

Изменение уровня экспрессии молекул адгезии клеток врождённого иммунитета человека гликополимерами морских бактерий

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

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

Modification of Levels of Adhesion Molecule Expression of Human Innate Immune Cells by Glycopolymers of Marine Bacteria

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

G. P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

С помощью цитометрического метода показано, что липополисахарид и экзополисахарид морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* изменяют экспрессию молекул адгезии на нейтрофилах и моноцитах человека, снижая уровень экспрессии молекул CD62L и увеличивая экспрессию CD11b, CD11c и CD54.

Ключевые слова: морские бактерии, липополисахарид, экзополисахарид, молекулы адгезии.

By flow cytometry it was demonstrated that lipopolysaccharide and exopolysaccharide of marine proteobacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* alter the expression of adhesion molecules on human neutrophils and monocytes, reducing the expression level of molecules CD62L and increasing the expression of CD11b, CD11c and CD54.

Key words: marine bacteria, lipopolysaccharide, exopolysaccharide, adhesion molecules.

Введение

Врождённый иммунитет является первой линией защиты организма от патогенов и реализуется с помощью клеток-эффекторов. Движение лейкоцитов — одних из главных эффекторных клеток врождённого иммунитета — в очаг воспаления начинается с серии адгезионных событий, каждое из которых связано с изменением экспрессии определённого типа поверхностных молекул [1]. В связи с этим актуален поиск препаратов, активирующих процессы адгезии эффекторов врождённого иммунитета. Наиболее изученными и эффективными индукторами активации иммунной системы организма являются бактериальные липополисахариды (ЛПС), однако они содержат токсический компонент липид А, что ограничивает использование ЛПС в качестве основы для получения лекарственных препаратов [2]. Другими перспективными для биомедицины гликополимерами являются экзополисахариды (ЭПС) бактерий, которые характеризуются сложной химической структурой, большим количеством функциональных групп и проявляют биологическую активность [3].

В последнее десятилетие наблюдается повышенный научный интерес к морской микробиологии. Специфические особенности морской среды обитания приводят к разнообразию физиологических возможностей морских микроорганизмов. Многие соединения, изолированные из морских гетеротрофных бактерий, оказались уникальными по своей структуре и/или физиологическому действию [4, 5]. Морские аэробные бактерии рода *Pseudoalteromonas* — важная в фундаментальном и практическом отношении группа микроорганизмов. Бактерии этой группы продуцируют широкий набор биологически активных соединений, перспективных для биотехнологии, обнаруживаются во всех районах Мирового Океана на поверхности биотических и абиотических объектов, в морской воде, а также могут культивироваться в искусственных условиях [6]. ЛПС морских бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* содержат необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом [7] и оказывают активирующее действие на клетки крови человека [8].

Цель работы — изучение влияния ЛПС и экзополисахарида (ЭПС) *P. nigrifaciens* (штамм КММ 156) на миграционный потенциал клеток врождённого иммунитета, от которого существ-

© Коллектив авторов, 2015

Адрес для корреспонденции: 690087 Владивосток, ул. Сельская, 1. НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. П. Сомова

Уровень экспрессии молекул адгезии на поверхности лейкоцитов после инкубации с гликополимерами *P.nigrifaciens*

Маркёры	Сроки инкубации	Моноциты			Гранулоциты		
		Контроль	ЛПС	ЭПС	Контроль	ЛПС	ЭПС
Средняя интенсивность флуоресценции (MFI), Me [Min—max]							
CD62L	1 ч	70,6 (62,3—77,2)	52,6* (45,8—56,2)	2,9* (2,1—3,7)	171 (152—179)	167 (148—173)	15* (10—21)
	24 ч	10 (8,5—12,8)	15 (12,4—16,6)	21* (18,4—23,3)	100 (87—121)	55* (44—61)	21* (15—31)
CD11b	1 ч	1506 (1465—1598)	1855* (1714—1975)	3347* (3117—3512)	1010 (917—1092)	1207* (1153—1261)	3788* (3590—3936)
	24 ч	701 (655—767)	1842* (1726—1908)	1823* (1711—1931)	739 (682—784)	1338* (1295—1374)	1254* (1178—1281)
CD11c	1 ч	448 (401—473)	537* (512—597)	973* (854—1021)	101 (71—123)	98 (72—118)	327* (279—363)
	24 ч	387 (305—435)	1247* (1168—1284)	1253* (1195—1347)	105 (75—128)	189* (165—201)	186* (160—195)
CD54	1 ч	91 (55—111)	113 (84—123)	292* (256—342)	16,6 (11,2—18,4)	17,4 (13,7—19,4)	28,9* (24,6—33,7)
	24 ч	143 (127—178)	1267* (1093—1322)	2507* (2237—2614)	45 (36—49)	120* (109—137)	235* (211—254)

