

АКТИВАЦИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМИ РАЗНОГО СОСТАВА

Зубова С.В.¹, Волошина Е.В.¹, Косякова Н.И.²,
Грачев С.В.³, Прохоренко И.Р.¹

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино, Московская область

² Отделение аллергологии и иммунологии ПНЦ РАН, г. Пущино, Московская область

³ Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

Резюме. Исследовано влияние состава липополисахаридов (ЛПС) на активацию мононуклеаров крови человека по оценке уровня высвобождаемых клетками провоспалительных цитокинов TNF α и IL-6. Показано, что ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG в отличие от ЛПС из *E. coli* не активирует клетки к синтезу цитокинов.

Ключевые слова: цитокины, липополисахариды, мононуклеары крови человека, сыворотка крови

Zubova S.V., Voloshina E.V., Kosjakova N.I., Grachev S.V., Prokhorenko I.R.

ACTIVATION OF HUMAN BLOOD MONONUCLEARS BY LIPOPOLYSACCHARIDE OF DIFFERENT COMPOSITION

Abstract. Influence of lipopolysaccharide (LPS) composition upon activation of human blood mononuclears was investigated, by measuring levels of pro-inflammatory TNF α and IL-6 cytokines released by the cells. It is shown that LPS from *Rhodobacter capsulatus* PG, in contrast to *E. coli* LPS, did not activate the target cells for synthesis of the cytokines. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 4-5, pp 405-408)

Keywords: cytokines, lipopolysaccharides, human blood mononuclear cells, blood serum.

Введение

Бактериальные эндотоксины (липополисахариды, ЛПС) играют важную роль в патогенезе тяжелых грамотрицательных инфекций. Ведущим фактором токсичности эндотоксинов, приводящим к развитию шока, является вызываемый ими синтез провоспалительных цитокинов клетками врожденной иммунной системы. Сигнал от эндотоксина-агониста через CD14 передается на рецепторный мембранный комплекс TLR4/MD-2 и через цитоплазматические адаптерные белки на внутриклеточные сигнальные

системы, включающие различные киназы. Процесс завершается транслокацией ядерного фактора NF- κ B в ядро и последующим синтезом цитокинов [6]. Интенсивность цитокинового ответа клеток зависит от химической структуры эндотоксина [13]. Максимальный ответ наблюдается на структуры, в состав липида А которых входят 6 жирных кислот и 2 фосфатных остатка [14]. Некоторые ЛПС не только не активируют клетки к синтезу цитокинов, но и блокируют его, выступая в качестве антагонистов эндотоксинов [16]. Ранее нами было показано, что ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует некоторые активности эндотоксинов, в их числе праймирование нейтрофилов [5], замедление апоптоза нейтрофилов и моноцитов [3]. Предполагается, что ЛПС из *Rb. capsulatus* блокирует эффекты эндотоксинов, конкурируя с ними за связывание с рецепторами [1].

Целью настоящей работы было исследовать способность ЛПС из *Rb. capsulatus* PG индуцировать в мононуклеарах крови человека синтез про-

Адрес для переписки:

Зубова Светлана Владимировна

ИФПБ РАН

142290, Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, 2.

Тел.: (4967) 73-07-44.

Факс: (4967) 33-05-32.

E-mail: zusvet@rambler.ru

воспалительных цитокинов TNF α и IL-6 и противовоспалительного цитокина IL-1ra.

Материалы и методы

В работе использовали ЛПС из *E. coli* O55:B5 (Sigma). ЛПС из *Rb. capsulatus* PG (ВКМ В-2381Д Российской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН) получали по методике, описанной ранее [4].

Выделение мононуклеаров крови человека. Мононуклеары выделяли из гепаринизированной (10 Ед/мл) венозной крови 6-ти здоровых доноров, возраст 20-45 лет (4 муж., 2 жен.), методом дифференциального центрифугирования на градиенте фиколл-урографин (плотность 1,077). Жизнеспособность выделенных клеток была не менее 95% при окрашивании трипановым синим.

