. Мы изучили возможность индукции толерантности МФ к мурамилпептидам и ЛПС с помощью обработки МФ агонистами NOD1 (мурамилпептидами, полученными из *S. typhi*)

и агонистом NOD2 (ГМди). Оказалось, что ГМтри и ГМди индуцируют толерантность к самим себе и перекрестную толерантность друг к другу (что согласуется с данными литературы [23]), но не вызывают перекрестную толерантность к ЛПС. Причины расхождения между нашими данными и результатами Hedl et al. [15] не вполне ясны и могут быть связаны с особыми свойствами МДП, который в нашей работе не использовался.

Отсутствие перекрестной толерантности между ЛПС и мурамилпептидами можно объяснить исходя из положения, что толерантность друг к другу вызывают только вещества, активирующие один и тот же сигнальный путь [10]. Согласно имеющимся данным, сигнальные пути от NOD1 и NOD2 практически идентичны [24], тогда как их объединение с сигнальными путями от TLR4 происходит лишь на поздних этапах (активация киназы ИКК). Интересно, что ГМтри полностью подавляет ответ на ГМди, тогда как ГМди подавляет ответ на ГМтри лишь на 90%. Это показывает, что у рецептора NOD1 существует дополнительный сигнальный путь, отсутствующий у NOD2. С практической точки зрения, использование ГМтри и других агонистов NOD1 для создания толерантности, вероятно, предпочтительнее, чем применение агонистов NOD2, т.к. позволяет «закрыть» одновременно два рецептора (NOD1 и NOD2).

Важно, что толерогенным эффектом обладали как оптимальные, так и субоптимальные (с точки зрения индукции TNF при однократной стимуляции) концентрации ГМтри. Кроме того, субоптимальные агонисты NOD1, такие как ГМтетра, диГМтетра и ЛАКтри,

обладали сходной с ГМтри толерогенной активностью при меньшей способности индуцировать выработку TNF в стадию индукции толерантности (рис. 3). Те же закономерности наблюдались и для субоптимальных концентраций ЛПС. В перспективе это позволит минимизировать побочные эффекты, связанные со способностью ЛПС и мурамилпептидов индуцировать выработку TNF и других провоспалительных цитокинов.

