 10.15789/1563-0625-IOE-3023

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА IN VITRO

Петров С. А. [1],
Каленова Л. Ф. [1],
Суховей Ю. Г. [1],
Костоломова Е. Г. [2],
Бажин А. С. [2],
Нарушко М. В. [1]

[1] ФГБУН «Тюменский научный центр» Сибирского отделения Российской академии наук, Тюмень, Россия.
[2] ФГБОУ ВО Тюменский государственный медицинский университет Минздрава России, Тюмень, РФ.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

INFLUENCE OF EXOMETABOLYTES OF PALEOBACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* FROM PERMAFROST ROCKS ON THE MECHANISMS OF FORMATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN VITRO

Petrov S. A. [a],
Kalenova L. F. [a],
Sukhovey Yu. G. [a],
Kostolomova E. G. [b],
Bazhin A. S. [a],
Narushko M. V. [a],

[a] Tyumen Scientific Center SB RAS, Tyumen, Russia.
[b] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Tyumen State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Tyumen, Russia.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Резюме

Изучено влияние метаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамм 875 TS многолетнемерзлых пород плейстоцен-голоценового периода на механизмы и направленность формирования иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека in vitro. Установлено, что экзометаболиты палеобактерий значимо активируют дифференцировку моноцитов в субпопуляции промежуточных ($CD14^+CD16^+$) и неклассических ($CD14^{lo}CD16^+$) моноцитов, эффекторных $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов со сменой маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, дифференцировку Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$), а также стимулируют синтез цитокинов IFNγ и IL-4 относительно контрольных уровней. К особенностям влияния экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа их получения – «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5ºС), «среднетемпературные» (22ºС) и «тепловые» (37ºС) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно – дифференцировку промежуточных $CD14^+CD16^+$-моноцитов, увеличение активности дифференцировки $CD8^+$-Т-лимфоцитов и синтеза IFNγ. «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно – дифференцировку неклассических $CD14^{lo}CD16^+$-моноцитов, увеличение активности дифференцировки $CD4^+$-Т-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые трое суток культивирования клеток активность дифференцировки $CD8^+$-Т-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой $CD4^+$-Т-лимфоцитов, а уровень секреции IFNγ превышает уровень IL-4. На третьи сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к нормализации баланса между IFNγ(Th1) и IL-4(Th2) к седьмым суткам. Прослеживается четкое влияние Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что с одной стороны, препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой – не приводят к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3 сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина IFNγ. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваниях, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-IOE-3023

Ключевые слова: метаболиты палеобактерий, субпопуляции моноцитов, Т-лимфоциты, Treg, IFNγ, IL-4, *Bacillus cereus*

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Abstract

It has been established that exometabolites of paleobacteria *Bacillus cereus* strain 875 TS significantly activate the differentiation of monocytes in the subpopulation of intermediate ($CD14^+CD16^+$) and non-classical ($CD14^{lo}CD16^+$) monocytes, effector $CD4^+$ and $CD8^+$ T-lymphocytes with a change in markers of early (CD69), mid (CD25) and late (HLA- DR) activation, differentiation of Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$), and also stimulate the synthesis of cytokines IFNγ and IL-4 relative to control levels. The peculiarities of the influence of exometabolites of paleobacteria include the dependence of immunomodulatory activity on the method of their preparation - “cold” (obtained from bacteria when they are cultivated at 5ºC), “mid temperature” (22ºC) and “heat” (37ºC) metabolites. “Cold” metabolites stimulate mainly the mechanisms of the immune response with pro-inflammatory activity, in particular, the differentiation of intermediate $CD14^+CD16^+$ monocytes, an increase in the activity of differentiation of $CD8^+$ T-lymphocytes and the synthesis of IFNγ. “Heat” metabolites stimulate predominantly immune response mechanisms with anti-inflammatory activity, namely the differentiation of non-classical $CD14^{lo}CD16^+$ monocytes, increased differentiation activity of $CD4^+$ T-lymphocytes and IL-4 secretion. Also a distinctive feature is the relationship between pro- and anti-inflammatory mechanisms, which do not depend on the type of exometabolites. Thus, during the first three days of cell culture, the differentiation activity of $CD8^+$ T-lymphocytes prevails over the differentiation of $CD4^+$ T-lymphocytes, and the level of IFNγ secretion exceeds the level of IL-4. On the third day, there is a significant increase in Treg levels, which is accompanied by a tendency to normalize the balance between IFNγ(Th1) and IL-4(Th2) by the seventh day. There is a clear influence of Tregs ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) on the strength and duration of the immune response. The increase in Treg levels occurs moderately and briefly, which, on the one hand, prevents the excessive development of pro-inflammatory mechanisms, and on the other hand, does not lead to the development of long-term immunosuppression. An increase in Treg levels on days 1-3 is accompanied by a decrease in the activity of monocyte differentiation in the subpopulation and the synthesis of the proinflammatory cytokine IFNγ.

Keywords: paleobacteria metabolites, monocyte subpopulations, T-lymphocyte, Treg, IFNγ, IL-4, *Bacillus cereus*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

1 **Введение**

Одной из важных задач медицины по-прежнему остается поиск способов и методов коррекции нарушений иммунного статуса. Современный уровень знаний тонких механизмов развития иммунного ответа позволяет с высокой степенью репрезентативности подойти к выбору и оценке эффективности разрабатываемых иммунотропных препаратов методами in vitro.

Известно, что направленность иммунного ответа определяется превалированием активности той или иной субпопуляции моноцитов и Т-лимфоцитов, активности регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), балансе про- и противовоспалительных цитокинов.

Популяция моноцитов, циркулирующих в периферической крови, состоит из трёх фенотипически и функционально различных субпопуляций, которые различаются по экспрессии поверхностного CD14 (клеточный корецептор липополисахарида) и CD16 (низкоаффинный рецептор IgG) [13; 17; 29]. Например, классические моноциты ($CD14^{hi}CD16^{-}$) участвуют в тканевом гомеостазе, фагоцитозе, первыми мигрируют в очаг воспаления, инициируют противогрибковый ответ, продуцируют IL-6, IL-10, G-CSF и др. [18; 26; 29; 30]. Промежуточные моноциты ($CD14^{hi}CD16^{+}$) отвечают, в том числе, за пролиферацию и стимуляцию Т-лимфоцитов, процессинг MHC класса II, антигенпрезентацию, активируют $CD8^{+}$-Т-клетки, индуцируют ангиогенез и др. [15; 29; 30]. Неклассические ($CD14^{lo}CD16^{+}$) являются патрулирующими моноцитами, предшественниками резидентных макрофагов, ответственны за активацию $CD4^{+}$-Т-клеток и выработку IL-4, обнаружение вирусов, противоинфекционный иммунитет, секретируют высокие уровни TNF-α, IFN-α, IL-1β и др. [16; 18; 26; 29; 30]. Направление дифференцировки моноцитов в субпопуляции регулируется действием системных факторов, в том числе бактериального происхождения [10; 17; 18; 23; 26].

