

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ И СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ THP-1 МОНОЦИТОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОРБОЛ-МИРИСТАТ-АЦЕТАТА (РМА)

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Ершов Ф.И.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Исследованы уровни экспрессии TLR/RLR- генов и продукция цитокинов в процессе дифференцировки клеток моноцитарной лейкемии THP-1 в морфологически зрелые макрофаги добавлением РМА (форбол 12-миристанат 13-ацетат) через 1 и 5 дней. Впервые в зрелых макрофагах показаны высокие уровни стимуляции генов сигнальных иммунных рецепторов и факторов транскрипции и ингибирующее действие TLR3, TLR7/TLR8, TLR9-агонистов. Активированные РМА-THP-1 макрофаги секретируют в среду большие количества воспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α .

Ключевые слова: клетки THP-1, дифференцировка РМА, макрофаги, гены TLR/RLRs, цитокины, TLR-агонисты

REGULATION OF TLR/RLR GENE ACTIVITY AND SYNTHESIS OF CYTOKINES DURING PHORBOL MYRISTATE ACETATE (PMA)-INDUCED DIFFERENTIATION OF THP-1 MONOCYTES INTO MACROPHAGE-LIKE CELLS

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Ershov F.I.

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The levels of TLR/RLR gene expression and production of some cytokines were studied in monocytic THP-1 cell line during its differentiation to mature macrophage-like forms induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment for 1 and 5 days *in vitro*. For the first time, we have shown high induction levels for the genes that encode signaling immune receptors and transcription factors in response to PMA, as well as inhibitory effects of TLR3, TLR7/TLR8, TLR9-agonists in mature macrophages. The PMA-activated THP-1 macrophage-like cells secreted large quantities of inflammatory IL-1 β and TNF α cytokines into culture medium.

Keywords: THP-1 cells, PMA, differentiation, macrophages, TLR/RLR genes, cytokines, TLR-agonists

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 193-43-19.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Address for correspondence:

Sokolova Tatiana M.
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (499) 193-43-19.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Образец цитирования:

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, Ф.И. Ершов
«Регуляция активности генов TLR/RLR-рецепторов
и синтез цитокинов в процессе дифференцировки THP-1
моноцитов в макрофаг-подобные клетки под действием
форбол-миристанат-ацетата (РМА)» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 27-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34

© Соколова Т.М. и соавт., 2017

For citation:

T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, A.N. Shuvalov, F.I. Ershov
“Regulation of TLR/RLR gene activity and synthesis of cytokines
during phorbol myristate acetate (PMA)-induced differentiation
of THP-1 monocytes into macrophage-like cells”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 1, pp. 27-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-27-34>

Введение

Клеточная линия ТНР-1 получена от ребенка с острой моноцитарной лейкемией [14]. Сегодня клетки ТНР-1 широко используются как модельная система *in vitro* для изучения регуляции дифференцировки моноцитов в макрофаги иммуномодулирующими препаратами [7, 12]. Добавление к суспензионной клеточной культуре ТНР-1 форболового эфира (форбол-12-миристан-13-ацетат – РМА) вызывает прикрепление клеток к стеклу (адгезию) и стабильное изменение их фенотипа на макрофаг-подобный. В литературе описаны оптимальные условия культивирования клеток ТНР-1 с РМА с целью достижения максимального сходства макрофагов с образующими из моноцитов в организме [8, 13]. Мы использовали разработанные методики в настоящей работе.

У человека известно 10 видов Toll-подобных рецепторов (TLRs), участвующих в распознавании разных молекулярных структур: микробные липопептиды (TLR1, TLR2, TLR6), липополисахариды (TLR4), флагелин (TLR5) и нуклеиновые кислоты (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [11]. Последние имеют эндосомальную локализацию. Дополнительно существуют два цитоплазматических сенсора RIG1 и MDA5 для вирусных и клеточных осРНК и дсРНК. Все перечисленные рецепторы широко представлены в иммунокомпетентных клетках. В реализации иммунных рецепторных TLR- и RLR-сигналов ключевую роль играют адапторы MyD88 и TRIF, IFN-регулируемый митохондриальный белок IPS, а также факторы транскрипции – универсальный NF-κB и IFN-регулируемые IRF3- и IRF7-активаторы промоторов генов воспалительных цитокинов и IFN типа 1 [10].

