

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ФАГОЦИТОЗА *ESCHERICHIA COLI* ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ МЫШИ

© В. В. Милюкене,^{1,*} Г. Ю. Бизюлявичене,^{2,3} Л. П. Хаустова,¹
А. В. Пилинкене,³ Г. А. Бизюлявичюс³

¹Институт биохимии, Вильнюс, ²Естественнонаучный факультет Вильнюсского университета
и ³Институт иммунологии Вильнюсского университета, Литва;
*электронный адрес: valemt@bchi.lt

Методом флуориметрии были исследованы количественные параметры фагоцитоза меченных флуоресцеином клеток *Escherichia coli* перитонеальными макрофагами мыши. Клетки *E. coli* конъюгировали с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), а затем инкубировали с макрофагами. Фагоцитоз останавливали добавлением лизирующего раствора (0.5%-ный раствор Тритона X-100 в 0.01 М фосфатном буфере на 0.15 М физиологическом растворе, рН 7.4). Трипановый синий в концентрации 0.04 % применяли как гасящий агент для различения прикрепившихся и переваривающихся клеток *E. coli*. Анализ показал, что фагоцитоз клеток *E. coli* зависит от температуры и опсонизации бактерий. Число клеток *E. coli*, переваренных макрофагами, быстро увеличивалось в первые 60 мин инкубации при 37 °С. Для достижения оптимального поглощения клеток *E. coli* необходима их опсонизация 5%-ной нативной сывороткой. Поглощение неопсонированных бактерий макрофагами было ниже, чем опсонированных ($P < 0.05$). Показано, что азид натрия вызывает дозозависимое угнетение фагоцитоза клеток *E. coli* перитонеальными макрофагами.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, макрофаги, фагоцитоз, флуориметрия.

Принятые сокращения: РКЗ — рецептор 3-го компонента комплемента, ФИТЦ — флуоресцеинизотиоцианат, ФФБ — физиологический раствор на фосфатном буфере, Fc_γR — Fc-рецептор для иммуноглобулина G.

Escherichia coli — распространенная грамтрицательная бактерия — является частью нормальной бактериальной флоры животных и человека. Штаммы *E. coli*, как правило, непатогенны, хотя известны и отдельные патогенные, продуцирующие высокоактивные токсины, поражающие организм человека и теплокровных животных (Gyles, 1994; Nagy, Fekete, 1999). Накоплена достаточно обширная информация о непатогенных штаммах *E. coli*. Между тем патогенность *E. coli* изучена плохо. С другой стороны, непатогенные штаммы *E. coli* широко применяются в исследованиях благодаря их быстрому росту (время их удвоения составляет лишь 20 мин). Поэтому анализ фагоцитоза *E. coli* макрофагами и характеристики взаимодействия бактерии и фагоцита могут иметь клиническое значение для диагностики заболеваний, связанных с *E. coli*.

Фагоцитоз — это первичный механизм, с помощью которого иммунная система устраняет внеклеточные патогенные микроорганизмы (Bassoe et al., 2000). Макрофаги являются специализированными клетками при защите хозяина против инфекций благодаря их способности переваривать и убивать бактерии. Оптимальный фагоцитоз зависит от сывороточных опсонов (главным образом иммуноглобулинов и компонентов комплемента) на поверхности мишени (Lehmann et al., 2000).

Целью нашего исследования была оценка (с помощью флуориметрии) количественных параметров фагоцитоза

E. coli перитонеальными макрофагами мыши. Кроме того, оценивали факторы, влияющие на фагоцитоз, — опсонизация, температура и время.

Материал и методика

Культивирование *E. coli*. Штамм HB101 *E. coli* выращивали в среде LB (1%-ный триптон, 0.5%-ный дрожжевой экстракт и 1%-ный раствор хлорида натрия) на возвратном вибраторе (150 об/мин). После культивирования в течение ночи при 37 °С бактерии собирали центрифугированием, дважды промывали 0.01 М физиологическим раствором на 0.15 М фосфатном буфере (ФФБ), рН 7.4, и 1 раз дистиллированной водой. Бактерии инактивировали в течение 60 мин на водяной бане при 56 °С.

