

МЕХАНИЗМЫ УСИЛЕНИЯ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ МОНОЦИТОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ТНР-1 ПОД ВЛИЯНИЕМ КОМПОНЕНТОВ ПИОГЕННОГО СТРЕПТОКОККА

Старикова Э.А.¹, Лебедева А.М.¹, Актуреева Н.А.²,
Бурова Л.А.¹, Фрейдлин И.С.¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Усиление процесса трансэндотелиальной миграции лейкоцитов в условиях инфекции и воспаления происходит благодаря повышению уровня экспрессии адгезионных молекул иммуноглобулинового суперсемейства ICAM-1 и VCAM-1 и усилению секреции воспалительных хемокинов эндотелиальными клетками. Ранее в наших исследованиях в модели *in vitro* было показано, что компоненты пиогенного стрептококка значительно усиливали интенсивность трансэндотелиальной миграции моноцитоподобных клеток линии ТНР-1, однако при этом на эндотелиальных клетках не изменялся уровень экспрессии адгезионных молекул. Цель работы состояла в изучении механизмов, лежащих в основе усиления трансэндотелиальной миграции клеток ТНР-1 в присутствии супернатанта стрептококковых клеток (ССК). ССК проявлял в отношении клеток ТНР-1 свойства хемоаттрактанта. ССК усиливал хемотаксис и трансмиграцию клеток ТНР-1, в то время как 24-часовая преинкубация клеток ТНР-1 в присутствии ССК, напротив, ослабляла оба эти процесса, что сопровождалось снижением уровня фосфорилирования киназы фокальных адгезионных контактов. Преинкубация клеток ТНР-1 с коклюшным токсином снижала интенсивность их трансмиграции в присутствии ССК до уровня спонтанной. Полученные результаты свидетельствуют о том, что усиление трансмиграции клеток ТНР-1 под влиянием ССК обусловлено его хемоаттрактантным действием в отношении мигрирующих клеток.

Ключевые слова: клетки ТНР-1, трансэндотелиальная миграция, *Streptococcus pyogenes*

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
к.б.н., старший научный сотрудник отделения
иммунологии ФГБУ «Научно-исследовательский
институт экспериментальной медицины»
СЗО РАМН
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный
сотрудник отдела иммунологии ФГБУ «Научно-
исследовательский институт экспериментальной
медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург
Лебедева А.М. — аспирант, научный сотрудник
отдела иммунологии ФГБУ «Научно-
исследовательский институт экспериментальной
медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург
Актуреева Н.А. — студент, Санкт-Петербургский
государственный технологический институт
(технический университет), Санкт-Петербург
Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник
отдела микробиологии ФГБУ «Научно-
исследовательский институт экспериментальной
медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург
Фрейдлин И.С. — д.м.н., член-корр. РАМН,
заведующая отделом иммунологии ФГБУ «Научно-
исследовательский институт экспериментальной
медицины» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

Поступила 15.04.2013

Принята к печати 20.06.2013

REGULATORY MECHANISMS OF HUMAN MONOCYTIC THP-1 CELLS TRANSENDOTHELIAL MIGRATION INDUCED BY *STREPTOCOCCUS PYOGENES* COMPONENTS

Starikova E.A.^a, Lebedeva A.M.^a, Aktureeva N.A.^b,
Burova L.A.^a, Freidlin I.S.^a

^a Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Enhanced transendothelial migration of leukocytes during infection and inflammation occurs due to increased expression of ICAM-1 and VCAM-1 adherence molecules of the immunoglobulin superfamily, and increased secretion of chemokines by endothelial cells. Our previous *in vitro* studies with human monocytic THP-1 cells showed that some components of *Streptococcus pyogenes* caused a sufficient enhancement of transendothelial cell migration. However, expression levels of adhesion molecules remained unchanged on endothelial cells. The purpose of the work was to study mechanisms underlying the enhanced transendothelial migration of THP-1 cells treated with supernatante of streptococcal cells (SSC). SSC exhibited chemoattractive activity towards THP-1 cells. SSC increased chemotaxis and transmigration of THP-1 cells. Meanwhile, a 24-hour preincubation of THP-1 cells with SSC caused suppression of the both effects, being accompanied by decreased level of Focal Adhesion Kinase phosphorylation. Preincubation of THP-1 cells with pertussis toxin did reduce the transmigration intensity in presence of the SSC down to the level of spontaneous migration. These results suggest that increased transmigration of THP-1 cells under the influence of SSC may be determined by its chemoattractive action upon the migrating cells. (*Med. Immunol.*, 2013, vol. 15, N 5, pp 457-464)