Процессы дифференцировки миелоидных предшественников и моноцитов в зрелые макрофаги и дендритные клетки являются ключевыми в адаптивном иммунном ответе на патогены. Механизмы клеточной регуляции во многом связаны с участием в них факторов сигнальной трансдукции, прежде всего с активацией TLR/RLR-рецепторов врожденного иммунитета [12]. Спектры активированных генов в макрофагах, дифференцированных РМА в культуре ТНР-1, имеют определенное сходство с макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров добавлением ГМ-КСФ (гранулоцит-макрофаг-колоний-стимулирующий фактор) [9]. Однако в этой работе не были исследованы гены TLR/RLR-рецепторов врожденного иммунитета и ряд ключевых факторов сигнальной трансдукции.

В нашей работе впервые изучено действие РМА на экспрессию группы генов сигналь-

ной трансдукции в процессе дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаг-подобные клетки. Параллельно определена секреция воспалительных цитокинов и реакция на TLR-агонисты дифференцированными макрофагами.

Материалы и методы

Клетки ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC TIB-202) получены из РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали с концентрацией 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с глутамином, 10% эмбриональной сывороткой телят и антибиотиками. В исследованиях *in vitro* ТНР-1 клетки были дифференцированы в макрофаги добавлением 50-100 нг/мл форбол12-миристан13-ацетата (РМА, Sigma-Aldrich) в течение 1 и 5 дней согласно известной процедуре РМА [8, 13]. Микроскопическое исследование монослоя ТНР-РМА-макрофагов проводили в инвертированном световом микроскопе DMIL (Leica Microsystems, Германия) при увеличении в 100 и 400 раз. Микрофотосъемку клеток выполняли с помощью оборудования Nikon digital camera DXM1200F.

Использовали TLR-агонисты из набора Human TLR1-TLR9 Agonist Kit (InvivoGen, USA). Агонисты добавляли в свежую культуральную среду на 5 день дифференцировки ТНР-РМА макрофагов. Концентрации TLR-агонистов соответствовали рекомендуемым фирмой производителем и составляли poly(IC)NMW и poly(IC)LMW – 4 мкг/мл; ssRNA40 – 400 нг/мл. Препарат Ридостин «Диафарм» (Рибонуклеат натрия, смесь осРНК и дсРНК киллерных штаммов дрожжей *Sacharomyces cerevisiae*) добавлен в эффективной для ТНР-1 дозе 40 мкг/мл [1].

Анализ экспрессии генов проведен методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Метод позволяет количественно оценить уровни синтеза мРНК в клетках. Суммарную РНК выделяли из ~1 млн клеток с помощью реагента PurZol (Bio-Rad, USA) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК, осаждали изопропанолом и обрабатывали ДНК-азой (набор RNA-free, Ambion). На матрице суммарной РНК получали кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ) с random (случайные) праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5x буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, USA).

Полученную кДНК в разведении 1/3 и 1/6 тестировали в количественной ПЦР с парами специфических олигонуклеотидных праймеров. Использовали 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA). Структура праймеров для мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, RIG1, MDA5, IPS, NF-κB, IRF3, IRF7 опубли-

кованы нами ранее [1-5]. Дополнительно в программе Primer 3 Blast рассчитаны пары праймеров к мРНК MyD88: прямой 5'-gtttcgatgcctcatctgct и обратный 5'-gtggccttctagccaacct; мРНК TRIF: прямой 5'-tttgtgatcctccacgscag и обратный 5'-ctgagtggctatggcgtcc. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия).

ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °С 2 мин, далее 55 циклов 94 °С 10 с, 50-54 °С 20 с, 72 °С 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флуоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка кратности экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме с оценкой средних стандартных ошибок в повторных образцах. Показатели контролей принимали равными 1.

В конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-амплификатов. Дополнительно ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием на соответствие расчетным размерам.

Иммуноферментный анализ секретируемых клетками цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-10, IFN α и IFN γ выполнен с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций повторных образцов в пг/мл выполнен на микропланшетном фотометре модель Anthos 2010 в программе ADAP+ (Биохим-Мак, Россия).

Статистическая обработка

Данные ОТ-ПЦР в реальном времени получены с 3 повторными образцами кДНК и представлены как средние значения дельтаCq со стандартными отклонениями (SD). Величины SD не превышали 15% от значений средних. Значимость различий между образцами оценена по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ в программе Medcalc.

Результаты и обсуждение

Добавление к суспензионной культуре ТНР-1 моноцитов форболового эфира (PMA) в дозе от 50 до 100 мкг/мл вызывает прочное прикрепление клеток к поверхности стекла через 24 ч культивирования. После удаления PMA (смена питательной среды) клетки сохраняют адгезивные свойства на протяжении последующих 5 дней культивирования и меняют морфологию. Размеры клеток увеличиваются и подобно макрофагам содержат внутриклеточные включения (рис. 1А, Б).

По данным литературы [8], макрофаг-подобные ТНР-РМА приобретают иммунофенотип CD11b и резистентны к индукторам апоптоза. Механизм адгезивного действия PMA связан с активацией группы киназ, прежде всего протеинкиназы С, а также AMPK и Syk [6].

Исходная суспензионная культура ТНР-1 моноцитов имеет, по нашим данным [1], низкие и нестабильные конститутивные уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета. В полученной монослойной культуре ТНР-РМА-макрофагов происходит выраженная активация транскрипции генов TLR/RLR рецепторов и факторов сигнальной трансдукции (рис. 2А, Б).

Исследования проведены на 1 и 5 день в 2-х независимых экспериментах, используя приблизительно равные количества клеток в контроле и опыте. PMA стимулирует транскрипцию мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, их адапторов TRIF и MyD88, цитоплазматических хеликаз RIG1, MDA5 и фактора транскрипции NF- κ B. Ряд генов (TLR3, TLR7 и MDA5) активируются PMA быстро (через 24 ч). Группа генов TLR2, TLR3, TLR4, TLR8, TLR9 реагирует на форболовый эфир медленнее, их активность возрастает к 5 дню. Сравнительный анализ ПЦР-продуктов в агарозном геле на 1 и 5 день дифференцировки показывает наличие специфических ДНК-амплификатов с расчетными размерами (рис. 2Б).

Таким образом, процессы дифференцировки, вызываемые PMA в ТНР-1 моноцитах, сопровождаются ростом транскрипционной активности TLR/RLRs генов и их сигнальных факторов.

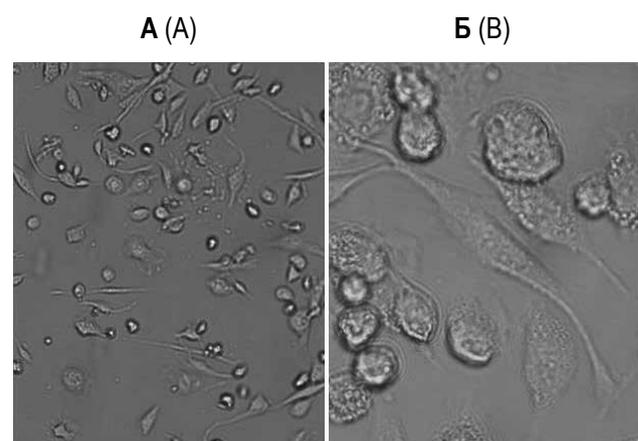


Рисунок 1. Морфология дифференцированных ТНР-макрофагов под действием PMA

Примечание. Срок исследования 24 ч, микрофотографии при увеличении в 100 (А) и 400 (Б) раз.