Мечение бактерий флуоресцеином. $1 \cdot 10^9$ убитых нагреванием *E. coli* отмывали в ФФБ и далее инкубировали в 2.5 мл 0.1 М карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9.0, содержащего 500 мкг изомера 1 флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ; Sigma, США), в течение 60 мин при 4 °С. После перемешивания в течение 60 мин при 4 °С клетки энергично промывали несколько раз охлажденным на льду ФФБ и 1 раз дистиллированной водой. После каждого промывания производили центрифугирование. Было найдено, что надосадочная жидкость, полу-

ченная после последнего центрифугирования, не содержит ФИТЦ. Меченные флуоресцеином клетки *E. coli* хранили в малом количестве сбалансированного солевого раствора Хенкса при pH 7.4.

Мыши. Все процедуры были проведены в соответствии с нормативами Европейского Союза и получили разрешение Комитета по этике Института иммунологии Вильнюсского университета (Литва). Мыши BALB/c обоего пола в возрасте от 4 до 8 нед массой 24 ± 2 г были получены от одной и той же организации. Животных содержали в стандартных условиях, они получали пищу и воду *ad libitum*.

Получение макрофагов. Индукцию макрофагов вызывали интраперитонеальным введением адьюванта Фрейнда (по 0.5 мл на животное). Через 2 сут мышей забивали и промывали брюшную полость 5 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса, содержащего 2 мкл гепарина. Экссудат освобождали от крови. Клеточную взвесь инкубировали 3 ч при 37 °C в сбалансированном солевом растворе Хенкса в атмосфере 5 % CO₂. Через 3 ч макрофаги прочно прикреплялись к стеклянной поверхности. Затем среду удаляли и прикрепившиеся клетки энергично промывали сбалансированным солевым раствором Хенкса для удаления неприкрепившихся клеток. Жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию трипановым синим (Merck, Darmstadt, Германия), всегда составляла 98 %. Около 96 % прикрепленных клеток обладали морфологическими и тинкториальными характеристиками макрофагов.

Получение сыворотки. Использовали нормальную сыворотку мыши. Мышей надежно наркотизировали хлороформом и обескровливали с помощью пункции сердца. Цельной крови давали свернуться в течение 60 мин при комнатной температуре, затем выдерживали 2 ч при 4 °C. Сыворотку удаляли центрифугированием при 1000 г в течение 20 мин при 4 °C и разделяли на аликвоты по 100 мкл. Для выяснения зависимости фагоцитоза от опсононов часть сыворотки инактивировали при 56 °C в течение 30 мин и тоже разделяли на аликвоты по 100 мкл. Оба типа сывороток хранили при -70 °C. В каждом эксперименте аликвоты размораживали перед употреблением.

Опсонизация бактерий. Меченные флуоресцеином клетки *E. coli* опсонизировали инкубацией в течение 1 ч при 37 °C с 5%-ной сывороткой или с 5%-ной инактивированной сывороткой мыши. После опсонизации сыворотку удаляли центрифугированием для устранения избытка опсононов.

Оценка фагоцитоза. Меченные флуоресцеином клетки *E. coli* суспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса и добавляли к прикрепленным фагоцитам в концентрации $5 \cdot 10^5$ в 1 мл. Конечное соотношение бактерий и макрофагов (50 : 1, 100 : 1, 200 : 1 или 400 : 1) проверяли в конечном объеме 500 мкл. После инкубации при 0 или 37 °C в течение различного времени фагоциты промывали 3 раза раствором ФФБ и аспирировали для удаления непереваренных клеточных частиц. Поверхностную флуоресценцию гасили, добавляя к суспензии 100 мкл 0.04%-ного раствора трипанового синего в ФФБ, pH 4.5, на 2 мин. Затем клетки солубилизировали добавлением 500 мкл 0.5%-ного Тритона X-100 (BDH Chemicals, Poole, Англия) в 0.15 М физиологическом растворе на 0.01 М фосфатном буфере, pH 7.4. После этого раствор переносили в кювету флуоресцентного спектрофотометра (MPF-4, Hitachi, Токио, Япония) и измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбужде-

ния и излучения соответственно 493 и 520 нм. Число фагоцитированных клеток определяли по интенсивности флуоресценции, используя калибровочную прямую. Все эксперименты повторяли как минимум трижды.