Активация мононуклеаров. Перед инкубацией мононуклеары выдерживали 1 ч при 4 °С, затем клетки (4 x 10⁶ кл/мл) инкубировали в 48 луночных культуральных планшетах (Nunc) (объем пробы 1 мл) в питательной среде RPMI-1640, содержащей либо 10% термоинактивированной (56 °С 30 мин) эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (BioClot GmbH), либо 10% термоинактивированной (56 °С 30 мин) аутологической человеческой сыворотки, либо 2% аутологической человеческой сыворотки в течение 4-х или 14-ти часов при 37 °С в присутствии 5% CO₂ в инкубаторе Jouan (Франция). Мононуклеары стимулировали к синтезу цитокинов добавлением в пробу ЛПС *E. coli* или ЛПС *Rb. capsulatus* в концентрации 20 нг/мл. Контрольные клетки инкубировали в среде без добавления сыворотки и ЛПС. После инкубации клетки осаждали центрифугированием, супернатант хранили при -20 °С.

Определение содержания цитокинов. Содержание цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью специфических моноклональных антител по методике, предложенной производителем (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург, Россия). Содержание TNF α и IL-6 определяли через 4 часа, а рас-

творимого рецептора к IL-1 (IL-1ra) через 14 часов культивирования.[17]. Измерения проводили на спектрофотометре Stat Fax 3200 (США).

Каждое измерение выполнялось в 3-х повторностях. Результаты представлены в виде средних значений содержания цитокинов с величиной стандартного отклонения. Достоверность результатов определяли по критерию Стьюдента – Фишера.

Результаты

Влияние типа и концентрации сыворотки на синтез цитокинов. Были проведены эксперименты по влиянию типа и концентрации сыворотки на спонтанную индукцию TNF α мононуклеарами крови человека (табл. 1). Из представленных результатов видно, что в отсутствие внешнего стимула сыворотка активирует клетки к спонтанному синтезу TNF α . Минимальный эффект стимуляции клеток проявляла 2% аутологическая сыворотка. Уровень цитокинов в присутствии этой сыворотки увеличивался в 2 раза по сравнению с уровнем в среде RPMI, тогда как при использовании 10% инактивированной аутологической сыворотки в десятки раз.

Оценка способности липополисахаридов разного состава индуцировать в мононуклеарах синтез цитокинов. Нами была исследована способность ЛПС из *Rb. capsulatus* PG в сравнение с ЛПС из *E. coli* стимулировать мононуклеары к синтезу цитокинов TNF α и IL-6. Контролем индуцибельной активности различных ЛПС служили уровни цитокинов, высвобождаемых нестимулированными мононуклеарами в среду инкубирования, содержащую 2% аутологической сыворотки.

Из приведенной гистограммы видно (рис. 1), что ЛПС из *E. coli* в концентрации 20 нг/мл сильно активировал клетки к синтезу цитокинов. Концентрация TNF α возросла в 8 раз в сравнение с контролем, а IL-6 – в 5,5 раза (p < 0,001). В отличие от этого эндотоксина, ЛПС из *Rb. capsulatus* PG в такой же концентрации не только не стимулировал синтез цитокинов, но даже незначительно подавлял синтез TNF α , индуцированный

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ТИПА СЫВОРОТКИ НА СПОНТАННУЮ ИНДУКЦИЮ TNF α МОНОНУКЛЕАРАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Условия культивирования мононуклеаров	Содержание TNF α	
	абсолютное, пг/мл	относительное*
Среда RPMI	2,3±0,3	1
Среда RPMI + 10% инактивированная ЭТС	7,8±1,8	3,4
Среда RPMI + 10% инактивированная аутологическая сыворотка	155,2±5,1	68,1
Среда RPMI + 2% аутологическая сыворотка	4,4±1,2	1,9

Примечание. * – концентрация TNF α после инкубации мононуклеаров в RPMI условно принята за 1. Каждая серия экспериментов была выполнена в трех повторях на мононуклеарах крови 6-ти доноров.

гомологичной сывороткой, и практически не активировал синтез IL-6.

Обсуждение

В литературе представлен широкий разброс данных о типах сывороток и их концентрациях, используемых в экспериментах при оценке способности ЛПС индуцировать синтез цитокинов миелоидными клетками крови. При определении активации мононуклеаров эндотоксинами использовалась 2% аутологическая сыворотка [11], в более поздних работах использовалась 10% сыворотка [12, 15], а в работе Jansky с соавторами 10% инактивированная эмбриональная сыворотка теленка [9]. Вклад сыворотки в активацию клеток авторами не оценивался. Однако при исследовании действия ЛПС необходимо учитывать эффекты собственно сыворотки, добавляемой в среду культивирования мононуклеаров. Из-за возможного присутствия в сыворотке медиаторов и цитокинов, таких как IL-1 β ; IL-6; IL-8; TNF α ; фактора, активирующего тромбоциты; интерферона гамма; а также других белков крови (система комплемента, С5а, опсоины), не исключена активация клеток к синтезу цитокинов без участия внешнего стимула [8]. С другой стороны, присутствие таких белков, как трансформирующий фактор роста бета, IL-10, антагонисты к рецептору IL-1 и растворимые рецепторы, может препятствовать активации лейкоцитов. Показано, что изолированные мононуклеары при культивировании в течение 12 часов в среде, содержащей 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки, пролиферируют и продуцируют цитокины без дополнительного стимула. В условиях эксперимента концентрация TNF α в среде достигала максимального значения через 4 часа, и этот уровень сохранялся в течение 24-х часов [9].