Процесс активации эффекторных $CD4^{+}$- и $CD8^{+}$-Т-лимфоцитов проявляется пролиферацией клеток с последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации [9; 14; 24]. Контроль за силой и продолжительностью пролиферации эффекторных Т-лимфоцитов и иммунного ответа осуществляют, в том числе, регуляторные Т-клетки. Регуляторные Т-клетки относятся к субпопуляции $CD3^{+}CD4^{+}$-Т-клеток с высоким уровнем экспрессии $CD25^{hi}$ и низкой экспрессией $CD127^{-}$ маркеров на поверхности клеток ($CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$). При связывании TCR с антигеном Treg приобретают способность ингибировать пролиферацию Т-эффекторов прямыми контактами через связывание поверхностных молекул CTLA-4 на Treg-клетках с CD80/CD86 молекулами (естественные Treg) на эффекторных Т-клетках или местную секрецию цитокинов IL-10, TGFβ (индуцибельные Treg) [7; 8; 9; 14]. Естественные Treg дифференцируются непосредственно в тимусе. Индуцибельные Treg клетки формируются в периферических лимфоидных органах из Т-клеток под влиянием различных факторов, в том

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

числе при контакте с дендритными клетками, макрофагами, цитокинами IL-10 и TGFβ и др. Вслед за этим активированные индуцибельные Treg клетки синтезируют IL-10 и TGFβ, под влиянием которых подавляются аутоиммунные реакции. Недостаточность или дисфункция Treg может привести к развитию аутоиммунных заболеваний [28]. Естественные Treg более эффективно супрессируют аутореактивные Т-клетки, индуцибельные Treg – при инфекциях, трансплантации, системных воспалительных аутоиммунных и аллергических заболеваниях [9; 12].

Естественными стимуляторами иммунной системы являются микроорганизмы, отдельные компоненты которых могут обладать иммуносупрессивной и иммуномодулирующей активностью. Иммунотропные препараты бактериального происхождения применяются для предотвращения гипервоспалительного процесса при развитии инфекции, усиления иммуносупрессии за счет увеличения синтеза IL-10 [25] и увеличения числа $CD4^{+}CD25^{+}$-Treg клеток [11; 27]. Основу иммуномодуляторов микробного происхождения могут составлять рибосомально-протеогликановые комплексы бактерий, лизаты [16], конкретные антигены [25], липопротеины [11].

Интерес для поиска веществ с иммуномодулирующими свойствами, могут представлять вторичные метаболиты (экзометаболиты), секретируемые микроорганизмами во внешнюю среду. Экзометаболиты обеспечивают многообразные регуляторные системы адаптации и коммуникации микроорганизмов во внешней среде. В состав экзометаболитов входят сигнальные молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры, способные обеспечивать как межклеточное, так и межвидовое взаимодействие [1; 5; 6]. Одни из них обладают антимикробной активностью, другие являются специфическими ингибиторами ферментов, третьи – ростовыми факторами, многие обладают фармакологической активностью. Изменение температурных условий культивирования МО способно вызывать изменения в их росте/размножении, геномных структурах и отдельных метаболических реакциях [5].

Ранее нами был выявлен иммуномодулирующий потенциал у экзометаболитов палеобактерий *Bacillus sp.* из многолетнемерзлых пород позднего неогена. Причем установлен важный нюанс – иммунобиологическая активность экзометаболитов палеобактерий в значительной степени зависела от температуры при которой они получены [19; 20; 21]. Поиск штаммов микроорганизмов, способных секретировать экзометаболиты со свойствами иммуномодуляторов представляется актуальным.

Цель – оценить влияние экзометаболитов палеобактерий рода *Bacillus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние, на ранние механизмы формирования иммунного ответа in vitro в зависимости от температуры их получения.

2 **Материалы и методы**

В исследовании использован штамм 875 TS *Bacillus cereus* из дисперсных обводненных пород, перешедших в мерзлое состояние голоцен-плейстоценового периода возрастом до 40 тысяч лет (район Тарко-Сале, Западная Сибирь), депонированный в ВКПМ (регистрационный № В-12242). Микроорганизмы (МО) культивировали на ГРМ-агаре (Оболенск). Для исключения попадания веществ из питательной среды в экзометаболиты смыв МО трижды отмывали в физиологическом растворе центрифугированием. МО в дозе $1x10^7$ микробных клеток инкубировали в 1 мл физиологического раствора в течение 72 часов при 5ºС (холод, Х), 22ºС (средняя температура, С) и 37ºС (тепло, Т). Клеточную взвесь пропускали через мембранные фильтры (Millipore, 0,22um, White GSWP, USA) и получали комплекс экзометаболитов (МБ) бактерий 3 видов – холодовые (МБ-Х), среднетемпературные (МБ-С) и тепловые (МБ-Т).

Мононуклеарные клетки (МНК) человека выделяли из гепаринизированной периферической крови 0(Rh+) на градиенте плотности DIACOLL-1077. Кровь получали от трёх доноров (мужчины 25-30 лет), давших информированное добровольное согласие на взятие крови и проведение данного исследования. Культивирование МНК проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 в присутствии 5% CO_2 при 37°С в триплетах в течение 1, 3 и 7 сут. В контрольных пробах к культуре МНК добавляли полную культуральную среду. В опытных группах добавляли разные виды МБ – МБ-Х, МБ-С и МБ-Т.

Методом проточной цитометрии (цитофлуориметр CytoFLEX, BecmanCulter, США) в гейте моноцитов определяли содержание (%) классических ($CD14^{hi}CD16^{–}$), промежуточных ($CD14^{+}CD16^{+}$) и неклассических ($CD14^{lo}CD16^{+}$) моноцитов. Для идентификации моноцитов использовали моноклональные антитела CD14-FITC и CD16-PE (BecmanCulter, США) согласно инструкциям производителя. В гейте лимфоцитов определяли содержание (%) регуляторных (Treg, $CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$). хелперных $CD3^{+}CD4^{+}$- и цитотоксических $CD3^{+}CD8^{+}$-Т-лимфоцитов с маркерами ранней (CD69), средней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации. Для идентификации лимфоцитов использовали моноклональные антитела CD3-FITC и CD45-PE (Beckman Coulter). Результаты обрабатывали в программе Kaluza Analysis (Beckman Coulter). В каждом образце анализировали не менее 5×10^5 клеток. В супернатантах клеточных культур методом ИФА определяли содержание IFNγ и IL-4 с использованием наборов ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя на спектрофотометре LUCY-2(ANTHOS) (Австрия).

