*Оригинальная исследовательская статья*

# МОДУЛИРОВАНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ У МЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ TLR9

**Е. Д. Гаврилова[1]*, Е. В. Гойман[1], Е. Н. Демченко[1], Е. В. Чуб[2], Н. Н. Вольский[1], В. А. Козлов[1]**




[1] Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, 630099, Россия, Новосибирск
[2] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Россия, Новосибирск

* Автор-корреспондент: edav.gavr@mail.ru

**Для цитирования:**

Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Демченко Е. Н., Чуб Е. В., Вольский Н. Н., Козлов В. А. Модулирование воспалительной реакции в экспериментальных моделях у мышей различных линий с использованием синтетических лигандов TLR9. *Современные направления в биомедицине.* 2026;2(1):89—100. https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-6

Поступила
02.03.2026 г.
Прошла рецензирование
14.04.2026 г.
Принята к печати
16.04.2026 г.
Опубликована
09.09.2026 г.

© Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Демченко Е. Н., Чуб Е. В., Вольский Н. Н., Козлов В. А., 2026
© Оформление, БФУ им. И. Канта, 2026

**Резюме:** Внеклеточная ДНК животных и человека обладает иммуномодулирующими свойствами и в основе механизма ее действия может лежать связывание с рецепторами распознавания образов, например TLR9. В результате активации этих рецепторов инициируется воспаление и увеличивается продукция провоспалительных цитокинов. Представляется актуальным изучение влияния активации TLR9-рецептора специфическим агонистом ODN 1826 на изменение уровней вкДНК и продукцию TNF-$\alpha$ в ответ на экзогенный провоспалительный стимул у мышей C57BL/6 и Balb/c, оппозитных линий — в ответ на развитие воспаления и продукцию TNF-$\alpha$ — в ответ на экзогенный провоспалительный стимул.

Установлено, что введение агониста рецептора TLR9 — олигонуклеотида ODN 1826 — увеличивает у мышей показатели интенсивности воспаления при введении LPS, характеризующиеся повышением концентрации TNF$\alpha$ и вкДНК в крови и уменьшением содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток. На раннем этапе развития воспаления реакция мышей Balb/c на LPS качественно не отличалась от аналогичной реакции у мышей линии C57BL/6. Результаты дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса.

**Ключевые слова:** внеклеточная ДНК, TLR9, олигонуклеотиды, воспаление, TNF-$\alpha$, LPS

*Original research article*

# MODULATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN EXPERIMENTAL MODELS OF MICE OF DIFFERENT STRAINS USING SYNTHETIC TLR9 LIGANDS

**E. D. Gavrilova[1]*, E. V. Goiman[1], E. N. Demchenko[1], E. V. Chub[2], N. N. Volsky[1], V. A. Kozlov[1]**




[1] Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology," 630099, Novosibirsk, Russia
[2] Federal Budgetary Scientific Institution "State Research Center of Virology and Biotechnology 'Vector' of Rospotrebnadzor," 630559, Novosibirsk, Russia

* Corresponding author: edav.gavr@mail.ru

**To cite this article:**

Gavrilova E. D., Goiman E. V., Demchenko E. N., Chub E. V., Volsky N. N., Kozlov V. A. Modulation of the inflammatory response in experimental models of mice of different strains using synthetic TLR9 ligands. *Advanced Targets in Biomedicine.* 2026;2(1):89–100. https://doi.org/10.5922/ATB-2026-2-1-6

Received
02.03.2026
Revised
14.04.2026
Accepted
16.04.2026
Published
09.09.2026

© Gavrilova E. D., Goiman E. V., Demchenko E. N., Chub E. V., Volsky N. N., Kozlov V. A., 2026
© Design, IKBFU, 2026

**Abstract:** Cell-free DNA (cfDNA) from animals and humans possesses immunomodulatory properties, and the underlying mechanism of its action may involve binding to pattern recognition receptors such as TLR9. Activation of these receptors initiates inflammation and increases the production of proinflammatory cytokines. It is therefore relevant to study the effect of TLR9 receptor activation by the specific agonist ODN 1826 on changes in blood cfDNA levels and TNF-$\alpha$ production in response to an exogenous proinflammatory stimulus in C57BL/6 and Balb/c mice — strains known to differ in their response to the development of inflammation.

It was found that administration of the TLR9 receptor agonist ODN 1826 increased inflammation intensity in LPS-treated mice, as characterized by increased TNF-$\alpha$ and cfDNA concentrations in the blood and a decrease in the content of cfDNA covalently bound to proteins on the cell surface. At the early stage of inflammation development, the response of Balb/c mice to LPS was not qualitatively different from that of C57BL/6 mice.

