

## НОВАЯ ЛИНИЯ МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ С ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ОДНОМУ ИЗ ДВУХ ПРОТОКОЛОВ СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА

Астраханцева И.В.<sup>1, 2</sup>, Гладкова Л.С.<sup>2</sup>, Василенко Е.А.<sup>2</sup>,  
Тарабыкин В.С.<sup>2, 3</sup>, Друцкая М.С.<sup>4</sup>, Недоспасов С.А.<sup>1, 4, 5</sup>

<sup>1</sup> Научно-технологический университет «Сириус», г. Сочи, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

<sup>3</sup> Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский факультет Шарите, Берлин, Германия

<sup>4</sup> ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Резюме.** Более 40 лет назад было описано, что воздействие этилнитрозомочевина оказывает мощный мутагенный эффект на половые клетки млекопитающих. Этот химический мутаген приводит к появлению случайных точечных мутаций в ДНК гамет, что позволило использовать его для исследований генетики механизмов различных патологических и физиологических состояний на модельных организмах. В нашей работе после полногеномного мутагенеза этилнитрозомочевинной мышей линии СЗН в поколении F3 отбирали особей, показавших устойчивость к острой летальной гепатотоксичности, вызванной комбинацией липополисахарида (ЛПС) *E. coli* и Д-галактозамина (Д-гал). Известно, что облигатным медиатором этой патологии является фактор некроза опухоли (TNF). Воздействие Д-галактозамина повышает чувствительность гепатоцитов к действию TNF, что приводит к их некрозу и/или апоптозу. После двойного ЛПС/Д-гал-скрининга поколения F3 было выявлено несколько особей, устойчивых к воздействию ЛПС и Д-гал-гепатотоксичности, которые стали основателями «мутантных» семейств. С помощью аутбридинга на линию мышей C57BL/6 с последующим возвратным скрещиванием последовательно были получены поколения F5 и F7. В поколении F5 было выявлено одно семейство мутантных животных, у которого устойчивость к комбинации ЛПС и Д-гал сочеталась с чувствительностью к комбинации TNF и Д-галактозамина, причем этот фенотип проявлял приблизительно менделевское расщепление, соответствующее гипотезе о рецессивной мутации. Этот факт подтверждался чувствительностью гетерозиготных поколений (F4 и F6) к летальной гепатотоксичности. Первичные макрофаги костного мозга, полученные из половины мутантных мышей с таким фенотипом, характеризовались значительно сниженными уровнями индуцированного TNF в ответ на стимуляцию ЛПС *in vitro*. С другой стороны, уровень TNF в сыворотке крови через 1 час после введения мышам нелетальной дозы ЛПС не отличался у мышей мутантного семейства и мышей дикого типа. Эти результаты могут быть объяснены рецессивной мутацией в одном из генов, кодирующих компоненты сигнальной цепочки врожден-

### Адрес для переписки:

Недоспасов Сергей Артурович  
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»  
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.  
Тел.: 8 (499) 135-23-11.  
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

### Address for correspondence:

Nedospasov Sergey A.  
M. Lomonosov Moscow State University  
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 32.  
Phone: 7 (499) 135-23-11.  
E-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

### Образец цитирования:

И.В. Астраханцева, Л.С. Гладкова, Е.А. Василенко, В.С. Тарабыкин, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов «Новая линия мутантных мышей с избирательной устойчивостью к одному из двух протоколов септического шока» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 1. С. 27-34. doi: 10.46235/1028-7221-003-NSO  
© Астраханцева И.В. и соавт., 2020

### For citation:

I.V. Astrakhantseva, L.S. Gladkova, E.A. Vasilenko, V.S. Tarabykin, M.S. Drutskaya, S.A. Nedospasov "New strain of mutant mice characterized by selective resistance to one of two septic shock protocols", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 1, pp. 27-34. doi: 10.46235/1028-7221-003-NSO  
DOI: 10.46235/1028-7221-003-NSO

ного иммунитета, затрагивающей TLR4 каскад, включая в себя белки, связанные с переносом ЛПС, адаптерные молекулы, компоненты киназных сигнальных каскадов и транскрипционные факторы, в ферментах, участвующих в регуляции TLR4 каскада, таких как компоненты убиквитинового цикла, либо в регуляторной последовательности генома, контролирующей экспрессию одного из этих генов, включая ген *tnf*.