Учитывая эти результаты исследований, нами были проведены эксперименты по влиянию типа

и концентрации сыворотки на синтез TNF α . Этот цитокин был выбран в качестве контроля, во-первых, потому, что он является мощным стимулом воспаления, во-вторых, TNF α не стимулирует TNP-1 моноциты к CD14-зависимому синтезу IL-6 [17].

ЛПС из *Rb. capsulatus* PG отличается от токсичного ЛПС из *E. coli* составом и количеством жирных кислот липида А – носителя биологической активности эндотоксинов. В состав липида А из ЛПС *E. coli* входит 6 жирных насыщенных кислот от С10 до С14, тогда как липид А из ЛПС *Rb. capsulatus* включает 5 жирных кислот, одна из которых ненасыщенная. Эти различия в структуре отражаются в биологической активности исследуемых ЛПС [2]. ЛПС из *Rb. capsulatus* PG в такой же концентрации как ЛПС из *E. coli*, не только не стимулировал синтез цитокинов, но даже незначительно подавлял синтез TNF α , индуцированный эндогенными белками гомологичной сыворотки, и практически не активировал синтез IL-6.

В ответ на эндотоксины клетки синтезируют не только провоспалительные цитокины, но и растворимые формы рецепторов к ним. Взаимодействие между про- и противовоспалительными медиаторами играет ключевую роль в контроле за адекватным уровнем иммунной активности в ответ на инфекцию. Мы исследовали влияние разных ЛПС на синтез IL-1ra, который ингибирует активность IL-1, конкурируя за его связывание с рецепторами клеток к IL-1. Известно, что сам IL-1ra не индуцирует какой-либо клеточный ответ [10]. ЛПС из *E. coli* стимулировал мононуклеары к синтезу IL-1ra (рис. 1). В отличие от эндотоксина ЛПС из *Rb. capsulatus* не стимулировал мононуклеары к синтезу исследуемых цитокинов. Из полученных результатов следует, что ЛПС из *Rb. capsulatus* связывается с рецептором, блокируя активацию клеток в том числе эндогенными донорами [7]. Результаты настоящей работы вместе с полученными ранее данными

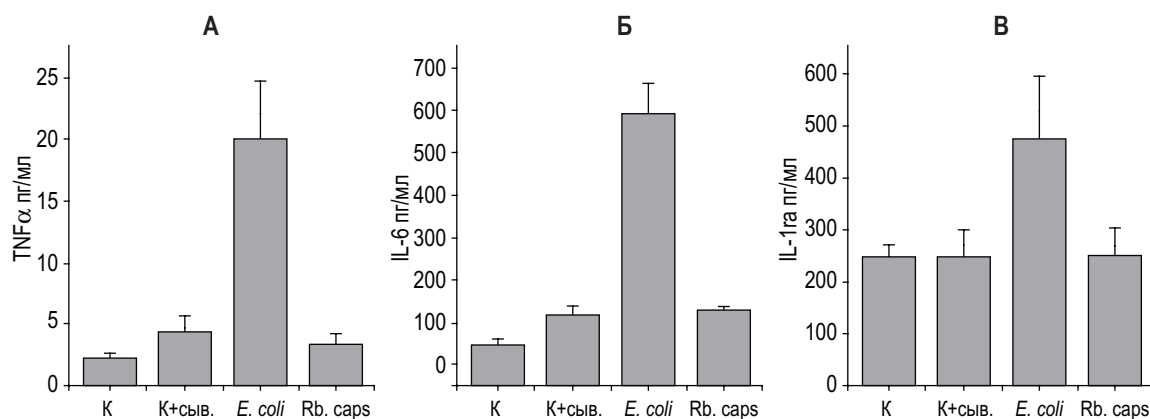


Рисунок 1. Влияние липополисахаридов из *E. coli* и *Rb. capsulatus* на продукцию цитокинов TNF α (А), IL-6 (Б) и IL-1ra (В) моноцитами крови человека, культивированными в среде RPMI с 2% аутологичной сывороткой

предполагают, что ЛПС из *Rb. capsulatus* можно рассматривать как потенциальный антагонист эндотоксинов.