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

венно зависит эффективность элиминации патогенных микроорганизмов. Для этого исследовали динамику экспрессии молекул адгезии трёх семейств: селектинов (CD62L), интегринов (CD11b и CD11c) и иммуноглобулинов (CD54) — на мембранах моноцитов и гранулоцитов человека.

Материал и методы

ЛПС и ЭПС получены из штамма *Pseudoalteromonas nigrifaciens* КММ 156, выделенного из ткани желудка дальневосточного двусторчатого моллюска *Crenomytilus grayanus*. ЭПС состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы, один остаток 2-ацетамидо-2-дезоксид-Д-глюкозы и один остаток 3-O-[(R)-1-карбокситил]-D-глюкозы (глюколактоиловой кислоты) [9]. Гликополимеры выделены и любезно предоставлены нам для исследования сотрудниками Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г. Б. Елякова.

Материалом для исследования служила периферическая кровь с гепарином (25 ЕД/мл), полученная от здоровых доноров. 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 [10].

Исследуемые гликополимеры растворяли в физиологическом растворе (NaCl 0,9 %) и вносили в кровь в конечной концентрации 10 мкг/мл. В контрольные пробы вносили физиологический раствор в объёме, равном объёму раствора гликополимеров. Уровень экспрессии молекул определяли методом цитометрического анализа в программе «CellQuest Pro» на проточном цитометре «FACSCalibur» («Becton Dickinson») с использованием моноклональных антител к молекулам CD45-FITC/ CD14-PE, CD62L-FITC, CD11b-PE, CD11c-PE, CD54-PE, CD14-FITC («Beckman Coulter») и соответствующих изотипических контролей. Гейтирование субпопуляций гранулоцитов, основную часть которых составляют нейтрофилы, осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. В каждой пробе анализировали не

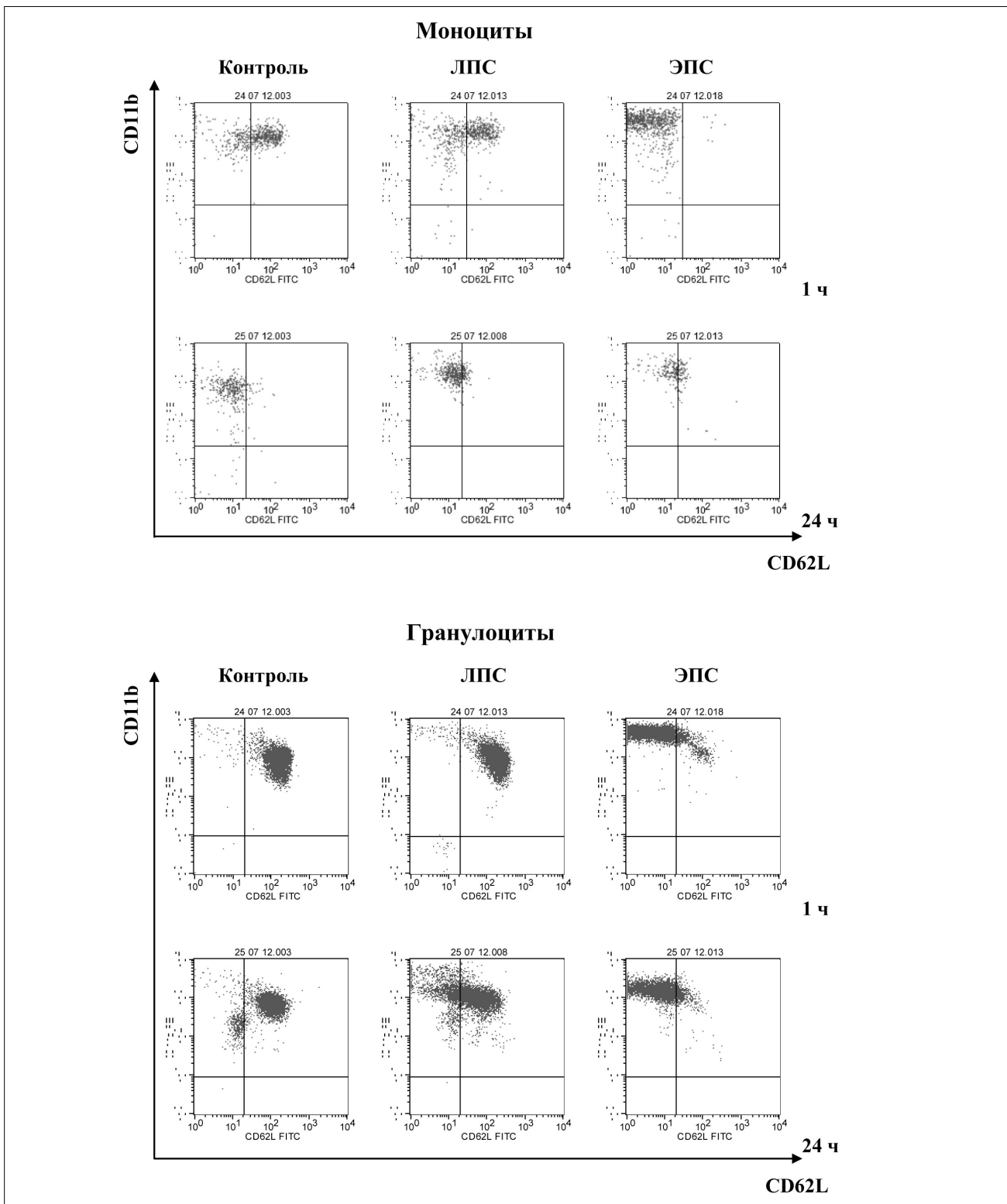
менее 10^4 клеток. Экспрессию молекул адгезии на поверхности клеток определяли через 1 и 24 ч.

