

УДК 571.27

Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует эффекты липотейхоевой кислоты – агониста Toll-подобного рецептора 2

С. В. Зубова^{1*}, Н. И. Косякова², С. В. Грачев^{1,3}, И. Р. Прохоренко¹¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия²Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, 142290 Россия³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.06.2022

Принята к печати 02.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11747

РЕФЕРАТ Липополисахариды (LPS) и липотейхоевые кислоты (LTA) являются главными индукторами воспалительных ответов клеток крови, вызываемых грамотрицательными и некоторыми грамположительными бактериями. CD14 – общий рецептор LPS и LTA, передает лиганды на TLR4 и TLR2 соответственно. Нами показано, что нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует синтез провоспалительных цитокинов при активации клеток крови LTA *Streptococcus pyogenes*, связываясь с рецептором CD14, что приводит к блокировке передачи сигнала к TLR2/TLR6. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG можно рассматривать как прототип для создания препаратов, защищающих клетки крови от действия LTA грамположительных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА липополисахариды, *Rhodobacter capsulatus*, липотейхоевые кислоты, TLR, CD14, цитокины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ LPS – липополисахарид; LTA – липотейхоевая кислота; CD – кластер дифференцировки; ERK – киназа, регулируемая внеклеточным сигналом; IL – интерлейкин; JNK – N-концевая киназа c-Jun; LBP – LPS-связывающий белок; MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; NF-κB – ядерный фактор транскрипции κB; PAMP – молекулярные структуры, связанные с патогеном; PI3K – фосфатидилинозит-3-киназа; PKC – протеинкиназа C; TLR – Толл-подобный рецептор; TNF-α – фактор некроза опухоли α.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов воспаления, вызванного лигандами различной природы, является одним из приоритетных направлений современной биомедицины. В нашей работе рассмотрена возможность использования липополисахарида (LPS) *Rhodobacter capsulatus* PG, нетоксичного антагониста эндотоксинов, для изучения механизмов функциональных ответов клеток врожденного иммунитета на PAMP различной природы. LPS и липотейхоевые кислоты (LTA) – главные элементы клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий, обладают иммуностимулирующей активностью. LPS – это гликолипиды, состоящие из трех структурных доменов: липида А, олигосахарида кора и O-антигена, и локализованные во внешнем

лепестке внешней мембраны грамотрицательных бактерий, а LTA – это амфифильные ди- и триацилированные липопептиды, заякоренные на внешней стороне цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий. В некоторых аспектах LTA рассматриваются как эквивалент LPS, ответственный за развитие септического шока, вызываемого грамположительными бактериями [1]. TLR4 и TLR2, экспрессированные на поверхности клеток крови, узнают эти биологически активные молекулы. TLR4 был идентифицирован как специфический рецептор к LPS, индуцирующий высвобождение провоспалительных цитокинов моноцитами и макрофагами, стимулированными эндотоксинами [2]. TLR2 узнает ди- или триацилированные LTA грамположительных бактерий, инициируя иммунные ответы [3, 4].