**Ключевые слова:** полногеномный мутагенез в мышах, цитокины, фактор некроза опухоли, воспаление, септический шок

## NEW STRAIN OF MUTANT MICE CHARACTERIZED BY SELECTIVE RESISTANCE TO ONE OF TWO SEPTIC SHOCK PROTOCOLS

Astrakhantseva I.V.<sup>a, b</sup>, Gladkova L.S.<sup>b</sup>, Vasilenko E.A.<sup>b</sup>,  
Tarabykin V.S.<sup>b, c</sup>, Drutskaya M.S.<sup>d</sup>, Nedospasov S.A.<sup>a, d, e</sup>

<sup>a</sup> Scientific and Technological University "Sirius", Sochi, Russian Federation

<sup>b</sup> N. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

<sup>c</sup> Institute of Cell and Neurobiology, Charité – Universitätsmedizin, Berlin, Germany

<sup>d</sup> V. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** More than 40 years ago ethyl nitrosourea was identified as a powerful mutagen for mammalian germ cells resulting in random point mutations in gamete DNA. This feature allowed the use of this mutagen for genetic studies on the mechanisms of various pathological and physiological processes in model organisms. In our study genome-wide mutagenesis in C3H mice by ethyl nitrosourea followed in generation F3 by selection of animals resistant to acute lethal hepatotoxicity caused by a combination of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) and D-galactosamine (D-gal). Tumor necrosis factor (TNF) is known to be a critical mediator of this pathology. Exposure to D-galactosamine increases sensitivity of hepatocytes to TNF leading to their necrosis and/or apoptosis. After double LPS/D-gal screening in F3 several mice resistant to LPS/D-gal-induced hepatotoxicity were identified, and became the founders of the corresponding "mutant" families. Using outcrossing to C57BL/6 background followed by intercrossing, generations F5 and F7 were obtained. Among families of mutant animals only one family showed the resistance to the combination of LPS and D-gal, but sensitivity to TNF-D-galactosamine. This phenotype showed approximately Mendelian inheritance consistent with the recessive mutation hypothesis. This latter fact was confirmed by the sensitivity of mice from "heterozygous generations" (F4 and F6) to lethal LPS/Dgal hepatotoxicity. Primary bone marrow macrophages obtained from half of the mutant mice showed significantly reduced levels of TNF after LPS stimulation *in vitro*. At the same time, the serum TNF levels 1 hour after the administration of a non-lethal LPS dose did not differ in the mutant family mice and wild-type mice. These results implicate a recessive mutation either in innate TLR4-mediated signaling pathway, including proteins associated with LPS transfer, adapter molecules, components of kinase signaling cascades, transcription factors, or in enzymes involved in regulation of TLR4 cascades, such as components of the ubiquitin cycle, or in genomic regulatory sequences that control the expression of one of these genes, including the *tnf* gene.

**Keywords:** full genomic mutagenesis in mice, cytokines, tumor necrosis factor, inflammation, septic shock

Работа авторов поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 17-00-00327.

### Введение

Полногеномный мутагенез в модельных животных остается ценным методическим

подходом к выявлению функций генов [6, 7, 8]. Вкратце: самцов поколения F0, подверженных трехкратному введению мутагена этилнитрозомочевина (ENU) [8], скрещивали с самками линейных мышей, после чего полученных в потомстве самцов (F1) также скрещивали с самками линейных мышей,

что позволяет закрепить предполагаемые мутации. Затем самцов и самок поколения F2, предположительно несущих мутации в гетерозиготном состоянии, скрещивали между собой, что позволяет в поколении F3 вести скрининг на заранее выбранный фенотип, такой как устойчивость к индуцированному модельному заболеванию [2, 10, 19].

В модели острой летальной гепатотоксичности, вызванной инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС) и Д-галактозамина (Д-гал), токсичность индуцируется активной экспрессией провоспалительных цитокинов, при этом необходима активация сигнального пути TLR4 [4, 16]. Более того, показано, что при этом уровень продукции провоспалительных цитокинов коррелирует с тяжестью протекания гепатотоксичности [3].

В предыдущей работе нами были отобраны несколько мутантных линий (семей), которые обладали устойчивостью к острой летальной гепатотоксичности, вызванной инъекцией бактериального ЛПС/Д-гал [1]. Известно, что молекулярным медиатором в этой экспериментальной мышинной модели острой гепатотоксичности является провоспалительный цитокин – фактор некроза опухоли (TNF) [3, 5, 9]. Хотя экспрессия TNF на уровне мРНК и белка у большинства этих мутантов не была нарушена, нами выявлена одна мутантная семья, особи которой чувствительны к другому протоколу острой гепатотоксичности – TNF-Д-гал, предположительно указывая на недостаточный уровень TNF *in vivo*. Кроме того, продукция TNF была изучена в первичных культурах макрофагов костного мозга, полученных от мутантных мышей, в ответ на стимуляцию ЛПС *in vitro*, причем примерно в половине случаев уровень TNF был значительно снижен.