Для изучения угнетения фагоцитоза азидом натрия (Sigma, США) клетки *E. coli* добавляли к макрофагам в конечном соотношении 400 : 1. Клетки инкубировали 60 мин при 37 °C как в присутствии Na₃N (1—100 мМ) в конечном объеме 500 мкл, так и без него. Фагоцитоз измеряли флуоресцентным методом, описанным выше.

Для всех представительных экспериментов были рассчитаны средние величины и их средние отклонения. Статистическую достоверность различий между величинами определяли, используя *t*-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $P < 0.05$. Все расчеты производили с помощью программы Microsoft Excel, версия 7.0.

Результаты и обсуждение

Цель нашего исследования заключалась в оценке флуориметрическим методом количественных параметров фагоцитоза клеток *E. coli* перитонеальными макрофагами мыши — скорости фагоцитоза и влияния на нее температуры и опсонизации. В ходе всего эксперимента была использована одна и та же группа клеток *E. coli*, меченных ФИТЦ. Включение метки оказалось стабильным в течение как минимум 1 года при температуре хранения -20 °C. Эксперименты проводили на убитых нагреванием клетках *E. coli* и прикрепившихся стеклу перитонеальных макрофагах мышей. Мы использовали убитых нагреванием *E. coli* в соответствии с сообщением предыдущих авторов (Kai et al., 2000). По интенсивности флуоресценции, измеренной на флуоресцентном спектрофотометре, меченых клеток *E. coli* определяли их число, пользуясь калибровочной прямой. Для ее построения использовали разные концентрации клеток *E. coli* (от 10⁴ до 10⁶ в 1 мл). Проведенное исследование показало, что интенсивность флуоресценции меченых клеток *E. coli* прямо пропорциональна их концентрации (рис. 1). Следует отметить, что калибровочную прямую получали параллельно в каждом эксперименте.

Фагоцитоз клеток *E. coli* оценивали через 10, 20, 30, 40, 50, 60 или 120 мин инкубации их с макрофагами. Ис-

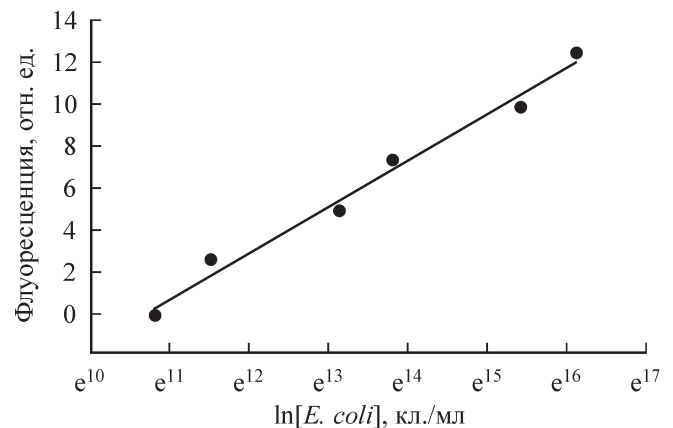


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации меченых ФИТЦ клеток *E. coli*.

Представлен 1 из 8 повторяющихся экспериментов.

пользуя традиционную световую микроскопию, мы столкнулись с рядом трудностей при выявлении различий между бактериями, прикрепленными к наружной поверхности фагоцитов, и бактериями, уже интернализированными, т. е. внутри фагоцитов. Поэтому мы использовали трипановый синий как гаситель неинтернализированных меченных флуоресцеином *E. coli*. Такой подход был заимствован нами из работы, в которой изучали фагоцитоз меченных флуоресцеином клеток *Cryptococcus neoformans* моноцитами и макрофагами, используя флуоресцентный многоканальный считыватель (Walenkamp et al., 2000). В указанные временные точки мы добавляли трипановый синий для гашения не подвергнутых фагоцитозу клеток *E. coli* и измеряли флуоресценцию. Как фагоцитированные, так и нефагоцитированные клетки *E. coli* не поглощали трипановый синий, и, таким образом, результаты интенсивности флуоресценции не были искажены. Интересно отметить, что не было статистически достоверных различий интенсивности флуоресценции макрофагов, обработанных и не обработанных трипановым синим ($P > 0.5$; данные не показаны). Полученные результаты подтвердила флуоресцентная микроскопия, результаты которой коррелировали с данными флуориметрии.