Keywords: THP-1 cells, transendothelial migration, *Streptococcus pyogenes*

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
PhD, Senior Research Associate, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences 197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg
Lebedeva A.M., Postgraduate Student, Research Associate, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg
Aktureeva N.A., Student, St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), St. Petersburg
Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg
Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Medical Sciences, Chief, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg

Received 15.04.2013

Accepted 20.06.2013

Введение

Эндотелиальные клетки играют важную роль в регуляции миграции лейкоцитов из кровеносного русла в ткани. Считается, что этот процесс происходит конститутивно. Активируя эукариотические клетки через рецепторы, распознающие бактериальные паттерны, ассоциированные с патогенностью, бактерии могут усиливать процесс мобилизации лейкоцитов из кровеносного русла в ткани, кроме того, они сами являются источником хемоаттрактантных факторов для лейкоцитов [9, 12]. *S. pyogenes* – один из самых распространенных возбудителей бактериальных инфекций человека. Проведенные нами ранее исследования показали, что под влиянием компонентов пиогенного стрептококка происходит значительное усиление адгезии и трансэндотелиальной миграции клеток линии ТНР-1, однако при этом ни на эндотелиальных клетках, ни на мигрирующих клетках не изменяется уровень экспрессии адгезионных молекул [1, 2]. Это противоречие побудило нас к более подробному исследованию процесса. **Цель данной работы** состояла в изучении механизмов, лежащих в основе усиления трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 в присутствии компонентов пиогенного стрептококка.

Материалы и методы

Супернатант стрептококковых клеток (ССК) был приготовлен из *S. pyogenes* серологической группы А, тип М22, штамм АL168. Штамм был предоставлен Dr. Lindahl (Отдел лабораторной медицины Лундского университета, Лунд, Швеция). В суточной культуре стрептококка количественными посевами контролировали концентрацию бактерий и доводили до стандартной $2,5-5,0 \times 10^8$ КОЕ/мл. Ультразвуковая дезинтеграция стрептококков проводилась в объеме 5 мл взвеси бактерий в забуференном физиологическом растворе при рН 7,0 в течение 5 мин, при частоте 22 кГц и мощности 0,3-0,4 мА на дезинтеграторе (MSE, Англия). После центрифугирования суспензию подвергали стерилизации с использованием фильтров Filtrapore S с размером пор 0,45 микрон (Sarstedt, Germany). Во всех экспериментах использовали ССК в разведении 1/50, что соответствовало максимально выраженному эффекту, при отсутствии токсичности.

В работе использовали коммерческие препараты липотейховой кислоты из *S. pyogenes* («Sigma», США) в концентрации 50 мкг/мл; рекомбинантный – TNF α «Рефнолин» (специфическая активность 1 ЕД – 0,06 нг) в концентрации 100 ЕД/мл, («Рефнолин», НПО «Фермент», «Sanitas», Литва); липополисахарид из *E. Coli* (055:B5) в концентрации 500 нг/мл («Sigma», США).

Работу проводили с использованием моноцитоподобных клеток перевиваемой линии ТНР-1. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («Биолот», СПб., РФ) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина, 2 мМ L-глутамин – все («Биолот», СПб., РФ). Пересев производили 1 раз в 2-3 дня добавлением равного количества полной культуральной среды.

Для моделирования процесса трансэндотелиальной миграции использовали эндотелиальные линии EA.hy926, любезно предоставленные Dr. Cora-Jean C. Edgell (Университет Северной Калифорнии, США). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 («Биолот», СПб., РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США), 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина 2 мМоль глутамин – все («Биолот», СПб., РФ) и НАТ («Sigma», США), при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. Для дезинтеграции монослоя клетки инкубировали в растворе Версена в течение 5-10 минут («Биолот», СПб., РФ). Пересев производили 1 раз в 3-4 дня.

Клетки культивировали при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂ в пластиковых флаконах объемом 50-250 мл («Sarstedt», Австрия). Жизнеспособность клеток до и после инкубации с исследуемыми веществами оценивали путем инкубации в 0,1% растворе трипанового синего. Во всех экспериментах жизнеспособность составляла не менее 90%.

