

ОЦЕНКА РЕЦЕПТОРНОГО АППАРАТА ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С МИКРООРГАНИЗМАМИ

Тонко О. В., Нижегородова Д. Б., Коломиец Н. Д., Ханенко О. Н.

*Государственное учреждение образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В эксперименте *in vitro* изучено влияние микроорганизмов (*E. coli*) на уровни экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов. Установлено, что наибольшее снижение экспрессии на мембране моноцитов отмечено для TLR2 при сокультивировании в равных концентрациях с *E. coli* в течение 96 ч (на 20 %). Количество экспрессирующих лимфоцитов было наибольшим при соотношении РВМС и *E. coli* 1:10. Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре.

Сокультивирование РВМС и *E. coli* в равной концентрации приводило к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах через 24 и 48 ч и незначительно менялось со снижением концентрации микроорганизмов.

Ключевые слова: лимфоциты, моноциты, РВМС, оппортунистические микроорганизмы, точная цитофлуориметрия, TLR2 (CD282), TLR4 (CD284), CD314 (NKG2D).

Введение. Выделение штаммов оппортунистических микроорганизмов из пищевых продуктов, объектов внешней среды и биологических материалов пациента не всегда может являться безусловным доказательством их этиологической роли. При возникновении инфекций, обусловленных такими микроорганизмами, верификация этиологии заболеваний также должна базироваться на комплексе достоверных критериев. Феномен оппортунистических и эмерджентных инфекций, который сформировался в самостоятельную медико-биологическую проблему, может быть объяснен модификацией фенотипических и генотипических признаков, в том числе этиологических и патогенетических свойств условно-патогенных микроорганизмов под воздействием качественно и количественно изменяющихся антропогенных факторов [1, 2, 3].

Факт выделения бактерий, например, при острых кишечных инфекциях, не является достаточным основанием для лабораторного подтверждения клинического диагноза или установления роли источника и фактора передачи, поскольку важной составляющей является оценка эпидемиологической значимости выделенных микроорганизмов, основанная, в частности, на характеристике их патогенного потенциала.

Фенотипические признаки бактерий подвержены изменчивости. Необходима разработка новых методов для оценки патогенного потенциала оппортунистических микроорганизмов *in vitro*. Перспективными направлениями изучения патогенетических характеристик как условно-патогенных, так и патогенных микроорганизмов являются иммунологические методы исследования [4].

К таким методам изучения относится метод проточной цитофлуориметрии, основанный на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции каждой индивидуальной клетки в суспензии. Метод может стать важным инструментом в микробиологии для изучения характеристик таких бактерий, как медленно растущие, труднокультивируемые, находящиеся в ассоциации в больших гетерогенных клеточных популяциях, непатогенные и условно-патогенные и др.

После инфицирования защита на локальном уровне осуществляется в первую очередь воспалительной реакцией, которая направлена на распознавание и уничтожение патогена и его компонентов. В- и Т-лимфоциты, осуществляющие адаптивный иммунный ответ, распознают патогены, используя высокоаффин-

ные рецепторы. Однако развитие адаптивного иммунитета обычно происходит достаточно медленно, так как предполагает активацию, пролиферацию лимфоцитов и синтез ими белков: цитокинов и иммуноглобулинов. Более быстрое развитие иммунных реакций обеспечивается врожденным иммунным ответом, который распознает патогены при помощи специальных рецепторов более широкой специфичности. Эти рецепторы распознают молекулярные структуры, общие для целых групп инфекционных возбудителей, в первую очередь к ним относятся Toll-подобные рецепторы (TLR). TLR взаимодействуют с молекулярными структурами, которые присутствуют на патогенах и активируют клеточный иммунный ответ. Toll-подобные рецепторы играют решающую роль в инициации иммунного ответа на вторжение микроорганизмов. Они экспрессируются многочисленными типами клеток, включая макрофаги и эпителиальные клетки, и активация TLR приводит к иммунной активации, которая включает в себя выработку цитокинов и хемокинов. Хемокины способствуют рекрутированию дополнительных иммунных клеток, включая нейтрофилы, которые впоследствии активируются воспалительной средой в месте локализации инфекции и еще больше усиливают воспалительный ответ. Распознавание патогена считается наиболее важным шагом для индукции адекватного иммунного ответа во время инфекции. К настоящему времени установлена важная роль TLR, особенно поверхностных, из-за их исключительной способности идентифицировать различные молекулярные паттерны вторжения патогенов. Эти рецепторы распознавания образов (PRR) не только действуют как врожденные сенсоры, но также формируют и связывают врожденные и адаптивные иммунные ответы. Кроме того, они также играют ключевую роль в регулировании баланса между Th1 и Th2 типами ответа.

