

## ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО РЕЖИМА ОПСОНИЗАЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Обоснована оптимальная процедура опсонизации рекомбинантного штамма *Escherichia coli* K12, несущего luxCDABE гены *P.leiognathi*, с использованием нормального иммуноглобулина человека, в отличие от прочих потенциальных опсононов (интактной и термоинактивированной сыворотки крови, комплемента) не оказывающего в отношении данного микроорганизма бактерицидного эффекта и минимально изменяющего уровень его исходной биолюминесценции. Показано, что опсонизированные подобным образом рекомбинантные штаммы *E.coli* вызывают дозозависимую стимуляцию люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофильных фагоцитов, а сами при подобном контакте демонстрируют прогрессирующее падение уровня биолюминесценции, природа которого предположительно определяется поглощением и внутриклеточным киллингом бактериальных клеток.

Аналитические методы, основанные на использовании феномена люминесценции (свечения, возникающего в ходе биохимических реакций), получают все большее распространение в современной биологии и медицине. В значительной степени это определяется тем, что уже к началу 80-х годов XX века технологии детекции излучения в оптическом диапазоне достигли чувствительности, позволяющей считать отдельные кванты [1]. Дополнительным важным преимуществом люминесцентных датчиков оказалось и их быстродействие, определившее возможность проведения исследований в режиме реального времени.

Среди разработанных на данной основе технологий люминесцентного анализа биологических жидкостей и клеточных суспензий широкую известность приобрел метод люминолзависимой хемилюминесценции фагоцитов [2, 3], в основу которого была положена способность химического вещества – люминола при окислении генерировать свечение с максимумом эмиссии при 425 нм, что позволило количественно оценивать выраженность «окислительного взрыва», формирующегося при активации фагоцитов.

Однако на этом фоне нерешенной остается задача оценки киллинга клеток-мишеней при фагоцитозе, являющегося наиболее интегральным показателем его эффективности и до последнего времени требующего использования трудоемких бактериологических техник [4]. Перспективные же пути решения данной проблемы связаны с использованием в качестве фагоцитируемых объектов рекомбинантных штаммов микроорга-

низмов с клонированными lux-операми морских люминесцирующих бактерий, способных генерировать спонтанное свечение с максимумом 495 нм [5]. При этом интенсивность падения уровня биолюминесценции потенциально должна являться пропорциональной доле бактериальных клеток, в отношении которых в этих условиях развивается киллинговый эффект.

Одним из аспектов создания технологии оценки эффективности фагоцитоза в режиме реального времени, использующей принцип одновременного уровня биолюминесценции бактериальных клеток-мишеней и хемилюминесценции фагоцитов, является разработка оптимального метода опсонизации рекомбинантных люминесцирующих бактерий, что и определило цель настоящего исследования.

Важность процедуры опсонизации (предварительной обработки объектов для фагоцитоза сывороткой крови) определяется тем, что она существенно повышает уровень активации фагоцитов за счет взаимодействия расположенных на их поверхности Fc- и C3b-рецепторов с соответствующими сывороточными компонентами, фиксирующихся на поверхности фагоцитируемых частиц [6]. При этом в качестве наиболее распространенных объектов для фагоцитоза обычно используют клетки стафилококка, частицы зимозана или латекса, каждый из которых, интенсивно адсорбируя на своей поверхности антитела или компоненты системы комплемента, не повреждаются при контакте с ними.

В то же время основная масса созданных к настоящему времени рекомбинантных люминесцирующих бактерий являются предста-

вителями семейства Enterobacteriaceae, что объясняется совместимостью их FMN-редуктаз с люциферазами морских микроорганизмов родов *Photobacterium* и *Vibrio*, чрезвычайно важной для воспроизведения феномена биолюминесценции в гетерологичной системе [7]. Будучи же типичными представителями грамотрицательных микроорганизмов, подобные рекомбинантные микроорганизмы эффективно повреждаются присутствующими в сыворотке крови опсонизирующими факторами [8], что в контексте поставленной задачи является абсолютно нежелательным эффектом.