These results suggest that agents capable of activating TLR9 may prove to be effective pharmacological tools for the treatment of immunopathological processes requiring correction of the Th1/Th2 balance.

**Keywords:** cell-free DNA, TLR9, oligonucleotides, inflammation, TNF-$\alpha$, LPS

## Введение

Вклад в развитие и поддержание иммунного воспаления, патологической аутоиммунной реакции могут вносить общебиологические процессы (апоптоз, нетоз), эпигенетическая регуляция [1—3]. На сегодняшний день существует достаточное количество исследований, которые свидетельствуют об изменениях содержания внеклеточной ДНК (вкДНК) в крови при определенных патологических процессах, а также об использовании этого показателя в качестве диагностического критерия при некоторых заболеваниях [1; 4—7]. Кроме того, в некоторых работах [8; 9] предполагается, что вкДНК животных и человека обладает иммуномодулирующими свойствами и в основе механизма ее действия может лежать связывание с рецепторами распознавания образов, например TLR9 [1]. Белки TLR9 входят в обширное семейство толл-подобных рецепторов (toll-like receptors), естественными лигандами которых являются определенные консервативные участки в молекулах патогенных бактерий и вирусов, объединяемых под названием патоген-ассоциированных молекулярных фрагментов [10]. Благодаря способности распознавать такие фрагменты белки этого семейства играют важную роль в создании первой линии защиты от инфекционных агентов, обеспечивая инициацию реакций врожденного иммунитета и развитие неспецифического воспаления при попадании в организм инфекционных агентов. Параллельно с этим TLR-белки способны активировать механизмы последующего специфического иммунного ответа на конкретные патогены, участвуя тем самым в регуляции направления и интенсивности иммунных реакций [10; 11].

TLR9 экспрессируются главным образом в клетках иммунной системы, таких как В-клетки, дендритные клетки и моноциты / макрофаги, и активируются в ответ на ДНК, содержащую неметилированные CpG-мотивы, которые характерны для бактериальной ДНК, участвуя в регуляции реакций врожденного противоинфекционного иммунитета [11—13]. При определенных условиях TLR9 могут распознавать и ауто-ДНК, в результате чего происходит активации этих рецепторов, инициируется воспаление и увеличивается продукция провоспалительных цитокинов [14]. Благодаря этому TLR9-белки могут принимать участие в развитии аутоиммунных реакций. Было обнаружено, что нокаут гена TLR9 у мышей с иммунокомплексным люпус-подобным нефритом приводит к значительному усилению проявлений болезни, в то время как гиперэкспрессия этого гена в В-клетках заметно тормозит развитие нефрита [15].

Исходя из представленных данных, представлялось актуальным изучить влияние активации TLR9 специфическим агонистом ODN 1826 на изменения уровней вкДНК в крови мышей и продукцию TNF-$\alpha$ в ответ на экзогенный провоспалительный стимул, а также выяснить возможность модуляции экспрессии гена TLR9 в клетках иммунной системы синтетическими лигандами этого рецептора, в том числе вкДНК крови, уровень которой существенно возрастает в ранней фазе воспалительного ответа.

Следует иметь в виду, что иммунная система контролирует развитие и интенсивность воспалительных реакций, так что сдвиг баланса хелперов в сторону Th1-лимфоцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины, является постоянным элементом реакций организма на индуцирующие воспаление внешние воздействия [16].

В связи с этим естественно ожидать, что во многих случаях изменение уровня вкДНК в крови может быть значимо связано с величиной Th1/Th2-соотношения в организме, что во многом определяет патогенез воспалительных процессов при различных заболеваниях.

## Материалы и методы

### *Объекты исследования*

В качестве экспериментальных животных были выбраны линии мышей C57BL/6 и Balb/c, оппозитных, как известно из данных литературы [17], в отношении ответа на развитие воспаления. В опыты были включены здоровые половозрелые 6—8-недель-

ные мыши, содержавшиеся в виварии в условиях, соответствующих требованиям эксперимента. Животные получали гранулированный комбикорм, сбалансированный по потребностям в белках, жирах, углеводах, витаминах, минеральных веществах и микроэлементах в рациональных дозах (ГОСТ Р 50258-92). Все эксперименты проводили в стандартных условиях содержания животных, соблюдения температурного режима, освещенности. В работе использовали самок мышей линий C57BL/6 и Balb/c (виварий, г. Томск). Экспериментальные исследования выполнены в полном соответствии с требованиями Международной конвенции по гуманному обращению с подопытными животными (Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, 1986) и Директивой № 2010/63/ЕС Европейского парламента и совета ЕС о защите животных, использующихся для научных целей (г. Страсбург, 2010). Исследование на экспериментальных животных одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ (протокол № 92 от 10.11.2015).