Figure 1. Morphology of PMA-differentiated THP macrophages
Note. 24-h treatment. Magnification of 100x (A), and 400x (B).

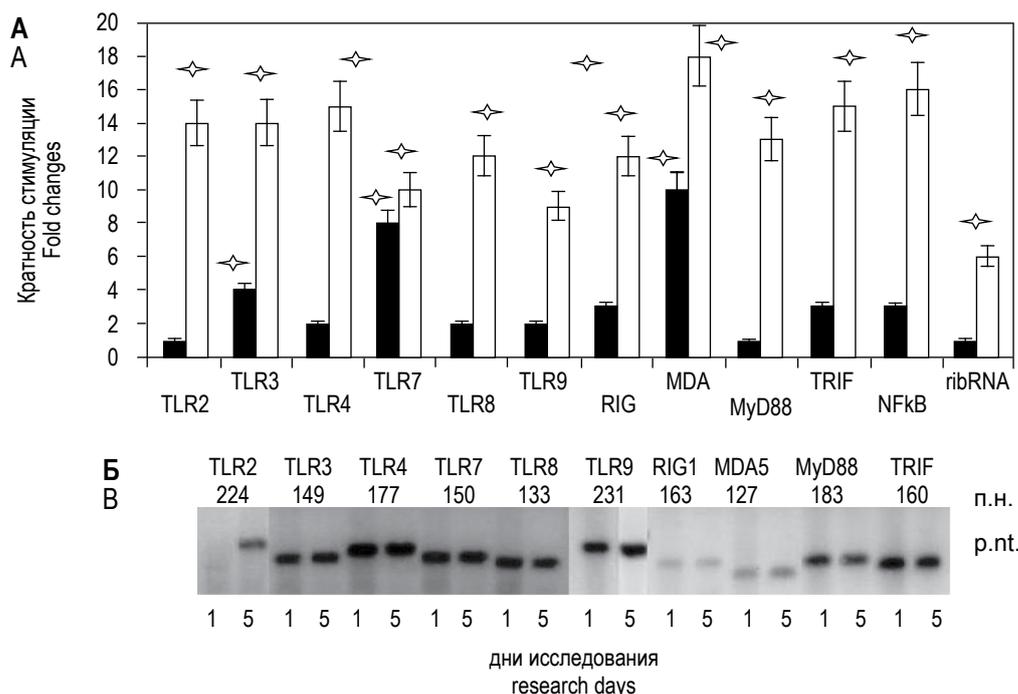


Рисунок 2. Стимуляция РМА экспрессии генов сигнальных рецепторов и адапторов в моноцитах THP-1 в процессе дифференцировки в макрофаги

Примечание. (А) По оси абсцисс – название генов, по оси ординат – кратность их стимуляции РМА (дельтаCq), относительно экспрессии генов в контроле клеток без РМА, принятых равными 1. Уровни стимуляции через 1 день (черный) и 5 дней (белый). Достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$ обозначены звездочками.

(Б) Электрофорез в 1,5% агарозном геле ПЦР-продуктов генов. Указаны размеры полученных ДНК-амплификатов в парах нуклеотидов (п.н.), соответствующие расчетным.

Figure 2. PMA-stimulated expression of signaling gene receptors and adaptors during THP-1 differentiation from monocytes to macrophages

Note. (A) Abscissa, gene designation. Ordinate, degree of PMA-induced gene expression (deltaCq) as ratios to gene expression in non-PMA-induced cells, taken as 1. Induction levels after 1 day (black) and 5 days of treatment (white). *, significant differences between experimental series ($p < 0.05$). (B) Electrophoretic patterns of gene-specific PCR products separated in 1.5% agarose gel. Calculated sizes of DNA amplicons (bp) are also shown.