## Материалы и методы

### Мыши и мутагенез

Разведение и содержание мышей осуществляли в апатогенных (specific pathogen free) условиях на базе вивария ННГУ им. Н.И. Лобачевского (г. Нижний Новгород). Мутагенез животных N-этил-N-нитризомочевинной проводили на самцах линии СЗН (F0), которых затем скрещивали с самками линии СЗН, затем получившихся самцов (F1) скрещивали с самками С57BL/6. Фенотипический скрининг проводили на животных поколения F3 возраста 6-7 недель [1].

В дальнейшем в конвенциональном виварии проводили скрещивание мышей на генотип С57BL/6 и в нечетных поколениях F5, F7

и F9 проверяли потомство на устойчивость к септическому шоку.

### Модели острой гепатотоксичности

Протокол ЛПС-Д-гал-токсичности применяли при первичном скрининге [1]. Для оценки устойчивости к TNF-Д-гал-индуцированной острой гепатотоксичности мышам внутрибрюшинно вводили рекомбинантный TNF человека (любезно предоставленный профессором Д. Маннел, Университет Регенсбурга, Германия) и Д-галактозамин (Sigma, кат. № G0500, США), из расчета 100 нг и 800 мкг на грамм веса животного соответственно.

### Получение первичных культур макрофагов костного мозга и их активация *in vitro*

Первичные культуры макрофагов костного мозга (bone marrow derived macrophages, BMDM) получали по стандартному протоколу путем дифференцировки клеток *in vitro* из костного мозга мутантных мышей и контрольных мышей дикого типа, полученных на смешанной генетической основе СЗН × С57BL/6 [14, 18]. Для измерения продукции TNF макрофаги рассаживали в 96-луночные планшеты из расчета  $5 \times 10^4$  клеток на лунку, добавляли среду DMEM без сыворотки, не содержащую или содержащую ЛПС в концентрации 100 нг/мл, либо Poly I:C в концентрации 1 мкг/мл, либо имихимод в концентрации 1 мкг/мл, инкубировали в течение 4 часов, затем переносили супернатант в 96-луночный планшет и хранили его при  $-80^\circ\text{C}$ .

### Стимулирование системной продукции TNF *in vivo*

Для определения базового уровня TNF у мышей за сутки до эксперимента была отобрана кровь из щечной венозной пазухи. Через сутки мышам внутрибрюшинно вводили ЛПС (Sigma, кат. № L2630, США) в нелетальной дозе: 3 мкг/г веса животного. Для анализа уровня TNF в сыворотке периферической крови проводили забор крови из щечной венозной пазухи через 1 час после инъекции ЛПС. В дальнейшем мышей подвергали острой ЛПС/Д-гал-индуцированной гепатотоксичности для определения чувствительности или устойчивости к этой экспериментальной модели.

### Иммуноферментный анализ TNF

Концентрацию продуцируемого TNF в первичной культуре макрофагов костного мозга или в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием набора "Mouse TNF $\alpha$  ELISA MAX<sup>TM</sup> Standart Set"

(Biolegend, США) по протоколу изготовителя. Статистический анализ полученных результатов проводили в программе Graphpad Prism с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия между группами при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Все особи одного из мутантных семейств, отобранных по устойчивости к ЛПС-Д-гал, чувствительны к TNF-Д-гал

Ранее нами было описано семейство мутантных мышей, часть особей которого в поколениях F3, F5 и F7 были устойчивы к острой летальной гепатотоксичности, вызываемой комбинацией ЛПС и Д-гал [1]. В этих мышах TNF производился на нормальном уровне *in vivo* и *in vitro*, и, кроме того, устойчивые мыши были также устойчивы к другому протоколу острой гепатотоксичности, индуцированной комбинацией TNF и Д-гал.

Однако в одной мутантной семье («мутант 2»), которой и посвящена настоящая работа, устойчивость была избирательной: мыши были устойчивы к ЛПС-Д-гал, но чувствительны к TNF-Д-гал (рис. 1А, Б).

Мыши прошли несколько раундов дополнительного скрещивания на генотип C57Bl/6, причем указанный фенотип показал почти менделевское наследование даже в F9.