Синтез цитокинов начинается в ответ на повреждение тканей или проникновение инфекции. Продукция цитокинов является частью клеточного ответа, который связан с распознаванием структурных компонентов патогенов, так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP). К ним относятся структурные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий — липополисахариды (LPS), мембранные компоненты грамположительных бактерий, пептидогликаны, вирусные РНК, бактериальные ДНК [5].

Трансмембранные белки экспрессируются на поверхности клетки и в субклеточных компартментах, таких как эндосомы. Локализация TLR связана с типом распознаваемого им лиганда. Так, TLR 1, 2, 4, 5, 6, связывающие структурные бактериальные компоненты, локализируются на поверхности клеток, тогда как TLR 3, 7, 8, 9, распознающие преимущественно вирус-ассоциированные структуры — нуклеиновые кислоты (дцРНК, оцРНК, ДНК), находятся в эндосомах, где взаимодействуют с лигандами после депротенинизации вирионов [6].

Универсальность механизмов, обусловленная как широким представительством данных маркеров на разнообразных клетках организма, так и широким спектром лигандов для них, определяет включение TLR в патогенетические звенья развития многих заболеваний. Экспрессию TLR исследуют с помощью специфических антител. Степень экспрессии TLR зависит от типа клетки и внешних стимулов.

Особой группой лимфоцитов врожденного иммунитета являются NK-клетки (*Natural killer*), или естественные киллеры. Одним из поверхностных маркеров активированных NK-клеток является трансмембранный гликопротеин или естественный рецептор цитотоксичности CD314 (NKG2D), который принадлежит к лектиновым рецепторам С-типа и необходим для проведения сигнала внутрь клетки и повышения функциональной активности киллеров. Помимо NK-клеток, рецептор CD314 определяется на некоторых $\gamma\delta$ -лимфоцитах и является костимулирующей молекулой для CD8-позитивных Т-лимфоцитов. Связывание CD314 со своими лигандами усиливает распознавание трансформированных или инфицированных клеток [7].

В связи с этим необходимы адекватные и надежные методы оценки влияния микроорганизмов на уровни экспрессии рецепторного аппарата лимфоцитов и моноцитов, которые могут быть воспроизведены в условиях стандартной клинической лаборатории.

Цель работы — моделирование *in vitro* влияния патогенного потенциала микроорганизмов на уровни экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов.

Материалы и методы. Исследование оценки уровня экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов в ответ на взаимодействие с микроорганизмами проводили на основании изучения функционального состояния мононуклеарных клеток крови (РВМС) при их сокультивировании с суспензиями бактерий.

Модельным микроорганизмом выбрана *E. coli*. Являясь условно-патогенным микроорганизмом, *E. coli*, может вызывать различные заболевания: кишечные инфекции (диареи), поражения мочевыводящих путей, бактериемии, менингиты, гнойные воспаления и др. Более 95 % клеточного материала *E. coli* состоит из макромолекул или полимеров: белков, полисахаридов, липидов, РНК, ДНК. На долю белков приходится 52 %, а на долю нуклеиновых кислот — 19 % массы сухого вещества. Около 3 % сухого вещества клеток составляют низкомолекулярные органические соединения и соли.

