

# Активация клеток врождённого иммунитета человека липополисахаридом и экстрацеллюлярным полисахаридом морских бактерий

Т. П. СМОЛИНА\*, Т. С. ЗАПОРОЖЕЦ, Н. Н. БЕСЕДНОВА

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

## Activation of Innate Immunity Human Cells by Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide Produced By Marine Bacteria

T. P. SMOLINA, T. S. ZAPOROZHETS, N. N. BESEDNOVA

Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

С помощью цитометрического метода показано, что липополисахарид (ЛПС) и экстрацеллюлярный полисахарид (ЭПС), выделенные из морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, увеличивают относительное количество моноцитов, синтезирующих IL-12. ЛПС и ЭПС повышают цитотоксический потенциал NK-клеток, усиливая их дегрануляцию (экспрессию мембранных CD107a), внутриклеточный синтез IFN- $\gamma$  и увеличивая экспрессию молекул CD25, CD69, HLA-DR, CD11b и CD54.

**Ключевые слова:** морские бактерии, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, врождённый иммунитет, липополисахарид, экстрацеллюлярный полисахарид, NK-клетки, CD107a, внутриклеточные цитокины.

It has been shown that using the cytometric method lipopolysaccharide (LPS) and extracellular polysaccharide (EPS) isolated from marine bacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* increase the relative amount of monocytes synthesizing IL-12. LPS and EPS enhance the cytotoxic potential of NK cells, enhancing their degranulation (expression of membrane CD107a), intracellular synthesis of IFN- $\gamma$  and increasing the expression of CD25, CD69, HLA-DR, CD11b, and CD54 molecules.

**Keywords:** marine bacteria, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, innate immunity, lipopolysaccharide, extracellular polysaccharide, NK cells, CD107a, intracellular cytokines.

Способность NK-клеток (натуральных киллеров) быстро осуществлять эффекторные функции, направленные на элиминацию заражённых и повреждённых клеток организма, позволяет отнести их к клеткам системы врождённого иммунитета. Стимуляция NK-клеток различными растворимыми веществами и/или контактными взаимодействиями приводит к изменению их фенотипа, функциональных свойств и возможности более эффективно осуществлять контактный цитолиз [1].

Для поиска препаратов, активирующих клетки врождённого иммунитета, перспективно применение гликополимеров микробного происхождения, несущих патоген-ассоциированные молекулярные структуры, распознающиеся системой врождённого иммунитета. Известно, что липополисахариды (ЛПС) клеточных стенок грамотрицательных бактерий могут активировать NK-клетки [2], однако входящий в их состав токсический

компонент (липид А) является препятствием для создания фармакологических препаратов.

В последнее время наблюдается повышенный научный интерес к морской микробиологии. Многие соединения, изолированные из морских гетеротрофных бактерий, являются уникальными по своей структуре и/или физиологическому действию [3]. Как оказалось, гликополимеры морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* содержат необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом. Эти бактерии могут культивироваться в искусственных условиях и перспективны для биотехнологии [4, 5]. Ранее нами было показано, что ЛПС и экстрацеллюлярный полисахарид (ЭПС), выделенные из морских бактерий *P. nigrifaciens*, активируют нейтрофилы и моноциты, а также усиливают миграционный потенциал этих клеток [6].

В связи с этим теоретический и практический интерес представляют возможности ЛПС и ЭПС *P. nigrifaciens* оказывать влияние на эффекторные функции NK-клеток человека и способность моноцитов синтезировать IL-12, который, действуя

© Коллектив авторов, 2017

\*Адрес для корреспонденции: E-mail tsmol@mail.ru

на NK-клетки, активирует их и способствует выработке IFN- $\gamma$ .

Цель работы — изучение влияния ЛПС и ЭПС *P.nigrifaciens* на внутриклеточную продукцию IL-12 моноцитами и на изменение функциональной активности и фенотипа NK-клеток. Для этого исследовали изменение экспрессии активационных маркеров (CD25 и CD69), молекул адгезии (CD11b и CD54) и главного комплекса гистосовместимости II класса (HLA-DR), маркера дегрануляции CD107a на мембранах NK-клеток, а также — внутриклеточную продукцию  $\gamma$ -ИФ NK-клетками.