Список литературы

1. Винокуров М.Г., Юринская М.М., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Липополисахарид из *Rhodobacter capsulatus* подавляет действие эндотоксина из разных хемотипов *E. coli* на праймирование и апоптоз нейтрофилов человека // Доклады Академии Наук. – 2009. – Т. 424, № 4. – С. 548-550.
2. Винокуров М.Г., Юринская М.М., Прохоренко И.Р., Грачев С.В. Нейтрализация эндотоксининдуцированных ответов нейтрофилов и моноцитов периферической крови человека липополисахаридом *Rhodobacter capsulatus* // Молекулярная медицина. – 2006. – № 4. – С. 56-62.
3. Винокуров М.Г., Юринская М.М., Прохоренко И.Р., Прохоренко С.В., Грачев С.В. Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* подавляет эндотоксининдуцированную задержку апоптоза миелоидных клеток человека // Доклады Академии Наук. – 2006. – Т. 406, № 3. – С. 398-401.
4. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.Р. Влияние метода выделения на выход и состав липополисахаридов из фотосинтезирующих бактерий // Прикл. биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 444-447.
5. Прохоренко И.Р., Золотушенко Е.В., Тарасевич Н.Ю., Авхачева Н.В., Сафронова В.Г., Грачев С.В. Вызванный *Escherichia coli* дыхательный взрыв нейтрофилов человека, праймированных разными липополисахаридами // Биол. Мембр. – 2007. – Т. 24, № 6. – С. 442-450.
6. Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 783-801.
7. Brunn G., Platt J. The etiology of sepsis: turned inside out // Trends Mol. Med. – 2006. – Vol. 12. – P. 10-16.
8. Eggesbo J.B., Hjermann I., Hostmark A.T., Kierulf P. LPS induced release of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α in EDTA or heparin anticoagulated whole blood from persons with high or low levels of serum HDL // Cytokine. – 1996. – Vol. 8. – P. 152-160.
9. Jansky L., Reymanova P., Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia* // Physiol. Res. – 2003. – Vol. 52. – P. 593-598.
10. Karima R., Matsumoto H., Higashi H., Matsushima K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure // Mol. Med. Today. – 1999. – Vol. 5, N 3. – P. 123-132.
11. Loppnow H., Libby P., Freudenberg M., Krauss J.H., Weckesser J., Mayer H. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS // Infect. Immunity. – 1990. – Vol. 58, N 11. – P. 3743-3750.
12. Mathiak G., Kabir K., Grass G., Keller H., Steinringer E., Minor T., Rangger C., Neville L.F. Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays // Inter. J. Mol. Med. – 2003. – Vol. 11. – P. 41-44.
13. Netea M.G., Kullberg B.J., Joosten L.A., Sprong T., Verschuere I., Boerman O.C., Amiot F., van den Berg W.B., Van der Meer J.W. Lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia is mediated through different pathways // Eur. J. Immunol. – 2001. – Vol. 31. – P. 2529-2538.
14. Rietschel E.T., Brade L., Shade U. Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian hosts – Weinheim: Verlag chemie, 1998. – P. 1-41.
15. Schmid B., Finnen M.J., Harwood J.L., Jackson S.K. Acylation of lysophosphatidylcholine plays a key role in the response of monocytes to lipopolysaccharide // Eur. J. Biochem. – 2003. – Vol. 270, N 13. – P. 2782-2788.
16. Schromm A.B., Brandenburg K., Loppnow H., Moran A.P., Koch M.H.J., Rietschel E.T., Seydel U. Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion // Eur. J. Biochem. – 2000. – Vol. 267, N 7. – P. 2008-2013.
17. Segura M., Vadeboncoeur N., Gottschalk M. CD14-dependent and -independent cytokine and chemokine production by human THP-1 monocytes stimulated by *Streptococcus suis* capsular type 2 // Clin. Exp. Immunol. – 2002. – Vol. 127. – P. 243-254.

поступила в редакцию 02.04.2010

принята к печати 19.04.2010