Для устранения данного недостатка нами была проведена серия экспериментов по опсонизации одного из рекомбинантных люминесцирующих микроорганизмов – *Escherichia coli* K12 TG1 (lux+) с клонированными luxCDABE генами *P.leiognathi* 54D10 [9], в которой в качестве действующих агентов использовались как сыворотка крови (пул сывороток 20 здоровых доноров), так и ее отдельные компоненты. В качестве таковых в отдельных экспериментальных сериях выступал иммуноглобулин (коммерческий препарат нормального иммуноглобулина человека), белки системы комплемента (комплемента морской свинки), альбумин (бычий сывороточный альбумин – БСА), яичный лизоцим, а также выделенный по оригинальной технологии тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), любезно предоставленный Ю.Б.Ивановым (ИКиВС УрО РАН).

В качестве основных критериев возможности использования названных факторов для опсонизации рекомбинантных микроорганизмов использовали отсутствие выраженного бактерицидного эффекта, минимальное воздействие на уровень их

биолюминесценции, а также достаточный уровень окислительного взрыва нейтрофилов периферической крови человека, формирующийся при добавлении к ним опсонизированных подобным образом бактерий. При этом наличие и выраженность бактерицидного эффекта оценивали нефелометрически и по результатам высева на плотные питательные среды, воздействие на уровень биолюминесценции определяли в кинетическом режиме с использованием биохемилюминметра БХЛМ-8802М (СКТБ «Наука», Красноярск),

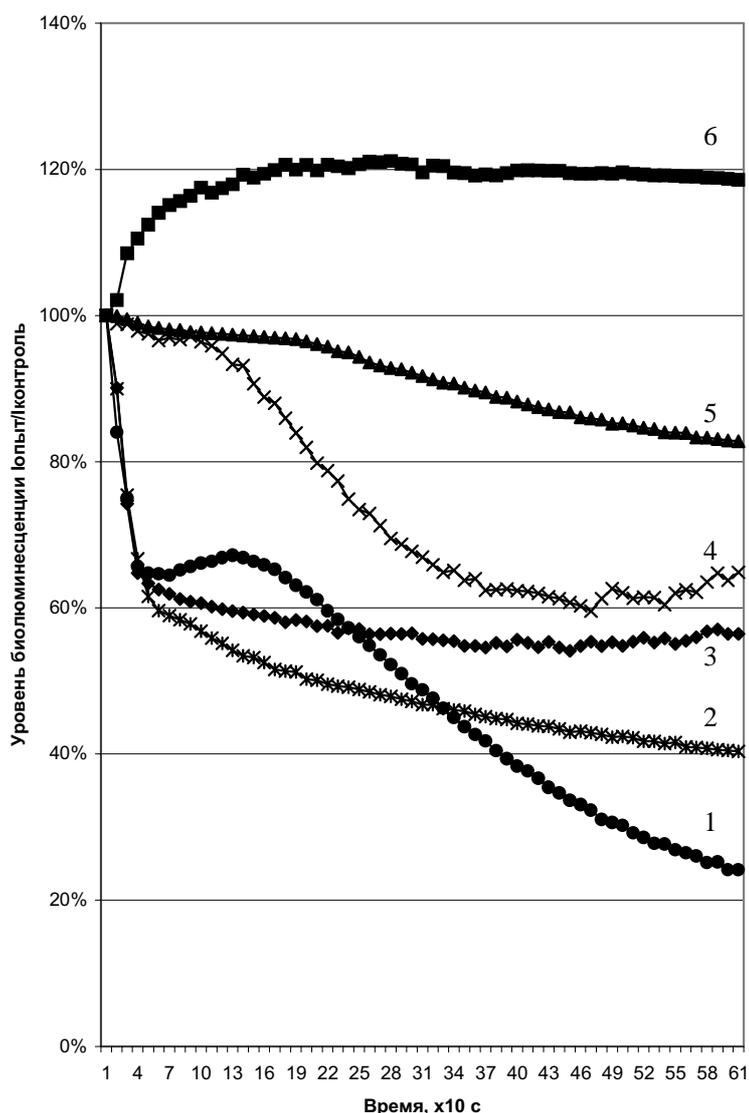


Рисунок 1. Кинетика биолюминесценции рекомбинантного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 (lux+) с клонированными luxCDABE генами *P.leiognathi* 54D10 при воздействии сыворотки крови (1) и ее отдельных компонентов: комплемента (2), альбумина (3), тромбоцитарного катионного белка (4), лизоцима (5) и иммуноглобулинов (6).