Анализ динамики поглощения клеток *E. coli* макрофагами мышей проводили при 0 и 37 °С. Для определения максимальной скорости фагоцитоза сравнивали различные соотношения клеток *E. coli* и макрофагов (50 : 1, 100 : 1, 200 : 1 и 400 : 1). Было найдено, что оптимальным является соотношение 400 : 1, которое и было использовано во всех последующих экспериментах. Поглощение опсонированных и неопсонированных клеток *E. coli*, измеренное флуориметрическим методом, показано на рис. 2. При 37 °С скорость переваривания клеток *E. coli* макрофагами оставалась приблизительно линейной в течение 30 мин, а затем (через 60 мин) выходила на плато (рис. 2, а). Скорость переваривания неопсонированных клеток *E. coli* макрофагами также зависела от времени (рис. 2, б). Однако не было выявлено значительных различий в скорости фагоцитоза между опсонированными 5%-ной нативной сывороткой и неопсонированными *E. coli*. Более того, было очевидно, что фагоцитоз клеток *E. coli* макрофагами зависит от температуры и что не происходит ассоциации между фагоцитирующими клетками и бактериями при 0 °С (рис. 2, в, г). Наши данные указывают на то, что высшее число фагоцитированных бактерий достигалось через 60 мин при 37 °С (рис. 2, а), а затем 1 макрофаг переваривал приблизительно 70 клеток *E. coli*. Наши результаты также показывают, что при 37 °С поглощение опсонированных бактерий макрофагами значительно выше, чем неопсонированных. Как видно на рис. 2, б, 1 макрофаг переваривает приблизительно 40 неопсонированных клеток *E. coli* ($P < 0.05$). Напротив, поглощение при 0 °С как опсонированных 5%-ной нативной сывороткой клеток *E. coli* (рис. 2, в), так и неопсонированных клеток (рис. 2, г) было практически одинаковым ($P > 0.5$). Как видно на рис. 2, для эффективного фагоцитоза строго требуется опсонизация.

Недавно была опубликована работа о количественных параметрах фагоцитоза клеток *E. coli* (Klein et al., 2000), в которой авторы применили флуориметрический планшетный считыватель для изучения роли белка, связывающего липосахариды, в фагоцитозе грамотрицательных бактерий альвеолярными макрофагами. Наши данные подтверждают эти результаты. Известно, что опсонизация бактерий является важным механизмом защиты

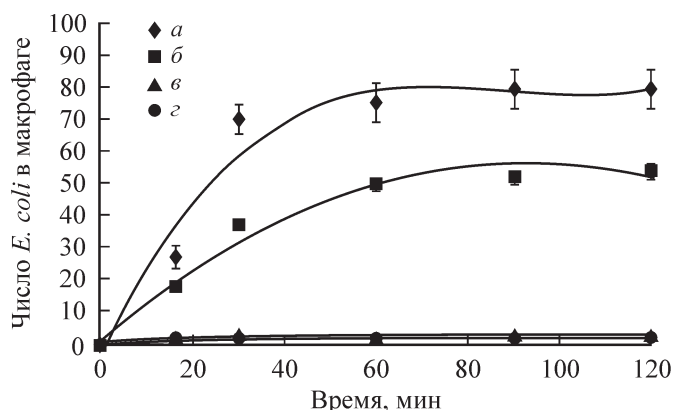


Рис. 2. Динамика фагоцитоза клеток *E. coli* перитонеальными макрофагами мышей при 37 (а, в) и 0 (б, г) °С.

а, в — опсонированные; б, г — неопсонированные *E. coli*.

клеток, так как она способствует фагоцитозу и убивает чужеродные организмы (McCloy, Salo, 2000). Также было охарактеризовано влияние опсонизации на фагоцитоз нейтрофилами, но на моноцитах эти события не были адекватно изучены. Штейгбигель и сотрудники (Steigbigel et al., 1974) сообщили, что фагоцитоз *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* более выражен у нейтрофилов, чем у моноцитов. Причина этих различий неясна, но, возможно, она связана с поверхностными рецепторами Fc_γR и PK3, которые, как известно, участвуют в процессах фагоцитоза, или же с какими-то трудностями, обусловленными выделением и очищением моноцитов (May et al., 2000).