LTA *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumonia* связываются непосредственно с TLR2 [5–7]. В доставке LPS к рецептору участвует белок LBP крови, который связывается с LPS и передает его в форме мономера мембраносвязанному рецептору CD14, далее к MD-2 и TLR4 [8]. В доставке LTA к TLR2 также участвуют LBP и CD14 [4]. CD14 входит в мультилигандный рецепторный комплекс и опосредует разнообразные клеточные ответы, связанные с передачей сигналов от TLR2 и TLR4 [9]. CD14 усиливает активацию TLR2, облегчая связывание липопептидов и гетеродимеризацию TLR2 с TLR1 или TLR6. Активация комплекса TLR2/TLR6 диацелированными липопептидами, в частности LTA, происходит с участием рецептора CD36 [10]. Чтобы TLR4 функционировал как рецептор LPS, необходим фактор миелоидной дифференцировки MD-2 [11]. MD-2 физически ассоциирован с TLR2, но слабее, чем MD-2 с TLR4 [12]. Показано, что эта вспомогательная молекула усиливает опосредованные TLR2 ответы на LTA [13]. Передача сигналов от TLR2 и TLR4 запускается индуцированной лигандами димеризацией рецепторов. В отличие от TLR4, который в ответ на LPS передает сигналы в виде гомодимера (TLR4)₂, TLR2 при распознавании LTA формирует гетеродимер с TLR6 или TLR1 [14, 15]. Бактериальные компоненты LTA и LPS запускают внутриклеточный сигнальный каскад через TLR2 и TLR4 по сходному сигнальному пути, приводящему к активации транскрипционного фактора NF- κ B, PKC, PI3K, ERK, JNK и p38 MAPK и к синтезу провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 и хемокина IL-8 [16]. LPS целого ряда грамотрицательных бактерий, не относящихся к энтеробактериям, активируют клетки миелоидной линии через TLR2 [17, 18]. К особенностям липидов A этих LPS относятся наличие фосфорилированного диглюкозамина, длина углеводородных цепей остатков жирных кислот, отличная от длины цепей у энтеробактериальных LPS, или присутствие разветвленных ацильных цепей [19]. Нетоксичный LPS грамотрицательной фототрофной бактерии *Rhodobacter capsulatus* PG является антагонистом эндотоксинов [20, 21]. Этот LPS способен блокировать активацию клеток крови, которая приводит к высвобождению широкого спектра провоспалительных цитокинов, вызванному эндотоксинами [22]. Синтетический аналог липида A из *R. capsulatus*, E5531, подавляет наработку TNF- α моноцитами крови человека, активированными LPS *Escherichia coli* 0111:B4 или LTA *Staphylococcus faecalis*, практически не проявляя собственной активности [23]. Структура нетоксичного липида A LPS *Rhodobacter capsulatus* вклю-

чает в дисахаридную основу дифосфорилэтиламин при C-1 и фосфорилэтиламин при C-4', а также ненасыщенную жирную кислоту (12:1) [24]. На основании этих структурных особенностей липида A мы предположили, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, подобно E5531, может конкурировать с LTA *Streptococcus pyogenes* за TLR2, блокируя активацию синтеза провоспалительных цитокинов клетками крови.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на цельной крови здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 25 до 30 лет. Все испытуемые дали письменное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования соответствует Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и одобрен Локальным этическим комитетом больницы Пущинского научного центра (№ 2 от 10.04.2014). Забор периферической крови осуществляли в клинических условиях с использованием вакутейнеров (Becton Dickinson and Company, Великобритания), обработанных гепарином натрия (17 ед./мл).

Активация клеток крови LPS и LTA

Для исследования влияния LPS и LTA на синтез цитокинов и хемокинов кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:10 и инкубировали с LPS *E. coli* 055:B5 (100 нг/мл), LPS *Salmonella enterica* серотип Typhimurium (100 нг/мл), LTA *Streptococcus pyogenes* (1000 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США) или LPS *Rhodobacter capsulatus* PG (1000 нг/мл) в различных сочетаниях в течение 6 и 24 ч при 37°C в 5% CO₂. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG был получен согласно методике, описанной ранее [25]. Для определения антагонистического действия LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в отношении LPS *E. coli*, *S. enterica* или LTA *S. pyogenes* в различных сочетаниях кровь в течение 30 мин предынкубировали с LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, после чего добавляли LPS или LTA. Для определения роли рецептора CD14 в активации клеток кровь предварительно инкубировали с антителами (AT) к CD14 (2 мкг/мл) (Purified Anti-human CD14 Clone M5E2, BioLegend, США) в течение 30 мин при 4°C, а затем добавляли LPS или LTA. Образцы инкубировали в течение 6 и 24 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин). Супернатанты отбирали и хранили при –20°C до определения содержания цитокинов и хемокинов.

Содержание цитокинов и хемокинов

Содержание цитокинов и хемокинов определяли с помощью наборов для ИФА TNF- α , IL-6, IL-1 β ,

IL-8 («Вектор-БЕСТ», Россия) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов определяли на ИФА-анализаторе STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили методами непараметрической статистики в Origin Pro 7.5 и Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat). Результаты представлены в виде медианных значений с верхним и нижним квартилями (IQR). Статистическую значимость различий между медианными значениями определяли по критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* стимулировали значительную, близкую по величине, наработку провоспалительных цитокинов TNF- α (рис. 1), IL-6 (рис. 2) и IL-1 β (рис. 3), а также хемокина воспаления IL-8 (рис. 4), продукция которых значимо превышала контрольные значения. В ответ на активацию LTA также нарабатывались высокие уровни исследуемых цитокинов и хемокинов. Уровень синтеза более позднего цитокина IL-1 β и хемокина IL-8 в ответ на LTA *S. pyogenes* превышал уровни при активации посредством LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* (рис. 3, 4).

Нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в концентрации, в 10 раз превышающей концентрацию эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica*, и в равной концентрации с LTA *S. pyogenes* не стимулировал клетки к наработке TNF- α , IL-6 и IL-1 β (рис. 1–3). Количество хемокина IL-8 в крови в ответ на LPS *Rhodobacter capsulatus* PG незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, но было значительно ниже, чем при активации клеток крови эндотоксинами или LTA *S. pyogenes* (рис. 4). Исследование способности LPS *Rhodobacter capsulatus* PG защищать клетки крови от действия эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica* показало, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG подавлял синтез цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β в крови, причем блокирование ответа на LPS *S. enterica* было сильнее, чем на LPS *E. coli* (рис. 1–3).

По синтезу хемокина IL-8 защитного эффекта LPS *Rhodobacter capsulatus* PG от действия эндотоксинов не наблюдалось (рис. 4). IL-8 является важным медиатором ответа хозяина на воспаление и инфекцию [26]. Предполагается, что ответ клеток на воздействие бактериальных агентов и синтез IL-8 индуцируются раньше, чем синтез IL-6 [27].

При активации клеток LTA *S. pyogenes* предварительная инкубация крови с LPS *Rhodobacter capsulatus* PG приводила к значительному снижению синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β и хемокина IL-8 (рис. 1–4). Из полученных данных следует, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG проявляет антагонистическую активность не только в отношении эндотоксинов, но и в отношении LTA *S. pyogenes*.

В контрольных образцах АТ к CD14 не влияли на активацию синтеза TNF- α в клетках крови (рис. 5). Предварительная инкубация крови с АТ к CD14 при последующей активации клеток LPS *E. coli*, LPS *S. enterica* или LTA *S. pyogenes* более заметно снижала синтез TNF- α , индуцированный LTA, чем эндотоксинами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Толл-подобные рецепторы (TLR) активируют клетки врожденной иммунной системы, распознавая различные микроорганизмы через ассоциированные с патогеном молекулярные паттерны (PAMP), в частности LPS грамотрицательных бактерий и LTA грамположительных бактерий. Рецепторы TLR4 узнают LPS – центральные индукторы воспалительных ответов, вызываемых грамотрицательными бактериями, а TLR2 узнают LTA – индукторы воспалительных ответов, вызываемых грамположительными бактериями [3]. Оба рецептора способны к передаче сигналов, формируя гомодимер (TLR4)₂ или гетеродимер TLR2/TLR6 соответственно. Вариации в количестве ацильных цепей в липиде А эндотоксина могут ослабить сигнализацию через TLR4 и изменить иммунный ответ хозяина на патоген [28]. TLR4/MD-2 распознает гексаацилированный липид А *E. coli* как агонист. Структурные изменения в липиде А других грамотрицательных бактерий снижают их активность в рецепторном комплексе по сравнению с гексаацилированным липидом А. Исследуя способность E5531 – пентаацилированного синтетического аналога липида А *Rhodobacter capsulatus*, ингибировать связывание LPS *E. coli* с моноцитами человека, рассчитали аффинность E5531 к клеткам, которая оказалась в 24 раза ниже, чем у LPS *E. coli* [23]. Для блокирования эффектов LPS *E. coli* или *S. enterica* мы использовали LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в концентрациях, в 10 раз превышающих концентрации эндотоксинов. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG сильнее блокировал синтез провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-1 β в клетках, активированных LPS *S. enterica*, чем LPS *E. coli*. Значительно более выраженной была антагонистическая активность LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в отношении LTA

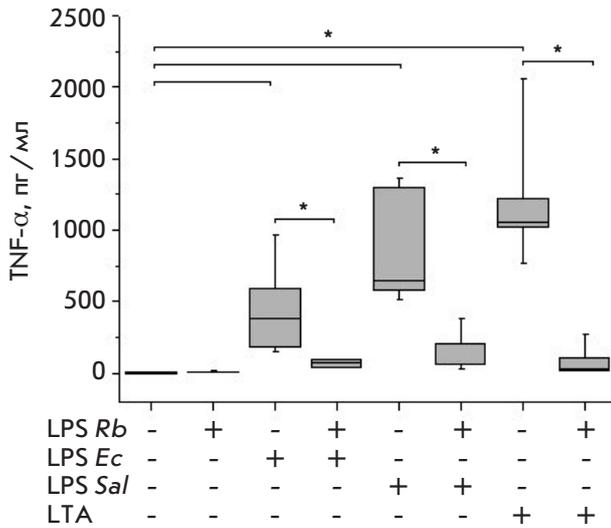


Рис. 1. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию TNF- α при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