а уровень активации нейтрофилов периферической крови человека, выделенных на двойном градиенте фиколл/верографин [10] анализировали методом хемилюминесцентного анализа [2,3] с использованием люминола (Sigma, США). В последнем случае объектом исследования являлся также полученный авторами настоящей статьи нелюминесцирующий вариант *Escherichia coli* K12 TG1 (lux-).

Результаты исследования взаимодействия рекомбинантного штамма *E.coli* K12 TG1 (lux+) с сывороткой крови позволили зафиксировать типичные фазные изменения уровня свечения [11], интенсивность которых зависела от используемой концентрации действующего агента и на разных фазах сопровождалась или не сопровождалась развитием бактерицидного эффекта (рисунок 1).

В первые 15-45 секунд контакта *E.coli* (lux+) с сывороткой крови регистрировалась быстрая ингибция свечения, достигающая до  $37,1 \pm 3,2\%$  от его исходного уровня, но не связанная с развитием бактерицидного эффекта. Последующий анализ природы подобного явления позволил связать его с присутствием в сыворотке крови значительного количества (до 50 г/л) альбумина, проявляющего способность к неспецифическому связыванию миристинового альдегида и через истощение данного субстрата ведущего к подавлению активности бактериальной люциферазы [12]. При этом доказательствами подобного предположения являлось аналогичное ингибирующее воздействие очищенного БСА на уровень биолюминесценции, в равной степени выраженный как в отношении целых клеток, так и выделенных из них ферментных систем генерации свечения, а также сохранение подобного эффекта в термоинактивированной ( $56^{\circ}\text{C}$ ) сыворотке крови.

Основным содержанием второй фазы явилось временное повышение интенсивности свечения до  $10,8 \pm 1,3\%$  от ранее достигнутых значений, коррелирующее с регистрируемой по изменению оптической плотности агрегацией (микроагглютинацией) бактериальных клеток. Сходные эффекты могли быть воспроизведены при использовании фракции нормальных иммуноглобулинов, индуцирующих дозозависимую стимуляцию

свечения (рисунок 1), что позволяет связать природу второй фазы эффекта цельной сыворотки крови с присутствием в ней названного действующего агента.

В свою очередь третья фаза эффекта сыворотки крови на *E.coli* K12 TG1 (lux+) заключалась в прогрессирующем снижении уровня его люминесценции, на этот раз пропорционального количеству гибнущих клеток-мишеней. Среди присутствующих в сыворотке крови факторов в развитии подобных эффектов могли принимать участие белки системы комплемента, тромбоцитарный катионный белок и лизоцим, каждый из которых оказывал на анализируемые параметры ингибирующее воздействие, по своей выраженности убывающее в ряду «комплемент>ТКБ>лизоцим» (рисунок 1). При этом наибольшее ингибирующее действие комплемента на уровень бактериальной биолюминесценции, достигающее  $60,0 \pm 5,0\%$  от контрольных значений, частично может объясняться присутствием в составе данного коммерческого препарата фракции альбуминов, определяющих развитие начального, не связанного с бактерицидностью эффекта. В то же время результатом активации системы комплемента при контакте с рекомбинантным штаммом *E.coli* K12 TG1 (lux+) являлась последующая прогрессирующая ингибция его свечения как следствия развивающегося во времени бактерицидного эффекта в отношении данных клеток-мишеней.

Таким образом, как цельная сыворотка крови, так и отдельные присутствующие в ней факторы, могли оказывать выраженное ингибирующее воздействие на уровень свечения рекомбинантного люминесцирующего штамма *E.coli* K12 TG1 (lux+), в ряде случаев за счет развития в отношении него бактерицидного эффекта (таблица). По этой причине в качестве единственного фактора, потенциально используемого для опсонизации данного микроорганизма, должен быть признан препарат нормальных иммуноглобулинов человека как не оказывающий ингибирующего воздействия на уровень его свечения и не ведущий к гибели бактериальных клеток-мишеней. При этом исследование эффектов различных концентраций иммуноглобулинов и позволило

констатировать, что при их использовании в количестве <math><1,0 \text{ мг/мл}</math> на E.coli K12 TG1 (lux+) в течение 10 мин эффект стимуляции свечения не выходил за границу  $\pm 20\%$  от исходного, что по существующим представлениям считается допустимым уровнем внешнего воздействия [9].

