

ВЛИЯНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ НА АКТИВАЦИЮ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

INFLUENCE OF INFECTIOUS AGENTS ON THE ACTIVATION OF INFLAMMATORY CELLS

М. А. Палачич¹, О. В. Тонко²

М. А. Palachich¹, O. V. Tonko²

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: palachichm@bk.ru

²Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет, ИПКиПК УО БГМУ,
г. Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Personnel
of the Educational Institution «Belarusian State Medical University», IPK BSMU,
Minsk, Republic of Belarus

Воспаление – наиболее распространенный патологический процесс, который лежит в основе более чем 80% заболеваний. Это делает понятным необходимость детального изучения причин, роли влияния различных факторов и условий, механизмов развития данного процесса. Именно локализация и степень развития воспаления влияет на специфику заболевания. Целью исследования является оценка влияния патогенных и условно-патогенных микроорганизмов на функциональную активность фагоцитов при их совместном культивировании.

Inflammation is the most common pathological process, that underlies more than 80% of diseases. This makes clear the need for a detailed study of the causes, the role of influence of various factors and conditions, and the mechanisms of development of this process. It is the localization and degree of development of inflammation that influences the specifics of the disease. The purpose of the study is to assess the influence of pathogenic and opportunistic microorganisms on the functional activity of phagocytes during their co-cultivation.

Ключевые слова: воспаление, медиаторы, TLR, PBMC, проточная цитофлуориметрия.

Keywords: inflammation, mediators, TLR, PBMC, flow cytometry.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-211-215>

Воспалительный процесс, представляющий собой сложную реакцию, которая может быть вызвана патогенами, токсическими соединениями, поврежденными клетками и различными другими факторами. Защитная система организма, т.е. иммунная система, реагирует на травму или внедрение патогенных агентов, запуская процессы клеточных и биохимических событий, которые приводят к повреждению тканей и развитию воспалительной реакции.

Инициаторами воспалительного ответа являются медиаторы воспаления. Медиаторы воспаления, вырабатываемые в начале воспаления, способствуют расширению и нарушению целостности кровеносных сосудов, что способствует миграции воспалительных клеток из кровотока в пораженные ткани. К клеткам, играющим ключевую роль в процессе воспаления относятся: нейтрофилы, макрофаги, моноциты, лимфоциты. Эти клетки после распознавания патогенов (микроорганизмов) вырабатывают и высвобождают дополнительные медиаторы воспаления, оказывающие воздействие на различные ткани и клетки-мишени, которые реагируют, изменяя свои функциональные состояния и вырабатывая дополнительные медиаторы для создания эффективной воспалительной реакции на повреждающих раздражителей [2].

Нейтрофилы. Нейтрофилы – это самые распространенные клетки воспаления. Нейтрофилы представляют собой тип гранулярных лейкоцитов, способных осуществлять три основные функции: фагоцитоз, дегрануляция и высвобождение ядерного материала в виде нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs).

Это самые многочисленные гранулоциты, занимающие около 40-60% от общего числа лейкоцитов в крови. Нейтрофилы, находящиеся в кровотоке, получают сигналы от медиаторов воспаления, обладающих хемотаксическим действием, после чего покидают кровоток мигрируя в место воспаления. Хемотаксическим действием обладают ряд цитокинов, имеющие название хемокины. Примерами являются IL-1 β , который способен привлекать

нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Решающую роль в привлечении нейтрофилов играют СХС-хемокины. Самым изученным и самым важным СХС-хемокином является IL-8. Также в привлечении нейтрофилов принимают участие следующие медиаторы: фактор некроза опухоли (TNF), некоторые лейкотриены, простагландины и белки системы комплемента – C3a и C5a. Попадая в очаг воспаления начинают активно фагоцитировать патогены, после чего погибают. Кроме того, происходит активация нейтрофилов, и путем экзоцитоза они выделяют содержимое своих гранул, создавая при этом высокие концентрации АФК, сериновых протеаз, лизоцима, дефензинов, лактоферрина и других веществ, которые, в основном, представлены белками, обладающими антимикробными свойствами и помогающими бороться с инфекциями. Также может образовываться интерферон, который воздействует на вирусы, и пирогены – биологически активные вещества, которые способны повышать местную температуру и активность других лейкоцитов, запуская каскад иммунных и воспалительных реакций.

