

УЧАСТИЕ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 В ИНТЕРНАЛИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* НЕЙТРОФИЛАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Зубова С.В.¹, Грачев С.В.², Прохоренко И.Р.^{1,2}

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

² Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва

Резюме. Рецептор Toll-4 (TLR4) является важнейшим участником в сигнальной системе клеток хозяина. В литературе активно обсуждается роль TLR4 в активации клетки, в том числе при фагоцитозе. В экспериментах на цельной крови исследовалась способность нейтрофилов в присутствии моноклональных АТ (клон HTA125) к TLR4 поглощать ФИТЦ-меченые бактерии *E. coli* после активации клеток крови липополисахаридами различной структуры. Показано, что TLR4 не играет существенной роли в интернализации бактерий нейтрофилами в цельной крови. Фагоцитарная активность нейтрофилов в крови возрастает после их праймирования эндотоксинами из *E. coli*. Липополисахарид (ЛПС) из *Rb. capsulatus* не влияет на фагоцитоз. В присутствии эндотоксинов степень участия TLR4 в фагоцитозе нейтрофилами крови зависит от структуры ЛПС.

Ключевые слова: TLR4, эндотоксины, липополисахариды, фагоцитоз, нейтрофилы.

Zubova S.V., Grachev S.V., Prokhorenko I.R.

PARTICIPATION OF TLR4 IN ENGULFMENT OF *ESCHERICHIA COLI* BY HUMAN BLOOD NEUTROPHILS IN PRESENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDES

Abstract. TLR4 is a key player in signaling system of host cells. Possible role of TLR4 is actively discussed, e.g. its significance for phagocytosis. A capacity of neutrophils to engulf FITC-labeled *E. coli* bacteria upon activation with LPS of different origin was studied in presence of anti-TLR4 Mab's (HTA125 clone). It was shown that, in whole blood, TLR4 does not play any essential role in engulfment of bacteria by the neutrophils. Phagocytic activity of neutrophils in blood increases increased after their priming with *E. coli* endotoxins. LPS from *Rb. capsulatus* did not affect phagocytosis. In presence of endotoxins, the degree of TLR4 involvement in neutrophil phagocytosis depends on LPS structure. (*Med. Immunol.*, 2012, vol. 14, N 3, pp 219-222)

Keywords: TLR4, endotoxins, lipopolysaccharides, phagocytosis, neutrophils.

Введение

Рецептор Toll-4 (TLR4) является важнейшим участником в сигнальной системе клеток хозяина. В литературе активно обсуждается участие и роль TLR4 и адаптерных к нему белков в активации клетки, в том числе при фагоцитозе, образовании активных форм кислорода, синтезе провоспалительных цитокинов.

Адрес для переписки:

Зубова Светлана Владимировна,
ИФПБ РАН

142290, Московская обл., г. Пущино,

ул. Институтская, 2.

Тел.: (4967) 31-83-32. Факс: (4967) 33-05-32.

E-mail: zusvet@rambler.ru

Лигация Toll-рецепторов запускает MyD88-зависимую сигнализацию через IRAK4 и p38 и приводит к повышенной регуляции ряда генов, ответственных за фагоцитоз [6, 7, 15]. В исследованиях последних лет показано, что TLR4 также вовлекается в фагоцитоз, помогая фагоцитам узнавать бактерии или их составные части [8]. Однако существует множество противоречивых данных по участию TLR4 фагоцитозе, что объясняется в большей мере различиями в выборе объектов исследования и постановке экспериментов. Важно учитывать также фазу фагоцитоза, для которой рассматривается участие TLR4.

Рецепторная система иммунных клеток позволяет распознать малейшие различия в структуре липополисахаридов (ЛПС) и сформировать оптимальный ответ клеток на инфекцию. Макси-

мальный ответ наблюдается на структуры ЛПС, в состав липида А которых входят 6 жирных кислот и 2 фосфатных остатка [12]. Некоторые ЛПС не только не активируют клетки к синтезу цитокинов, но и блокируют его, выступая в качестве антагонистов эндотоксинов. Ранее нами было показано, что ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует некоторые активности эндотоксинов, в их числе праймирование нейтрофилов [4], замедление апоптоза нейтрофилов и моноцитов [1]. Предполагается, что ЛПС из *Rb. capsulatus* блокирует эффекты эндотоксинов, конкурируя с ними за связывание с рецепторами.