В качестве поверхностных маркеров лимфоцитов и моноцитов для исследования были выбраны:

TLR2 (CD282) — рецептор для микробных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, таких как липопротеины. TLR2 распознает микробные PAMPs и активирует различные внутриклеточные сигнальные молекулы и факторы транскрипции. PAMPs может связываться с рецептором TLR2, что приводит к клеточной активации сигнальных путей;

TLR4 (CD284) — рецептор для распознавания липополисахарида (LPS) и LPS-опосредованных воспалительных реакций. TLR4 вовлечен в события передачи сигнала, вызванные липополисахаридом, обнаруженным у большинства грамотрицательных бактерий;

CD314 (NKG2D) — трансмембранный белок, который распознает белки, появляющиеся на поверхности NK-клеток и субпопуляций Т-клеток. CD314 является основным рецептором распознавания для обнаружения и удаления трансформированных и инфицированных клеток.

Комплекс используемых антител подбирался на основании выбранных поверхностных маркеров: антитела моноклональные мышинные FITC antihuman TLR2 (CD282) Antibody, антитела моноклональные мышинные PE antihuman TLR4 (CD284) Antibody, антитела моноклональные мышинные Anti-APC antihuman CD314 (NKG2D) Antibody.

Выделение РВМС проводилось из цельной венозной крови, полученной от здоровых доноров. Выделенную фракцию крови (25 мл) помещали в одноразовую стерильную вакуумную пробирку и добавляли антикоагулянт — гепарин для сохранения клеточных и внутриклеточных компонентов. Метод выделения РВМС основан на разной плавучести различных форменных элементов крови. Применение градиента определенной плотности позволяет

отделить лимфоциты и моноциты от эритроцитов и гранулоцитов.

При проведении исследований использовались: среда питательная RPMI-1640 с L-глутамином, эмбриональная телячья сыворотка (FBS), добавка антимикробная к культуральной среде — антибиотик-антимикотик (Penicillin-Streptomycin-Neomycin (PSN)).

При моделировании эксперимента осуществлялся подбор концентраций микроорганизма и РВМС для совместного культивирования, а также отрабатывались требования к температурному режиму, оптимальной культуральной среде, уровню pH, осмотическому давлению и др.

Итоговая концентрация выделенных РВМС рассчитывалась опытным путем и составила $2 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл, либо $2 \cdot 10^5$ в 100 мкл в каждой лунке планшета. Для проведения эксперимента отбирали по 100 мкл исследуемого комплекса клеток, которые в последующем инкубировали с предварительно титрованными количествами меченных антител (на 100 мкл взвеси клеток по 100 мкл коктейля антител), конъюгированными FITC и PE флуорохромами с соответствующими изотипическими контролями в течение 15 мин при комнатной температуре в темноте.

Подготовка культуры бактерий проводилась в несколько этапов. Колонии бактерий высевались на мясо-пептонный агар и инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Затем клетки выросшей культуры *E. coli* переносились в физиологический раствор для приготовления суспензии и

получения необходимых для опыта концентраций.

Комплекс мононуклеаров сокультивировали с различными концентрациями бактериальных суспензий *E. coli* или липополисахаридом в качестве положительного контроля в течение 24, 48 и 96 ч при 37°C в CO_2 -инкубаторе.

Методом проточной цитофлуориметрии (FCM) определяли уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на моноцитах и лимфоцитах, CD-314 на лимфоцитах на аппарате CytoFlex (Beckman Coulter, США), оборудованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. В качестве негативного контроля использовали неокрашенные клетки. Разделение фракций клеток осуществляли на основе регистрируемых параметров прямого (FSC) и бокового светорассеяния (SSC) в режиме dot-plot. Анализ интенсивности флуоресценции и процента флуоресцирующих клеток проводили в зеленой области (FITS) FL1 (495 нм) и оранжевой области (PE) FL2 (585 нм).

Результаты и их обсуждение. Изучены уровни экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на нестимулированных и стимулированных в ответ на сокультивирование с бактериальным агентом моноцитах.