Нейтрофильные ловушки (NETs) – это специфический механизм, используемый нейтрофилами для борьбы с инфекциями. Они представляют собой сеть из ДНК, гистонов и белков, которые выстраиваются вокруг бактерий, вирусов или других патогенов, захватывая и уничтожая их. Образуются в результате активации нейтрофилов при стимуляции различными факторами, такими как бактерии, вирусы, цитокины и другие медиаторы воспаления.

Моноциты. Моноциты – это тип лейкоцитов, образующиеся в костном мозге, циркулирующие в крови. В воспалительной реакции моноциты активируются и мигрируют к месту воспаления под действием хемотаксических сигналов. По прибытии в очаг воспаления они превращаются в макрофаги. Моноциты также способны фагоцитировать бактерии, вирусы, клетки-мишени и другие чужеродные частицы.

Макрофаги. Макрофаги являются основным компонентом мононуклеарной фагоцитарной системы, состоящей из близкородственных клеток костного мозга, включая моноциты крови, и тканевые макрофаги. Из крови моноциты мигрируют в различные ткани и дифференцируются макрофаги. Макрофаги вызывают воспаление за счет продукции IL-1, IL-6 и TNF- α . Макрофаги активируются несколькими способами, в том числе Т-клетками, цитокинами (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α), или соединениями патогенного происхождения, такими как токсины липополисахаридов бактерий. Во время воспаления очищают клетки от ненужных продуктов и мертвых нейтрофилов путем фагоцитоза [4].

Лимфоциты. Это еще один вид клеток, которые играют важную роль в воспалительной реакции. Лимфоциты делятся на несколько подтипов с различными функциями: Т-лимфоциты, В-лимфоциты и НК-клетки.

НК-клетки (натуральные киллеры). Данные клетки являются частью врожденного иммунитета и способны уничтожать зараженные или поврежденные клетки организма, тем самым они играют важную роль в воспалительной реакции. Активированные НК-клетки следующие функции: производство цитокинов, таких как интерферон- γ (IFN- γ), который стимулирует воспалительную реакцию и активирует другие иммунные клетки, и прямое уничтожение зараженных или поврежденных клеток путем высвобождения киллерных гранул, содержащих перфорин и гранзимы, которые совместно нарушают целостность мембраны и тем самым вызывают гибель клетки.

Т-лимфоциты. Активация Т-лимфоцитов происходит в лимфоузлах, где им предоставляются антигены. После активации Т-лимфоцитов начинается их дифференцировка, которая происходит под воздействием различных цитокинов и других сигнальных молекул, примерами которых являются интерлейкины (IL-12), интерфероны (IFN- γ), способствующие дифференцировке в цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), тогда как IL-4 и IL-6 могут способствовать дифференцировке Т-хелперов (Th).

Т-лимфоциты могут вырабатывать цитокины, которые усиливают или уменьшают воспаление, тем самым данные клетки регулируют иммунный ответ. Цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), способны распознавать и уничтожать клетки, зараженные вирусами или другими патогенами.

В-лимфоциты. Главная функция В-лимфоцитов продукция антител. Также В-клетки могут выделять цитокины, которые участвуют в регуляции воспалительного ответа. Цитокины, выделяемые В-лимфоцитами во время воспаления, могут включать в себя различные медиаторы воспаления, такие как интерлейкины (IL-6, IL-10), фактор некроза опухоли (TNF- α), интерфероны (IFN- γ) и другие. Эти цитокины играют важную роль в регуляции воспалительного процесса, усиливая иммунный ответ и участвуя в балансе противовоспалительных и провоспалительных механизмов [1].