Результаты отражают плотность (количество) молекул на поверхности клеток и представлены в виде условных единиц средних интенсивностей флуоресценции (MFI).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием пакета компьютерных программ GEOSTAT, которые включали 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

Селектины. Анализ экспрессии L-селектинов показал, что инкубация цельной крови с гликополимерами *P.nigrifaciens* приводила к статистически значимому снижению ($p \leq 0,05$) уровня экспрессии молекул CD62L на мембранах моноцитов и гранулоцитов по сравнению с контролем (рисунок, таблица). ЭПС *P.nigrifaciens* оказывал на моноциты и гранулоциты более выраженный эффект, чем ЛПС, инициируя максимальное снижение количества молекул L-селектинов уже через 1 ч инкубации. К 24 ч инкубации шеддинг (слущивание) L-селектинов с поверхности моноцитов, инкубированных с ЭПС, прекращался, и начиналось восстановление экспрессии мембранных молекул CD62L. Снижение экспрессии CD62L под действием ЛПС продолжалось до окончания эксперимента (до 24 ч), но степень снижения плотности этих молекул была ниже, чем при использовании ЭПС. В ходе эксперимента количество мембранных молекул CD62L на моноцитах снижалось и в опытной, и в контрольной группах, так как клетки вне организма могут активироваться и без стимулирующего агента. В результате этого значимого различия между уровнями экспрессии L-селектинов



Уровень экспрессии L-селектинов и β -интегринов моноцитами и гранулоцитами после инкубации с гликополимерами *P.nigrifaciens*.

опытных (ЛПС) и контрольных моноцитов к 24 ч не наблюдалось.

Миграция иммунокомпетентных клеток к тканям-мишеням — сложный многоступенчатый процесс, который включает в себя каскад последовательных взаимодействий между лейкоцитами и

клетками эндотелия. Молекулы адгезии, относящиеся к селектинам, играют специализированную роль в процессе передвижения лейкоцитов в участок воспаления и передаче различных межклеточных сигналов. L-селектины принимают участие в процессе «роллинга» клеток, а затем бы-

стро слушиваются с их поверхности для остановки лейкоцитов и дальнейшей миграции в ткани [11]. Известно, что L-селектин конститутивно экспрессируется на всех классах лейкоцитов, действует как низкоаффинный рецептор ЛПС. Взаимодействие ЛПС с молекулами L-селектинов на нейтрофилах опосредует не только первый этап миграции, но и активацию клеток, продукцию супероксидных радикалов [12]. L-селектины, экспрессированные на моноцитах, играют ключевую роль в инициации миграции моноцитов из крови в место воспаления [11]. Снижение уровня экспрессии CD62L на гранулоцитах и моноцитах под действием гликополимеров свидетельствует о мобилизации и активации эффекторных клеток, готовности их к миграции.