Границы позитивного сигнала флуоресценции определялись в соответствии с негативным контролем флуоресценции неокрашенных клеток. Показатели отрицательного контроля (моноциты в питательной среде) использовались для сравнения результатов проб с и без суспензий бактерии (рисунок 1).

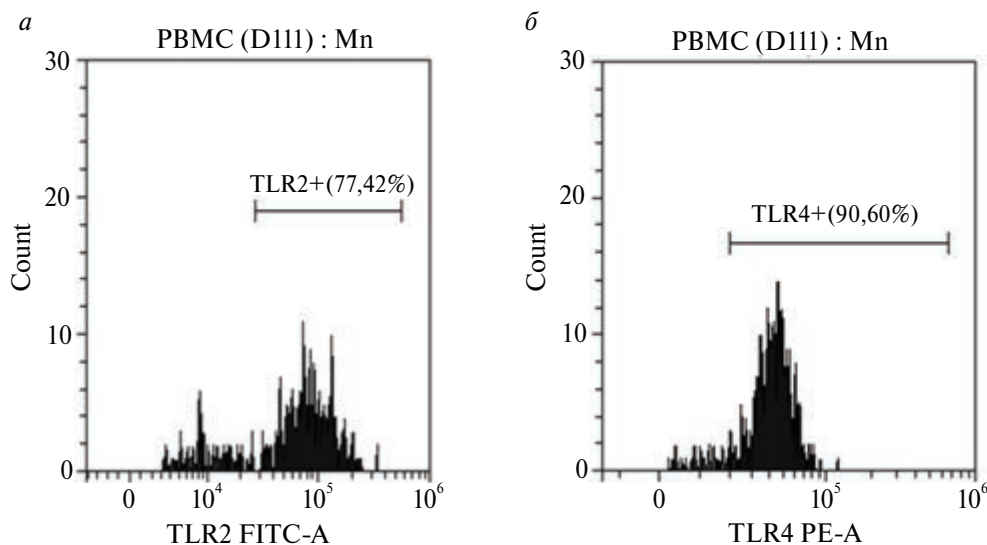


Рисунок 1 — Экспрессия TLR2 (а) и TLR4 (б) на мембране моноцитов (отрицательный контроль)

На гистограмме выделены два пика: негативный и позитивный среди фракции моноцитов. Позитивный пик показывает активность экспрессии TLR2 и TLR4 в процентном соотношении на мембране моноцитов в виде степени флуоресценции. Негативный пик — неокрашенные клетки (аутофлуоресценция).

Экспрессия рецепторов на мембране моноцитарных клеток периферической крови без

стимулирования сокультивированием с бактериальным агентом составила для TLR2 — 77,4 % и для TLR4 — 90,6 % от всей популяции клеток.

Уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов, полученные при совместном культивировании моноцитов с различными концентрациями бактериальных суспензий *E. coli* в течение 24 ч инкубации, представлены на рисунках 2 и 3.