На основе мышей этого семейства с устойчивым фенотипом в поколениях F7 и F9 была сделана попытка получить потомство с 100% устойчивостью к ЛПС/Д-гал-токсичности. Однако в этих поколениях также наблюдалось расщепление по фенотипу, то есть лишь часть потомства характеризовалась устойчивостью к ЛПС/Д-гал (41,7 и 27,7% для поколения F7а и F9а соответственно). Более того, доля выживших в этих поколениях статистически не отличалась от доли выживших в гетерозиготных «родительских» поколениях ( $p > 0,05$ ) (рис. 1Б, В). Это наблюдение может свидетельствовать о неполной пенетрантности изучаемого фенотипа.

### Костномозговые макрофаги мышей семейства мутанта 2 в половине случаев характеризуются сниженной продукцией TNF в ответ на стимуляцию ЛПС *in vitro*

TNF является основным медиатором ЛПС/Д-гал-гепатотоксичности, а макрофаги — его главным источником в ответ на ЛПС [17, 19]. Нами были получены первичные культуры

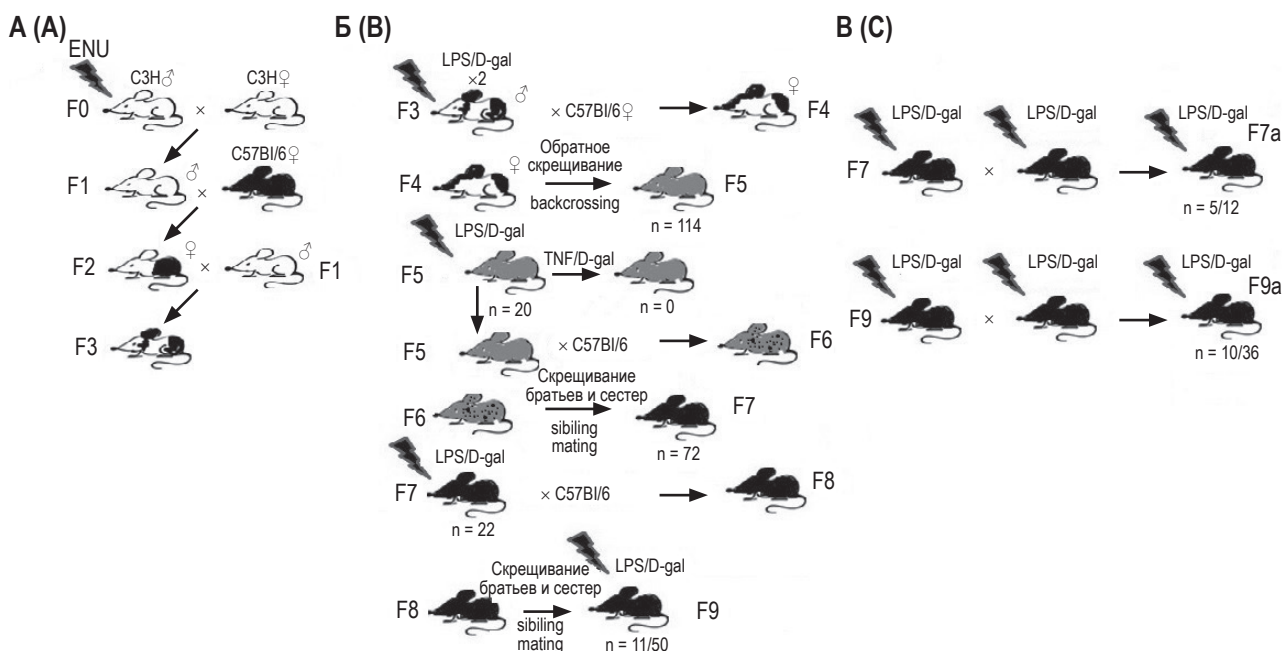


Рисунок 1. Схема скрещивания

Примечание. А – получение третьего поколения мышей после ENU-мутагенеза для выявления рецессивных мутаций. Б – отбор мышей устойчивых к острой гепатотоксичности (ЛПС/Д-гал). В – выведение «чистой» линии мышей, устойчивых к септическому шоку. Обратное скрещивание – скрещивание гибрида с одним из родителей.

Figure 1. Breeding scheme

Note. A, breeding of the third generation of mice after ENU mutagenesis allowing to identify recessive mutations. B, selection of mice resistant to acute hepatotoxicity (LPS/D-gal). C, generation of a "homozygous" strain of mice resistant to septic shock. Backcrossing – breeding a heterozygous offspring with one of the parents.