Интегрины. Инкубация цельной крови с ЛПС в течение 1 ч приводила к увеличению β_2 -интегринов (CD11b и CD11c) на мембранах моноцитов по сравнению с контролем (см. рисунок, таблицу). К 24 ч инкубации уровень экспрессии интегринов на моноцитах превышал контрольные показатели: CD11b — в 2,6 раза; CD11c — в 3,2 раза. ЭПС *P.nigrifaciens* оказывал на моноциты более выраженный эффект, увеличение — β_2 -интегринов (CD11b и CD11c) на клеточных мембранах наблюдалось уже через 1 ч инкубации. К 24 ч инкубации уровень CD11b начинал снижаться, но всё ещё превышал контрольный показатель, в то время как экспрессия молекул CD11c продолжала увеличиваться.

Анализ экспрессии адгезионных молекул гранулоцитов показал, что при инкубации клеток крови с ЛПС в течение 1 ч увеличивалась экспрессия только молекул CD11b, а уровень CD11c не превышал показателя контрольной группы. Ко второму сроку эксперимента (24 ч) оба маркера адгезии: CD11b и CD11c — значительно возросли. ЭПС индуцировал максимальное увеличение уровня экспрессии молекул CD11b и CD11c в течение первого часа инкубации. К 24 ч инкубации разница между уровнем экспрессии этих адгезионных молекул контрольной и опытной групп (ЭПС) уменьшалась, но оставалась значимой.

Комплекс CD11/CD18 является β_2 -интегрином, который экспрессируется на поверхности нейтрофилов и моноцитов. Интегрины относятся к семейству трансмембранных гликопротеинов, состоят из α - и β -субъединиц и образуют различные гетеродимеры. Интегрины принимают участие в процессах миграции и адгезии клеток, формировании межклеточных контактов, регуляции фагоцитоза. CD11b — субъединица α_M рецептора CR3 для компонента комплемента iC3b, принадлежит к семейству β_2 -интегринов ($\alpha_M\beta_2$). CD11b обеспечивает адгезию лейкоцитов между собой и к поверхности эндотелия, а также фагоцитоз частиц, опсонизированных iC3b. CD11c — белок с

внеклеточной, трансмембранной и цитоплазматической частями. Является субъединицей α_X рецептора CR4 для компонента комплемента iC3b. Принадлежит к семейству β_2 -интегринов ($\alpha_X\beta_2$). Молекулы CD11c участвуют в удалении опсонизированных частиц и иммунных комплексов, связываются с фибриногеном, необходимы для адгезии макрофагов и нейтрофилов к эндотелию. Комплекс CD11/CD18 накапливается во вторичных гранулах нейтрофилов и моноцитов. При активации клеток происходит быстрое перемещение комплекса из гранул и их экспрессия на поверхности клеток [13].

Молекулы межклеточной адгезии. В исследовании показано, что под действием ЭПС плотность молекул CD54 на моноцитах и гранулоцитах значительно возрастала уже через 1 ч инкубации и продолжала увеличиваться до конца срока эксперимента (24 ч). ЛПС увеличивал уровень экспрессии CD54 только к 24 ч инкубации.

Молекулы межклеточной адгезии, ICAM-1 (CD54) экспрессируются на лейкоцитах крови при активации и участвуют в обеспечении адгезии нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов к активированному сосудистому эндотелию с последующей их экстравазацией и миграцией в очаг воспаления. Также молекулы CD54 функционируют как сигнальные и принимают участие в передаче сигнала с клеточной мембраны внутрь клетки и запуске каскада событий, результатом чего является продукция супероксидных радикалов [14]. На экспрессию молекул CD54 оказывают влияние цитокины, особенно ИЛ-1, ФНО- α и ИФН- γ [15].

В исследовании показано, что под действием ЭПС плотность молекул CD54 на моноцитах и гранулоцитах значительно возрастала уже через 1 ч инкубации и продолжала увеличиваться до конца срока эксперимента (24 ч). ЛПС увеличивал уровень экспрессии CD54 только к 24 ч инкубации.