Анализ характера распределения исследуемых показателей соответствовал нормальному, поэтому достоверность различий между группами оценивали по *t* критерию Стьюдента в программе SPSS Statistics 21 (IBM). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

0.05. Для удобства анализа и наглядности результаты исследования отражены на рисунках в процентах от контрольного уровня.

3 **Результаты**

Оценка влияния экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus*, полученных при разных температурах, была проведена в три этапа. На первом этапе оценивалось влияние МБ на дифференцировку Мон, на втором – на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg, на третьем – на синтез цитокинов, ответственных за направленность иммунного ответа по клеточному (IFNγ) или гуморальному (IL-4) пути.

На первом этапе исследования изучено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку моноцитов. Известно, что в норме до 90% всех Мон составляют классические ($CD14^{hi}CD16^{-}$), около 10% промежуточные ($CD14^{hi}CD16^{+}$) и неклассические ($CD14^{lo}CD16^{+}$) Мон [13; 17; 29]. В нашем исследовании уровень субпопуляций в общем пуле моноцитов контрольных групп в динамике наблюдения (табл. 1) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК и соответствовал литературным данным.

В опытных группах (рис. 1) под влиянием всех видов МБ регистрируется снижение уровня классических $CD14^{hi}CD16^{-}$-Мон по сравнению с контролем. Максимально снижается уровень классических Мон при воздействии «тепловых» метаболитов ($p<0,01$ на 1-3-7 сутки культивирования МНК). На этом фоне, соответственно, возрастают уровни промежуточных и неклассических Мон. Уровень субпопуляции промежуточных $CD14^{+}CD16^{+}$-Мон максимально возрастает под влиянием «холодовых» МБ (на 3 сутки в 3 раза по сравнению с контролем, $p<0,01$ на 1-3-7 сутки культивирования). Активность дифференцировки Мон в субпопуляцию неклассических $CD14^{lo}CD16^{+}$-Мон наиболее значимо возрастает под влиянием «тепловых» МБ (в 1 сутки в 5,5 раз по сравнению с контролем, $p<0,01$ на 1-3-7 сутки культивирования МНК). Причем активность дифференцировки неклассических Мон в 1,5-2 раза выше, чем активность дифференцировки промежуточных Мон.

Из литературных данных известно, что каждая субпопуляция играет определенную роль в развитии иммунологических процессов [15; 16; 18; 26; 29; 30]. Сопоставляя известные данные с полученными результатами можно предположить, что метаболиты палеобактерий, в зависимости от температуры их получения, способны индуцировать дифференцировку Мон в разные субпопуляции и, как следствие, модулировать направленность иммунного ответа. Для подтверждения этого предположения нами были проведены 2-й и 3-й этапы исследования.

На втором этапе исследования было оценено влияние МБ палеобактерий на дифференцировку эффекторных Т-лимфоцитов, в том числе Treg. Известно, что процесс дифференцировки антигенспецифических Т-лимфоцитов в эффекторные $CD4^{+}$-и $CD8^{+}$-Т-лифоциты сопровождается последовательной экспрессией на мембране клеток маркеров ранней (CD69), средней (CD25) и

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

поздней (HLA-DR) активации. Уровень CD69 повышается через 3-12 часов после стимуляции TCR, CD25 – в течение 24 часов, а HLA-DR экспрессируется на мембране клеток примерно через 48 часов после активации [12; 24; 28].

В нашем исследовании показано, что в контрольных пробах (табл. 2) у $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов четко прослеживается динамика изменения экспрессии маркеров ранней активации с CD69 (максимум 1-е сутки) на маркеры средней активации CD25 (3-и сутки), затем на экспрессию маркеров поздней активации HLA-DR (7-е сутки), что вполне согласуется с литературными данными [14; 24].

В опытных группах (рис. 2) установлено, что метаболиты палеобактерий оказали значимое влияние на активность и направленность дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Причем это влияние в значимой степени зависело от вида метаболитов. «Тепловые» метаболиты (МБ-Т) преимущественно стимулируют дифференцировку $CD4^+$-Т-лимфоцитов, а «холодовые» метаболиты (МБ-Х) – активность дифференцировки $CD8^+$- Т-лимфоцитов. Об этом свидетельствуют, в том и другом случае, повышение уровней экспрессии ранних маркеров активации (CD69) на первые сутки, маркеров средней активации (CD25) на третьи сутки и HLA-DR на седьмые сутки культивирования МНК, что можно считать классикой дифференцировки эффекторных Т-лимфоцитов. Тем не менее, активность дифференцировки $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов между собой различается. Так, уровень экспрессии активационных маркеров на мембране $CD8^+$-Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Х практически в 2-4 раза выше, чем у $CD4^+$-Т-лимфоцитов под влиянием МБ-Т в процессе их дифференцировки.

Контроль за силой и продолжительностью иммунного ответа осуществляют, в том числе, регуляторные Т-лимфоциты (Treg). В нашем исследовании уровень экспрессии маркеров Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{hi}CD127^-$) в контроле (табл. 2) был относительно стабилен на протяжении всего срока культивирования МНК.

В опытных группах (рис. 3) по сравнению с контролем на активность дифференцировки индуцибельных Treg наиболее значимое стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты (на 1-3 сутки $p<0,01$ и на 7 сутки $p<0,05$). Под влиянием «холодовых» метаболитов уровень индуцибельных Treg был повышен на 1-3 сутки ($p<0,01$). «Среднетемпературные» метаболиты не оказали достоверного влияния на уровень Treg ($p>0,05$ в динамике наблюдения). Из этого мы делаем вывод, что метаболиты палеобактерий способны стимулировать активность индуцибельных Treg. Причем степень этой стимуляции можно направленно модулировать изменением температуры преинкубации бактерий при получении метаболитов. Супрессивная активность индуцибельных Treg под влиянием «холодовых» МБ в большей степени ассоциируется со снижением активности дифференцировки $CD4^+$-Т-лимфоцитов (в 2-3 раза по сравнению с уровнем активности $CD8^+$-Т-лимфоцитов). Под влиянием «тепловых» МБ супрессивная активность индуцибельных Treg в большей степени ассоциируется со снижением

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

активности дифференцировки цитотоксических $CD8^+$-Т-лимфоцитов (в 3-4 раза по сравнению с уровнем активности $CD4^+$-Т-лимфоцитов).