## Материал и методы

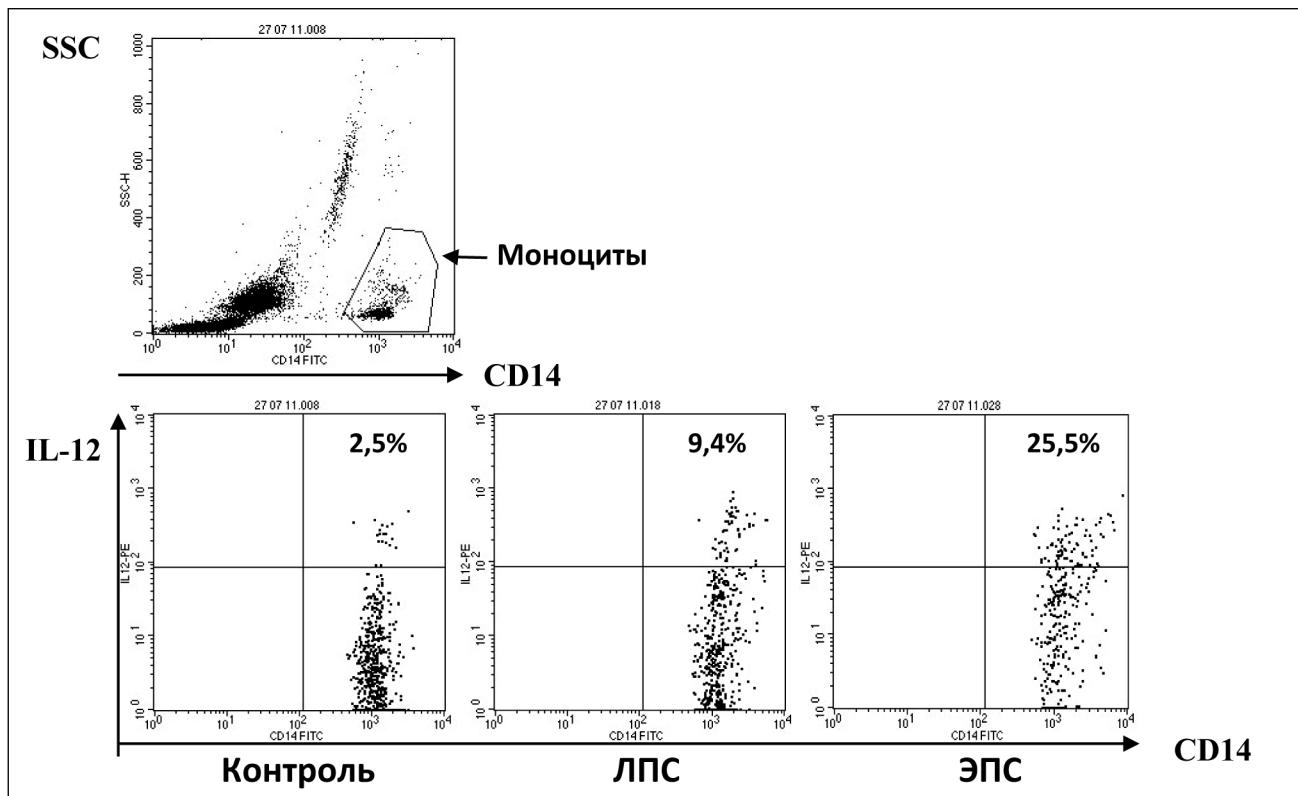
ЛПС и ЭПС получены из штамма КММ 156 бактерий *P.nigrifaciens*, выделенных из ткани желудка дальневосточного двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. ЭПС состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы, один остаток 2-ацетамило-2-дезокси-D-глюкозы и один остаток 3-O-[(R)-1-карбоксиэтил]-D-глюкозы (глюколактиловой кислоты) [7]. Гликополимеры выделены и любезно предоставлены для исследования сотрудниками Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова.