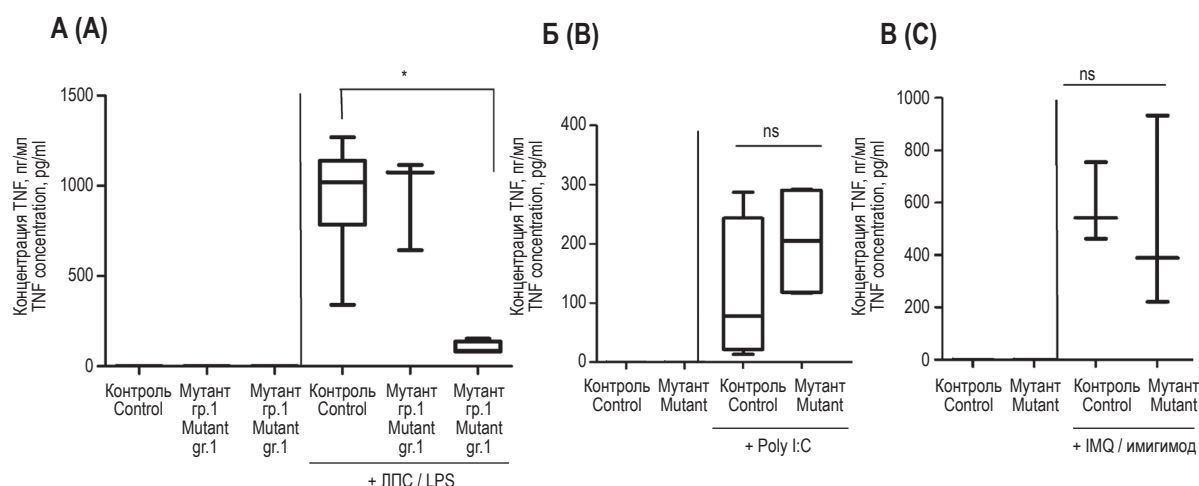


макрофагов костного мозга из 8 мышей мутантной линии 2, которые были отобраны по устойчивости к ЛПС-Д-гал, а затем жили в нормальных условиях в течение двух недель. В качестве контрольной группы использовали 7 мышей дикого типа, полученных на смешанной генетической основе СЗН и С57В16, которые не подвергались ENU-мутагенезу. В этих культурах была проведена сравнительная оценка продукции TNF в ответ на 3 разных индуктора врожденного иммунитета: ЛПС, Poly I:C и имихимод. В отсутствие лигандов рецепторов врожденного иммунитета в культурах неактивированных макрофагов как из контрольных, так и из мутантных мышей продукция TNF в культуральной среде не детектировалась, а через 4 часа после добавления ЛПС из расчета 100 нг/мл наблюдали значительное увеличение в продукции TNF как в контрольных, так и в мутантных культурах (рис. 2А). При этом в половине (n = 4/8)

макрофагальных культур наблюдался достоверно сниженный уровень продукции TNF (рис. 2А). Интересно, что продукция TNF в ответ на Poly I:C и имихимода не отличалась в этих же контрольных и мутантных культурах (рис. 2Б, В).

**В сыворотке крови мышей из семейства мутанта 2 детектируется высокий уровень TNF через 1 час после введения ЛПС *in vivo***

Базовый уровень TNF как у мышей «дикого типа», так и у мышей семейства мутанта 2 был ниже пределов чувствительности эксперимента. При введении ЛПС мышам семейства мутанта 2 отмечалось резкое повышение концентрации TNF в сыворотке крови через 1 час (рис. 3), при этом уровень TNF достоверно не отличался от контроля ни у особей из «мутантной семьи» (показавших в последующих опытах чувствительность к ЛПС/Д-гал), ни у особей с устойчивым фенотипом.



**Рисунок 2. Продукция TNF макрофагами костного мозга мышей из семейства мутанта 2 по сравнению с макрофагальными культурами мышей дикого типа *in vitro***

**Примечание.** А – концентрация TNF в пг/мл в первичных культурах макрофагов костного мозга дикого типа (контроль, n = 7) и мышей мутантной линии (мутант группа 1, n = 4, мутант группа 2, n = 4) до стимуляции ЛПС и через 4 часа после добавления 100 нг/мл ЛПС (+ LPS). Б – концентрация TNF в первичных культурах макрофагов костного мозга дикого типа (контроль, n = 4) и мышей мутантной линии (мутант группа, n = 4) до стимуляции Poly I:C и через 4 часа после добавления 1 мкг/мл Poly I:C (+ Poly I:C). В – концентрация TNF в первичных культурах макрофагов костного мозга дикого типа (контроль, n = 4) и мышей мутантной линии (мутант группа, n = 4) до стимуляции имихимодом и через 4 часа после добавления 1 мкг/мл имихимода (+ имихимод).