Для выяснения роли TLR4 в фагоцитозе бактерий нейтрофилами человека, праймированными липополисахаридами различной структуры, была исследована способность нейтрофилов в присутствии моноклональных АТ к TLR4 (клон HTA125) фагоцитировать ФИТЦ-меченые бактерии *E. coli*. В нашей работе исследовалась начальная фаза фагоцитоза – интернализация бактерий. Эксперименты проводили на цельной крови, обеспечивая тем самым присутствие всех значимых участников процесса фагоцитоза – белков комплемента, иммуноглобулинов и других, приближая исследуемый процесс к условиям *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы ФИТЦ-меченые бактерии *E. coli* (штамм К-12) BioParticles (Molecular Probes), антитела к TLR4 (Mouse anti-human TLR4, clone HTA125, Serotec), коммерческие препараты ЛПС из *Escherichia coli* 055:B5 (S-хемотип); ЛПС из *E. coli* K12 штамм JM103 (R-хемотип, Re-мутант) (Sigma). ЛПС из *Rhodobacter capsulatus* PG (ВКМ В-2381Д Российской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН) получали фенольной экстракцией по методике, описанной ранее [3].

Интернализация бактерий *E. coli* нейтрофилами крови человека. Исследование выполнено на крови 5 условно здоровых доноров 25–35 лет (добровольное согласие доноров имеется). В пробирку вносили 90 мкл цельной гепаринизированной крови (гепарин 20 ед./1 мл крови), добавляли 50 мкл суспензии ФИТЦ-меченых бактерий *E. coli* в растворе Хенкса (2×10^7 кл/мл; соотношение лейкоцит–бактерия – 1:10), тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем кровь лизировали добавлением 2 мл лизирующего буфера и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Лейкоциты осаждали центрифугированием (21 °С, 200 g, 5 мин), отмывали 2 мл охлажденного фосфатного буфера, содержащего 0,02% ЭДТА, и осадок ресуспендировали в 400 мкл фосфатный буфер–ЭДТА. Образцы переносили в цитометрические пробирки и хранили на холоде до анализа на проточном цитофлуориметре EPICS XL-MCL (Beckman Coulter). На гистограмме FS-SS выделяли гейт, соответ-

ствующий нейтрофилам. О фагоцитарной активности нейтрофилов судили по величине средней интенсивности флуоресценции (Mn1 X).

Влияние липополисахаридов на интернализацию бактерий *E. coli* нейтрофилами крови человека. В экспериментах по исследованию влияния активации клеток эндотоксинами на фагоцитоз перед добавлением ФИТЦ-меченых бактерий *E. coli* в гепаринизированную кровь вносили по 100 нг/мл различных ЛПС (из S-*E. coli*, Re-*E. coli* или *Rb. capsulatus*) и инкубировали 30 мин при 37 °С.

Участие TLR4 в интернализации бактерий *E. coli* нейтрофилами крови человека. В серии экспериментов по исследованию роли TLR4 в интернализации бактерий нейтрофилами перед постановкой реакции фагоцитоза цельную гепаринизированную кровь инкубировали с 1 мкг АТ к TLR4 30 мин. В экспериментах по исследованию участия TLR4 в фагоцитозе бактерий нейтрофилами, праймированными эндотоксинами, после инкубации клеток с АТ к TLR4 в кровь добавляли по 100 нг/мл различных ЛПС (из S-*E. coli*, Re-*E. coli* или *Rb. capsulatus*) и инкубировали 30 мин при 37 °С.

Статистическая обработка данных проведена с помощью программы OriginPro 7.5. Результаты представлены в виде средних значений эффектов с величиной средней квадратичной ошибки по результатам пяти независимых экспериментов. Достоверность результатов определяли по критерию Стьюдента–Фишера.