Мыши каждой из исследуемых линий были разделены на четыре группы (по 6 животных):

1-я — интактные мыши;

2-я — животные с воспалительной реакцией, вызванной введением LPS (контроль);

3-я — мыши, которым помимо LPS был введен специфический лиганд TLR9 — ODN 1826, содержащий в своей структуре два CpG-динуклеотида;

4-я — мыши, которым помимо LPS был введен другой лиганд TLR9 — ODN 1982, где CpG-динуклеотиды отсутствуют.

Всем животным экспериментальных групп (группы 2—4) однократно внутрибрюшинно вводили LPS *E. coli* штамма 111:B4 (Sigma, США) в дозе 1 мкг/мышь. Животным, входящим в группу 1, вводился соответствующий объем PBS. Мышам в группах 3 и 4 двукратно до инъекции липополисахарида (LPS) подкожно 2 раза с интервалом в два дня вводили ODN 1826 или в качестве контроля ODN 1982 в дозе 25 мкг/мышь. Через 4 ч после введения LPS мышей забивали, забирали у них кровь для последующих исследований.

### *Методы исследования*

Выделение и количественное определение вкДНК проводили согласно методике [18]. Кровь собирали в пробирки, содержащие 3×PBS (PBS — 10 мМ фосфатный буфер pH 7,4, 0,15 М NaCl) и 15 mM ЭДТА в качестве антикоагулянта. Плазму отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. К осажденным клеткам добавляли девятикратный объем PBS с 5 mM ЭДТА, супернатант отделяли центрифугированием при 400 g в течение 20 мин. Для определения вкДНК, связанной с клеточной поверхностью, клетки инкубировали 5 мин с 0,25%-ным раствором трипсина, реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина из соевых бобов (Sigma, США) и центрифугированием отделяли супернатант, содержащий вкДНК. Выделение ДНК из полученных фракций проводили на колонках компании «БиоСилика» (Новосибирск) согласно прилагаемой инструкции. Определение ДНК осуществляли с помощью флюоресцентного красителя PicoGreen (Invitrogen, США). ДНК рассчитывалась по калибровочной кривой, построенной для известных концентраций стандартной двухцепочечной λ ДНК.

Количество TNF$\alpha$ в сыворотке крови мышей определяли иммуноферментным методом с помощью набора Mouse TNF-alpha Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Inc, США).

Определение количества мРНК гена TLR9 осуществлялось методом ПЦР в режиме «реального времени» на приборе CFX96 Thermal Cycler (Bio-Rad, США).

### *Статистическая обработка*

Результаты в таблицах и на рисунках приведены в виде средних величин. Достоверность выявленных различий и величину связей между измеренными па-

раметрами оценивали методом непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна — Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p < 0,05$.

## Результаты и обсуждения

### *Оценка влияния синтетических лигандов TLR9 на развитие воспалительной реакции у мышей линий C57BL/6 и Balb/c*

В задачу исследования входила оценка уровня вкДНК и продукции TNFα у интактных и LPS-стимулированных экспериментальных животных и изучение влияние олигонуклеотида ODN 1826 (агониста TLR9) на уровень вкДНК и синтез TNFα у мышей линий C57BL/6 и Balb/c.

В ранее проведенных исследованиях [19—21] нами было обнаружено, что концентрация вкДНК в плазме крови существенно увеличивается при ответе на небольшую дозу LPS и, следовательно, этот параметр может служить одним из показателей интенсивности воспалительных процессов в организме. Такой хорошо согласующийся с имеющимися литературными данными вывод был сделан нами на основании результатов экспериментов, проведенных на других линиях мышей. Результаты настоящего исследования на мышах C57BL/6 и Balb/c свидетельствуют, что повышение уровней вкДНК в плазме крови на ранней стадии развития воспалительных реакций наблюдается у животных этих линий (графа 1 в таблицах 1 и 2). Этот показатель хорошо коррелировал с повышением уровня TNF-a в ответ на воспалительный стимул как у мышей C57BL/6 ($p = 0,51$, $p < 0,05$), так и у Balb/c ($p = 0,44$, $p < 0,05$).

*Таблица 1*

**Влияние лигандов рецептора TLR9 на показатели LPS-стимулированного воспалительного ответа у мышей линии C57BL/6**

*Table 1*

**The effect of TLR9 receptor ligands on LPS-stimulated inflammatory response in C57BL/6 mice**

| Группа | Внеклеточная ДНК, нг/мл | | | Соотношение «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК» | N/L | TNF-a, пг/мл |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 1. Интактные мыши | 25 | 255 | 3302 | 0,9 | 0,17 | 12,49 |
| 2. +LPS | 249 | 86* | 1412 | 0,83 | 0,46** | 174,4** |
| 3. +ODN 1826 + LPS | 852 | 137 | 1367 | 0,64 | 0,33 | 476,1## |
| 4. +ODN 1982 + LPS | 436 | 151 | 827# | 0,6# | 0,42 | 217,7 |

*Примечание.* Обозначения фракций вкДНК в столбце «Внеклеточная ДНК»: 1 — плазма; 2 — буфер; 3 — вкДНК, связанная с поверхностью клеток; N/L — соотношение «нейтрофилы / лимфоциты» в крови.