\* –  $p < 0,05$ ; ns – нет статистически достоверных различий.

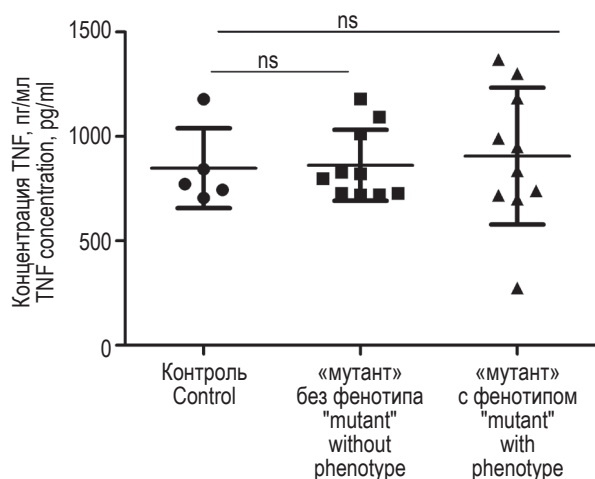
Figure 2. TNF production by murine bone marrow macrophages from mutant family 2 compared to TNF production by wild-type macrophage cultures *in vitro*

Note. A, TNF concentration in pg/ml in primary cultures of wild-type bone marrow macrophages (control, n = 7) and mutant bone marrow macrophages (mutant group 1, n = 4, mutant group 2, n = 4) before LPS stimulation and 4 hours after adding 100 ng/ml LPS (+ LPS). B, TNF concentration in primary cultures of wild-type bone marrow macrophages (control, n = 4) and the mutant bone marrow macrophages (mutant group, n = 4) before stimulation with Poly I:C and 4 hours after addition of 1 µg/ml Poly I:C (+ Poly I:C). C, TNF concentration in primary cultures of wild-type bone marrow macrophages (control, n = 4) and the mutant bone marrow macrophages (mutant group, n = 4) before stimulation by imiquimod and 4 hours after the addition of 1 µg/ml imiquimod (+ IMQ).

\*,  $p < 0.05$ ; ns, no statistically significant differences.

## Обсуждение

Настоящая работа продолжает цикл исследований по поиску «иммунологического фенотипа» при полногеномном мутагенезе на мышах, впервые предпринятом в Российской Федерации. В предыдущем исследовании [1] нами было описано 5 семейств мутантов, которые отличались устойчивостью к летальной дозе ЛПС в комбинации с Д-гал, причем одно из этих семейств («мутант 3») было изучено более подробно *in vitro* и *in vivo*. Поскольку эти мыши продуцировали нормальный уровень системного TNF в ответ на ЛПС и были устойчивы к другому типу септического шока, вызываемого комбинацией TNF-Д-гал, стало ясно, что дефект находится «ниже» TNF и предположительно связан с физиологическими особенностями гепатоцитов. Действительно, TNF является облигатным медиатором ЛПС-Д-гал токсичности [3, 5], а мишенью системного TNF являются как раз клетки печени [11, 12]. Однако мыши описываемого в настоящей



**Рисунок 3. Уровень продукции TNF через 1 час после введения ЛПС в сыворотке мышей из семейства мутанта 2 не отличается от мышей дикого типа**

**Примечание.** Концентрация TNF в пг/мл в сыворотке мышей дикого типа (контроль, n = 5), мышей мутантной линии, чувствительных к ЛПС/Д-гал («мутант» без фенотипа, n = 10), и мышей мутантной линии, устойчивых к ЛПС/Д-гал («мутант» с фенотипом, n = 10), через 1 час после введения ЛПС в дозе 3 мкг/г веса животного.

Figure 3. Serum TNF levels in mice from the mutant family 2 one hour after the LPS administration does not differ from that of wild-type mice

Note. The concentration of TNF in pg/ml in the serum of wild-type mice (control, n = 5), and mice of the mutant strain sensitive to LPS/D-gal ("mutant" without phenotype, n = 10) and mice of the mutant strain resistant to LPS/D-gal ("mutant" with the phenotype, n = 10) 1 hour after the administration of LPS at a dose of 3 µg/g of animal weight.