Изучение миграции и трансэндотелиальной миграции клеток ТНР-1 проводили в трансвеллах с диаметром пор 8 мкм («Becton Dickinson», США). Трансвеллы помещали в лунки 24-луночного планшета (Falcon, США). В сериях экспериментов по оценке миграции, хемотаксиса и трансмиграции клетки инкубировали в культуральной среде RPMI-1640 («Биолот», СПб., РФ) с добавками и 2,5% эмбриональной телячьей сыворотки.

Для оценки интенсивности миграции культуральную среду, содержащую исследуемые вещества, помещали в нижнюю камеру трансвелл, в верхнюю камеру вносили клетки ТНР-1 в концентрации 500 тыс./мл и инкубировали 2 часа.

Для оценки хемоаттрактантной активности в верхнюю камеру вносили клетки ТНР-1 в концентрации 500 тыс. в 200 мкл, в нижнюю камеру вносили культуральную среду с добавками, исследуемые вещества помещали: только в нижнюю камеру; только в верхнюю камеру; одновременно в верхнюю и в нижнюю камеру трансвелл и инкубировали 2 часа.

Для оценки интенсивности трансэндотелиальной миграции за 24 часа до проведения опыта в верхнюю камеру трансвелл вносили эндотелиальные клетки EA.hy926. В день проведения опыта содержимое верхней камеры удаляли и вносили

ли клетки ТНР-1 в концентрации 500 тыс. в 200 мкл. Одновременно в нижнюю камеру вносили культуральную среду, содержащую исследуемые вещества, и инкубировали 3 часа.

В отдельных экспериментах проводили точную преинкубацию клеток линии EA.hy926 или клеток линии ТНР-1 в присутствии ССК, а также только для клеток ТНР-1 16-часовую инкубацию в присутствии 100 нг/мл коклюшного токсина (Sigma, США).

По окончании времени инкубации содержимое нижних камер собирали и проводили подсчет количества мигрировавших клеток с помощью коммерческих наборов «True count» («Becton Dickinson», США), с использованием проточного цитофлуориметра Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США).

Для исследования уровня фосфокиназ (ФАК и NF-κB) клетки инкубировали 20 мин в присутствии исследуемых веществ, фиксировали и пермеабелизовали с помощью Intra Prep fixation/permeabilisation Kit (Beckman Coulter, США). Далее производили окрашивание клеток с использованием моноклональных антител против фосфо-ФАК и фосфо-NF-κB (BD Pharmingen, США). Образцы анализировали на приборе Navios (Beckman Coulter, США). Для оценки интенсивности трансэндотелиальной миграции (ТЭМ) клеток ТНР-1 предварительно в трансвеллы (Becton Dickinson, США) с диаметром пор 8 мкм вносили эндотелиальные клетки, инкубировали до образования конфлюэнтного монослоя, после чего в верхние камеры трансвеллов вносили клетки ТНР-1. После 3-часовой инкубации проводили подсчет количества мигрировавших клеток с помощью коммерческих наборов «True count» («Becton Dickinson», США), с использованием проточного цитофлуориметра Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США). Все опыты проводили как минимум в трех повторностях. Статистическую обработку данных производили с использованием t-критерия Стьюдента и программы STATISTICA 6.0.

Результаты

Проводили изучение трансэндотелиальной миграции клеток ТНР-1 в стандартных условиях (культуральная среда), в присутствии провоспалительного цитокина TNFα (в качестве стандартного индуктора) или ССК в нижних камерах. Было показано, что интенсивность трансэндотелиальной миграции возрастала и в присутствии TNFα, и в присутствии ССК в нижней камере трансвелл. При этом ССК обладал более выраженным эффектом по сравнению с TNFα (табл. 1).

Для того чтобы оценить вклад активации эндотелиальных клеток и мигрирующих клеток в этот процесс, изучали интенсивность трансэндотелиальной миграции в тех же условиях, но с предва-

рительной 24-часовой инкубацией в присутствии ССК отдельно эндотелиальных клеток или клеток ТНР-1. Было показано, что после преинкубации эндотелиальных клеток в присутствии ССК интенсивность спонтанной ТЭМ не изменялась. При этом в случае миграции в присутствии ССК в нижней камере происходило достоверное усиление ТЭМ по сравнению с контролем. А интенсивность ТЭМ в присутствии TNFα после преинкубации эндотелиальных клеток с бактериальными компонентами снижалась до уровня спонтанной (табл. 1). Преинкубация клеток ТНР-1 в присутствии ССК приводила к двукратному снижению интенсивности спонтанной и индуцированной ТЭМ.