Инфицирование клеток микроорганизмами активизирует воспалительную реакцию, и первоначальное восприятие инфекции опосредовано врожденными паттерн-распознающими рецепторами (PRR). Фагоциты распознают микробы по патоген-ассоциированным молекулярным образам (PAMP). Наибольшая роль в распознавании PAMP отводится толл-подобным рецепторам (TLR). У людей идентифицировано 10 видов TLR, каждый из этих рецепторов специализирован на распознавании определенных патогенов или молекул. Например, TLR4 локализуется преимущественно на поверхности цитоплазматической мембраны фагоцитов и распознает липополисахариды клеточных стенок у грамотрицательных бактерий, а TLR3 располагается, как правило, в цитоплазме и участвует в распознавании двуцепочных РНК, образующихся во время репликации вирусов.

TLR входящие в состав клеток распознают патогены, активируют сигнальные пути, после чего клетки вырабатывают и высвобождают медиаторы воспаления, оказывающие воздействие на различные ткани и клетки-мишени, которые реагируют, изменяя свои функциональные состояния и вырабатывая дополнительные медиаторы для создания эффективной воспалительной реакции на повреждающих раздражителях [3].

Материалы и методы. В процессе проведения исследования подбирались патогенных и условно-патогенные микроорганизмы в различных концентрациях, которые культивировались совместно с мононуклеарными клетками, с целью изучения их влияния на функциональную активность.

Выделение мононуклеаров. Мононуклеарные клетки (РВМС) – это крупные одноядерные клетки лимфоидного ряда (лимфоциты, моноциты, бластные клетки). Выделение РВМС проводилось из цельной венозной крови, полученной от здоровых доноров. Выделенную фракцию крови поместили в одноразовую стерильную пробирку и добавили гепарин – антикоагулянт, предотвращающий свертывание крови, и, способствующий сохранению клеточных компонентов.

Образец размещается на градиенте плотности, который обычно состоит из различных концентраций градиентных разделителей, например, Ficoll-Paque Plus. Градиент позволяет разделить клетки по плотности, с более легкими клетками оставаясь ближе к верхней части градиента, а тяжелыми клетками перемещаясь ближе к нижней части градиента. После того, как клетки разделены в градиенте, РВМС могут быть аккуратно извлечены при помощи обычного дозатора или пастеровской пипетки в отдельную пробирку. Разделение на градиенте плотности включает также и центрифугирование (1500 об./мин., 10-15 минут).

В последующем, выделенные клетки требуют процедуры отмывания для избавления от клеточных обломков и других ненужных веществ. Отмывание осуществляется изотоническим раствором хлорида натрия. После отмывания подсчитывается концентрация клеток, а также изучается их морфология.

Микроскопия. Для микроскопического изучения РВМС используется оптический микроскоп. Для этого образец крови с РВМС наносится на предметное стекло, фиксируется и окрашивается специальными красителями, чтобы улучшить контрастность и видимость клеток под микроскопом. В качестве красителей используются эозин, гематоксилин [6].

Проточная цитофлуориметрия. Выделенные РВМС используются, также для анализа методом проточной цитофлуориметрии (FCM). Проточная цитофлуориметрия - это метод исследования клеток, основанный на пропускании клеточной суспензии через узкий поток жидкости (проточную камеру) и одновременном измерении различных параметров клеток.

Принцип работы проточного цитофлуориметра основан на регистрации параметров светорассеяния и флуоресценции от каждой отдельно взятой клетки в клеточной суспензии, предварительно окрашенной моноклональными антителами (МАТ), конъюгированными с флуорохромами. Клетки по одной проходят через специальную камеру, пересекая лазерный луч высокой интенсивности, со скоростью несколько тысяч в секунду и при этом происходит возбуждение флуорохромов, которые испускают рассеянные и флуоресцентные световые сигналы. Эти сигналы регистрируются при помощи светочувствительных детекторов, усиливаются и при помощи аналого-цифровых преобразователей переводятся в цифровые значения, выводимые на компьютер, который используется также для переработки и хранения информации.