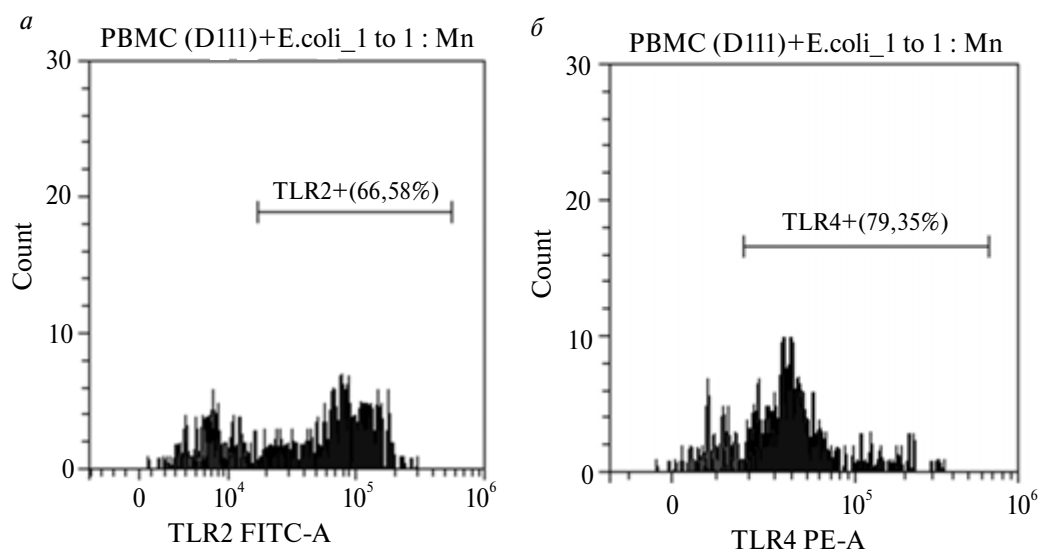


Рисунок 2 — Экспрессия TLR2 (a) и TLR4 (б) на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч (соотношение PBMC и *E. coli* 1:1)

В стимулированных PBMC суспензией *E. coli* в соотношении 1:1 экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов снижалась по сравнению с отрицательным контролем и со-

ставляла для TLR2 — 66,6 и 79,4 % для TLR4, что указывает на активное взаимодействие рецепторов моноцитов с патогенными детерминантами *E. coli*.

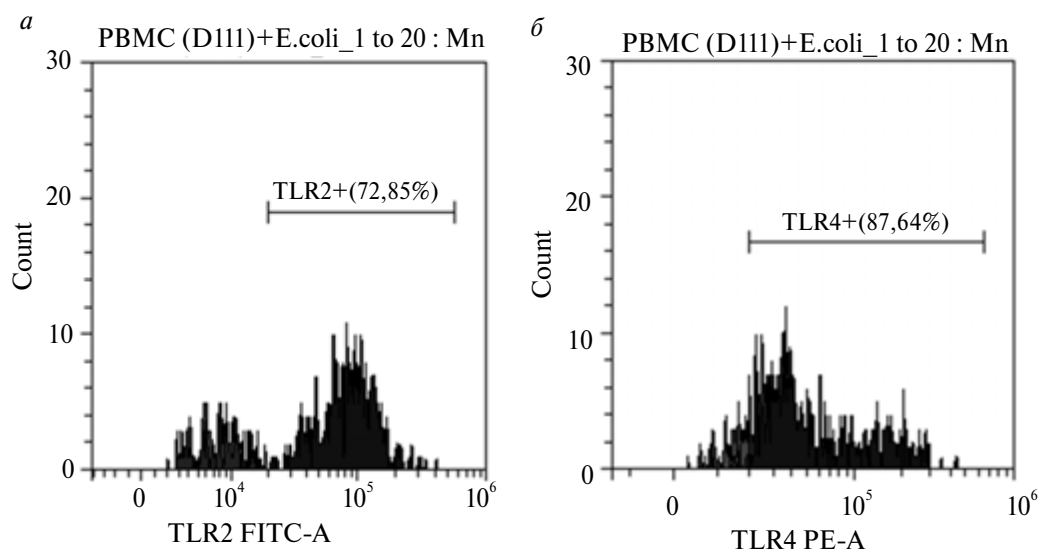


Рисунок 3 — Экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч (соотношение PBMC и *E. coli* 1:20)

При соотношении PBMC и *E. coli* 1:20 экспрессия TLR2 и TLR4 на моноцитах снижалась менее значительно по сравнению с отрицательным контролем и соотношением PBMC и *E. coli* 1:1 и составила 72,9 и 87,6 % соответственно.

В таблице 1 отображены уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч.

Установлено снижение уровней экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч по сравнению с не стимулированными бактериальными антигенами клетками. Наибольшее

снижение отмечено для TLR2 (на 20 % при равных концентрациях PBMC и *E. coli*). При увеличении концентрации *E. coli* в культуре и, соответственно, нагрузки бактериальными антигенами, снижение экспрессии TLR2 и TLR4 нарастало и при соотношении 1:10 составило 62 и 94,4 % соответственно.