Материалом для исследования служила полученная от здоровых доноров периферическая кровь с гепарином (25 ЕД/мл), которую разводили в соотношении 1:2 полной питательной средой (среда RPMI-1640, содержащая 10% эмбриональной телячей сыворотки, 0,01 М HEPES, 200 мМ L-глутамина, 100 мг/мл гентамицина). Использование цельной крови не требует выделения и подготовки клеток к культивированию, устраняет неспецифическую активацию клеток на этапах сепарации, и при этом сохраняется существующий *in vivo* баланс различных типов клеток крови.

Исследуемые гликополимеры растворяли в 0,9% растворе NaCl и вносили образцы в кровь в конечных концентрациях 10 и 100 мкг/мл. В контрольные пробы вносили 0,9% раствор NaCl в объеме, равном таковому раствора гликополимеров.

Уровень экспрессии поверхностных молекул определяли методом цитометрического анализа в программе «CellQuest Pro» на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson») с использованием моноклональных антител к молекулам CD3-FITC, CD14-PE, CD69-PE, CD11b-PE, CD25-PE, CD54-PE, HLA-DR-PE, CD56-APC, CD107a-PE («Beckman Coulter») и соответствующих изотипических контролей. В каждой пробе анализировали не менее  $10^4$  клеток. Экспрессию молекул CD107a определяли после 4 ч инкубирования, всех остальных молекул — через 24 ч.

Для оценки внутриклеточной продукции цитокинов цельную кровь инкубировали с 10 мкг/мл. ЛПС или ЭПС в присутствии 2 мкмоль/л моненсина (Sigma) при температуре 37°C (4 ч — для определения внутриклеточного ИЛ-12 в моноцитах; 20 ч — для выявления ИФН- $\gamma$  в NK-клетках) в полистироловых 12×75 мм пробирках с пробками (Falcon). Нестимулированный контроль инкубировали в тех же условиях в присутствии моненсина без добавления активаторов. После инкубации клетки окрашивали антиген-специфическими моноклональными антителами для поверхностных маркеров (CD3-FITC, CD56-APC), лизировали эритроциты (BD FACS Lysing Solution), клетки пермеабилизовали (BD FACS Permeabilizing Solution) и отмывали. Для выявления внутриклеточных цитокинов добавляли коньюгированные с PE МКА к IL-12, или IFN- $\gamma$ . После отмычки клетки ресусцинировали в 500 мкл 1% раствора параформальдегида и анализировали образцы на проточном цитометре [8]. При гейтировании популяцию моноцитов выделяли по CD14 в комбинации с боковым светорассеянием (SSC). NK-клетки идентифицировали как CD3-CD56+ клетки. В каждой пробе анализировали не менее  $10^4$  клеток. Результаты представлены как процент NK-клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры. Плотность (количество) молекул на поверхности клеток отра-