Таким образом, проведённое исследование демонстрирует значимые изменения в уровне экспрессии L-селектинов (CD62L), интегринов (CD11b и CD11c) и иммуноглобулинов (CD54) на мембранах моноцитов и гранулоцитов человека под действием гликополимеров морских бактерий *P.nigrifaciens*. ЛПС и ЭПС эффективно воздействуют как на гранулоциты, так и на моноциты крови, но ЭПС оказывает более быстрый эффект, чем ЛПС. Возможно, это связано с тем, что ЭПС был выделен путём экстракции клеток физиологическим раствором и сохранил нативную конформацию в сравнении с ЛПС, полученным с помощью обработки клеток горячим водным фенолом.

Изменение экспрессии молекул адгезии моноцитов и гранулоцитов определяет особенности

активации и осуществление эффекторных функций клеток. Экспрессированные на клетках рецепторы проводят сигналы, запускающие внутриклеточные каскадные реакции, которые могут активировать процессы адгезии, миграции, фагоцитоза, дегрануляции, продукции хемокинов и цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета [16].

Известно, что дефект адгезии лейкоцитов приводит к нарушению бактерицидной функции фагоцитов. Из-за отсутствия на лейкоцитах молекул адгезии нарушается их взаимодействие с другими клетками, нейтрофилы не связываются с клетками эндотелия и не мигрируют в ткани в ответ на хемотаксические стимулы [17]. Защитное действие иммуномодуляторов бактериального происхождения, несущих патоген-ассоциированные молекулярные структуры микроорганизмов активирующих клетки врождённого иммуни-

тета, наступает быстро, является относительно неспецифичным, а значит эффективным против больших групп патогенов. В этой связи ЛПС и ЭПС *P.nigrifaciens* представляют интерес для фундаментальных и биотехнологических исследований как перспективные активаторы клеток врождённого иммунитета.

Выводы

1. ЛПС и ЭПС, выделенные из морских бактерий *P.nigrifaciens*, усиливают миграционный потенциал нейтрофилов и моноцитов человека, снижая уровень экспрессии молекул CD62L и увеличивая экспрессию CD11b, CD11c и CD54.

2. ЭПС оказывает более эффективное действие на изменение экспрессии молекул адгезии нейтрофилами и моноцитами крови человека, чем ЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Beutler B. Innate immunity: an overview. *J Mol Immunol* 2004; 40: 845–859.
2. Alexander C., Rietschel E.T.J. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotox Res* 2001; 7: 3: 167–202.
3. Nwodo U., Green E., Okoh A.I. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 14002–14015.
4. Okami Y. The search for bioactive metabolites from marine bacteria. *J Mar Biotechn* 1993; 1: 59–65.
5. Laurienzo P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: An overview. *Mar Drugs* 2010; 8: 2435–2465.
6. Bowman J.P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Mar Drugs* 2007; 5: 220–241.
7. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Исаков В.В. Установление структуры липида А из морской граммотрицательной 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]
8. Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. Ранняя активация лимфоцитов и моноцитов периферической крови человека компонентами протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. *Тихоокеан мед журн* 2009; 3: 45–48. / Smolina T.P., Zaporozhec T.S., Gorshkova R.P., Nazarenko E.L. Rannjaja aktivacija limfocitov i monocitov perifericheskoj krovi cheloveka komponentami proteobakterij *Pseudoalteromonas nigrifaciens*. *Tihookean med zhurn* 2009; 3: 45–48. [in Russian]

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), вр.и.о директора НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток

9. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Zubkov A.A. и др. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* КММ156. *Биоорган хим* 1993; 19(3): 327–336. / Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov A.A. i dr. Struktura povtorjajushhego zvena kislogo polisaharida *Alteromonas haloplanktis* КММ156. *Bioorgan him* 1993; 19 (3): 327–336. [in Russian]
10. Glasser L., Fiederlein R. The effect of various cell separation procedures on assays of neutrophil function. A critical appraisal. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 662–669.
11. Smalley D.M., Ley K. L-Selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 255–266.
12. Rosen S.D. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 129–156.
13. Rosales C., Juliano, R. L. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukocyte Biol* 1995; 57: 189–198.
14. Takashi S., Okubo J., Horie S. J. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol* 2001; 91: 613–622.
15. Roebuck K.A., Finnegan K.A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukocyte Biol* 1999; 12: 66.
16. Aplin A.E, Howe S.K, Alahari K, and Juliano R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *J Pharmacol Rev* 1998; 50: 197–263.
17. Etzioni A. Adhesion molecules: their role in health and disease. *Pediatric Research* 1996; 39: 191–198.

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