Результаты

Влияние ЛПС различной структуры на фагоцитарную активность нейтрофилов человека. Нами было исследовано влияние ЛПС из S-*E. coli*, Re-*E. coli* или *Rb. capsulatus* на фагоцитарную активность нейтрофилов в экспериментах на цельной крови 5 условно здоровых доноров. Из результатов, представленных на рисунке 1, видно, что индивидуальные ответы нейтрофилов различных доноров заметно отличаются. Однако средние значения полученных результатов подчиняются определенной зависимости.

На рисунке 2 представлены усредненные результаты фагоцитарной активности нейтрофилов в %. Контрольный фагоцитоз для каждого донора принят за 100%. Из полученных результатов видно, что активация клеток токсичными ЛПС из *E. coli* приводила к статистически значимому усилению фагоцитоза в среднем на 14% независимо от их хемотипа ($p < 0,01$). Преактивация нейтрофилов ЛПС из *Rb. capsulatus* практически не влияла на уровень фагоцитоза, который оставался близким к контрольному.

Участие TLR4 в процессе интернализации бактерий *E. coli* нейтрофилами человека. Из представленных результатов (рис. 1 и 2), иллюстрирующих вклад TLR4 в фагоцитарную активность

нейтрофилов человека, видно, что АТ к TLR4 стимулируют неспецифическую фагоцитарную активность нейтрофилов на 3%.

При ингибировании TLR4 антителами при последующем праймировании клеток с помощью ЛПС наблюдалась тенденция к снижению фагоцитоза (для ЛПС из *E. coli* S-хемотипа ~ на 9%, а для ЛПС из *E. coli* Re-хемотипа ~ на 4%). (Предварительное добавление в кровь АТ к TLR4 при последующем праймировании клеток с помощью ЛПС из *E. coli* S-хемотипа приводило к подавлению фагоцитоза на 9%, а ЛПС из *E. coli* Re-хемотипа – на 4%, по сравнению с активацией фагоцитоза соответствующим эндотоксином.) При праймировании клеток с помощью ЛПС из *Rb. capsulatus* предварительное добавление АТ к TLR4 приводило к незначительному усилению фагоцитарной активности.

Обсуждение

Бактериальные эндотоксины (липополисахариды) являются основной причиной септического шока. В ответ на стимуляцию эндотоксинами активируются различные иммунные клетки. В системе врожденного иммунитета нейтрофилы и макрофаги играют ключевую роль в защите клеток хозяина против инфекции. Фагоцитоз и последующее переваривание патогенов фагоцитами (моноцитами, макрофагами, нейтрофилами) играют ведущую роль в ответе врожденной иммунной системы на микробную инфекцию [5].

В крови грамотрицательные патогены распознаются фагоцитами посредством специфических рецепторов: Fcγ и CR3 (CD11b) [13]. Взаимодействие этих рецепторов с лигандами (иммуноглобулинами и комплементом крови) активирует ряд внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к быстрой реорганизации цитоскелета, необходимой для поглощения бактерий фагоцитами. Узнавание и поглощение патогена начинается с взаимодействия со специфическими рецепторами на лейкоцитах с последующей сборкой клеточного актина, образованием псевдоподий и смыканием фагосомы.

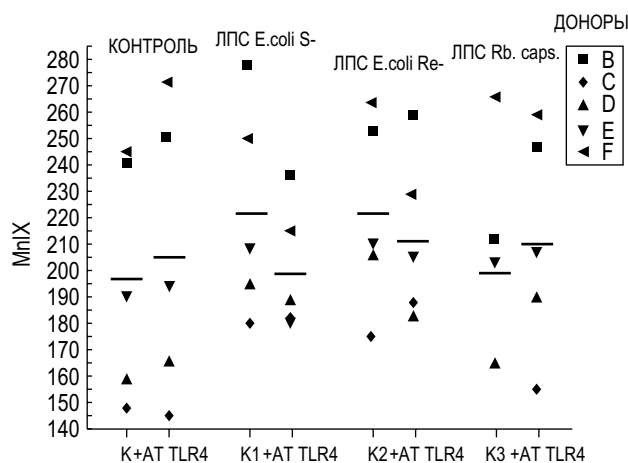


Рисунок 1. Влияние разных ЛПС и АТ к TLR4 на интернализацию бактерий нейтрофилами крови человека

Примечание. К – контрольные нейтрофилы без добавления каких-либо стимулов; K1 – нейтрофилы, праймированные ЛПС из *E. coli* S-структуры; K2 – нейтрофилы, праймированные ЛПС из *E. coli* Re-структуры; K3 – нейтрофилы, праймированные ЛПС из *Rb. capsulatus*.