работе семейства мутанта 2 имели дефект «выше» TNF, так как, во-первых, они были чувствительны к TNF-Д-гал токсичности, и во-вторых, некоторые из этих мышей продуцировали пониженный уровень TNF на культурах макрофагов *in vitro*. Лимфоидные органы этих мышей, в частности Пейеровы бляшки, имели нормальные размеры и архитектуру (данные не показаны), что коррелировало с тем, что мутация приводила к количественным вариациям в уровне продукции TNF, но не к его полной элиминации. Причины неполной пенетрантности фенотипа в настоящий момент однозначно не установлены. Не исключено, что у части мышей, переживших ЛПС-Д-гал тест, развивается толерантность к эффектам ЛПС на уровне культуры макрофагов *in vitro* [18]. Тем не менее чувствительность к TNF-Д-гал явно и воспроизводимо отличала семейство мутанта 2 от других мутантных семейств, которые были устойчивы к обоим видам экспериментального септического шока. Следует подчеркнуть, что мыши с указанным фенотипом присутствовали даже в поколении F9. Поскольку обработка мутагеном предположительно вносила множественные повреждения в геном мышей линии СЗН, такой результат с большой вероятностью указывает на то, что речь идет об очень небольшом числе мутаций, скорее всего, об одной, вызывающей исследуемый фенотип.

На основании полученных данных мы можем предположить, что эта мутация произошла в одном из компонентов TLR4 каскада, который включает в себя белки, связанные с переносом ЛПС на сигнальный рецептор TLR4 (LBP, CD14, MD-2), адаптерные молекулы (MyD88, TRIF, TIRAP), компоненты киназных сигнальных каскадов (TAK/TAB, IKK) и транскрипционные факторы (например, NF-κB). Кроме того, возможны мутации в генах ферментов, обслуживающих эти каскады (например, компоненты убиквитинового цикла), или регуляторные мутации в регуляторных участках генома, влияющие на уровень экспрессии одного из указанных генов [19]. В настоящее время мы проводим полноэкзомное секвенирование ДНК индивидуальных мышей семейства мутанта 2 (с фенотипом и без него) для того, чтобы установить природу мутации и подойти к молекулярным механизмам устойчивости к ЛПС-Д-гал.

## Благодарности

Мы благодарим Е.О. Губернаторову за анализ лимфоидных органов мутантных мышей.