Предстоит выяснить, какой из этих рецепторов наиболее важен для взаимодействия бактерий и фагоцитов. Нагревание сыворотки приводит к инактивации компонента и в конечном итоге к угнетению фагоцитоза, опосредованного рецепторами комплемента. Известно, что макрофаги мышей обладают рецепторами Fc иммуноглобулина IgG (Mejorada, 1998; May et al., 2000). Когда термолabile сывороточные опсонины были инактивированы, IgG служил основным опсоном для клеток *E. coli*. Результаты нашего исследования показывают, что в инактивированной сыворотке число клеток *E. coli*, переваренных 1 макрофагом через 60 мин фагоцитоза, было

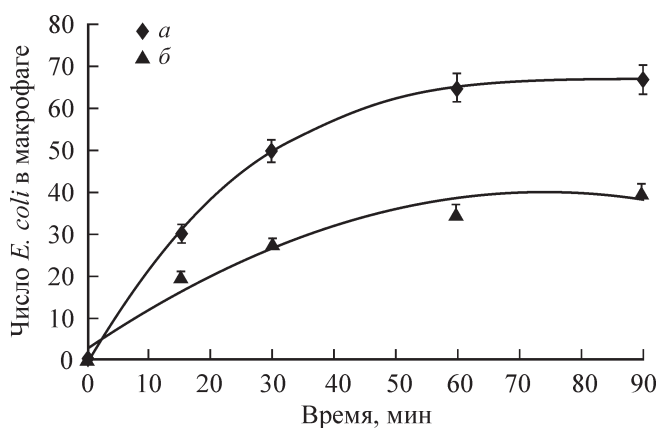


Рис. 3. Фагоцитоз перитонеальными макрофагами клеток *E. coli*, опсонированных (а) и инактивированной сывороткой мышей (б).

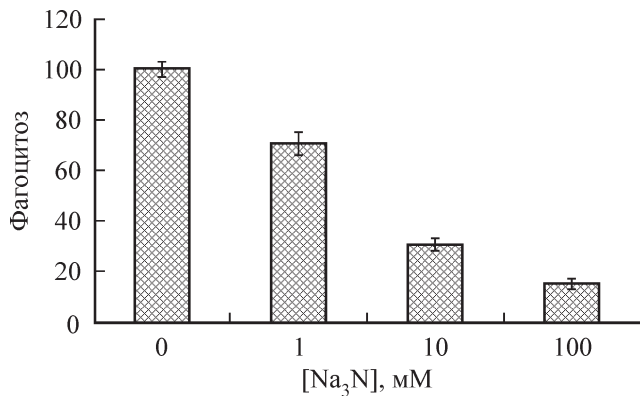


Рис. 4. Влияние азид натрия на фагоцитоз опсонированных полной сывороткой клеток *E. coli* перитонеальными макрофагами мышей.

ниже, чем в контроле, приблизительно на 50 % (рис. 3). Тогда количество клеток *E. coli*, переваренных 1 макрофагом (по данным флуориметрического определения), объясняется фагоцитозом макрофагов с помощью FcR лишь наполовину, а вторая половина фагоцитоза, по-видимому, осуществляется другими рецепторами — скорее всего, рецепторами комплемента. Однако в данной работе мы не проводили прямого измерения компонентов комплемента на мембране — это будет целью нашего дальнейшего исследования. Кроме того, необходимо дальнейшее исследование рецепторов опсониннов для общего понимания механизмов, лежащих в основе фагоцитоза *E. coli* макрофагами мышей.

Наконец, мы исследовали действие азид натрия как метаболического ингибитора фагоцитоза опсонированных клеток *E. coli*. Как видно на рис. 4, азид натрия дозозависимо угнетал фагоцитоз *E. coli*. В концентрации 100 мМ азид натрия снижал фагоцитоз приблизительно до уровня 15 % от контроля ($P < 0.05$). Наши результаты расходятся с данными других авторов, ранее показавших, что свежеполученные макрофаги мышей могут повышать свою способность переваривать *Pseudomonas aeruginosa* после короткого действия азид натрия (Heale, Speert, 2001). Однако сравнивать наши результаты и результаты других авторов неправомерно, так как цели и экспериментальные условия соответствующих исследований были различными. Целью упомянутых авторов (Heale, Speert, 2001) было показать, как легочные и перитонеальные макрофаги мыши фагоцитируют неопсонированные клетки *P. aeruginosa*, и исследовать факторы, предположительно контролируемые такие фенотипические различия. Разница между нашими данными и данными других авторов может объясняться различными объектами и использованными методами.