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ТНР-МОНОЦИТАМИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РМА И ЛПС ЧЕРЕЗ 24 Ч

TABLE 1. EFFECT OF PMA AND LPS ON CYTOKINE PRODUCTION BY THP-MONOCYTIC CELLS AFTER 24-h INCUBATION

Цитокины* Cytokines pg/ml*	Варианты обработки Treatment options		
	ТНР	ТНР+РМА	ТНР+ЛПС ТНР+LPS
IL-1β	2-4	400-500	30-40
IL-10	0,4	20-25	2-3
TNFα	2-3	80-100	40-50
IFNα	2-3	2-3	2-3
IFNγ	1-2	1-4	1-4

Примечание. * – диапазон повторных измерений в 2-х опытах.

Note. * – Range of repeated measurements for two separate experiments.

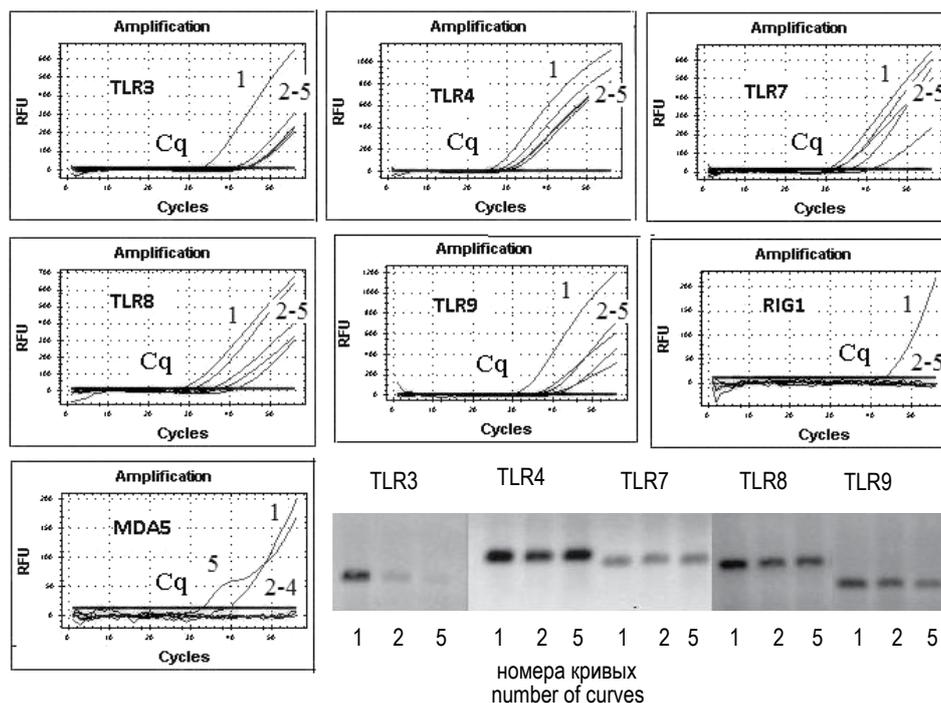


Рисунок 3. Действие TLR-агонистов на экспрессию TLR/RLRs генов в дифференцированных THP-ПМА-макрофагах
Примечание. По оси абсцисс – пороговые циклы амплификации Cq TLR/RLRs генов, по оси ординат – уровни включения флуоресцентного красителя Eva Green в ДНК-амплификаты. 1 – THP-ПМА-макрофаги, 2-5 – THP-ПМА-макрофаги + TLR-агонисты. Электрофорез в 1,5% агарозном геле ПЦР-продуктов.

Figure 3. Effect of TLR-agonists upon TLR/RLRs gene expression in differentiated PMA-induced THP macrophages
Note. Abscissa, threshold Cq values for appropriate TLR/RLRs gene amplified. Ordinate, levels of fluorescent Eva Green binding to DNA amplification products. 1, PMA-THP macrophages; 2 to 5, THP-PMA macrophages with addition of TLR-agonists. The PCR products were analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gel.