## Список литературы / References

1. Астраханцева И.В., Василенко Е.А., Бабаев А.А., Губернаторова Е.О., Горшкова Е.А., Друзцкая М.С., Круть В.Г., Тарабыкин В.С., Недоспасов С.А. Поиск генов, связанных с развитием септического шока, методами прямой генетики // Российский иммунологический журнал, 2018. Т. 12, № 4. С. 55-61. [Astrakhanseva I.V., Vasilenko E.A., Babaev A.A., Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Drutskaya M.S., Krut V.G., Tarabykin V.S., Nedospasov S.A. Search for genes associated with the development of septic shock, methods of direct genetics. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2018, Vol. 12, no. 4, pp. 55-61. (In Russ.)]
2. Борисова Е.В., Епифанова Е.А., Тутукова С.А., Белоусова И.И., Жидкова Н.М., Русанова А.М., Салина В.А., Туровский Е.А., Туровская М.В., Tarabykin V.S., Бабаев А.А. Идентификация новых генетических мутаций, контролирующих пороки развития коры головного мозга, вызванных посредством ENU-индуцированного мутагенеза у мышей // Современные технологии в медицине, 2018. Т. 10, № 3. С. 70-77. [Borisova E.V., Epifanova E.A., Tutukova S.A., Belousova I.I., Zhidkova N.M., Rusanova A.M., Salina V.A., Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Tarabykin V.S., Babaev A.A. Identification of novel mutations controlling cerebral cortex malformations caused by ENU-induced mutagenesis in the mouse. *Sovremennyye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2018, Vol. 10, no. 3, pp. 70-77. (In Russ.)]
3. Корнеев К.В. Мышиные модели сепсиса и септического шока // Молекулярная биология, 2019. Т. 53, № 5. С. 1-16. [Korneev K.V. Mouse models of sepsis and septic shock. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2019, Vol. 53, no. 5, pp. 1-16. (In Russ.)]
4. Beutler B., Kruys V. Lipopolysaccharide signal transduction, regulation of tumor necrosis factor biosynthesis, and signaling by tumor necrosis factor itself. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1995, Vol. 25, Suppl. 2, pp. 1-8.
5. Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*, 1985, Vol. 229, no. 4716, pp. 869-871.
6. Bull K.R., Rimmer A.J., Siggs O.M., Miosge L.A., Roots C.M., Enders A. Unlocking the bottleneck in forward genetics using whole-genome sequencing and identity by descent to isolate causative mutations. *PLoS Genet.*, 2013, Vol. 9, no. 1, e1003219. doi: 10.1371/journal.pgen.1003219.
7. Caignard G., Eva M.M., van Bruggen R., Eveleigh R., Bourque G., Malo D., Gros P., Vidal S.M. Mouse ENU mutagenesis to understand immunity to infection: methods, selected examples, and perspectives. *Genes (Basel)*, 2014, Vol. 5, no. 4, pp. 887-925.
8. Cashman S., Lampe K., Sheridan R., Hoebe K. An ENU mutagenesis approach to dissect "self"-induced immune responses: Unraveling the genetic footprint of immunosurveillance. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, no. 6, pp. 856-862.
9. Cavaillon J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. *Toxicol.*, 2018, Vol. 149, pp. 45-53.
10. Erickson R.P., Mitchison N.A. The low frequency of recessive disease: insights from ENU mutagenesis, severity of disease phenotype, GWAS associations, and demography: an analytical review. *J. Appl. Genet.*, 2014, Vol. 55, no. 3, pp. 319-327.
11. Freudenberg M.A., Keppler D., Galanos C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect. Immun.*, 1986, Vol. 51, no. 3, pp. 891-895.
12. Galanos C., Freudenberg M.A. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology*, 1993, Vol. 187, no. 3-5, pp. 346-356.
13. Kinoshita M., Miyazaki H., Nakashima H., Nakashima M., Nishikawa M., Ishikiriya T. *In vivo* lipopolysaccharide tolerance recruits CD11b<sup>+</sup> macrophages to the liver with enhanced bactericidal activity and low tumor necrosis factor-releasing capability, resulting in drastic resistance to lethal septicemia. *J. Innate. Immun.*, 2017, Vol. 9, no. 5, pp. 493-510.
14. Kuhla A., Eipel C., Siebert N., Abshagen K., Menger M.D., Vollmar B. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF $\alpha$ -dependent Fas/FasLigand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure. *Apoptosis*, 2008, Vol. 13, no. 12, pp. 1427-1438.
15. Luan H.H., Wang A., Hilliard B.K., Carvalho F., Rosen C.E., Ahasic A.M., Herzog E.L., Kang I., Pisani M.A., Yu S., Zhang C., Ring A.M., Young L.H., Medzhitov R. GDF15 is an inflammation-induced central mediator of tissue tolerance. *Cell*, 2019, Vol. 178, no. 5, pp. 1231-1244.e11.
16. Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.-Y., van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, Vol. 282, no. 5396, pp. 2085-2088.
17. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.*, 1994, Vol. 8, no. 2, pp. 217-225.
18. Shakhov A.N., Collart M.A., Vassalli P., Nedospasov S.A., Jongeneel C.V. Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.*, 1990, Vol. 171, no. 1, pp. 35-47.
19. Stottmann R., Beier D. ENU mutagenesis in the mouse. *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, 2014, Vol. 82, 15.4.1-10. doi: 10.1002/0471142905.hg1504s82.

**Авторы:**

**Астраханцева И.В.** — к.б.н., старший научный сотрудник Научно-технологического университета «Сириус», г. Сочи; Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

**Гладкова Л.С.** — лаборант Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

**Василенко Е.А.** — преподаватель Института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

**Тарабыкин В.С.** — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетики развития мозга, Научно-исследовательский институт нейронаук ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия; директор Института клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский факультет Шарите, Берлин, Германия

**Друцкая М.С.** — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, Москва, Россия

**Недоспасов С.А.** — д.б.н., академик РАН, профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; заведующий кафедрой иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва; руководитель направления в Научно-технологическом университете «Сириус», г. Сочи, Россия

**Authors:**

**Astrakhantseva I.V.**, PhD (Biology), Senior Research Associate, Scientific and Technological University “Sirius”, Sochi; Institute of Biology and Biomedicine, N. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

**Gladkova L.S.**, Laboratory Assistant, Institute of Biology and Biomedicine, N. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

**Vasilenko E.A.**, Lecturer Assistant, Institute of Biology and Biomedicine, N. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

**Tarabykin V.S.**, PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Brain Genetics and Development, Institute of Biology and Biomedicine, N. Lobachevsky State University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation; Director, Institute of Cell and Neurobiology, Charité — Universitätsmedizin, Berlin, Germany

**Drutskaya M.S.**, PhD (Biology), Leading Research Associate, V. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**Nedospasov S.A.**, PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, V. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Head, Department of Immunology, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow; Head, Department at Scientific and Technological University “Sirius”, Sochi, Russian Federation

Поступила 18.11.2019  
Отправлена на доработку 20.12.2019  
Принята к печати 08.02.2020

Received 18.11.2019  
Revision received 20.12.2019  
Accepted 08.02.2020