Распознавание консервативных структур бактерий эукариотическими клетками запускает каскад внутриклеточных реакций, приводящих к фосфорилированию транскрипционного фактора NF-κB и последующей активации клеток. Проводили исследование уровня экспрессии фосфо-NF-κB в эндотелиальных клетках и клетках ТНР-1 в присутствии исследуемых факторов. Было выявлено, что ЭК имели исходно низкий уровень экспрессии фосфо-NF-κB, который не изменялся после их инкубации в присутствии ССК. Напротив, в присутствии TNFα уровень экспрессии фосфо-NF-κB достоверно повышался (табл. 2). Исследование экспрессии фосфо-NF-κB в клетках линии ТНР-1 выявило достоверное повышение уровня фосфорилирования этой киназы только под влиянием стандартного индуктора TNFα (табл. 2).

Известно, что миграция лейкоцитов в субэндотелиальное пространство осуществляется по градиенту концентрации хемоаттрактантов, роль которых могут выполнять не только хемокины, но и сами бактериальные компоненты [6, 8, 11]. В дальнейших экспериментах изучали хемоаттрактантное действие компонентов пиогенного стрептококка в сравнении с хемоаттрактантным действием липотейхоевой кислоты из пиогенного стрептококка, липополисахарида грамотрицательных бактерий и провоспалительного цитокина TNFα. Для этого клетки инкубировали в трансвеллах в присутствии исследуемых веществ в нижней камере.

ССК, помещенный в нижнюю камеру трансвелл, статистически достоверно усиливал миграцию клеток ТНР-1 (табл. 3). Остальные исследуемые факторы таким эффектом не обладали, миграция клеток в присутствии липотейхоевой кислоты, липополисахарида и TNFα не отличалась от миграции клеток в контроле. Очевидно, что усиленная миграция клеток в присутствии ССК могла быть связана как с его хемоаттрактантным эффектом (направленная миграция), так и увеличением подвижности клеток (ненаправленная миграция). Поэтому исследовали

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ССК И TNF α НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ КЛЕТОК ТНР-1

Инкубация в присутствии в нижней камере	Концентрация мигрировавших клеток в нижней камере (кл/мл, M \pm SD)		
	без преинкубации	после преинкубации в присутствии ССК (24 ч) клеток EA.hy926	после преинкубации в присутствии ССК (24 ч) клеток ТНР-1
культуральной среды (контроль)	182,5 \pm 45,74 (n = 15)	218,9 \pm 66,57 (n = 9)	82,2 \pm 38,40 (n = 9)
ССК	405,7 \pm 128,22*** (n = 11)	427,1 \pm 56,77*** (n = 5)	158,9 \pm 158,52 (n = 7)
TNF α	298,8 \pm 72,02*** (n = 4)	215,9 \pm 4,13 (n = 3)	85,9 \pm 78,79 (n = 4)

Примечание. *** – различия статистически достоверны по сравнению с контролем (p < 0,001).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ССК И TNF α НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ФОСФО-NF- κ B В КЛЕТКАХ ЛИНИИ EA.HY 926 И КЛЕТКАХ ЛИНИИ ТНР-1

Инкубация в присутствии	Уровень экспрессии фосфо-NF- κ B (MFI, M \pm SD)	
	в клетках линии EA.hy 926, (n = 8)	в клетках линии ТНР-1, (n = 4)
культуральной среды (контроль)	247,1 \pm 30,84	174,2 \pm 25,268
ССК	245,5 \pm 24,39	182,3 \pm 16,78
TNF α	394,3 \pm 133,46**	254,1 \pm 65,93*
контроль изотипических антител	178,5 \pm 36,5	120 \pm 26,21

Примечание. ** – различия статистически достоверны по сравнению с контролем, при p < 0,01; * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем, p < 0,05.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИЙ И TNF α НА МИГРАЦИЮ КЛЕТОК ЛИНИИ ТНР-1

Инкубация в присутствии в нижней камере	Концентрация мигрировавших клеток в нижней камере (кл/мл, M \pm SD)	
	без преинкубации (n = 6)	после преинкубации в присутствии ССК (n = 4)
культуральной среды	229,8 \pm 24,56	67,7 \pm 19,77
ССК	1200,6 \pm 628,37**	335,2 \pm 287,82
липотейхоевой кислоты	197,7 \pm 90,66	99,7 \pm 30,29
липополисахарида	185,1 \pm 52,03	66,6 \pm 3,74
TNF α	201,1 \pm 32,81	67,9 \pm 4,92

Примечание. ** – различия статистически достоверны по сравнению с контролем, при p < 0,01.