У разных доноров наблюдался значительный разброс индивидуальных ответов на стимулы (рис. 1). По-видимому, это связано с состоянием иммунной системы донора, предшествующими контактами с различными инфекциями, приемом лекарственных препаратов.

Известно, что фагоцитарная активность макрофагов значительно усиливается после обработки ЛПС [14]. Нашей задачей было исследовать фагоцитарную активность нейтрофилов, праймированных липополисахаридами различной структуры в цельной крови. Полученные результаты показывают, что фагоцитарная активность нейтрофилов возрастает при праймировании клеток эндотоксинами из *E. coli*, при этом хемотип *E. coli* не влияет на наблюдаемый эффект. Из представленных результатов следует, что эндотоксины активируют рецептор Toll-like 4, тем самым усиливая фагоцитоз. Фагоцитоз нейтрофилов, праймированных ЛПС из *Rb. capsulatus*

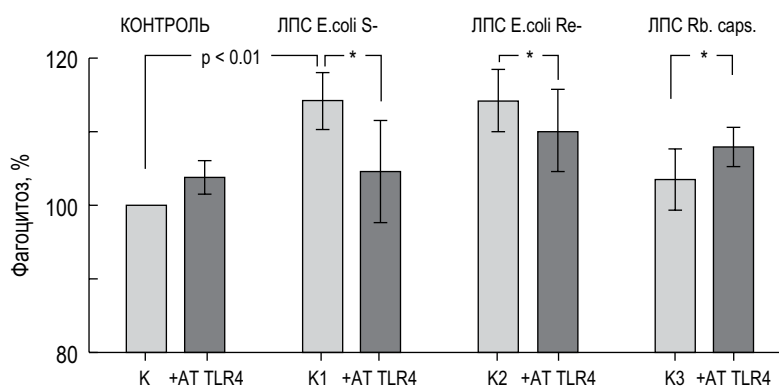


Рисунок 2. Влияние разных ЛПС и АТ к TLR4 на интернализацию бактерий нейтрофилами крови человека

Примечание. Результаты представлены в %, где за 100% взят фагоцитоз контрольных нейтрофилов (К), не подвергнутых никаким стимулам. Обозначения аналогичны рис. 1. * – $p > 0,05$.

сохранялся на уровне контроля (рис. 1, 2). TLR4 является ведущим рецептором в ответе на бактериальные ЛПС, хорошо известные как PAMP [10]. Участие TLR4 в фагоцитозе широко обсуждается в современной литературе [6, 8, 15].

ЛПС из *E. coli* активируют клетки через TLR4. Активация эндотоксинами TLR4 сопровождается передачей сигнала по MyD88-зависимому пути и приводит к быстрой активации ядерного фактора NF- κ B и высвобождению таких провоспалительных цитокинов, как TNF α , IL-1 β , IL-6 и других [11]. Интенсивность ответа зависит от состава ЛПС. Биологическая активность ЛПС связана с составом и структурой липида А. В состав липида А из *E. coli* входит 6 жирных кислот, обеспечивающих максимальную эндотоксическую активность. ЛПС из всех хемотипов *E. coli* включают в свой состав липид А/КДО-структуру, оптимальную для проявления эндотоксической активности.