На третьем этапе исследования в супернатанте клеточной культуры МНК было определено содержание IFNγ и IL-4. Как показало наше исследование (рис. 4) на синтез Th-репетуарного цитокина IFNγ все три вида метаболитов МО оказали в той или иной степени выраженное достоверное стимулирующее влияние. Наиболее выраженное стимулирующее влияние на синтез IFNγ оказали «холодовые» метаболиты: через сутки совместного культивирования МНК с МБ-Х уровень IFNγ резко увеличился (в 15 раз по сравнению с контролем), к 7-м суткам снизился практически до контроля. Под влиянием МБ-Т максимум увеличения уровня IFNγ наблюдается на 3-и сутки – в 10 раз, под влиянием МБ-С – в 8 раз также на 3 сутки.

На синтез Th2-репетуарного цитокина IL-4 выраженное стимулирующее влияние оказали «тепловые» метаболиты. Под влиянием МБ-Т активность синтеза IL-4 сохранялась на повышенном уровне (в 2-2,8 раза по сравнению с контролем) на протяжении всего срока наблюдения ($p<0,01$). Под влиянием МБ-Х активность синтеза IL-4 увеличилась только через сутки на 60% относительно контрольного уровня ($p<0,01$). МБ-С не оказали достоверного влияния на синтез IL-4.

Причем во всех опытных группах независимо от вида метаболитов, баланс между цитокинами IFNγ и IL-4 (табл. 3) был сдвинут в сторону IFNγ, а соотношение IFNγ/IL-4 в опытных группах значимо превышало таковой в контрольной группе для всего срока культивирования МНК. Например, под влиянием МБ-Х на 3 сутки соотношение IFNγ/IL-4 было более чем в 20 раз, под влиянием МБ-С – в 15раз, под влиянием МБ-Х – почти в 5 раз ($p<0,01$ для всех случаев) выше контрольного.

Эти данные показывают, что под действием метаболитов палеобактерий баланс между Th1- и Th2-зависимым иммунным ответом смещается в сторону Th1-зависимого.

4 **Обсуждение**

Проведенное исследование показало, что экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают значимой иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью. Под влиянием экзометаболитов палеобактерий проявляются как общие закономерности, так и особенности формирования иммунного ответа на чужеродные антигены.

К общим закономерностям проявления иммуностимулирующей способности экзометаболитов палеобактерий можно отнести характерную динамику и последовательность активации механизмов развития иммунного ответа: значимая активация дифференцировки моноцитов в субпопуляции промежуточных и неклассических моноцитов; активация дифференцировки эффекторных $CD4^+$- и $CD8^+$-Т-лимфоцитов со сменой маркеров ранней, средней и поздней активации; увеличение уровня Treg и синтеза цитокинов IFNγ и IL-4 относительно контрольных уровней данных показателей.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

К особенностям формирования иммунного ответа на антигены экзометаболитов палеобактерий можно отнести зависимость иммуномодулирующей активности от способа получения МБ – «холодовые» (получены от бактерий при их культивировании при 5ºС), «среднетемпературные» (22ºС) и «тепловые» (37ºС) метаболиты. «Холодовые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с провоспалительной активностью, а именно – дифференцировку промежуточных $CD14^{+}CD16^{+}$-моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD8^{+}$-Т-лимфоцитов и синтеза IFNγ. «Тепловые» метаболиты стимулируют преимущественно механизмы иммунного ответа с противовоспалительной активностью, а именно – дифференцировку неклассических $CD14^{lo}CD16^{+}$-моноцитов и, соответственно, увеличение активности дифференцировки $CD4^{+}$-Т-лимфоцитов и секреции IL-4. Также к отличительной особенности можно отнести соотношение про- и противовоспалительных механизмов между собой, которые не зависят от вида экзометаболитов. Так, первые трое суток культивирования клеток активность дифференцировки $CD8^{+}$-Т-лимфоцитов превалирует над дифференцировкой $CD4^{+}$-Т-лимфоцитов, а уровень секреции IFNγ превышает уровень IL-4. На третьи сутки происходит значимое повышение уровня Treg, что сопровождается тенденцией к нормализации баланса между IFNγ(Th1) и IL-4(Th2) к седьмым суткам.

Прослеживается четкое влияние Treg ($CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$) на силу и продолжительность иммунного ответа. Повышение уровня Treg происходит умеренно и кратковременно, что с одной стороны препятствует чрезмерному развитию провоспалительных механизмов, с другой не приводят к развитию длительной иммуносупрессии. Повышение на 1-3 сутки уровня Treg сопровождается снижением активности дифференцировки моноцитов в субпопуляции и синтеза провоспалительного цитокина IFNγ. Учитывая, что одной из главных функций индуцированных Treg является подавление системных воспалительных, аутоиммунных и аллергических заболеваниях, повышение их активности под влиянием экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS может служить основой для разработки новых биопрепаратов для лечения широкого круга заболеваний.

Полученные данные, с одной стороны, в значительной степени согласуются с известными данными о влиянии микроорганизмов на иммунную систему [5; 22], с другой – дают нам новый способ селективной модуляции направленности иммунного ответа экзометаболитами палеобактерий. Базисом данного способа является фактор температуры при получении экзометаболитов. Зависимость общей жизнедеятельности микроорганизмов от температурного фактора общеизвестна. В частности, изменение температурных условий культивирования микроорганизмов может оказывать влияние на их рост, размножение, геномные структуры, метаболические реакции [5; 2]. Установлено, что в состав метаболитов при стандартных условиях культивирования микроорганизмов (37°С), входят сигнальные

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

молекулы и соединения невысокого молекулярного веса и разнообразной химической структуры [4], которые могут обладать антимикробной активностью, фармакологической активностью, являться специфическими ингибиторами ферментов, ростовыми факторами [1; 2; 4; 5; 22]. Однако практически отсутствует информация об особенностях состава и функциональной активности экзометаболитов, полученных в различных температурных условиях внешней среды.