зависимость миграции клеток ТНР-1 от присутствия ССК в верхней и нижней камерах трансвелл (рис. 1).

Интенсивность миграции клеток ТНР-1 в присутствии ССК только в верхней камере достоверно не отличалась от уровня миграции клеток в контроле. Интенсивность миграции клеток ТНР-1 в присутствии лизата и в верхней, и в нижней камерах была достоверно ниже, чем интенсивность миграции в присутствии лизата только в нижней камере, но выше, чем в контроле. Таким образом, ССК усиливал и направленную, и ненаправленную миграцию клеток ТНР-1.

Так же как и в случае трансэндотелиальной миграции, предварительная 24-часовая инкубация клеток ТНР-1 в присутствии ССК в разы подавляла спонтанную и индуцированную миграцию этих клеток (табл. 3). Для уточнения ме-

ханизмов такого ингибирующего действия изучали влияние ССК на апоптоз/некроз клеток ТНР-1 и процессы метаболизма. Было показано, что в присутствии ССК не происходило снижения жизнеспособности клеток ТНР-1. Доля клеток в состоянии некроза/апоптоза в присутствии ССК не отличалась от доли клеток в состоянии некроза/апоптоза в контроле (данные не представлены). Исследования метаболизма клеток также не выявили отличий между уровнем метаболизма клеток в стандартных условиях культивирования по сравнению с уровнем метаболизма клеток после их инкубации с ССК (данные не представлены).

Согласно данным литературы, ведущую роль в регуляции процессов миграции клеток играет киназа фокальных адгезионных контактов – Focal Adhesion Kinase (FAK) [16]. Снижение

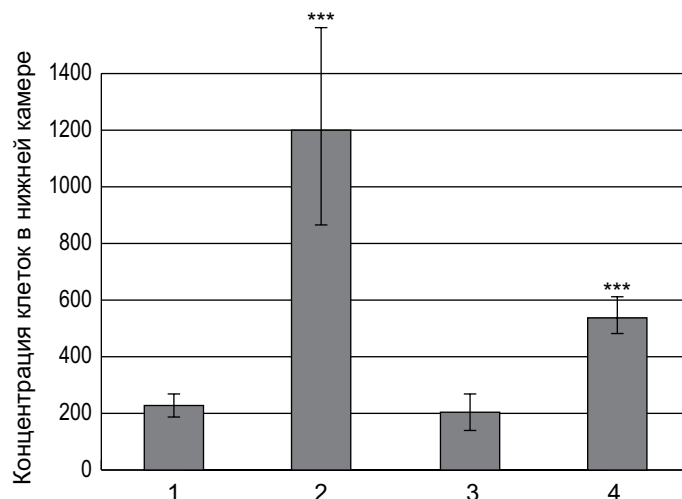


Рисунок 1. Зависимость миграции клеток ТНР-1 от присутствия ССК в верхней и нижней камерах трансвелл

Примечание. Концентрация клеток в нижней камере после миграции в присутствии:

1 – культуральной среды; 2 – ССК только в нижней камере; 3 – ССК только в верхней камере; 4 – ССК и в верхней и в нижней камере.

*** – различия статистически достоверны по сравнению с контролем, при $p < 0,001$.

интенсивности ТЭМ и миграции после 24 ч инкубации в присутствии ССК могло быть обусловлено снижением подвижности клеток.

Для проверки этого предположения изучали влияние ССК на уровень экспрессии фосфо-FAK в клетках ТНР-1. Исследования показали, что после 30 мин инкубации клеток в присутствии ССК уровень фосфорилирования этой киназы не изменялся (табл. 4), в то время как 24-часовая инкубация приводила к достоверному снижению экспрессии ее исходно высокого уровня.

Большинство эндогенных хемоаттрактантов и хемоаттрактанты бактериального происхождения взаимодействуют с клеткой через рецепторы, связанные с G-белками, – G-protein-coupled receptors (GPCR) [6, 11].