Достоверное отличие от группы 1 (контроль): * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Достоверное отличие от группы 2 (+LPS): # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$.

*Note:* Designations of cfDNA fractions in the "Cell-Free DNA" column: 1 — plasma; 2 — buffer; 3 — cell-surface-bound cfDNA; N/L — neutrophil / lymphocyte ratio in the blood.

Significant difference from group 1 (control): * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$.

Significant difference from group 2 (+LPS): # — $p < 0.05$; ## — $p < 0.01$.

Другим значимым следствием развития в организме животных воспалительной реакции можно считать снижение количества вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток крови, и, соответственно, уменьшение соотношения «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК», что видно из результатов, представленных в таблицах 1, 2. При этом у линии Balb/c эти изменения достоверны (табл. 2).

*Таблица 2*

**Влияние лигандов рецептора TLR9 на показатели LPS-стимулированного воспалительного ответа у мышей линии Balb/c**

*Table 2*

**The effect of TLR9 receptor ligands on LPS-stimulated inflammatory response in Balb/c mice**

| Группа | Внеклеточная ДНК, нг/мл | | | Соотношение «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК» | N/L | TNF-a, пг/мл |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| 1. Интактные мыши | 39 | 140 | 4807 | 0,96 | 0,6 | 21,9 |
| 2. +LPS | 491** | 142 | 2501* | 0,8** | 0,29 | 690,3** |
| 3. +ODN 1826 + LPS | 1601$^{\#\#}$ | 421$^{\#}$ | 3119 | 0,61$^{\#\#}$ | 0,16$^{\#}$ | 1458,1 |
| 4. +ODN 1982 + LPS | 767 | 126 | 1532 | 0,63$^{\#}$ | 0,35 | 352,5 |

*Примечание.* Обозначения фракций вкДНК в столбце «Внеклеточная ДНК»: 1 — плазма; 2 — буфер; 3 — вкДНК, связанная с поверхностью клеток; N/L — соотношение «нейтрофилы / лимфоциты» в крови.

Достоверное отличие от группы 1 (контроль): * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$.

Достоверное отличие от группы 2 (+LPS): # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$.

*Note:* Designations of cfDNA fractions in the "Cell-Free DNA" column: 1 — plasma; 2 — buffer; 3 — cell-surface-bound cfDNA; N/L — neutrophil/lymphocyte ratio in the blood.

Significant difference from group 1 (control): * — $p < 0.05$; ** — $p < 0.01$.

Significant difference from group 2 (+LPS): # — $p < 0.05$; ## — $p < 0.01$.

В данной работе было исследовано влияние на вышеуказанные параметры двух лигандов TLR9: олигонуклеотида ODN 1826, содержащего в своей структуре два CpG-динуклеотида, что должно обеспечивать выраженную активацию TLR9, и олигонуклеотида ODN 1982, в котором CpG-динуклеотиды отсутствуют. Оба использованных препарата представляли собой фосфотиоатные производные соответствующих олигонуклеотидов, что обеспечивает их устойчивость к разрушению эндогенными нуклеазами [22].

Из приведенных в таблицах 1, 2 данных видно, что ODN 1826 — агонист TLR9 — существенно увеличивает интенсивность воспалительного ответа на LPS, оцениваемую с помощью исследованных нами параметров (уровни TNF-a и вкДНК в плазме, уровень связанной с поверхностью клеток вкДНК и отношение связанной с поверхностью клеток вкДНК к суммарной вкДНК). Это согласуется с имеющимися литературными данными и может быть истолковано, как способность активированного TLR9 влиять на Th1/Th2-соотношение, сдвигая этот баланс в провоспалительную сторону. Из работ других авторов известно, что агонисты этого рецептора могут стимулировать продукцию IL-12 дендритными клетками [23] и подавлять Th2-зависимые иммунные реакции при аллергии [24] и аутоиммунных процессах [10; 25].

Не содержащий CpG олигонуклеотид (ODN 1982) не воздействовал на показатели воспалительной реакции, такие как уровень TNF-a и количество вкДНК в плазме у мы-

шей обеих линий. Однако фракция вкДНК, связанной с поверхностью клеток, значительно снижена, что приводит к изменению индекса, то есть соотношения этой фракции к общему количеству вкДНК, что может косвенно свидетельствовать о том, что не только фрагменты ДНК, богатые неметилированными CpG-динуклеотидами, могут быть лигандами TLR9. При этом нельзя исключать и другие потенциальные механизмы активации или блокировки данного рецептора, что, конечно, требует дополнительных исследований.