Культивирование PBMC с LPS (1мкг/мл) (положительный контроль) в течение 96 ч приводило к значительному подавлению экспрессии рецепторов на мембране моноцитов, что указывает на высокий уровень их стимуляции экзогенным антигеном.

Таблица 1 — Результаты экспрессии TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов (96 ч)

Условия культивирования	Экспрессия рецептора, %	
	TLR2	TLR4
Отрицательный контроль (PBMC)	88,33	99,07
PBMC + <i>E. coli</i> (1:1)	68,41	97,40
PBMC + <i>E. coli</i> (1:10)	61,97	94,36
Положительный контроль (PBMC + LPS)	29,17	79,17

Изучены уровни экспрессии Toll-подобных рецепторов TLR2 и TLR4 на не стимулированных и стимулированных лимфоцитах перифе-

рической крови в ответ на сокультивирование с различными концентрациями *E. coli* в культуре в течение 24 ч (рисунок 4).

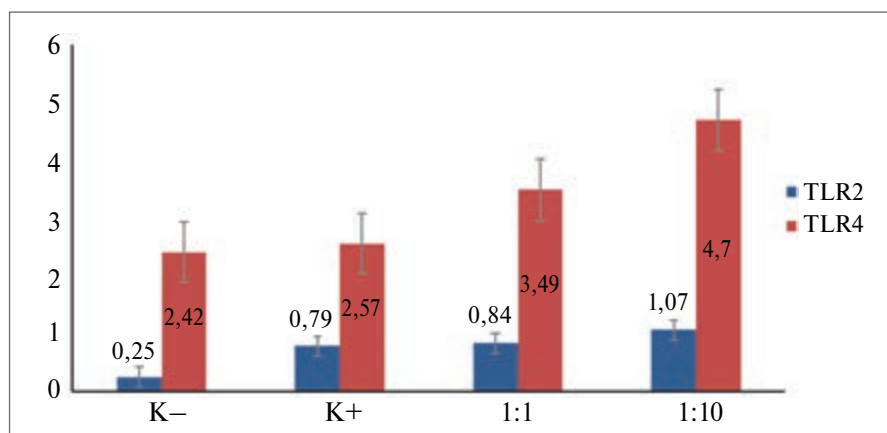


Рисунок 4 — Экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 ч

Не стимулированная экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов составила 0,25 % и 2,42 %, соответственно. С добавлением культуры *E. coli* количество лимфоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4-рецепторы, увеличивалось. При соотношении PBMC и *E. coli* 1:10, количество экспрессирующих лимфоцитов было максимальным и составило 1,07 % для TLR2 и 4,7 % для TLR4. При высокой концентрации *E. coli* (в соотношении PBMC и *E. coli* 1:20) экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов

снижалась и составила 0,66 % для TLR2 и 2,79 % для TLR4.

Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре (рисунок 5).

Высокие уровни экспрессии TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов свидетельствуют о высоком уровне ответной реакции данных клеток при длительном взаимодействии с бактериальными агентами.

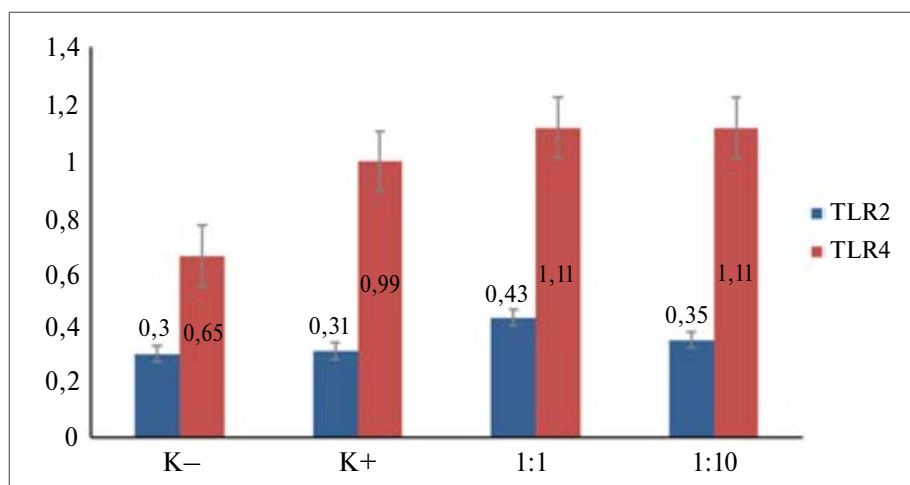


Рисунок 5 — Экспрессия TLR2 и TLR4-рецепторов на мембране лимфоцитов при сокультивировании с *E. coli* в течение 96 ч