Хотя изученные в работе мурамилпептиды не вызывали толерантность к ЛПС, тем не менее возможна индукция сочетанной толерантности к мурамилпептидам и ЛПС путем сочетанного применения соответствующих агонистов. Поскольку мурамилпептиды и ЛПС способны взаимно потенцировать выработку провоспалительных цитокинов [25], то в условиях *in vivo* вводить те и другие необходимо в субоптимальных дозах и, вероятно, последовательно, а не одновременно. Как показано в данной работе, субоптимальные концентрации агонистов NOD1/NOD2 и TLR4 не оказывают взаимного влияния на индукцию толерантности к самим себе. Это дает основание полагать, что толерогенная активность мурамилпептидов и ЛПС при сочетанном применении *in vivo* будет не ниже, чем при использовании каждого из двух соединений в отдельности, что позволит применять мурамилпептиды и ЛПС как независимые, взаимно дополняющие друг друга средства профилактики септического шока. Это предположение нуждается в проверке на моделях эндотоксического и септического шока *in vivo*.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aboab J., Nardi O., Lipiner D., Sharshar T., Annane D. Emerging drugs for the treatment of sepsis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2006, 11(1), 7–22.
2. Passlick B., Labeta M.O., Izbicki J.R., Ostertag P., Loffler T. et al. Prevention of experimental endotoxin shock by a monocyte activator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995, 39(11), 2535–2540.
3. Taveira da Silva A.M., Kaulbach H.C., Chuidian F.S., Lambert D.R., Suffredini A.F. et al. Brief report: shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328(20), 1457–1460.
4. Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 2003, 348(2), 138–150.
5. Wang J.H., Doyle M., Manning B.J., Blankson S., Wu Q.D. et al. Cutting edge: bacterial lipoprotein induces endotoxin-independent tolerance to septic shock. *J. Immunol.* 2003, 170(1), 14–18.
6. Lehner M.D., Ittner J., Bundschuh D.S., van Rooijen N., Wendel A. et al. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to Salmonella enterica serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infect. Immun.* 2001, 69(1), 463–471.
7. Freudenberg M.A., Galanos C. Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect. Immun.* 1988, 56(5), 1352–1357.
8. Cross A.S. Endotoxin tolerance-current concepts in historical perspective. *J. Endotoxin Res.* 2002, 8(2), 83–98.
9. Cavaillon J.M., Adrie C., Fitting C., Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J. Endotoxin Res.* 2003, 9(2), 101–107.
10. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S. et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007, 178(2), 1164–1171.
11. Suffredini A.F., Hochstein H.D., McMahon F.G. Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli O:113 endotoxin. *J. Infect. Dis.* 1999, 179(5), 1278–1282.
12. Tidswell M., Tillis W., Larosa S.P., Lynn M., Wittek A.E. et al. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* 2010, 38(1), 72–83.
13. Chamailard M., Hashimoto M., Horie Y., Masumoto J., Qiu S. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* 2003, 4(7), 702–707.
14. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamailard M., Labigne A. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(11), 8869–8872.
15. 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), 19440–19445.
16. Parant M.A., Pouillart P., Le Contel C., Parant F.J., Chedid L.A. et al. Selective modulation of lipopolysaccharide-induced death and cytokine production by various muramyl peptides. *Infect. Immun.* 1995, 63(1), 110–115.
17. Cartwright N., Murch O., McMaster S.K., Paul-Clark M.J., van Heel D.A. et al. Selective NOD1 agonists cause shock and organ injury/dysfunction in vivo. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007, 175(6), 595–603.
18. Pashenkov M.V., Popilyuk S.F., Alkhasova B.I., L'vov V.L., Murugin V.V. et al. Muropeptides

- trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 2010, 10(8), 875–882.
19. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003, 278(43), 41702–41708.
  20. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D., Andronova T., Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine* 2007, 25(23), 4515–4520.
  21. Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 2007, 447(7147), 972–978.
  22. Пащенко М.В., Попилук С.Ф., Алхазова Б.И., Львов В.Л., Феденко Е.С. и др. Иммунобиологические свойства мурамилпептидных фрагментов пептидогликана грамотрицательных бактерий. *Иммунология* 2010, 31(3), 119–125.
  23. Kim Y.G., Park J.H., Daignault S., Fukase K., Nunez G. Cross-tolerization between Nod1 and Nod2 signaling results in reduced refractoriness to bacterial infection in Nod2-deficient macrophages. *J. Immunol.* 2008, 181(6), 4340–4346.
  24. Strober W., Murray P.J., Kitani A., Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6(1), 9–20.
  25. Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D. et al. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 2005, 35(8), 2459–2470.

## INDUCTION OF TOLERANCE OF HUMAN MACROPHAGES TO LIPOPOLYSACCHARIDE AND MURAMYL PEPTIDES FROM GRAM-NEGATIVE BACTERIA

**M.V. Pashenkov, B.I. Alkhazova, V.L. L'vov, B.V. Pinegin**

*National Research Center «Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia»,  
Moscow, Russia*

The induction of temporary tolerance of macrophages to bacterial components, including lipopolysaccharide (LPS) and muramyl peptides, is considered as a potential strategy to prevent septic shock. We studied the ability of LPS and muramyl peptides from Gram-negative bacteria to induce tolerance of macrophages to these same compounds as well as cross-tolerance. Muramyl peptide agonists of NOD1 and NOD2 receptors, when used at optimal and suboptimal concentrations, induced cross-tolerance to one another, but not to LPS, and did not affect LPS-induced tolerance to LPS. In turn, optimal and suboptimal concentrations of LPS did not induce cross-tolerance to muramyl peptides and did not influence muramyl-peptide-induced tolerance to muramyl peptides. Thus, muramyl peptides and LPS may be used as independent, complementary means of septic shock prevention.