Проведенное нами ранее изучение «холодовых» экзометаболитов палеобактерий *Bacillus cereus* показало, что в их состав входят особые низкомолекулярные фракции углеводов – олигомеры, имеющие в своей основе двухосновный алкалоид и цепь из звеньев этиленгликоля в виде «гребёнки» [3]. Данные фракции углеводов обладают иммуномодулирующим потенциалом, который на 30% слабее, чем цельный комплекс метаболитов. Следует отметить, что в качестве контрольного был использован современный штамм *Bacillus cereus* из лекарственного препарата «Бактисубтил» (Франция). У современного штамма данные фракции углеводов не секретировались. Известно, что количество информации, содержащейся в углеводах (например, в полисахаридах клеточной стенки) значительно больше, чем это необходимо для выполнения чисто механических функций. Роль углеводов в кодировании биологически значимой информации (в том числе влиянии на иммунореактивность организма) на наш взгляд несколько недооценивается.

Проведенное исследование показало, экзометаболиты палеобактерий *Bacillus cereus* штамма 875 TS обладают выраженной иммуностимулирующей и иммуномодулирующей активностью.

5 **Благодарности**

Исследования выполнялись в рамках Государственному заданию на 2021-2030 годы. Пространственно-временные явления и процессы, происходящие в водах суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата (Приоритетное направление 1.5.11. Программа 1.5.11.1).

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

ТАБЛИЦЫ

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 1. LEVEL OF MONOCYTE SUBPOPULATIONS IN THE CONTROL GROUP (%)

Субпопуляции Subpopulations	1 сутки 1 day	3 сутки 3 day	7 сутки 7 day
$CD14^{+}CD16^{-}$	85,1±2,2	83,4±1,9	84,1±2,4
$CD14^{+}CD16^{+}$	9,4±0,9	10,7±0,9	10,8±0,9
$CD14^{lo}CD16^{+}$	5,4±0,6	5,8±0,7	5,1±0,6

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ РАННЕЙ (CD69), СРЕДНЕЙ (CD25) И ПОЗДНЕЙ (HLA-DR) АКТИВАЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ И УРОВЕНЬ TREG ($CD4^{+}CD25^{HI}CD127^{-}$) В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ (%)

TABLE 2. EXPRESSION OF MARKERS OF EARLY (CD69), MID (CD25) AND LATE (HLA-DR) ACTIVATION OF T-LYMPHOCYTES AND THE LEVEL OF TREG ($CD4^{+}CD25^{HI}CD127^{-}$) IN THE CONTROL GROUP (%)

Маркеры активации activation markers	1 сутки 1 day	3 сутки 3 day	7 сутки 7 day
$CD3^{+}CD4^{+}CD69^{+}$	5,4±0,4	1,9±0,2**	0,22±0,03**
$CD3^{+}CD4^{+}CD25^{+}$	2,1±0,2	3±0,27**	0,5±0,04**
$CD3^{+}CD4^{+}HLA\text{-}DR^{+}$	0	0,7±0,05	3,8±0,3**
$CD3^{+}CD8^{+}CD69^{+}$	6,2±0,54	1,9±0,17**	0,38±0,03**
$CD3^{+}CD8^{+}CD25^{+}$	1,9±0,13	5,5±0,48**	0,8±0,07**
$CD3^{+}CD8^{+}HLA\text{-}DR^{+}$	0	1,3±0,11	4,1±0,35**
$CD3^{+}CD4^{+}CD25^{hi}CD127^{-}$	6,9±0,58	6,4±0,36	6,1±0,47

*Примечание: достоверность отличия показателя в данной группе от показателя в предыдущей группе: * -p<0,05; ** - p<0,01.*
*Note: reliability of the difference between the indicator in this group and the indicator in the previous group: * - p<0.05; ** - p<0.01.*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

ТАБЛИЦА 3. СООТНОШЕНИЕ УРОВНЕЙ IFNГ/IL-4

TABLE 3. IFNГ/IL-4 LEVEL RATIO

Группы Groups	**0**	**1**	**3**	**7 сутки** 7 day
Контроль Control	1,6±0,12	1,6±0,18	1,8±0,2	2,2±0,3
МБ-Х MB-C	1,6±0,12	22,8±1,73**	17,3±1,54**	5,5±0,61**
МБ-С MB-A	1,6±0,12	5,5±0,62**	15,4±1,33**	4±0,36**
МБ-Т MB-W	1,6±0,12	2,4±0,35*	4,8±0,57**	3,9±0,44**

*Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * -p<0,05; ** - p<0,01.*

*Note: reliability of differences in indicators in the experimental group from the control: * - p<0.05; ** - p<0.01*

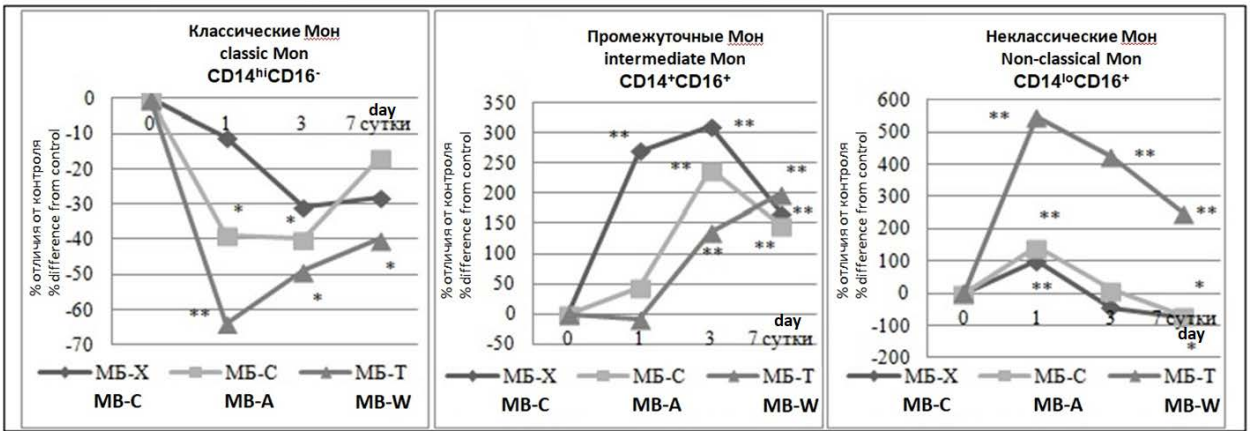
 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

РИСУНКИ

Рисунок 1. ***Влияние МБ палеобактерий на уровни субпопуляций моноцитов in vitro***

Figure 1. *Effect of MB of paleobacteria on the levels of monocyte subpopulations in vitro*



Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * -p<0,05; ** - p<0,01.