Изучение РВМС при помощи проточной цитофлуориметрии позволяет точно определить различные подтипы клеток, такие как лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и другие, что позволяет проводить дифференциальный анализ клеточного состава крови и выявлять изменения в клеточных подтипах при различных патологиях. Также данный метод дает возможность анализировать уровень экспрессии различных поверхностных маркеров на мононуклеарных клетках, что является важным для идентификации активных клеток, оценки степени дифференцировки и выявления изменений. Оценивается функциональные характеристики мононуклеаров: продукция цитокинов, фагоцитоз, а также оценивается активация и апоптоз мононуклеарных клеток

В качестве поверхностных маркеров используются TLR, в частности TLR2 и TLR4, поскольку данные рецепторы способны распознавать и взаимодействовать со многими патогенами, существует возможность изучения уровня экспрессии на исследуемых клетках [5].

Результаты. При выделении РВМС, удалось выделить чистую суспензию нейтрофилов. Данные клетки играют важную роль в развитии воспаления, мигрируя первыми в очаг, осуществляя фагоцитоз микроорганизмов и, выделяя цитокины. Исследовались фагоцитарный показатель (ФП) и фагоцитарное число (ФЧ) – главные параметры фагоцитоза, при смешивании нейтрофилов с микроорганизмами в разных концентрациях (1:10; 1:100; 1:1000). После чего при помощи учебной программы «STATISTIKA» проводилась статистическая обработка данных по критерию «Стьюдента» (Р): сравнивались показатели контрольной группы с разведениями.

Таблица 1

Сравнение данных контрольной группы и первого разведения (1:10)

Оцениваемый параметр	Контроль	1:10	Р
Фагоцитарный показатель (%)	55,5	24	0,010104
Фагоцитарное число	5,7	4,05	0,019286

При разведении 1:10 наблюдается снижение ФП и ФЧ. Следовательно при больших концентрациях раздражения, т.е. микроорганизмов, наблюдается низкий уровень фагоцитоза, уменьшение количества клеток, а следовательно иммунная система продуцирует большое количество клеток на борьбу с воспалением.

Таблица 2

Сравнение данных контрольной группы и первого разведения (1:100)

Оцениваемый параметр	Контроль	1:100	P
Фагоцитарный показатель (%)	55,5	36	0,016320
Фагоцитарное число	5,7	4,55	0,136275

При разведении 1:100 наблюдается снижение ФЧ и ФП, но в данном случае ФП меньшим, а ФЧ большим. Исходя из этого можно сделать вывод, что при увеличении концентрации микроорганизмов, в первую очередь происходит значительная гибель клеток.

Таблица 3

Сравнение данных контрольной группы и первого разведения (1:1000)

Оцениваемый параметр	Контроль	1:1000	P
Фагоцитарный показатель (%)	55,5	69	0,116572
Фагоцитарное число	5,7	5,58	0,795167

При разведении 1:1000 было обнаружено, что незначительно увеличивается ФЧ, так же как и ФП. Исходя из этого, можно сделать вывод, что при воздействии на нейтрофилы малых доз раздражителей, их способность к фагоцитозу увеличивается.

С помощью метода проточной цитофлуорометрии были определены уровни экспрессии TLR2 и TLR4 на мембранах моноцитов и лимфоцитов, а также CD-314 на поверхности NK-клеток.

Экспрессия TLR2 и TLR4 на мембранах моноцитов при отсутствии воздействия микроорганизмов составила 77,4% для TLR2 и 90,6% для TLR4 от всей популяции клеток.