**Влияние гликополимеров *P.nigrifaciens* на изменение внутриклеточного синтеза IL-12 моноцитами крови человека**

**Уровень экспрессии молекул на поверхности натуральных киллеров после инкубации с гликополимерами *P. nigrifaciens***

Маркеры	Концентрация ЛПС и ЭПС, мкг/мл	Контроль		ЭПС		ЛПС		ЭПС	
		% клеток, экспрессирующих маркеры	Me (Min–max)	Me (Min–max)	Me (Min–max)	Me (Min–max)	Me (Min–max)	средняя интенсивность флюоресценции (MFI)	Me (Min–max)
CD69	10	25,8 (6,3–29,2)	47,5* (45,8–56,2)	72,6* (64,1–79,7)	9,4 (8,2–11,4)	21,4* (18,9–23,3)	95,3* (89,3–97,2)		
	100		83,4* (71,4–89,6)	95,8* (90,4–97,3)		70,2* (64,9–72,6)		234* (215,1–241,0)	
CD11b	10	94,3 (85,5–96,7)	95,2 (89,6–97,5)	96,5 (90,3–98,2)	130 (125,2–133,2)	137 (133,1–141,0)		160* (152,7–163,6)	
	100		95,6 (90,6–97,9)	97,3 (93,1–98,6)		139* (136,1–146,3)		207* (201,3–212,1)	
CD25	10	2,1 (1,8–3,1)	3,5 (2,1–4,6)	25,1* (18,5–27,4)	1,2 (1,0–1,4)	1,5 (1,3–1,8)		2,8* (2,4–3,1)	
	100		14,1* (11,6–18,4)	27,8* (22,5–32,7)		4,5* (2,5–7,1)		33,9* (29,4–38,2)	
CD54	10	45,2 (35,6–52,0)	50,5 (47,3–56,3)	63,4* (59,1–67,5)	8,6 (6,2–9,4)	9,1 (7,7–11,4)		13,3* (11,6–16,7)	
	100		79,6* (71,3–82,1)	86,2* (83,4–91,3)		16,7* (12,1–19,7)		24,4* (21,1–28,4)	
HLA-DR	10	4,9 (2,5–5,7)	6,1 (5,1–8,2)	8,4 (5,6–11,2)	4,3 (2,5–6,3)	4,7 (3,1–6,3)		5,8 (4,1–6,8)	
	100		14,4* (10,7–17,4)	18,1* (15,6–24,1)		6,2 (4,2–8,40)		8,3* (6,8–10,9)	

**Примечание.** Me – медиана; (Min–max) – минимальное и максимальное значение; \* – различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к контролю.

жена в виде условных единиц средних интенсивностей флюоресценции (MFI).

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики, включающими расчёт медианы и квартильного размаха (разность значений 75-го и 25-го процентиля), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп.

## Результаты и обсуждение

Моноциты человека в ответ на бактериальные продукты могут продуцировать различные цитокины, в том числе IL-12 – плейотропный цитокин, оказывающий влияние на различные биологические эффекты Т-клеток и натуральных киллеров [9]. Инкубирование цельной крови в течение 4 ч как с ЛПС, так и с ЭПС в концентрации 10 мкг/мл приводило к значимому увеличению относительного количества моноцитов, синтезирующих IL-12 внутри клеток (рисунок). Более выраженный эффект оказывал ЭПС, увеличивая процент синтезирующих IL-12 моноцитов до  $25,5 \pm 3,8\%$  (контроль –  $2,5 \pm 1,1\%$ ), в то время как ЛПС повышал этот показатель до  $9,4 \pm 2,3\%$ .

IL-12 является сильным индуктором синтеза IFN- $\gamma$  Т-лимфоцитами и NK-клетками периферической крови и способствует активизации цитолитической активности NK-клеток [10]. Через 20 ч инкубации клеток крови с 10 мкг/мл ЭПС относительное количество NK-клеток, синтезирующих IFN- $\gamma$ , возрастало до  $21,2 \pm 3,4\%$  при контроле показателе  $3,9 \pm 2,1\%$ . ЛПС оказывал меньший эффект, увеличивая процент IFN- $\gamma$ -позитивных NK-клеток до  $8,3 \pm 1,7\%$ . Различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к контролю.

При активации NK-клеток на их мембране регистрируется экспрессия маркера CD107a, который характеризуется как трансмембранный белок LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein1) и является маркером дегрануляции клеток [11]. Инкубация клеток крови с 10 мкг/мл ЭПС в течение 4 ч приводила к увеличению относительного количества NK-клеток, экспрессирующих на поверхности CD107a, до  $9,1 \pm 1,7\%$  (контроль –  $0,8 \pm 0,9\%$ ). ЛПС увеличивал относительное количество субпопуляции CD107a-позитивных NK-клеток до  $7,1 \pm 0,9\%$ .

Стимуляция различными веществами может приводить NK-клетки не только к быстрому эффекторному ответу в виде контактного цитолиза с помощью цитотоксических гранул, но и к изменению их фенотипа и функциональных свойств.