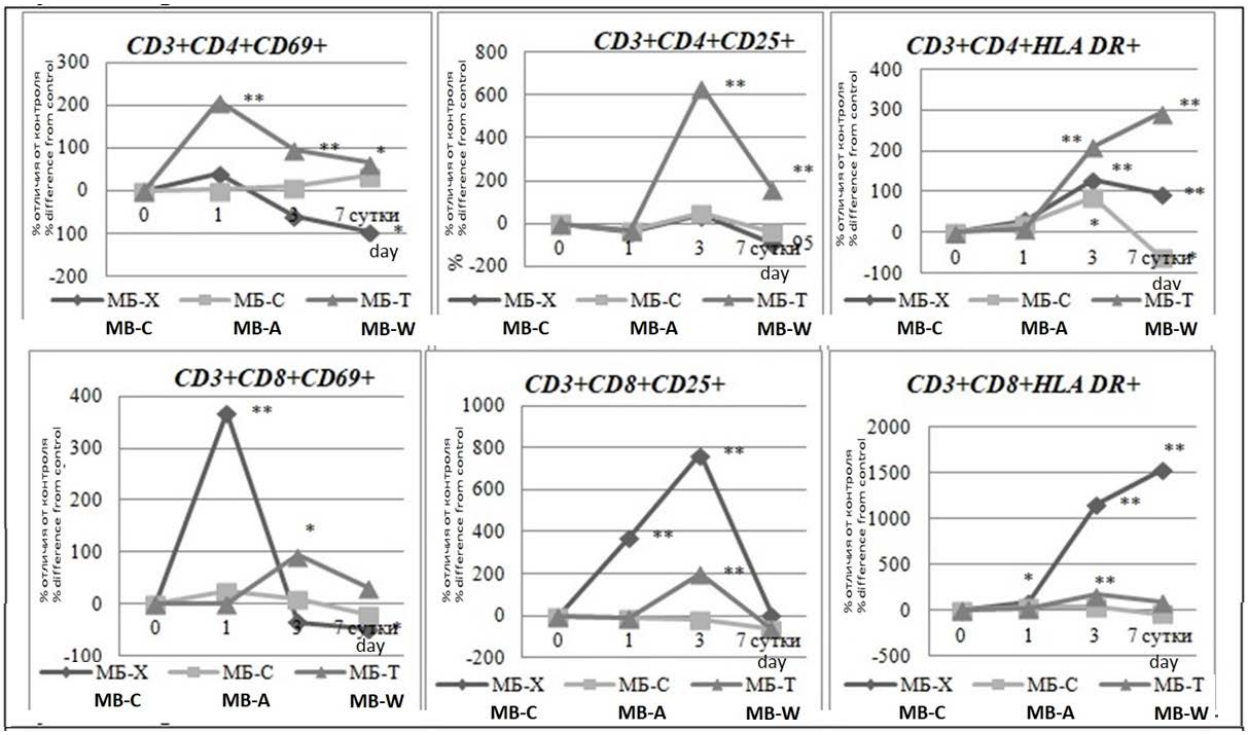
*Note: the significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: * -p<0.05; ** - p<0.01*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Рисунок. 2. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку CD4$^+$- и CD8$^+$-Т-лимфоцитов

Figure. 2. *The influence of MB paleobacteria on the differentiation of CD4$^+$ and CD8$^+$ T-lymphocytes*



Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * -p<0,05; ** - p<0,01.

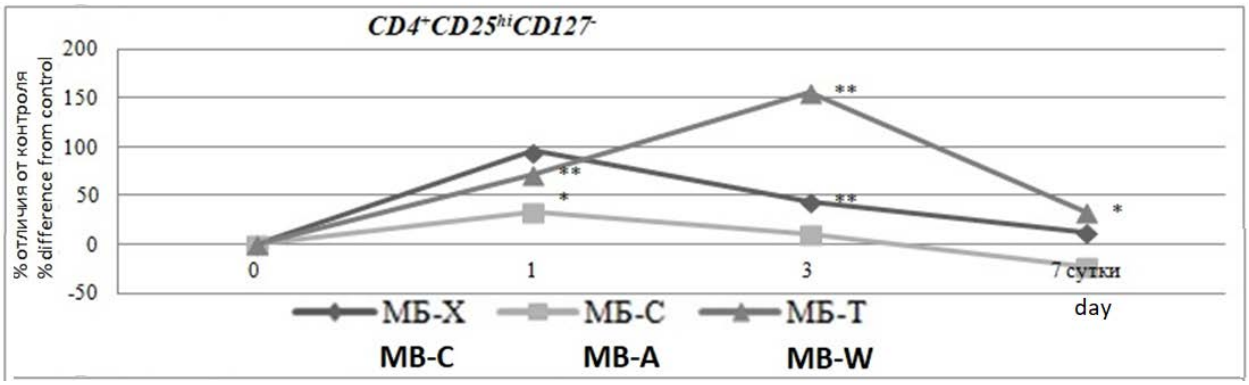
*Note: the significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: * -p<0.05; ** - p<0.01.*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Рисунок. 3. Влияние МБ палеобактерий на дифференцировку Treg (CD4+CD25hiCD127-)

Figure. 3. *Effect of MB paleobacteria on Treg differentiation (CD4+CD25hiCD127-)*



Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * -p<0,05; ** - p<0,01.

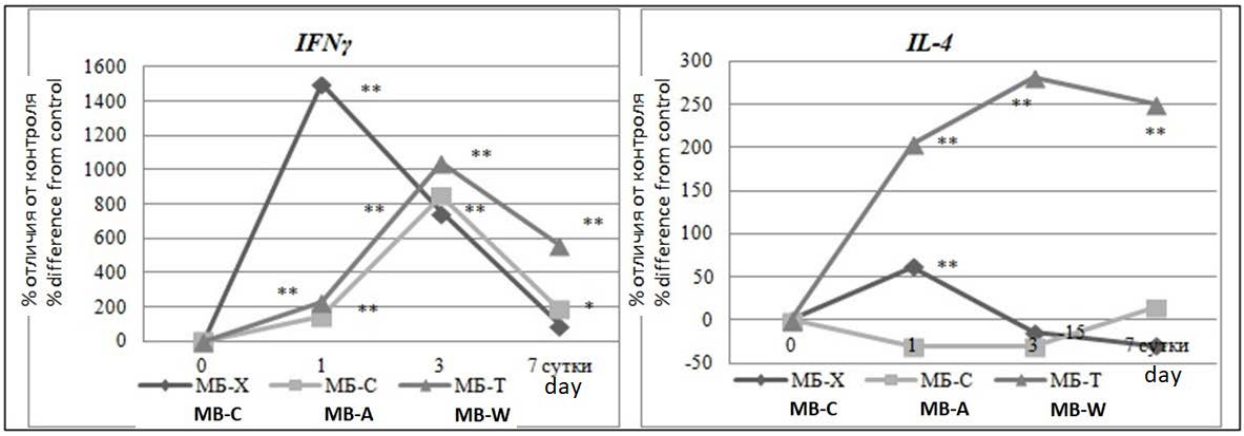
*Note: the significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: * -p<0.05; ** - p<0.01.*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Рисунок. 4. Влияние МБ палеобактерий на синтез IFNγ и IL-4

Figure. 4. *The influence of paleobacterial MB on the synthesis of IFNγ and IL-4*



Примечание: достоверность отличия показателей в опытной группе от контроля: * -p<0,05; ** - p<0,01.