Выявленные нами изменения параметров воспалительного ответа у мышей исследованных линий не позволяют охарактеризовать мышей Balb/c как генетически предрасположенных к иному варианту ответа на воспалительные стимулы, нежели наблюдаемый у мышей линии C57BL/6. Следует отметить, что у мышей Balb/c, даже у интактных животных, уровни TNF-α и вкДНК в плазме почти в два раза выше, чем у мышей C57BL/6 (табл. 1, 2), тогда как на фоне воспалительной реакции и под действием ODN 1826 эти показатели в группах 2 и 3 у линии Balb/c выше в 3—4 раза, чем у C57BL/6. Можно предположить, что различия ответа на активацию TLR9 проявляются в силе реакции, а не в разнонаправленности эффектов. В обеих линиях наблюдается значительное снижение содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток, и, соответственно, уменьшение соотношения «вкДНК, связанная с поверхностью клеток / суммарная вкДНК», что видно из результатов соотношения «трипсин / суммарная вкДНК» (табл. 1, 2).

В качественном отношении выявленные изменения оцениваемых параметров сходны у обеих линий мышей, то есть различия ответа на активацию TLR9 проявляются не в разнонаправленности действия, как предполагалось изначально, а в выраженности реакции.

Этот вывод формально противоречит известной оппозитности указанных линий в отношении иммунного ответа на Т-зависимые антигены (у Balb/c выше Th2-зависимый гуморальный ответ, в то время как у C57BL/6 выше Th1-зависимая реакция ГЗТ) и результатам недавней работы группы китайских авторов [17]. В их исследовании было установлено, что при развитии воспалительного процесса концентрация вкДНК в плазме крови мышей Balb/c, измеряемая в течение нескольких дней после заражения животных, заметно ниже, чем у C57BL/6 при аналогичных условиях эксперимента. В нашей работе такое отличие не наблюдалось и даже интенсивность ответа на LPS у Balb/c была несколько выше, чем у C57BL/6. Однако на деле между полученными нами и литературными данными нет реального противоречия, поскольку, во-первых, в цитируемой работе речь идет о тяжелом септическом процессе с гибелью почти всех экспериментальных животных, в то время как в ранее выполненных нами экспериментах вызванное LPS-воспаление имело умеренную интенсивность с возвращением всех показателей к исходному уровню через 24 ч после введения липополисахарида [20]. Во-вторых, и это главное, как было показано в исследовании китайских авторов, в первые сутки после заражения постепенное увеличение концентрации вкДНК в крови происходит совершенно одинаково у обеих исследованных линий мышей [17], что полностью совпадает с результатами нашей работы.

Следует предполагать, что величина и направление конкретных изменений в организме этих животных при дальнейшем развитии воспаления обусловлены совокупным действием многих регуляторных факторов, одним из которых может быть степень экспрессии TLR9 у мышей различных линий и его активации при различных воздействиях.

Результаты проведенных экспериментов и данные литературы дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты бактериальной ДНК и синтетические лиганды этого рецептора (со свойствами как его агонистов, так и антагонистов) могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса. Выяснение их терапевтических возможностей представляется актуальной задачей дальнейших исследований.

## Оценка экспрессии гена TLR9 у мышей различных линий при воздействии синтетических лигандов этого рецептора

После изучения эффектов синтетических лигандов TLR9 на развитие воспаления в экспериментальной модели и выяснения того факта, что уровни вкДНК и TNFa в крови мышей — как C57BL/6 (Th1), так и Balb/c (Th2) — существенно зависят от воздействия на TLR9, было исследовано влияние этих лигандов на экспрессию гена TLR9 (количество мРНК TLR9) и сделана попытка выявить взаимосвязь этого процесса с уровнем вкДНК при разных типах иммунологического ответа Th1 и Th2 у мышей линии C57BL/6 и Balb/c.

Данные, полученные в экспериментах, в которых изучалось возможное влияние лигандов TLR9 на экспрессию гена TLR9 в спленоцитах мышей двух оппозитных линий, представлены в таблице 3.