В экспериментах показано (таблица), что инкубация клеток крови с ЛПС или ЭПС в течение 24 ч приводила к изменению субпопуляционного состава NK-клеток: увеличивалось относительное число клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD69) и поздней (CD25, HLA-DR) активации, а

также молекул адгезии (CD54) на мемbrane клеток; возрастала плотность интегринов (CD11b). ЭПС оказывал более выраженное действие на изменение фенотипа NK-клеток, чем ЛПС. Роль всех этих маркеров на NK-клетках связана с осуществлением цитотоксической функции [12–17].

Трансмембранный гликопротеин CD69 является одним из самых ранних поверхностных маркеров активированных NK-клеток, который необходим для проведения сигнала внутрь клетки и повышения функциональной активности NK-клеток. Лимфоциты, в том числе NK-клетки, в интактном состоянии не экспрессируют CD69, эти молекулы появляются на их поверхности после активации клеток различными стимулами. Известно, что экспрессия CD69 на NK-клетках связана с их цитотоксической функцией. Установлена роль CD69 в лизисе, осуществляемом активированными NK-клетками. Кроме того CD69 принимает участие в регулировании других функций NK-клеток, таких как пролиферация, продукция ФНО- $\alpha$  и экспрессия других функционально значимых антигенов (CD25, ICAM-1). [12]. CD69 имеет прямое отношение к активации генов, ответственных за синтез интерлейкина-2, и сигналы, поступающие с CD69, вызывают увеличение как продукции этого цитокина, так и количества рецепторов к нему на клетках CD25+ [13], экспрессию которых принято считать одной из ключевых стадий процесса активации.

ЭПС вызывал более значительное повышение экспрессии CD25 на NK-клетках, чем ЛПС и, соответственно, в большей степени увеличивал возможность проявления цитотоксических свойств NK-клеток, т.к. известно, что экспрессия CD25 позитивно коррелирует с цитотоксической функцией NK-клеток, увеличивая их дегрануляцию и процент гибели клеток-мишеней, а также продукцию ИФН- $\gamma$  [14].

Система HLA обеспечивает регуляцию иммунного ответа. NK-клетки, экспрессирующие HLA-DR, характеризуются сильной лизической активностью и играют значительную роль в процессах инициации и усиления воспалительных реакций.

CD11b является важным интегрином, который связан с созреванием и цитотоксичностью NK-клеток [15].

Молекулы межклеточной адгезии ICAM-1 (CD54) экспрессируются на клетках крови при активации и участвуют в обеспечении адгезии и миг-

рации клеток в очаг воспаления [16]. Молекулы CD54, экспрессирующиеся на NK-клетках, участвуют в регулировании процесса цитолиза [17].

Таким образом, увеличение экспрессии молекул CD69, CD25, HLA-DR, CD11b и CD54 на NK-клетках связано с возрастанием их цитотоксического потенциала.

Известно, что активация одного типа клеток может приводить к активации другого, причём активирующее действие NK-клеток на моноцитарно-макрофагальные клетки связано, главным образом, с секрецией IFN- $\gamma$ , а моноцитарно-макрофагальные клетки стимулируют натуральные киллеры с помощью цитокинов IL-12, IL-15 и IL-18 и контактных взаимодействий.

Анализ результатов экспериментов позволяет предположить, что ЛПС и ЭПС, выделенные из *P.nigrifaciens*, оказывают прямое действие на моноциты крови через паттерн-распознающие рецепторы, увеличивая относительное количество моноцитов, синтезирующих IL-12 уже через 4 ч инкубации. Наблюдаемая активация NK-клеток и увеличение их цитотоксичности могут быть связаны как с прямым воздействием исследуемых гликополимеров, так и с влиянием IL-12, который может приводить к запуску продукции IFN- $\gamma$  и индуцировать экспрессию активационных маркеров.

В связи с тем, что NK-клеткам принадлежит важнейшая роль в иммунологическом надзоре, а ЛПС и ЭПС морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* являются индукторами NK-клеточной активности, представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров и создание на их основе фармакологических противовирусных и противоопухолевых препаратов.