*Note: the significance of the difference between the indicators in the experimental group and the control: * -p<0.05; ** - p<0.01.*

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку
Петров Сергей Анатольевич, д.м.н., профессор, г.н.с. отдела биоресурсов криосферы Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр Тюменский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук (ТюмНЦ СО РАН);
адрес: 625046, г. Тюмень, ул. 30 лет Победы д. 146, кв. 112;
телефон: 8(969)804-50-00;
e-mail: tumiki@yandex.ru
Petrov Sergey Anatolievich, Dr. of Med. Sc., Principal Researcher of Department of Cryosphere Bioresources TyumSC SB RAS;
address: 625046, Tyumen, 30 let Pobedy st. 146 ap.112;
telephone: 8(969)804-50-00;
e-mail: tumiki@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах
Калёнова Людмила Федоровна д.б.н., г.н.с. отдела биоресурсов криосферы ТюмНЦ СО РАН;
Kalenova Lyudmila Fedorovna, Dr. of Biol. Sc., Principal Researcher of Department of Cryosphere Bioresources TyumSC SB RAS;

Суховей Юрий Геннадиевич д.м.н., профессор, г.н.с. отдела биоресурсов криосферы ТюмНЦ СО РАН;
Sukhovey Yuri Gennadievich, Dr. of Med. Sc., professor, Principal Researcher of Department of Cryosphere Bioresources TyumSC SB RAS;

Костоломова Елена Геннадиевна к.б.н., ассистент кафедры микробиологии Тюменский государственный медицинский университет;
Kostolomova Elena Gennadevna, Cand. of Biol. Sc, Assistant, Department of Microbiology, Tyumen State Medical University;

Бажин Александр Сергеевич м.н.с. отдела биоресурсов криосферы ТюмНЦ СО РАН;
Bazhin Alexander Sergeevich, Junior researcher of Department of Cryosphere Bioresources TyumSC SB RAS;

Нарушко Максим Викторович м.н.с. отдела биоресурсов криосферы ТюмНЦ СО РАН;
Narushko Maksim Viktorovich, Junior researcher of Department of Cryosphere Bioresources TyumSC SB RAS.

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

Блок 3. Метаданные статьи

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ИЗ МНОГОЛЕТНЕМЕРЗЛЫХ ПОРОД НА МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА IN VITRO

INFLUENCE OF EXOMETABOLYTES OF PALEOBACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* FROM PERMAFROST ROCKS ON THE MECHANISMS OF FORMATION OF THE IMMUNE RESPONSE IN VITRO

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТОВ ПАЛЕОБАКТЕРИЙ
INFLUENCE OF METABOLYTES OF PALEOBACTERIA

Ключевые слова: метаболиты палеобактерий, субпопуляции моноцитов, Т-лимфоциты, Treg, IFNγ, IL-4, Bacillus cereus

Keywords: paleobacteria metabolites, monocyte subpopulations, T-lymphocyte, Treg, IFNγ, IL-4, Bacillus cereus

Оригинальные статьи.
Количество страниц текста – 8,
Количество таблиц – 3,
Количество рисунков – 4.
10.07.2024

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Вахитов Т.Я., Петров Л.Н. Регуляторные функции экзометаболитов бактерий // Микробиология, 2006, Т. 75, № 4, с. 483-488.	Regulatory functions of bacterial exometabolites. Microbiology.	https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261706040084 https://doi.org/10.1134/S0026261706040084
2	Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий // Прикладная биохимия и микробиология, 2004, Т. 40, № 3, с. 261-269.	Stressors, stress and survival of bacteria. Applied biochemistry and microbiology.	https://link.springer.com/article/10.1023/B:ABIM.0000025941.11643.19 https://doi.org/10.1023/B:ABIM.0000025941.11643.19
3	Калёнова Л.Ф., Петров С.А., Суховей Ю.Г. Репарационный и иммуномодулирующий	Repair and immunomodulatory potential of low molecular weight fractions of secondary metabolites of Bacillus sp.	https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-022-05387-5 10.1007/s10517-022-05387-5

	потенциал низкомолекулярных фракций вторичных метаболитов Bacillus sp.// БЭБИМ. – 2021. –Т. 172, №9. – С. 323-327.	Bulletin of Experimental Biology and Medicine	
4	Проворов Н.А., Тихонович И.А. Генетические и молекулярные основы симбиотических адаптаций // Успехи современной биологии, 2014, Т. 134, № 3, с. 211–226.	Genetic and molecular basis of symbiotic adaptations. Advances in modern biology	https://link.springer.com/article/10.1134/S2079086414060061 https://doi.org/10.1134/S2079086414060061
5	Николаев Ю.А., Мулюкин А.Л., Степаненко И.Ю., Эль-Регистан Г.И. Ауторегуляция стрессового ответа микроорганизмов // Микробиология, 2008, Т. 75, № 4, с. 489-496.	Autoregulation of the stress response of microorganisms. Microbiology	https://link.springer.com/article/10.1134/S0026261706040096 https://doi.org/10.1134/S0026261706040096

6	Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Сорокин В.В. и др. Бактериофаги низкотемпературных систем Арктики и Антарктики // Микробиология, 2016, Т. 85, № 3, с. 337-346.	Bacteriophages in Arctic and Antarctic low-temperature systems. Microbiology	https://colab.ws/articles/10.1134/s0026261716030048 10.1134/s0026261716030048
7	Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 347-354.	Regulatory T cells: origin and functions.Medical immunology	https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/467?locale=en_US https://doi.org/10.15789/1563-0625-2005-4-347-354
8	Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) // Медицинская иммунология. – 2011. – Т.11, №1. – С.7-16.	Cytometric analysis of T-helper subpopulations (Th1, Th2, Treg, Th17, activated T-helpers). Medical Immunology.	https://www.mimmun.ru/mimmun/article/view/428?locale=en_US https://doi.org/10.15789/1563-0625-2011-1-7-16