*Таблица 3*

**Изменения уровней мРНК гена TLR9 в спленоцитах мышей линий Balb/c и C57BL/6 под влиянием LPS и лигандов данного рецептора**

*Table 3*

**Changes in TLR9 mRNA levels in splenocytes of Balb/c and C57BL/6 mice under the influence of LPS and ligands of this receptor**

| Группа | Уровень мРНК, усл. ед. | |
|---|---|---|
| | Balb/c | C57BL/6 |
| 1. Контроль (n = 6) | 0,96 ± 0,12 | 1,30 ± 0,26 |
| 2. +LPS (n = 6) | 1,21 ± 0,09 (26 %↑) | 1,69 ± 0,27 (30 %↑) |
| 3. +ODN 1826 + LPS (n = 6) | 1,29 ± 0,07 (34 %↑) | 1,23 ± 0,19 (5 %↓) |
| 4. +ODN 1982 + LPS (n = 5) | 2,35 ± 0,54 (≥2 раза) | 1,49 ± 0,28 (15 %↑) |

*Примечание:* %↑↓ — относительно контрольных групп соответствующих линий мышей.

*Note:* %↑↓ — relative to the control groups of the corresponding mouse strains.

Отличия между исследованными группами, которые представлены в таблице 3, не позволяют считать, что использованные нами искусственные лиганды могут существенно влиять на транскрипцию мРНК TLR9 в иммунокомпетентных клетках (спленоцитах), так как изменения недостоверны. То же можно сказать и о соответствующем влиянии вкДНК на этот параметр (по крайней мере в ранней фазе воспалительного ответа на введение LPS, когда уровень вкДНК в крови существенно возрастает).

Следовательно, наблюдаемые эффекты лигандов TLR9 на развитие воспалительной реакции нельзя объяснить изменениями количества мРНК этого рецептора, а, видимо, можно связать с активацией уже существующих TLR9. Этот факт, разумеется, не исключает возможности влияния лигандов данного рецептора (в том числе и вкДНК крови) на его экспрессию в более поздние периоды после их воздействия. Однако проверка такого предположения требует проведения специальных экспериментов.

## Заключение

В экспериментах на мышах линий Balb/c и C57BL/6 продемонстрирована возможность модулирования воспалительной реакции в ответ на LPS с использованием синтетических лигандов рецептора TLR9. Введение агониста TLR9 — ODN 1826 — увеличивало у мышей показатели интенсивности воспаления при введении LPS, харак-

теризующиеся повышением концентрации TNFα и вкДНК в крови животных и уменьшением содержания вкДНК, ковалентно связанной с белками на поверхности клеток. Не содержащий CpG олигонуклеотид ODN 1982 в меньшей степени воздействовал на показатели воспалительной реакции. На раннем этапе развития воспаления реакция мышей Balb/c на LPS качественно не отличалась от аналогичной реакции у мышей линии C57BL/6. Результаты проведенных экспериментов и данные литературы дают основание предполагать, что способные активировать TLR9 препараты бактериальной ДНК и синтетические лиганды этого рецептора (со свойствами как его агонистов, так и антагонистов) могут оказаться эффективными фармакологическими средствами при лечении иммунопатологических процессов, при которых требуется коррекция Th1/Th2-баланса. Исследование их терапевтических возможностей представляется актуальным и перспективным направлением.

В то же время обнаружено, что лиганды TLR9 (как синтетические лиганды, так и вкДНК плазмы крови, уровень которой существенно возрастает после стимуляции острой воспалительной реакции у этих животных) не приводят к достоверным изменениям экспрессии гена TLR9 в спленоцитах мышей, по крайней мере в ранней фазе воспалительного ответа на введение LPS. Однако не исключается возможность влияния лигандов данного рецептора (в том числе и вкДНК крови) на экспрессию гена TLR9 в более поздние периоды после их воздействия.

**Финансирование.** Исследование проведено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу (РК № 124112700049-9).

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи. Все соавторы одобрили окончательную версию рукописи и принимают ответственность за все аспекты работы, включая корректное изучение и урегулирование вопросов, относящихся к точности и добросовестности представленных данных.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределен следующим образом:

**Е. Д. Гаврилова** — концепция и дизайн исследования, написание черновика текста статьи, анализ и обсуждение данных, редактирование статьи**;**

**Е. В**. **Гойман** — сбор и обработка биологического материала, оформление ссылок и таблиц;

**Е. Н. Демченко** — сбор и обработка биологического материала, обсуждение материалов;

**Е. В. Чуб** — определение количества мРНК гена TLR9 методом ПЦР;

**Н. Н. Вольский** — статистическая обработка и анализ результатов;

**В. А. Козлов** — концепция исследования, привлечение финансирования**.**

**Funding.** The study was conducted using federal budget funds to fulfill the state assignment for scientific research work (№ 124112700049-9).