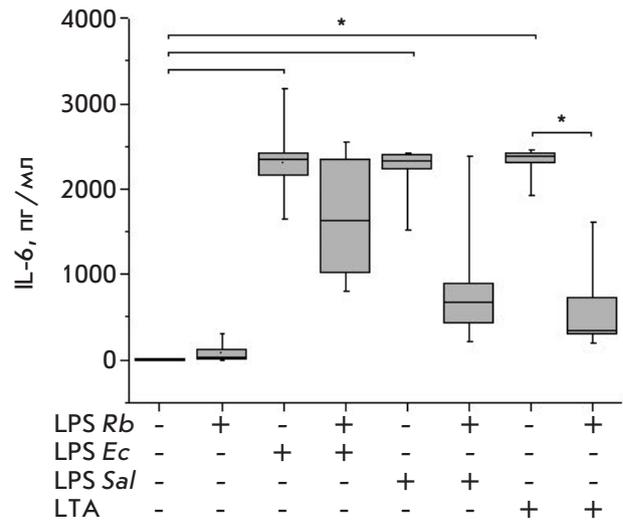


Рис. 2. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-6 при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

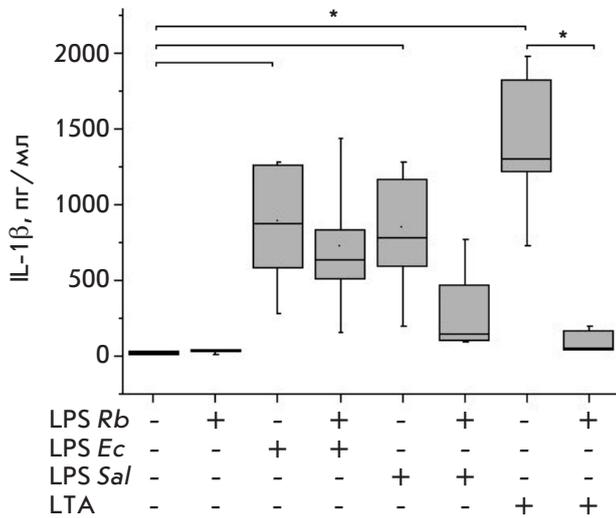


Рис. 3. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-1 β при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

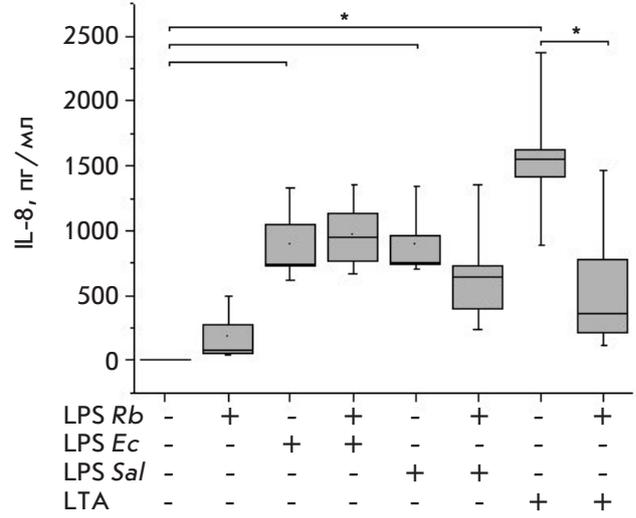


Рис. 4. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-8 при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

S. pyogenes при использовании равных весовых концентраций LPS *Rhodobacter capsulatus* PG и LTA *S. pyogenes*. Способность LPS *Rhodobacter capsulatus* PG защищать клетки от активации агонистами синтеза цитокинов снижалась в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli* (рис. 1–3). В передаче сигнала как от LPS, так и от LTA критическую роль играет рецептор CD14, который участвует не только в узнавании лигандов рецепторами