Представленные здесь материалы могут быть легко использованы для анализа взаимодействий между фа-

гоцитами и другими микроорганизмами. Кроме того, результаты этого исследования можно использовать для диагностики различных инфекционных заболеваний, связанных, с одной стороны, с неполноценными фагоцитарными функциями, а с другой — с микробными инфекциями.

Авторы благодарны Аурелии Варнайте за техническую помощь.

Работа выполнена при финансовой поддержке Литовского государственного фонда науки и научных исследований (проекты Т-04049 и Т-05016).

Список литературы

- Bassoe C. F., Smith I., Sornes S., Holstensen A., Lehmann A. K. 2000. Concurrent measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods*. 22 : 202—220.
- Gyles C. L. 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International. 91—364.
- Heale J. P., Speert D. P. 2001. Protein kinase C agonists enhance phagocytosis of *P. aeruginosa* by murine alveolar macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 69 : 158—160.
- Kai K., Komine K., Komine Y., Kuroishi T., Kozutsumi T., Kobayashi J., Ohta M., Kitamura H., Kumagai K. 2000. Lactoferrin stimulates a *Staphylococcus aureus* killing activity of bovine phagocytes in the mammary gland. *Microbiol. Immunol.* 46 : 187—198.
- Klein R. D., Su G. L., Schmidt C., Aminlari A., Steintraesser L., Alarcon W. H., Zhang H. Y., Wang S. C. 2000. Lipopolysaccharide-binding protein accelerates and augments *Escherichia coli* phagocytosis by alveolar macrophages. *J. Surg. Res.* 94 : 159—166.
- Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A. 2000. Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 243: 229—242.
- May R. C., Caron E., Hall A., Machesky L. M. 2000. Involvement of the Arp 2/3 complex in phagocytosis mediated by Fc_γR or CR3. *Nature Cell. Biol.* 2 : 246—248.
- McClockey P., Salo R. J. 2000. Flow cytometric analysis of group B Streptococci phagocytosis and oxidative burst in human neutrophils and monocytes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27 : 59—65.
- Mejorada G. S. 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J. Leukocyte Biol.* 63: 521—533.
- Nagy B., Fekete P. Z. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet. Res.* 30 : 259—284.
- Steigbigel R. T., Lambert L. H., jr., Remington J. S. 1974. Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J. Clin. Invest.* 53 : 131—142.
- Walenkamp A. M. E., Scharringa J., Scramel F. M. N. H., Coenjaerts F. E. J. 2000. Quantitative analysis of phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by adherent phagocytic cells by fluorescence multi-well plate reader. *J. Microbiol. Methods.* 40 : 39—45.

Поступила 12 V 2005

DETERMINATION OF QUANTITATIVE PARAMETERS OF *ESCHERICHIA COLI* PHAGOCYTOSIS
MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

V. V. Miliukienė,^{1,*} G. J. Biziulevičienė,^{2,3} L. P. Chaustova,¹ A. V. Pilinkienė,¹ G. A. Biziulevičius³

¹Institute of Biochemistry, Vilnius, ²Faculty of Natural Sciences, University of Vilnius,
and ³Institute of Immunology, University of Vilnius, Lithuania;
*e-mail:valem@bchi.it

The fluorometric method was used to study quantitative parameters of phagocytosis of fluorescein-labeled *Escherichia coli* cells by mouse peritoneal macrophages. *E. coli* cells were conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and then incubated with macrophages. At the end of the assay phagocytosis was arrested with a lysing solution (0.5 % Triton X-100 in 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline, pH 7.4). Trypan blue at a concentration of 0.04 % was used as a quenching agent to differentiate between attachment and ingestion of *E. coli* cells. The time course analysis within this method showed that phagocytosis of *E. coli* cells was temperature and opsonin dependent. The number of *E. coli* cells ingested by macrophages increased rapidly during the initial 60 min of incubation at 37 °C. *E. coli* cells required opsonization with 5 % native serum to achieve their optimal uptake. The uptake of nonopsonized bacteria by macrophages was significantly lower than that of opsonized ones ($P < 0.05$). It was demonstrated that sodium azide inhibited phagocytosis of *E. coli* cells by mouse peritoneal macrophages in a dose-dependent manner.

Key words: *Escherichia coli*, macrophages, phagocytosis, fluorometric assay, quantitative parameters.