Изучали зависимость интенсивности трансмиграции клеток ТНР-1 в присутствии ССК после их преинкубации в присутствии токсина коклюша, который блокирует сигнал от GPCR. Было показано, что 16-часовая преинкубация клеток с коклюшным токсином вызывала достоверное трехкратное снижение спонтанной ТЭМ. Интенсивность ТЭМ в присутствии индукторов (ССК и TNF α) после инкубации клеток с коклюшным токсином снижалась в 7-8 раз (табл. 5).

Обсуждение

В данной работе в качестве стандартного вещества, усиливающего трансэндотелиальную миграцию клеток линии ТНР-1, нами был выбран провоспалительный цитокин TNF α . Механизмы усиления ТЭМ лейкоцитов, индуцированные TNF α , в настоящее время хорошо изучены. Известно, что под влиянием этого цитокина на эндотелиальных клетках происходит повышение экспрессии адгезионных молекул – селектинов (которые опосредуют роллинг лейкоцитов), молекул иммуноглобулинового суперсемейства – ICAM-1, VCAM-1 (в комплексе с тетраспанинами, обеспечивающих прочную адгезию и формирование синапсов между ЭК и лейкоцитами) [3, 13]. TNF α индуцирует перераспределение латерально расположенных адгезионных молекул семейства JAM и молекул PECAM-1 на апикальную поверхность эндотелиальной клетки, диссоциацию и латеральную диффузию VE-кадгеринов [8]. Усиление секреции воспалительных хемокинов эндотелиальными клетками является необходимым условием для активации и повышения аффинности интегринов на лейкоцитах, обеспечивает градиент

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ИНКУБАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ССК НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ФОСФО-FAK В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ТНР-1

Инкубация в присутствии	Уровень экспрессии фосфо-FAK (MFI, M \pm SD) после (n = 3)	
	30 мин инкубации	24 ч инкубации
культуральной среды (контроль)	840,5 \pm 72,01	659,0 \pm 30,67
ССК	852,5 \pm 41,73	493,4 \pm 97,55**
контроль изотипических антител	120,0 \pm 26,21	125,6 \pm 41,88

Примечание. ** – различия статистически достоверны по сравнению с контролем, при $p < 0,01$.

ТАБЛИЦА 5. ВЛИЯНИЕ ПРЕИНКУБАЦИИ КЛЕТОК ТНР-1 С КОКЛЮШНЫМ ТОКСИНОМ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ИХ ТРАНСЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ МИГРАЦИИ

Инкубация в присутствии в нижней камере	Изменение интенсивности миграции (%), $M \pm SD$ *	
	без преинкубации с токсином	преинкубация с токсином
культуральной среды (контроль)	100,0 \pm 25,68 (n = 5)	21,8 \pm 4,26 (n = 5) ^{***}
ССК	277,2 \pm 68,40 (n = 5)	49,3 \pm 24,23 (n = 5) ^{***}
TNF α	158,7 \pm 63,69 (n = 3)	22,5 \pm 4,48 (n = 5) ^{**}

Примечание. За 100% принимали концентрацию клеток в нижней камере в контроле без преинкубации клеток с коклюшным токсином.

^{***} – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим значением интенсивности миграции без преинкубации с коклюшным токсином при $p < 0,001$.

^{**} – различия статистически достоверны по сравнению с соответствующим значением интенсивности миграции без преинкубации с коклюшным токсином при $p < 0,01$.