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ TLR-АГОНИСТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ TLR/RLRs ГЕНОВ В ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ THP-ПМА МАКРОФАГАХ

TABLE 2. EFFECT OF TLR-AGONISTS UPON EXPRESSION OF TLR/RLR GENES IN DIFFERENTIATED THP-PMA MACROPHAGES

Агонисты Agonists	THP-PMA Cq	THP-PMA + polyIC HMW Cq1-Cq2	THP-PMA + polyIC LMW Cq1-Cq3	THP-PMA + ssRNA Cq1-Cq4	THP-PMA + РидостинCq1-Cq5 THP-PMA + Ridostin Cq1-Cq5
Гены Genes	1	2	3	4	5
TLR3	33	↓-11	↓-11	↓-11	↓-8
TLR4	26	↓-5	↓-3	↓-3	-1
TLR7	30	↓-2	↓-11	↓-2	↓-6
TLR8	29	↓-3	↓-6	↓-8	↓-13
TLR9	30	↓-11	↓-8	↓-5	↓-7
RIG1	43	↓*	↓*	↓*	↓*
MDA5	39	↓*	↓*	↓*	↑+6

Примечание. * – неопределяемые уровни экспрессии.
Note. * – non-detectable expression levels.

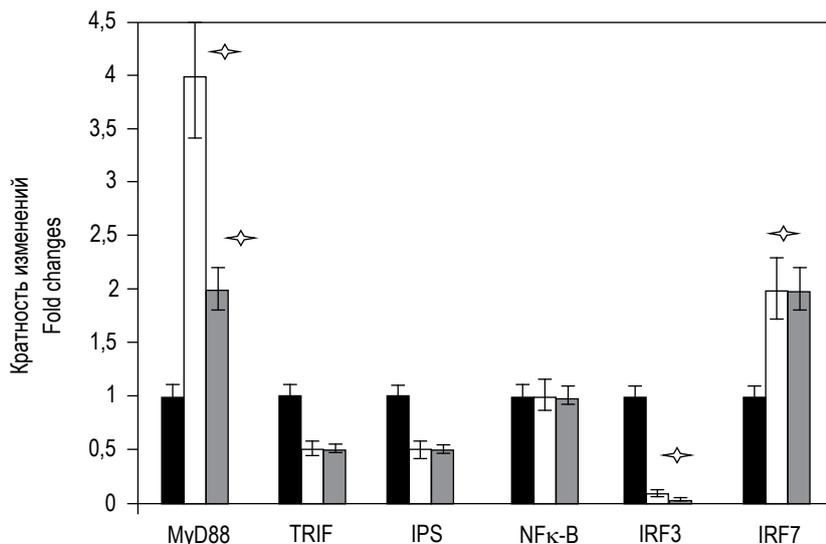


Рисунок 4. Действие TLR-агонистов на экспрессию генов сигнальных адапторов и факторов транскрипции в дифференцированных ТНР-РМА-макрофагах

Примечание. По оси абсцисс – название генов, по оси ординат – кратность изменений их активности. Контроль – ТНР-РМА-макрофаги принят равным 1 (черный), ТНР-РМА – макрофаги + poly IC HMW (белый), ТНР-РМА + Ридостин (серый). Достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$ обозначены звездочками.

Figure 4. Effect of TLR-agonists on expression of signaling adaptor genes and transcription factors in differentiated PMA-THP macrophages

Note. Abscissa, gene designation. Ordinate, ratios of gene activity against controls. Control series, gene expression in PMA-THP macrophages, taken as 1 (black); PMA-THP macrophages + polyIC HMW (white); PMA-THP + Ridostin (grey). *, significant differences between experimental series ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. ДЕЙСТВИЕ TLR-АГОНИСТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В ТНР-РМА-МАКРОФАГАХ

TABLE 3. EFFECTS OF TLR AGONISTS UPON PRODUCTION OF CYTOKINES IN THP-PMA MACROPHAGES

Варианты Treatment options	Цитокины* Cytokines, pg/ml*				
	IL-1β	TNFα	IL-10	IFNα	IFNγ
ТНР-РМА, 5d	100-200	70-150	40-50	5-10	3-4
+ Ридостин + Ridostin	3000-3500	500-600	70-80	10-15	4-5
+ poly-IC	4000-4300	300-400	40-50	2-5	4-5
+ ssRNA	500-600	200-250	20-30	10-15	4-5

Примечание. Диапазон цитокинов в 2-х независимых опытах.