Для оценки цитотоксичной способности лимфоидных клеток исследована экспрессия киллерного рецептора CD-314. Изучены уровни экспрессии CD-314 на не стимулированных

и стимулированных лимфоцитах периферической крови в ответ на сокультивирование с различными концентрациями *E. coli* в культуре в течение 24 и 48 ч (таблица 2, рисунок 6).

Таблица 2 — Экспрессия киллерного рецептора CD-314

Условие культивирования	Экспрессия рецептора, %, через	
	24 ч	48 ч
Отрицательный контроль (PBMC)	16,99	19,13
Положительный контроль (PBMC + LPS)	17,52	34,15
PBMC + <i>E. coli</i> (1:1)	24,45	39,63
PBMC + <i>E. coli</i> (2:1)	21,88	39,07
PBMC + <i>E. coli</i> (10:1)	22,99	33,32
PBMC + <i>E. coli</i> (100:1)	27,46	35,96
PBMC + <i>E. coli</i> (1000:1)	29,72	34,85

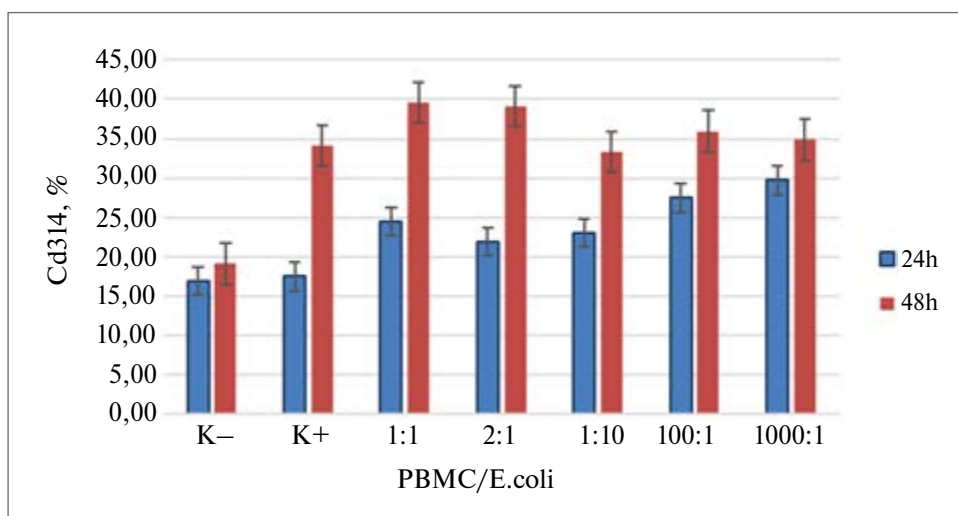


Рисунок 6 — Экспрессия CD-314 лимфоцитами при сокультивировании с *E. coli* в течение 24 и 48 ч

При не стимулированном культивировании экспрессия CD-314-положительных лимфоцитов составила 16,99 % через 24 ч и 19,13 % через 48 ч. Добавление *E. coli* в равной концентрации к РВМС привело к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах до 24,45 и 39,6 % соответственно. Дальнейшее уменьшение концентрации бактерий приводило к снижению экспрессии рецептора, однако снижение было незначительным и при соотношении РВМС и *E. coli* 1000:1 составило 29,72 % через 24 ч и 34,85 % через 48 ч, что так же значительно превышало продукцию рецепторов у не стимулированных сокультивированием лимфоидных клеток.