Полученные результаты явились основой для проведения следующей серии экспериментов, посвященных изучению уровня активации фагоцитов (нейтрофилов периферической крови человека) при их взаимодействии с *E.coli* K12 TG1, предварительно обработанными нормальным иммуноглобулином человека в описанных выше режимах. При этом для опсонизации использовался нелюминесцирующий вариант данного штамма (lux-), что позволило исключить эффект «перекрывания» люминолзависимой

хемилюминесценции фагоцитов и биолюминесценции бактериальных клеток-мишеней.

Проведение подобных исследований позволило констатировать, что увеличивающиеся концентрации нормального человеческого иммуноглобулина в диапазоне от 0,14 до 0,56 мг/мл позволяют достичь возрастающего опсонизирующего эффекта в отношении клеток *E.coli* K12 TG1 (lux-), регистрируемого по степени «окислительного взрыва» нейтрофилов периферической крови (рисунок 2а). Так, последние, используемые при соотношении бактерии: фагоциты равном 100:1, проявляли развивающуюся во времени активацию, регистрируемую по уровню их люминолзависимой хемилюминесценции с максимумом на 16,2-19,3 мин, интенсивность которой оказывалась пропорциональной концентрации используемого опсонизирующего фактора.

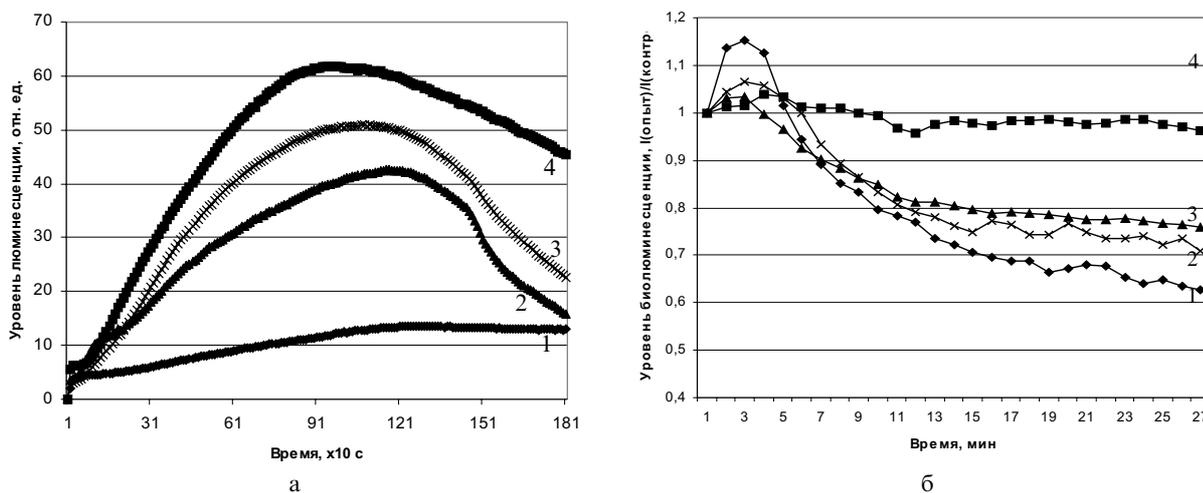


Рисунок 2. Кинетика хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови человека (А) и биолуминесценция рекомбинантного штамма *E.coli* K12 TG1 (Б) при их взаимном контакте в соотношении 1:100. Обозначения: 1 – без опсонизации; 2 – при опсонизации нормальным иммуноглобулином человека в концентрации 0,14 мг/мл; 3 – 0,28 мг/мл; 4 – 0,56 мг/мл.

Таблица. Характеристики сыворотки крови и ее отдельных компонентов, определяющие возможность их использования для опсонизации рекомбинантного штамма *Escherichia coli* K12 TG1 (lux+)

Наименование действующего фактора	Потенциальный опсонизирующий эффект	Влияние на уровень биолуминесценции (>20% от контрольных значений)	Развитие бактерицидного эффекта	Возможность использования для опсонизации
Сыворотка крови	+	+	+	-
Альбумин	-	+	-	-
Комплемент	+	+	+	-
Лизоцим	-	-	-	-
ТКБ	-	+	+	-
Иммуноглобулины	+	-	-	+