Note. Ranges of cytokine levels in two independent experiments.

Под действием РМА в ТНР-1 моноцитах возрастает и продукция воспалительных цитокинов (табл. 1).

Активированные макрофаги секретируют большие количества IL-1β и TNFα и небольшие количества IL-10. Не обнаружено секреции ими IFNα и IFNγ. Тип цитокинов говорит об участии адаптора MyD88 и фактора NF-κB. Цитокиновая реакция на липополисахарид (ЛПС), классический активатор ТНР-1 моноцитов, слабее, чем на форболовый эфир.

Особый интерес представляет ответ РМА-дифференцированных макрофагов на известные

TLR-агонисты. Нами исследованы 3 вида TLR-агонистов из набора фирмы InvivoGen: TLR3 – polyIC HMW и LMW (дсРНК высокого и низкого Mw), TLR8 – ssRNA40 (односпиральная РНК) и отечественный препарат Ридостин (смесь двуспиральных и односпиральных РНК дрожжей). Ридостин является активатором генов TLR3, TLR8, MDA5 сигнальных путей врожденного иммунитета, обеспечивающих синтез IFN и воспалительных цитокинов в клетках крови человека [2].

На рисунке 3 приведены данные ОТ-ПЦР в реальном времени (кривые накопления специфических ДНК-амплификатов TLR/RLR-генов

и последующий анализ их в агарозном геле). Видно, что в пробах ТНР-РМА макрофагов без TLR-агонистов (кривые 1) величины пороговых циклов (Cq) меньше величин Cq в пробах с добавлением TLR-агонистов (кривые 2-5). Это означает подавление агонистами экспрессии генов в дифференцированных ТНР-РМА макрофагах. Разница Cq (ТНР-РМА) – Cq(ТНР-РМА + агонисты) отрицательная (табл. 2).

Исключением является стимуляция Ридостином транскрипции гена MDA5. Между исследованными агонистами имеются определенные отличия по выраженности действия. Вместе с тем разные РНК/ДНК-структуры имеют и перекрестные мишени. Сильный ингибирующий эффект агонистов отмечен на эндосомальный ген TLR3 и цитоплазматические сенсоры RIG1/MDA5. PolyIC LMW и Ридостин снижает транскрипцию группы генов TLR3, TLR7, TLR8, TLR9. PolyIC HMW преимущественно подавляет экспрессию генов TLR3, TLR9. SsRNA40 (односпиральная РНК) ингибирует активность генов TLR3, TLR8, TLR9. В большей степени TLR-агонисты подавляют активность генов TLR3/TLR9 и, в меньшей степени, транскрипцию гена TLR4.

В зрелых ТНР-РМА-макрофагах polyIC HMW и Ридостин оказывают на гены факторов сигнальных путей слабо выраженное действие (рис. 4).

TLR-агонисты не влияют на активность гена фактора транскрипции NF-κB и слабо стимулируют транскрипцию генов MyD88 и IRF7. Однако агонисты заметно подавляют транскрипцию генов IFN-зависимых путей – IRF3, IPS и TRIF.

Ответ дифференцированных ТНР-РМА-макрофагов на TLR3, TLR7/TLR8 и TLR9-агонисты похож на описанный в зрелых дендритных клетках на TLR2/TLR4-агонист ЛПС [15]. Это дает нам основание считать, что в зрелых ТНР-РМА-макрофагах активация TLR/RLR-сигнальных процессов достигает максимума и включается механизм обратной связи.

При этом в зрелых ТНР-РМА-макрофагах не нарушается способность к продукции цитокинов (табл. 3).

Добавление к ним polyIC HMW, ssRNA40 и Ридостина усиливает секрецию ими IL-1β и TNFα (табл.1).