Из полученных нами результатов следует, что ингибирование TLR4 антителами не только не снижало, но даже незначительно увеличивало уровень фагоцитоза контрольных нейтрофилов, т.е. клеток, не активированных с помощью ЛПС. Моноклональные антитела к TLR4 (клон HTA125), используемые в нашей работе, не выключают участие рецептора TLR4 в экспериментах на цельной крови без преактивации эндотоксинами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в системе цельной крови Toll-like рецептор 4 не играет существенной роли в интернализации бактерий непраймированными нейтрофилами. В данной системе фагоцитоз обеспечивается другими рецепторами нейтрофилов – рецепторами базового фагоцитоза Fc γ и CR3 (CD11b) [9].

Праймирование эндотоксинами нейтрофилов, предварительно обработанных антителами к TLR4, заметно снижало уровень фагоцитоза. В этом случае подавление фагоцитоза антителами было более выражено при активации клеток S-структурой ЛПС и менее при активации ЛПС Re-структуры. Известно, что активация клеток липополисахаридами S- и Re-структуры происходит при участии разных механизмов. По-видимому, этим определяется различное участие рецептора Toll-like 4 в фагоцитозе бактерий клетками, праймированными эндотоксинами разных структур.

Эффект антител на фагоцитарную активность нейтрофилов, праймированных ЛПС *Rb. capsulatus*, противоположен эффектам эндотоксинов и сравним с влиянием антител на непраймированные клетки. ЛПС из *Rb. capsulatus* является нетоксичным соединением в отношении фагоцитов, что было показано нами ранее в экспериментах *in vitro* на моноцитах и на THP-1 клетках [2, 3]. Важным результатом, полученным в данной работе, является то, что нетоксичный ЛПС из *Rb. capsulatus*, являясь антагонистом эндотоксинов, не отменяет основной защитной функции нейтрофилов – фагоцитоза.

Список литературы

1. 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.
2. Волошина Е.В., Зубова С.В., Прохоренко С.В., Косякова Н.И., Прохоренко И.Р. Сравнение эффектов разных хемотипов липополисахаридов из *Escherichia coli* и *Salmonella* на синтез TNF- α и IL-6 макрофагоподобными клетками THP-1 // Медицинская Иммунология. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 509-514.
3. Зубова С.В., Волошина Е.В., Косякова Н.И., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. Активация мононуклеаров крови человека липополисахаридами разного состава // Медицинская Иммунология. – 2010. – Т. 12, № 4-5. – С. 405-408.
4. Прохоренко И.Р., Золотушенко Е.В., Тарасевич Н.Ю., Авхачёва 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.
5. Aderem A. Phagocytosis and the inflammatory response // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 187. – P. S340-S345.
6. Blander J.M., Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors // Science. – 2004. – Vol. 304. – P. 1014-1018.
7. Doyle S.E., O'Connell R.M., Miranda G.A., Vaidya S.A., Chow E.K., Liu P.T., Suzuki S., Suzuki N., Modlin R.L., Yeh W.-C., Lane T.F., Cheng G. Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38 // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 199. – P. 81-90.
8. Fitzgerald K.A., Rowe D.C., Golenbock D.T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex // Microbes Infect. – 2004. – Vol. 6. – P. 1361-1367.
9. Kong L., Ge B.-X. MyD88-independent activation of a novel actin-Cdc42/Rac pathway is required for Toll-like receptor-stimulated phagocytosis // Cell Research. – 2008. – Vol. 18. – P. 745-755.
10. Medzhitov R., Janeway C. The toll receptor family and microbial recognition (Reviews) // Trends in Microbiology. – 2000. – Vol. 8, N 10. – P. 452-456.
11. Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2 // Seminars in Immunology. – 2004. – Vol. 16, N 1. – P. 11-16.
12. 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.
13. Underhill D.M., Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action // Annu. Rev. Immunol. – 2002. – Vol. 20. – P. 825-852.
14. Wu T.-T., Chen T.-L., Chen R.-M. Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a Toll-like receptor 4-dependent pathway: Validated by RNA interference // Toxicol. Lett. – 2009. – Vol. 191. – P. 195-202.
15. Yates R.M., Russell D.G. Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4 // Immunity. – 2005. – Vol. 23. – P. 409-417.

поступила в редакцию 22.06.2011
отправлена на доработку 26.06.2011
принята к печати 21.09.2011