**Conflict of Interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article. All authors approved the final version of the manuscript and take responsibility for all aspects of the work, including ensuring that any questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

**Authors' contribution.** All authors confirm that their authorship complies with the international ICMJE criteria (all authors made a significant contribution to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article, and read and approved the final version before publication). The major contributions were distributed as follows:

**E. D. Gavrilova** — study concept and design, drafting the article, data analysis and discussion, and editing;

**E. V. Goiman** — collection and processing of biological material, references and table preparation;

**E. N. Demchenko** — collection and processing of biological material, discussion of materials**;**
**E. V. Chub** — determination of the TLR9 gene mRNA quantity by PCR;
**N. N. Volskiy** — statistical processing and analysis of results;
**V. A. Kozlov** — conceptualization, funding acquisition.

## Список литературы

1. Ferrera F., Altosole T., Tardito S., Astone G., Bernardi C., Parodi A., et al. Immunoregulatory properties of cell free DNA. Cell Mol. Life Sci. 2025, 82(1), 320, DOI: 10.1007/s00018-025-05862-y.

2. Wang Y., Du C., Zhang Y., Zhu L. Composition and function of neutrophil extracellular Traps. Biomolecules. 2024, 14(4), 416, DOI: 10.3390/biom14040416.

3. Singhal A., Kumar S. Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation.// Immunology. 2022, 165, 22—43, DOI: 10.1111/imm.13423.

4. Műzes G., Bohusné Barta B., Szabó O., Horgas V., Sipos F. Cell-Free DNA in the Pathogenesis and Therapy of Non-Infectious Inflammations and Tumors. Biomedicines, 2022, 10(11), 2853, DOI: 10.3390/biomedicines10112853.

5. Zhang Y., Liu Z., Ji K., Li X., Wang C., Ren Z., et al. Clinical Application Value of Circulating Cell-free DNA in Hepatocellular Carcinoma. Front. Mol. Biosci. 2021, 8, 736330, DOI: 10.3389/fmolb.2021.736330.

6. Смирнова С. Ю., Никулина Е. Е., Габеева Н. Г., Королева Д. А., Татарникова С. А., Смольянинова А. К., и др. Свободно циркулирующая ДНК в плазме у пациентов с диффузной В-крупноклеточной лимфомой и В-клеточной лимфомой высокой степени злокачественности ('double hit'/'triple hit'). Клиническая онкогематология. 2023, 16(2), 200—208, DOI: 10.21320/2500-2139-2023-16-2-200-208.

7. Киреева В. В., Лепехова С. А., Иноземцев П. О., Усольце Ю. К., Трофимова Е. А. Роль митохондриальной ДНК в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Казанский медицинский журнал. 2022, 103(3), 455—466, DOI: 10.17816/KMJ2022-455.

8. McCarthy C. G., Wenceslau C. F., Goulopoulou S., Ogbi S., Baban B., Sullivan J. C., et al. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc. Res., 2015, 107(1), 119—130, DOI: 10.1093/cvr/cvv137.

9. Brynychova I., Zinkova A., Hoffmanova I., Korabecna M., Dankova P. Immunoregulatory properties of cell-free DNA in plasma of celiac disease patients — A pilot study. Autoimmunity, 2019, 52(2), 88—94, DOI: 10.1080/08916934.2019.1608965.

10. Saber M. M., Monir N., Awad A. S., Elsherbiny M. E., Zaki H. F. TLR9: A friend or a foe. Life Sci. 2022, 307, 120874, DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120874.

11. Okude H., Ori D., Kawai T. Signaling Through Nucleic Acid Sensors and Their Roles in Inflammatory Diseases. Front. Immunol., 2021, 11, 625833, DOI: 10.3389/fimmu.2020.625833.

12. Liu H., Ji Y., Ma X., He A., Zhao W., Zhang P., et al. Effects of CpG oligodeoxynucleotides on the differentiation of Treg/ Th17 cells. Molecular Immunology. 2021, 132, 199—208, DOI: 10.1016/j.molimm.2021.01.003.

13. Qu Y., Jiang Z., Chen Z., Luo S., Xie B., Wu X., et al. CpG-oligodeoxynucleotides challenged macrophages ameliorate acetaminophen induced liver injury by activating TLR9/IRG1/ itaconate metabolic pathway. Molecular Medicine, 2025, 31(1), 282, DOI: 10.1186/s10020-025-01324-0.

14. Lamphier M. S., Sirois C. M., Verma A., Golenbock D. T., Latz E. TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2006, 1082(1), 31—43, DOI: 10.1196/annals.1348.005.

15. Tilstra J. S., John S., Gordon R. A., Leibler C., Kashgarian M., Bastacky S., et al. B cell–intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus. J. Clin. Invest. 2020, 130(6), 3172–3187, DOI: 10.1172/JCI132328.

16. You K., Gu H., Yuan Z., Xu X. Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis. Front. Cell Dev. Biol. 2021, 9, 727075, DOI: 10.3389/fcell.2021.727075.