## Выходы

1. ЛПС и ЭПС, выделенные из морских бактерий *P.nigrifaciens*, оказывают влияние на регуляторную способность моноцитов, увеличивая их способность синтезировать IL-12.

2. Под действием ЛПС и ЭПС возрастает количество NK-клеток, синтезирующих ИФН- $\gamma$ .

3. ЛПС и ЭПС усиливают цитотоксический потенциал NK-клеток увеличивая экспрессию молекул CD107a, CD69, CD25, HLA-DR, CD11b и CD54.

4. ЭПС оказывает более эффективное, чем ЛПС, действие на изменение функциональной активности моноцитов и NK-клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Farag S.S., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev* 2006; 20: 123–137.
2. Goodier M. R., Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56 + CD3 – NK cells: a regulatory role of monocytes and IL-10. *J Immunol* 2000; 165: 139–147.
3. Alba S., Nazarenko E.L., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. Molecular Structure of Endotoxins from Gram-negative Marine Bacteria: An Update. Serena Leone. *Mar Drugs* 2007; 5 (3): 85–112.
4. Bowman J.P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 2007; 5: 220–241. doi:10.3390/md504220 · Source: PubMed
5. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Исаков В.В. Установление структуры липида А из морской грамотрицательной бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393т. Биоорган хим 2004; 30 (4): 409–416. / Krasikova I.N., Kapustina N.V., Isakov V.V. Ustanovlenie struktury lipida A iz morskoj gramotricatel'noj bakterii *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATSS 14393t. Bioorgan him 2004; 30 (4): 409–416. [in Russian]
6. Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Изменение уровня экспрессии молекул адгезии клеток врождённого иммунитета человека гликополимерами морских бактерий. Антибиотики и химиотер 2015; 60, 3–4: 37–41. / Smolina T.P., Zapozhets T.S., Besednova N.N. Izmenenie urovnya jekspresii molekul adgezii kletok vrozhdjonnogo immuniteta cheloveka glikopolimerami morskikh bakterij. Antibiotiki i himioter 2015; 60, 3-4: 37–41. [in Russian]
7. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков А.А. и др. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonashaloplanktis* KMM156. Биоорган хим 1993; 19 (3): 327–336./ Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov A.A. i dr. Strukturna poverjajushhego zvena kislogo polisaharida *Alteromonashaloplanktis* KMM156. Bioorgan him 1993; 19 (3): 327-336. [in Russian]
8. Foster B., Prussin C., Liu F., Whitmire J.K., Whittom J.L. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Curr Protoc Immunol* 2007; Aug; Chapter 6: Unit 6.24. doi: 10.1002/0471142735. im0624s78.
9. Chehimi J., Trinchieri G. Interleukin-12: a bridge between innate resistance and adaptive immunity with a role in infection and acquired immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1994; 14: 149–161.
10. Wolf S.F., Sieburth D., Syrek J. Interleukin-12: a key modulator of immune function. *Stem Cells Day* 1994; 12 (2): 154–68.
11. Betts M.R., Koup R.A. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 497–512. doi: 10.1016/S0091-679X(04)75020-7
12. Borrego F., Robertson M.J., Ritz J., Pena J., Solana R. CD69 is stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect. *Immunol* 1999; 97: 159–165.
13. Marzio R., Mauel J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function . *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999; 21; 3: 565–582.
14. Rudnicka K., Matusiak A. Chmiela M. CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochim Pol* 2015; 62 (4): 885–894. doi: 10.18388/abp.2015\_1152.
15. Fu B., Tian Z., Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 2014; 141: 4: 483–489.
16. Zimmerman T., Blanco F.J. Inhibitors targeting the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion interaction: design and mechanism of action. *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14; 22: 2128–2139.
17. Robertson M.J., Caligiuri M.A., Manley T.J., Levine H., Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytosis. *Immunol* 1990; 15; 145 (10): 194–201.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смолина Татьяна Павловна — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Запорожец Татьяна Станиславовна — д.м.н., с.н.с. (звание), зам. директора по науке НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток

Беседнова Наталья Николаевна — д.м.н., академик РАН, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова, Владивосток