В свою очередь проведение реакции в том же режиме, но в отсутствие люминола и с использованием люминесцирующего штамма *E.coli* K12 TG1 (lux+), позволило охарактеризовать динамику изменения уровня свечения данного микроорганизма в процессе его фагоцитоза (рисунок 2б). В этом случае начальные эффекты были связаны со стимуляцией свечения клеток-мишеней до уровня на 9,1-16,3% выше исходного, что может объясняться возрастанием в их составе продуктов перекисного окисления липидов, возникающих как результат «окислительного взрыва» фагоцитов и представляющих собой субстраты для люциферазной реакции [13]. Дальнейшие же события были связаны с прогрессирующим падением уровня биолюминесценции, природа которого предположительно определялась поглощением и внутриклеточным киллингом бактериальных клеток.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют принципиальную возможность биохемилюминесцентной оценки фагоцитоза в режиме реального времени, использующей принцип динамической регистрации биолюминесценции бактерий и хемилюминесценции нейтрофилов, соответственно являющихся показателями жизнеспособности клеток-мишеней и активации

фагоцитов. Одновременно те же результаты являются обоснованием для совершенствования существующих устройств регистрации био- и хемилюминесценции с целью одновременного сочетанного или отдельного анализа обоих названных параметров.

В частности, подобная задача может быть решена параллельным измерением двух идентичных проб, отличающихся использованием (lux+) и (lux-) вариантов фагоцитируемых бактерий или, в другом варианте, проведением определения в присутствии или отсутствии люминола. Другое решение заключается в проведении измерения уровня свечения в одной пробе, но в двух диапазонах длин волн, соответствующих максимуму биолюминесценции бактерий (495 нм) и хемилюминесценции люминола (425 нм). При этом каждое из подобных решений предполагает использование не одного (как обычно), но двух оптических регистраторов, снимающих интенсивность свечения с двух изолированных проб или с одной пробы через систему отсекающих светофильтров.

Разработке подобных устройств и технологий их использования для биохемилюминесцентной оценки фагоцитоза в режиме реального времени будут посвящены наши дальнейшие исследования.

**Список использованной литературы:**

1. Bioluminescence and chemiluminescence. – NY, Acad.Press, 1981.
2. Albrecht D., Jungi T.W. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes // *J.Leukoc.Biol.* – 1993. – V.54. – P.300-306.
3. Бакуев М.М., Саидов М.З. Особенности секреции миелопероксидазы и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы // *Иммунология.* – 1991. – №1. – С.15-18.
4. Рудик Д.В., Тихомирова Е.И. Методы изучения процесса фагоцитоза и функционально-метаболического состояния фагоцитирующих клеток. – Саратов, СГУ, 2006.
5. Thouand G., Daniel P., Horry H. et al. Comparison of the spectral emission of lux recombinant and bioluminescent marine bacteria // *Luminescence.* – 2003. – V.18. – №3. – P.145 – 155.
6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // *Иммунология.* – 1995. – №3. – С.3-8.
7. Мажуль М.М., Завильгельский Г.Б., Зарубина А.П. и др. FMN-редуктаза из *Escherichia coli* и ее влияние на активность люциферазы из морских бактерий *Vibrio fischeri* // *Микробиология.* – 1999. – Т.68. – №2. – С.149-154.
8. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Причины, определяющие характер изменения бактериальной люминесценции при воздействии сыворотки крови // *Микробиология.* – 2005. – №2. – С.191-197.
9. Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е. и др. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // *Вестник МГУ. Сер.16. Биология.* – 2002. – №3. – С.20-24.
10. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. – СПб, Наука, 2000.
11. Дерябин Д.Г., Поляков Е.Г. Влияние сыворотки крови человека на уровень свечения природных и рекомбинантных люминесцирующих бактерий // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 2004. – №9. – С.311-315.
12. Makemson J.C., Hastings J.W. Bovine serum albumin interacts with bacterial luciferase // *J. Biolum. Chemilum.* – 1991. – V.6. – №2. – P.131-136.
13. Исмаилов А.Д., Берия Л.В., Данилов В.С. Ферментативный и неферментативный процессы перекисного окисления липидов в бесклеточном экстракте *Vibrio harveyi* // *Микробиология.* – 1994. – Т.63. – №3. – С.466-472

**Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 06-04-96906-р\_офи).**