концентраций для их направленной миграции в субэндотелиальное пространство [12, 14]. Большинство из описанных изменений находится под контролем транскрипционного фактора NF- κ B [13, 15]. При изучении свойств ССК нами было выявлено значительное усиление ТЭМ. Однако при этом ни на эндотелиальных клетках, ни на клетках ТНР-1 не изменялся уровень экспрессии фосфо-NF- κ B. Ранее проведенные исследования показали, что инкубация эндотелиальных клеток в присутствии ССК повышает секрецию провоспалительных хемокинов, но не изменяет уровень экспрессии адгезионных молекул [1, 2]. В совокупности эти результаты указывают на то, что в основе усиления ТЭМ клеток ТНР-1 под влиянием ССК лежат механизмы, отличные от описанных при усилении ТЭМ этих клеток в присутствии TNF α . Так, эксперименты с преинкубацией ЭК и клеток ТНР-1 в присутствии ССК выявили, что усиление ТЭМ под влиянием компонентов пиогенного стрептококка было связано с изменением свойств самих мигрирующих, а не эндотелиальных клеток. Важная роль в регуляции трансэндотелиальной миграции отводится сигналам от рецепторов, связанных с G-белками, лигандами которых являются хемоаттрактантные белки (компоненты комплемента, хемокины, компоненты бактерий) [11]. На этапе роллинга и адгезии сигналинг от GPCR приводит к повышению аффинности интегринов на лейкоцитах и индуцирует их кластеризацию. Кроме описанных эффектов, хемоаттрактанты контролируют формирование лейкоцитами протрузий, их направленную миграцию к базальной поверхности эндотелиальных клеток и далее во внеклеточном матриксе [7, 9]. Наши исследования показали, что ССК проявлял в отношении клеток ТНР-1 свойства хемоаттрактанта. Доказательством этого послужило наличие направленной миграции клеток ТНР-1 по градиенту концентрации ССК (рис. 1). Блокирование сигналинга от GPCR коклюшным токсином полностью подавляло спонтанную и индуцированную влиянием ССК и TNF α трансмиграцию клеток

ТНР-1 (табл. 5). Следовательно, как спонтанная, так и индуцированная миграция ТНР-1 зависела от присутствия в системе хемоаттрактантов, которые являются лигандами GPCR. Связывание GPCR на клетках ТНР-1 с лигандами в составе ССК могло приводить к изменению конформации и повышению аффинности β 2-интегринов на этих клетках. В этом случае взаимодействия интегринов на клетках ТНР-1 с адгезионной молекулой ICAM-2, которая экспрессируется на эндотелиальных клетках, конститутивно могли опосредовать прочную адгезию клеток ТНР-1 к эндотелию [9]. Это объясняет результаты ранее проведенных исследований, в которых было показано усиление интенсивности адгезии клеток ТНР-1 к монослою эндотелиальных клеток без повышения уровня экспрессии адгезионных молекул [1]. Примечательно, что TNF α не обладал хемоаттрактантным действием в отношении клеток ТНР-1 (табл. 3). Однако преинкубация клеток ТНР-1 с токсином коклюша также снижала интенсивность ТЭМ в присутствии TNF α (рис. 1). Таким образом, усиление ТЭМ, индуцированное ССК, связано как с его собственным хемоаттрактантным действием, так и с действием хемокинов, секреция которых индуцируется в этих условиях. Очевидно, что усиление ТЭМ в присутствии TNF α происходит только благодаря действию хемокинов, т.к. сам цитокин не является хемоаттрактантом для клеток ТНР-1.

Известно, что патогенные бактерии в качестве стратегии выживания выработали разнообразные механизмы подавления и дисрегуляции защитных реакций организма хозяина [4, 5, 8]. Полученные нами результаты показали, что ССК усиливал хемотаксис и ТЭМ клеток ТНР-1, в то время как 24-часовая инкубация клеток ТНР-1 в присутствии ССК перед проведением эксперимента, напротив, подавляла оба эти процесса, что сопровождалось снижением уровня фосфорилирования киназы фокальных адгезионных контактов. Фокальные адгезионные контакты представляют собой комплекс белков, которые связывают поверхность клетки с актиновым ци-

тоскелетом, играют важную роль в подвижности клетки и ее взаимодействии с внеклеточным матриксом [16]. Одними из первых идентифицированных хемоаттрактантов для лейкоцитов являются бактериальные N-формилпептиды, такие как N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLF). Рецепторы для fMLF на эукариотических клетках (высокоаффинный – FPR и низкоаффинный – FPRL1) принадлежат к семейству рецепторов, связанных с Gi-белками. Связывание fMLF с его высокоаффинным рецептором приводит не только к активации различных функций лейкоцитов, но и блокирует их ответ на другие хемоаттрактанты. Это явление получило название десенситизации гетерологичных рецепторов [11]. Не исключено, что снижение миграционной активности клеток после их инкубации с компонентами стрепто-

кокка также было связано с десенситизацией GPCR. Подавление миграционной активности лейкоцитов при длительной инкубации в присутствии компонентов пиогенного стрептококка может приводить к снижению эмиграции мононуклеарных фагоцитов в региональные лимфоузлы и подавлять дальнейшее развитие специфического иммунного ответа.