Заключение. Таким образом, при сокультивировании в течение 24 ч моноцитов с суспензией *E. coli* в соотношении 1:1 экспрессия TLR2 и TLR4 на мембране моноцитов снижалась по сравнению с отрицательным контролем на 10,8 % для TLR2 и на 11,2 % для TLR4, при этом значительное увеличение концентрации бактерий (в 20 раз) меньше влияло на уровни экспрессии рецепторов (на 5 и 3 % соответ-

ственно). Наибольшее снижение экспрессии на мембране моноцитов отмечено для TLR2 при сокультивировании в равных концентрациях с *E. coli* в течение 96 ч (на 20 %).

С добавлением культуры *E. coli* количество лимфоцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4-рецепторы, увеличивалось. При соотношении РВМС и *E. coli* 1:10, количество экспрессирующих лимфоцитов было наибольшим и составило 1,07 % для TLR2 и 4,7 % для TLR4 против 0,25 и 2,45 % в контроле. Культивирование в течение 96 ч продемонстрировало тенденцию к увеличению экспрессии рецепторов на мембране лимфоцитов независимо от концентрации микроорганизмов в культуре.

Сокультивирование РВМС и *E. coli* в равной концентрации привело к увеличению экспрессии CD-314 на лимфоцитах на 7,5 % через 24 ч и на 20,6 % через 48 ч по сравнению с не стимулированными лимфоцитами. Уменьшение концентрации бактерий приводило к незначительному снижению экспрессии CD-314-положительных лимфоцитов.

Список цитированных источников

1. Miceli, M. H. Emerging opportunistic infections / M. H. Miceli, J. A. Diaz, S. A. Lee // *Lancet Infectious Diseases*. — 2011. — Vol. 11 (2). — P. 142–151.
2. Vouga, M. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond / M. Vouga, G. Greub // *Clinical Microbiology and Infection*. — 2016. — Vol. 22, № 1. — P. 12–21. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.10.010.
3. Fournier, P. E. New laboratory tools for emerging bacterial challenges / P. E. Fournier, M. Drancourt, D. Raoul // *Clin. Infectious Diseases*. — 2017. — Vol. 65, № 1. — P. 39–49.
4. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи / А. Р. Мавзютов [и др.] // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2007. — № 1. — С. 89–96.
5. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production / M. Dorner [et al.]. // *Immunology*. — 2009. — Vol. 128, № 4. — P. 573–579.
6. El-Zayat, S. R. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview [Electronic resource] / S. R. El-Zayat, H. Sibaii, F. A. Mannaa // *Bulletin of the National Research Centre*. — 2019. — Vol. 43, № 187. — Mode of access: <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>. — Date of access: 03.05.2021.
7. Mukherjee, S. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review / S. Mukherjee, S. Karmakar, S. P. Sinha Babu // *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. — 2016. — Vol. 20, № 2 — P. 193–204.

Evaluation of lymphocyte and monocyte receptions in co-culturing with microbes

Tonko O. V., Nizhegorodova D. B., Kolomiets N. D., Hanenko O. N.

*State Educational Institution “Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus*

In an in vitro experiment, the influence of microorganisms (*E. coli*) on the expression levels of surface markers of lymphocytes and monocytes was studied. It was found that the greatest decrease in expression on the monocyte membrane was noted for TLR2 when co-cultivated in equal concentrations with *E. coli*

for 96 hours (by 20 %). The number of expressing lymphocytes was highest at a ratio of PBMC and E. coli 1:10. Cultivation for 96 hours showed a tendency to increase the expression of receptors on the lymphocyte membrane, regardless of the concentration of microorganisms in the culture.

Co-cultivation of PBMC and E. coli at equal concentrations led to an increase in CD-314 expression on lymphocytes after 24 and 48 hours and changed insignificantly with a decrease in the concentration of microorganisms.

Keywords: lymphocytes, monocytes, PBMC, opportunistic microorganisms, flow cytometry, TLR2 (CD282), TLR4 (CD284), CD314 (NKG2D).

Поступила 22.06.2022