Коктейль антител 100 мкл включает в себя TLR2, TLR4 и CD-314, добавили к 100 мкл PBMC, культивированными вместе с микроорганизмами и инкубировали 24 часа, после чего провели измерение на проточнике. Использовались разные концентрации микроорганизмов и PBMC (1:1 и 1:20).

При взаимодействии PBMC с микроорганизмами в соотношении 1:1, наблюдается следующая экспрессия TLR на мембране моноцитов: TLR2 – 66,6% и TLR4 – 79,4%, что ниже чем показатели отрицательного контроля. Это может свидетельствовать о активном взаимодействии рецепторов с патогенными микроорганизмами.

При взаимодействии PBMC с микроорганизмами в соотношении 1:20, наблюдается следующая экспрессия TLR на мембране моноцитов: TLR2 – 72,9% и TLR4 – 87,6%. Уровень экспрессии снижался менее значительно, чем при отрицательном контроле.

В результате эксперимента было выявлено, что при добавлении большей концентрации микроорганизмов все больше увеличивается количество моноцитов, экспрессирующих TLR2 и TLR4. Высокие уровни экспрессии данных рецепторов показывают высокий уровень ответной реакции организма на воздействие патогенов.

Уровни экспрессии CD-314 на NK-клетках изучались при взаимодействии с микроорганизмами и без них. Использовались различные концентрации патогенов и разное время культивирования (24 и 48 часов).

Таблица 3

Экспрессия CD-314

Условия культивирования	Экспрессия CD-314, %	
	24 часа	48 часов
Отрицательный контроль	16,99	19,13
Положительный контроль	17,52	34,15
PBMC с патогенами (1:1)	24,45	39,63
PBMC с патогенами (2:1)	21,88	39,07
PBMC с патогенами (10:1)	22,99	33,32
PBMC с патогенами (100:1)	27,46	35,96
PBMC с патогенами (1000:1)	29,72	34,85

При увеличении концентрации патогенных микроорганизмов происходит повышение экспрессии CD-314 на мембранах NK-клеток. При уменьшении концентрации патогенов происходит незначительное снижение экспрессии рецептора.

В заключении можно отметить, что рецепторы TLR2 и TLR4, а также CD-314 являются ключевыми компонентами иммунной системы человека, ответственными за распознавание патогенов и запуск иммунного ответа, соответственно иммунные клетки, имеющие данные рецепторы, играют важную роль в иммунном ответе организма. Исследование экспрессии данных рецепторов являются важными для понимания их роли в воспалительном ответе, а также для выявления возможных нарушений в иммунной системе, связанных с различными заболеваниями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abul, K. Cellular and Molecular Immunology / K. Abul [et al.]. // Elsevier. – 2014. – №8. – P. 63-96.
2. Agita, A. Inflammation, Immunity, and Hypertension / A. Agita // Acta Med Indones. – 2017. – №2. – P. 158-165.
3. Bikash, R. Structure of fish Toll-like receptors (TLR) and NOD-like receptors (NLR) / R. Bikash // Elsevier. – 2020. – №161. – P. 1602-1617.
4. Brown, J. What is the role of white blood cells in the inflammatory response? / J. Brown // The knowledge burrow. – 2020. – №4. – P. 20-23.
5. McKinnon, K. Flow Cytometry: An Overview / K. McKinnon // Curr Protoc Immunol. – 2019. – №120. – P. 1-16.
6. Payne-Tobin, A. Designing a rigorous microscopy experiment: Validating methods and avoiding bias/ A. Payne-Tobin [et al.]. // Journal of Cell Biology. – 2019. – №218. – P. 1452-1466.

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования
«Международный государственный экологический
институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета



САХАРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ 2024 ГОДА: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ XXI ВЕКА

SAKHAROV READINGS 2024: ENVIRONMENTAL PROBLEMS OF THE XXI CENTURY

Материалы 24-й международной научной конференции

23-24 мая 2024 г.
г. Минск, Республика Беларусь

В двух частях
Часть 1

Минск
«ИВЦ Минфина»
2024