Таким образом, впервые показано, что дифференцировка ТНР-1 моноцитов в макрофаги под действием РМА сопровождается активацией сигнальных механизмов врожденного иммунитета с участием генов TLR/RLR-рецепторов, их адапторов и транскрипционного фактора NF-κB. Состояние зрелости активированных макрофагов проявляется негативной реакцией на TLR-агонисты. Вместе с тем дифференцированные макрофаги продолжают секретировать воспалительные цитокины IL-1β TNFα.

Важным является вопрос об отличиях свойств ТНР-РМА-макрофагов, полученных из клеток моноцитарной лейкемии, и макрофагов, образующихся из моноцитов крови здоровых доноров. Дальнейшие исследования позволят сравнить эти два типа макрофагов по генным реакциям и секретируемым цитокинам.

Список литературы / References

1. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов (ИФН) и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLRs-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116 // Российский биотерапевтический журнал, 2016. Т.15, № 3. С. 28-33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 28-33. (In Russ.)]
2. Соколова Т. М., Шувалов А. Н., Полосков В. В., Ершов Ф. И. Стимуляция генов сигнальной транскрипции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин // Цитокины и воспаление, 2015. № 2. С. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
3. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов ИФН // Медицинская иммунология, 2015. № 1. С. 7-18. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I. Activation of genes controlling the immune signalling pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for interferon preparations and IFN inducers. *Meditsinskaya immynologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18>

4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Стимуляция экспрессии генов сигнальных рецепторов и индукция синтеза цитокинов в клетках крови человека при действии препарата «Рибонуклеат натрия» и его комбинаций с гриппозными вакцинами *in vitro* // Молекулярная медицина, 2015. № 1. С.12-17. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Shapoval I.M., Kostinov M.P. Stimulation of signaling receptors gene expression and induction of synthesis of cytokines in human blood cells by drugs "Ribonucleat sodium" and its combination with inactivated influenza vaccines. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2015, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
5. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция транскрипции клеточных генов препаратом «Иммуномакс»: активация генов интерферонов и интерлейкинов // Иммунология, 2014. № 1. С. 17-21. [Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "Immunomax": activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya = Immunology*, 2014, no. 1, pp. 17-21. (In Russ.)]
6. Chang M-Y., Huang D-Yi, Ho F.M., Huang K-C., Lin W-W. PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *Plos one* 2012, Vol. 7, Issue 7, e40999.
7. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, Vol. 23, no. 1, pp. 37-45.
8. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLos one*, 2010, Vol. 9, no. 1, e8668.
9. Kohro T., Tanaka T., Murakami T., Wada Y., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. A. Comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol12-myristate13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. of Atheroscler Tromb*, 2004, Vol. 11, pp. 88-97.
10. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 426, no. 6, pp. 1246-1264.
11. Paul-Clark M.J., George P.M., Gatheral T., Parzych K., Wright .R., Crawford D., Bailey L.K., Reed D.M., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2012, Vol. 135, no. 2, pp. 200-215.
12. Remer K.A., Brcic M., Sauler K.S., Jungi T.W. Human monocytoic cells as a model to study Toll-like receptor-mediated activation. *J. Immunol Methods*. 2006, Vol. 313, no. 1-2, pp. 1-10.
13. Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, Vol. 59, pp. 555-561.
14. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 1980, Vol. 26, pp. 171-176.
15. Visintin A., Mazzoni A., Spitzer J.H., Wyllie D.H., Dower S.K., Segal D.M. Regulation of Toll-Like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 1, pp. 249-255.

Авторы:

Соколова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полосков В.В. — младший научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шувалов А.Н. — младший научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ершов Ф.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель отдела интерферонов и лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sokolova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Poloskov V.V., Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Shuvalov A.N., Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ershov F.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief, Department of Interferons and Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.09.2016
Принята к печати 19.09.2016

Received 16.09.2016
Accepted 19.09.2016