TLR4 и TLR2, но и в активации синтеза цитокинов клетками [6, 29]. Экспрессируемые на поверхности клетки рецепторы CD14 с высокой аффинностью связываются с молекулярными лигандами, ассоциированными с различными патогенами. Далее CD14 передает LPS сигнальному комплексу TLR4/MD-2 [30], а LTA – комплексу TLR2/TLR6 [4]. CD14 и CD36 действуют как корецепторы TLR2 в ответе моноцитов на LTA. Блокирование этих рецеп-

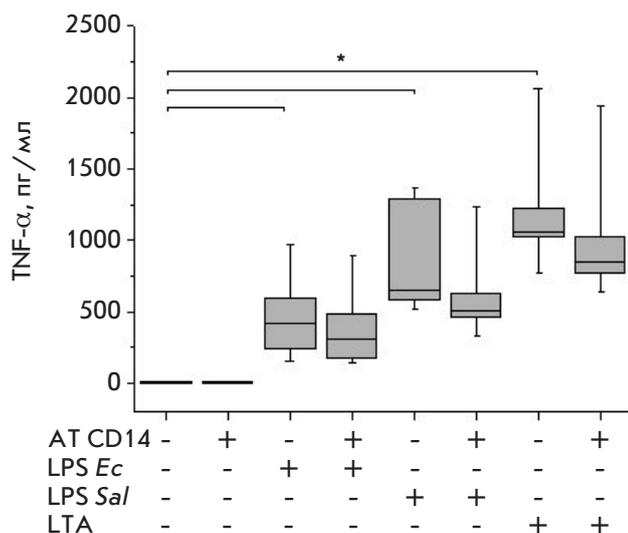


Рис. 5. Влияние AT CD14 на секрецию TNF-α при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, n = 7. *p < 0.05

торов антителами ингибирует индуцированное LTA высвобождение моноцитами TNF-α, что указывает на участие этих рецепторов в связывании LTA с плазматической мембраной и активации NF-κB [31]. На моноцитах человека показано, что LTA *Streptococcus sanguis* конкурирует с LPS *Salmonella abortusequi* за связывание с CD14, а связывание LPS с CD14 полностью ингибируется, если концентрация LTA в 100 раз превышает концентрацию LPS [32].

Для проверки этого предположения и понимания механизма подавления активации клеток посредством LPS *Rhodobacter capsulatus* PG мы блокировали рецепторы CD14 клеток крови с помощью mAT до активации агонистами LPS или LTA. Наблюдаемый нами невысокий (по сравнению с данными [23]) процент снижения активации при блокировании рецепторов CD14 связан, очевидно, со специфичностью используемых нами антител (Clone M5E2). Предварительная инкубация крови с AT CD14 перед активацией клеток LPS *E. coli*, LPS

S. enterica или LTA *S. pyogenes* более выражено снижала синтез TNF-α, индуцированный LTA, чем эндотоксинами. Полученные нами результаты показали, что CD14 участвует в активации и передаче сигнала к синтезу цитокинов от LPS и LTA, причем это участие снижается в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli* (рис. 5), аналогично снижению эффективности защиты LPS *Rhodobacter capsulatus* PG от активации клеток используемыми агонистами (рис. 1–3).

Можно предположить два возможных механизма блокирования активации клеток посредством LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, связанных с различной аффинностью исследованных лигандов к рецепторам CD14: блокирование на уровне взаимодействия с рецептором CD14 или на уровне активации рецепторного комплекса TLR4/MD-2 или TLR2/TLR6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают, что нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует синтез провоспалительных цитокинов при активации клеток крови LTA *S. pyogenes*, путем его связывания с рецептором CD14, что приводит к подавлению передачи сигнала к TLR2/TLR6. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG можно рассматривать прототипом для создания препаратов, защищающих клетки крови от действия LTA грамположительных бактерий. ●

Авторы выражают благодарность
Больнице Пуцинского научного центра РАН
за сотрудничество.