9	Athanassakis I., Vassiliadis S. T-regulatory cells: are we rediscovering T suppressor? Immunology Letters. – 2002. – Vol.84. – pp.179-183.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247802001827?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00182-7
10	Azeredo E.L., Neves-Souza P.C., Alvarenga A.R. et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. Immunology. – 2010. – Vol. 130(2). – pp. 202-216.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2878465/ 10.1111/j.1365-2567.2009.03224.x
11	Caramalho I., Lopes Carvalho T., Ostler D., Zelenay S., Haury M., Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll like receptors and are		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193858/ 10.1084/jem.20021633

	activated by lipopolysaccharide. J. Exp. Med. – 2003. – V.197. – pp.403–411.		
12	Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur.J.Immunol. – 2017. – Vol.47, no. – pp. 946–953.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6485631/ 10.1002/eji.201646837
13	During M., Cabanillas Stanchi K.M., Haufe S., et al. Patterns of monocyte subpopulations and their surface expression of HLA-DR during adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. Ann. Hematol. – 2015. – Vol. 94(5). – pp.825-836.		https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-014-2287-6 10.1007/s00277-014-2287-6
14	Fontenot J., Rudensky A. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T		https://www.nature.com/articles/ni1179

	cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. Nature Immunol. – 2005. – Vol.6. – pp.331-337.		10.1038/ni1179
15	Guilliams M., Mildner A., Yona S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. Immunity. – 2018. – Vol. 49(4). – pp. 595-613.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761318304461?via%3Dihub 10.1016/j.immuni.2018.10.005
16	Hijdra D., Vorselaars A.D.M., Grutters J.C. et al. Phenotypic characterization of human intermediate monocytes. Front Immunol. – 2013. – no. 4. – pp. 4-6.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805031/ 10.3389/fimmu.2013.00339
17	Jenkins S.J., Ruckerl D., Thomas G.D. et al. IL-4 directly signals tissue-resident macrophages to proliferate beyond		https://rupress.org/jem/article/210/11/2477/41538/IL-4-directly-signals-tissue-resident-macrophages 10.1084/jem.20121999

	homeostatic levels controlled by CSF-1. J. Exp. Med. – 2013. – Vol. 210(11). – pp. 2477-2491.		
18	Ka M.B., Olive D., Mege J.L. Modulation of monocyte subsets in infectious diseases. World J. Immunol. – 2017. – Vol. 4(3). – pp.185.		https://www.wjgnet.com/2219-2824/full/v4/i3/185.htm 10.5411/wji.v4.i3.185
19	Kalenova L.F., Novikova M.A., Kostolomova E.G. Effects of Low-Doses of Bacillus Spp. from Permafrost on Differentiation of Bone Marrow Cells. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2015, v.158, no. 3, p. 364-367.		https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2763-6 https://doi.org/10.1007/s10517-015-2763-6
20	Kalyonova L.F., Novikova M.A., Subbotin A.M., Bazhin A.S. Effects of Temperature on Biological		https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-015-2859-z 10.1007/s10517-015-2859-z.

	Activity of Permafrost Microorganisms. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2015, v. 158, no. 6, p.772-775. 10.1007/s10517-015-2859-z.		
21	Kalenova L.F., Kolyvanova S.S., Bazhin A.S. et al. Effects of Secondary Metabolites of Permafrost Bacillus sp. on Cytokine Synthesis by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2017, vol. 163, no. 2, p.235-238.		https://link.springer.com/article/10.1007/s10517-017-3774-2 https://doi.org/10.1007/s10517-017-3774-2
22	Ritchie A.J., Jansson A.P., Stallberg J.P. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Molecule N-3-(Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone		https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/iai.73.3.1648-1655.2005 https://doi.org/10.1128/iai.73.3.1648-1655.2005

	Inhibits T-Cell Differentiation and Cytokine Production by a Mechanism Involving an Early Step in T-Cell Activation. Infection and immunity, 2005, v. 45, p. 1648-1655.		
23	Rodriguez-Mucoz Y., Martin-Vilchez S., Lypez-Rodriguez R. et al. Peripheral blood monocyte subsets predict antiviral response in chronic hepatitis C. Aliment Pharmacol. Ther. – 2011. – Vol. 34(8). – pp. 960-971.		https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2036.2011.04807.x **https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04807.x**
24	Shipkova M., Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. Clin.Chim. Acta. – 2012. – Vol. 413, no. 17-18. – pp. 1338–1349.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898111006334?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.11.006

25	Sing A., Rost D., Tvardovskaia N., Roggenkamp A., Wiedemann A., Kirschning C.J., Aepfelbacher M., Heesemann J. Yersinia V antigen exploits toll like receptor 2 and CD14 for interleukin 10 mediated immunosuppression. J. Exp. Med. – 2002. – V.196. – pp.1017–1024.		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2194041/ 10.1084/jem.20020908
26	Smeekens S.P., van de Veerdonk F.L., Joosten L.A.B. et al. The classical CD14++CD16− monocytes, but not the patrolling CD14+CD16+ monocytes, promote Th17 responses to Candida albicans. Eur. J. Immunol. – 2011. – Vol. 41(10). – pp. 2915-2924.		https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201141418 **https://doi.org/10.1002/eji.201141418**

27	Sutmuller R.P.M., Morgan M.E., Netea M.G., Grauer O., Adema G.J. Toll like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. Trends Immunol. – 2006. – V.27. – pp.387–393.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490606001748?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/j.it.2006.06.005
28	Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. Clin. Biochem. – 2016. – Vol. 49, no. 4-5. – pp. 347–354.		https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912015003793?via%3Dihub https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099
29	Wong K.L., Yeap W.H., Tai J. et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. Immunol. Res. – 2012. – Vol. 53(1-3). – pp.41-57.		https://link.springer.com/article/10.1007/s12026-012-8297-3 10.1007/s12026-012-8297-3

 10.15789/1563-0625-IOE-3023

30	Wong K.L., Jing Yi, Tai J. et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and non-classical human monocyte subsets. Blood. – 2011. – Vol. 118(5). – pp.16-32.		https://ashpublications.org/blood/article/118/5/e16/29016/Gene-expression-profiling-reveals-the-defining https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)