17. Xin Y., Gao X., Wang W., Xu X., Yu L., Ju X., et al. Circulating cell-free DNA indicates M1/M2 responses during septic peritonitis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2016, 477(4), 589—594, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.092.

18. Tamkovich S. N., Litviakov N., Bryzgunova O. E., Dobrodeev A. Yu., Rykova E. Y., Tuzikov S. A., et al. Cell-Surface-Bound Circulating DNA as a Prognostic Factor in Lung Cancer. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008, 1137, 214—217, DOI: 10.1196/annals.1448.042.

19. Демченко Е. Н., Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Вольский Н. Н., Козлов В. А. Динамика уровня внеклеточной ДНК в ЛПС-индуцированной модели воспаления *in vivo*. Российский иммунологический журнал. 2022, 25(4), 423—430, DOI: 46235/1028-7221-1179-DOC.

20. Демченко Е. Н., Гаврилова Е. Д., Гойман Е. В., Вольский Н. Н., Колесникова О. П., Козлов В. А. Внеклеточная ДНК в крови как показатель воспалительной реакции *in vivo*. Медицинская иммунология. 2022, 24(4), 853—860, DOI: 10.15789/1563-0625-EDI-2504.

21. Demchenko E. N., Gavrilova E. D., Goiman E. V., Volsky N. N. Fatty acid receptor GPR84 and Th1/Th2 balance in the experimental system in vivo. Medical Immunology (Russia). 2021, 23(4), 659—664, DOI: 10.15789/1563-0625-FAR-2235.

22. Gavrilova E. D., Goiman E. V., Derzhalova A. S., Stetsenko D. A., Burakova E. A. Effects of Immunosuppressive Oligonucleotides A151, ODN4084-F, and μ-ODN4084-F on Mitigation of Acute Graft-Versus-Host Disease in Experimental Model. Cytokines and inflammation. 2024, 21(3), 135—143, DOI: 10.17816/CI642255.

23. Jakob T., Walker P. S., Krieg A. M., Udey M. C., Vogel J. C. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. J. Immunol. 1998, 161(6), 3042—3049.

24. Hayashi T., Beck L., Rossetto C., Gong X., Takikawa O., Takabayashi K., et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Clin. Invest. 2004, 114(2), 270—279, DOI: 10.1172/JCI21275.

25. Christensen S. R., Shupe J., Nickerson K., Kashgarian M., Flavell R. A., Shlomchik M. J. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. Immunity. 2006, 25(3), 417—428, DOI: 10.1016/j.immuni.2006.07.013.

## Об авторах

**Елена Давидовна Гаврилова**, кандидат биологических наук, ученый секретарь НИИФКИ, заведующая Лабораторией экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.
ORCID: 0000-0002-2014-3397
E-mail: edav.gavr@mail.ru

**Елена Владимировна Гойман**, кандидат медицинских наук, научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.
ORCID: 0000-0002-6443-6917
E-mail: l.goiman@mail.ru

**Елена Николаевна Демченко**, кандидат химических наук, научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.
ORCID: 0009-0001-5178-5616
E-mail: elena.demchenko@gmail.com

**Елена Владимировна Чуб**, кандидат биологических наук, заведующая отделом — начальник экспериментального участка отдела разработки и производства средств диагностики вирусных заболеваний, Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Россия.
ORCID: 0000-0003-1521-897X
E-mail: chub.e.v@yandex.ru

**Николай Николаевич Вольский**, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории экспериментальной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.
ORCID: 0000-0002-9341-1997
E-mail: dtheory@yandex.ru

**Владимир Александрович Козлов**, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель НИИФКИ, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Россия.
ORCID: 0000-0002-1756-1782
E-mail: vakoz40@yandex.ru

## The authors

**Elena D. Gavrilova**, PhD (Biology), Scientific Secretary, Head of the Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.
ORCID: 0000-0002-2014-3397
E-mail: edav.gavr@mail.ru

**Elena V. Goiman**, PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.
ORCID: 0000-0002-6443-6917
E-mail: l.goiman@mail.ru

**Elena N. Demchenko**, PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.
ORCID: 0009-0001-5178-5616
E-mail: elena.demchenko@gmail.com

**Elena V. Chub**, PhD (Biology), Head of Department — Head of the Experimental Section, Department for the Development and Production of Viral Disease Diagnostics, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Russia.
ORCID: 0000-0003-1521-897X
E-mail: chub.e.v@yandex.ru

**Nikolai N. Volskiy**, PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.
ORCID: 0000-0002-9341-1997
E-mail: dtheory@yandex.ru

**Vladimir A. Kozlov**, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. habil. (Medicine), Professor, Scientific Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Russia.
ORCID: 0000-0002-1756-1782
E-mail: vakoz40@yandex.ru