Работа выполнена в рамках Госзадания
122041200039-0, созданного Министерством
образования и науки Российской Федерации
на базе Института фундаментальных проблем
биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии
конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ginsburg L. // Lancet. Infect. Dis. 2002. V. 2. № 3. P. 171–179.
- Zhang G., Meredith T.C., Kahne D. // Curr. Opin. Microbiol. 2013. V. 16. № 6. P. 779–785.
- Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C.J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 25. P. 17406–17409.
- Schroder N.W.J., Morath S., Alexander C., Hamann L., Hartung T., Zahringer U., Gobel U.B., Weber J.R., Schumann R.R. // Biol. Chem. 2003. V. 278. № 18. P. 15587–15594.
- Im J., Choi H.S., Kim S.K., Woo S.S., Ryu Y.H., Kang S.S., Yun C.H., Han S.H. // Cancer Lett. 2009. V. 274. № 1. P. 109–117.
- Kang J.Y., Nan X., Jin M.S., Youn S.J., Ryu Y.H., Mah S., Han S.H., Lee H., Paik S.G., Lee J.O. // Immunity. 2009. V. 31. № 6. P. 873–884.
- Fieber C., Janos M., Koestler T., Gratz N., Li X.-D., Castiglia V., Aberle M., Sauert M., Wegner M., Alexopoulou L., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0119727.
- Ryu J.-K., Kim S.J., Rah S.-H., Kang J.I., Jung H.E., Lee D., Lee H.K., Lee J.-O., Park B.S., Yoon T.-Y., Kim H.M. // Im-

- munity. 2017. V. 46. V. 1. P. 1–13.
9. Schmitz G., Orso E. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. V. 13. № 5. P. 513–521.
 10. Triantafilou M., Gamper F.G., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K. // *Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 41. P. 31002–31011.
 11. Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. // *J. Exp. Med.* 1999. V. 189. № 11. P. 1777–1782.
 12. Dziarski R., Wang Q., Miyake K., Kirsching C.J., Gupta D.J. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 3. P. 1938–1944.
 13. Dziarski R., Gupta D.J. // *Endotox. Res.* 2000. V. 6. № 5. P. 401–405.
 14. Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 25. P. 13766–13771.
 15. Henneke P., Morath S., Uematsu S., Weichert S., Pfitzenmaier M., Takeuchi O., Müller A., Poyart C., Akira S., Berner R., et al. // *Immunol.* 2005. V. 174. № 10. P. 6449–6455.
 16. Su S.-H., Hua K.-F., Lee H., Chao L.K., Tan S.-K., Lee H., Yang S.-F., Hsu H.-Y. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 374. № 1–2. P. 106–115.
 17. Yokota S., Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K., Fujii N., Amano K. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007. V. 51. № 1. P. 140–148.
 18. Girard R., Pedron T., Uematsu S., Balloy V., Chignard M., Akira S., Chaby R. // *J. Cell Sci.* 2002. V. 116. Pt 2. P. 293–302.
 19. Erridge C., Pridmore A., Eley A., Stewart J., Poxton I.R. // *J. Med. Microbiol.* 2004. V. 53. Pt 8. P. 735–740.
 20. Katzke N., Bergmann R., Jaeger K.-E., Drepper T. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 824. P. 251–269.
 21. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010.
 22. Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 3. С. 275–283.
 23. Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P., Rose J.R., Kobayashi S., Yokohama H., Ishibashi A., Christ W.J., Katayama K., Yamatsu I., Kishi Y. // *Br. J. Pharmacology.* 1999. V. 127. № 4. P. 853–862.
 24. Krauss J.H., Seydel U., Weckesser J., Mayer H. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 180. № 3. P. 519–526.
 25. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.Р. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
 26. Baggiolini M., Walz A., Kunkel S.L. // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 84. № 4. P. 1045–1049.
 27. Hirao Y., Kanda T., Aso Y., Mitsuhashi M., Kobayashi I. // *Lab. Med.* 2000. V. 31. № 1. P. 39–44.
 28. Kawai T., Akira S. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 5. P. 373–384.
 29. Zanoni I., Ostuni R., Marek L.R., Baressi S., Barbalat R., Barton G.M., Granucci F., Kagan J.C. // *Cell.* 2011. V. 147. № 4. P. 868–880.
 30. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. // *Science.* 1990. V. 249. № 4975. P. 1431–1433.
 31. Nilsen N.J., Deininge S., Nonstad U., Skjeldal F., Husebye H., Rodionov D., von Aulock S., Hartung T., Lien E., Bakke O., Espevik T.J. // *Leukoc. Biol.* 2008. V. 84. № 1. P. 280–291.
 32. Sugawara S., Arakaki R., Rikiishi H., Takada H. // *Infect. Immunol.* 1999. V. 67. № 4. P. 1623–1632.