В данном исследовании получены убедительные доказательства того, что усиление ТЭМ клеток ТНР-1 в присутствии компонентов пиогенного стрептококка связано с хемоаттрактантным влиянием на клетки ТНР-1 и не связано с его влиянием на свойства эндотелиальных клеток. При стрептококковой инфекции механизмы миграции лейкоцитов из кровеносного русла в ткани в очаг воспаления и далее в лимфоузлы могут отличаться от общепринятых классических представлений.

Список литературы

1. Лебедева А.М., Старикова Э.А., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. Компоненты *Streptococcus pyogenes* изменяют активность адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 4-5. – С. 321-322.
2. Старикова Э.А., Соколов Д.И., Чернова А.А., Бурова Л.А., Сельков С.А., Фрейдлин И.С. Влияние бактериальных лигандов паттерн распознающих рецепторов моноцитоподобных клеток ТНР-1 на их трансэндотелиальную миграцию // Медицинская иммунология. – 2008. – Т. 10, № 6. – С. 605-613.
3. Старикова Э.А., Фрейдлин И. С., Соколов Д.И., Сельков С.А. Изменения свойств эндотелиальных клеток линии EA.hy.926 под влиянием TNFальфа, IFNгамма и IL-4 // Иммунология. – 2005. – № 2. – С. 83-87. Ссылки 4-15 см. в References (смр. 464). See References for numbers 4-15 at p. 464.

References

1. Lebedeva A.M., Starikova E.A., Burova L.A., Freydlin I.S. Komponenty *Streptococcus pyogenes* izmenyayut aktivnost' adgezii monotsitov k endotelial'nym kletkam [Components of *Streptococcus pyogenes* alter the activity of monocytes adhesion to the endothelial cells]. *Meditinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 2011, vol. 13, no. 4-5, pp. 321-322.
2. Starikova E.A., Sokolov D.I., Chernova A.A., Burova L.A., Sel'kov S.A., Freydlin I.S. Vliyanie bakterial'nykh ligandov pattern raspoznayushchikh retseptorov monotsitopodobnykh kletok ТНР-1 na ikh transendotelial'nyuyu migratsiyu [Influence of bacterial ligands pattern recognition receptors on the ТНР-1 cells transendothelial migration]. *Meditinskaya immunologiya – Medical Immunology*, 2008, vol. 10, no. 6, pp. 605-613.
3. Starikova E.A., Freydlin I.S., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Izmeneniya svoystv endotelial'nykh kletok linii EA.hy.926 pod vliyaniem TNFalfa, IFNgamma i IL-4 [Endothelial cells line EA.hy.926 properties alterations under the influence of TNF α , IFN γ and IL-4]. *Immunologiya – Immunology*, 2005, no. 2, pp. 83-87.
4. Blander J.M., Sander L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature reviews*, 2012, vol. 12, pp. 215-225.
5. Bhavsar A.P., Guttman J.A., Finlay B.B. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*, 2007, vol. 449, pp. 827-834.
6. Bokoch M.G. Chemoattractant Signaling and Leukocyte Activation. *Blood*, 1995, vol. 86, no. 5, pp. 1649-1660.
7. Imhof B.A., Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews*, 2004, vol. 4, pp. 432-444.
8. Johnston B., Butcher E.C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Seminars in immunology*, 2002, vol. 14, pp. 83-92.
9. Le Y., Li B., Gong W., Shen W., Hu J., Dunlop N.M., Oppenheim J.J., Wang J.M. Novel pathophysiological role of classical chemotactic peptide receptors and their communications with chemokine receptors. *Immunological Reviews*, 2000, vol. 177, pp. 185-194.
10. Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I., Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, vol. 7, no. 9, pp. 678-689.
11. Mantovani A., Bussolino F., Martino I. Cytokine regulation endothelial cell function: from molecular level to bedside. *Immunology today*, 1997, vol. 1, pp. 231-239.
12. Fernandez-Borja M., van Buul J.D., Hordijk P.L. The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovascular Research*, 2010, vol. 86, pp. 202-210.
13. Middleton J., Patterson A.M., Gardner L., Schmutz C., Ashton B.A. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 12, pp. 3853-3860.
14. Petri B., Phillipson M., Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *The Journal of Immunology*, 2008, vol. 180, pp. 6439-6446.
15. Tomar A., Schlaepfer D.D. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2009, vol. 21, no. 5, pp. 676-683.