



образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – 2020. – Т.56, вып. 1. – С. 61–64.

8. Красочко, П. А. Использование наночастиц серебра и меди при конструировании комплексных ветеринарных препаратов (аналитический обзор) / П. А. Красочко, М. А. Понаськов, Р. Б. Корочкин // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка: материалы Международной научно-практической конференции, г. Витебск, 2–4 ноября 2020 г. / УО ВГАВМ; ред. кол. : Н. И. Гавриченко (гл. ред.) [и др.]. – Витебск: ВГАВМ, 2020. – С. 63-69.

9. Петрицкая, Е. Н. Сравнительная характеристика антибактериального действия препаратов серебра и наносеребра *in vitro* / Е. Н. Петрицкая, Д. А. Рогаткин, Е. В. Русанова // Альманах клинической медицины. – 2016. – № 2. – С. 110–117.

10. Silver potentiates aminoglycoside toxicity by enhancing their uptake / M. Herisse [et al.] // Mol. Microbiol. – 2017. – V. 105. – P. 115–126.

УДК 57.085.23:612.017.1:615.076 (043.3)

<https://orcid.org/0000-0002-4641-4757>

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ *SACCHAROMYCES CEREVISI* ПУТЕМ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ

Красочко П.А.

доктор ветеринарных наук

доктор биологических наук

профессор

e-mail: krasochko@mail.ru

orcid id 0000-0002-4641-4757

²**Гончаров А.Е.**

кандидат медицинских наук,

доцент,

orcid id 0000-0002-4869-9864

²**Дуж Е.В.**

кандидат биологических наук

lenaduzh@gmail.com

orcid id 0000-0002-8172-9092

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

²ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

Abstract. The purpose of this research is to evaluate the immunostimulating effect of lipopolysaccharide from *Saccharomyces cerevisi* by the expression of surface markers of immunocompetent cells. Bacterial lipopolysaccharides of the producer strain *Saccharomyces cerevisi* are obtained by thermal hydrolysis in a 1% sodium hydroxide solution at 100 °C. Isolation of mononuclear cells from peripheral blood and obtaining immature DCs. A sterile Ficoll-Pak gradient with a density of 1077 g/l was poured into 15 ml propylene tubes. Monocytes were isolated from the MPC fraction by the adhesion method. A suspension of mononuclear cells (3×10⁶/ml) in a nutrient medium was poured into 12-well plates. The cells were incubated in a CO₂ incubator for 45 minutes to ensure complete adhesion of monocytes. After that, the medium with unattached cells was removed



and the wells were washed from lymphocytes with DPBS. Isolated PBMCs were cultured in AIM-V nutrient medium with the addition of cytokines: 100 ng/ml GM-CSF and 50 ng/ml IL-4 at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 6 days. Then the polysaccharides under study were added. The studies were carried out in 3–6-fold repetitions. On the surface of DCs, the expression of the following molecules was studied: class II GCS molecules - HLA-DR, costimulatory molecules CD80 and CD86, co-inhibitory molecules CD273, DC differentiation marker CD209. To determine the expression of surface molecules, cells were incubated with monoclonal antibodies. It was found that the level of expression of CD80, CD86, CD273 and HLA-DR molecules on dendritic cells (DC) was 1.5-2 times higher ($p < 0.05$) when compared with the corresponding control group, which indicates the immunobiological activity of lipopolysaccharide from *Saccharomyces cerevisi*. Key words: lipopolysaccharide, *Saccharomyces cervisi*, dendritic cells, surface markers of immunocompetent cells..

Keywords: lipopolysaccharide, *Bacillus subtilis*, dendritic cells, surface markers of immunocompetent cells

Введение

Бурное развитие иммунологии, микробиологии, химии (органического и неорганического синтеза), фармакологии и других смежных наук привело к тому, что появилось новое направление в иммунологии – иммунологическая регуляция. Приемы иммунотерапии, направленные на исправление дефекта иммунорегуляции, можно объединить общим термином «иммунокоррекция»

Из линейки иммунокорректоров или иммуностимуляторов Впоследние годы внимание исследователей привлекают бактериальные липолисахариды (ЛПС).

Строение ЛПС определяет результат иммунного ответа – будет ли бактериальная клетка распознана и уничтожена защитной системой организма-хозяина или же фагоцитоз будет предотвращен и будет обеспечено выживание бактерий.

Широкий спектр биологической активности ЛПС связывают с широким диапазоном молекулярных масс, констатируя, что физиологическая активность хорошо коррелирует с величинами молекулярных масс. Так, низкомолекулярные ЛПС (5000 - 15000) имеют тенденцию к проявлению *антикомплементарной активности*, в то время как высокомолекулярные (75000-125000) стимулируют ретикулоэндотелиальную систему. *Антикомплементарная активность* сводится к тому, что формирование мембраноатакующего комплекса происходит на О-специфических полисахаридных цепях, а не на мембране бактериальной клетки. Это защищает бактерию от лизиса.

Липополисахариды стимулируют многие защитные реакции организма: увеличивают количество лейкоцитов и их фагоцитарную активность, повышают активность системы комплемента, резистентность клеточных и субклеточных мембран к действию повреждающих агентов. Под влиянием ЛПС макрофаги, полиморфно-ядерные нейтрофилы и другие клетки продуцируют интерлейкины (ИЛ-1, ИЛ-6), простагландины, оксид азота (NO), кислородные радикалы и др.

Поликлональный активирующий эффект липополисахаридов может быть реализован без участия макрофагов и Т-лимфоцитов, хотя Т-клетки с регулирующей поликлональный ответ функцией, возможно, могут вовлекаться в процесс за счет прямого воздействия на них липополисахаридов.

Рассматривая механизм неспецифического иммуностимулирующего действия компонента микробных клеток, большинство авторов считают, что они преимущественно действуют на популяцию В-клеток, а также активируют синтез неспецифических иммуноглобулинов. Взаимодействие ЛПС со специфическими рецепторами на поверхности В-лимфоцитов сопровождается увеличением поступления ионов кальция внутрь этих клеток с последующим быстрым увеличением уровня циклического гуанидинмонофосфата и медленным нарастанием уровня циклического аденозинмонофосфата. Увеличение активности названных нуклеотидов приводит вначале к пролиферации (активность у ГМФ), а затем к



дифференцировке (активность у АМФ) лимфоцитов в плазматические клетки, синтезирующие иммуноглобулины.

Установлено, что ЛПС напрямую активируют миелоцитарный росток костного мозга, одним из проявлений которого является мегакариоцитоз и лейкоцитоз, сменяющий кратковременную лейкопению. При повторяющихся эндотоксиновых атаках вновь развивается лейкопения (как следствие истощения резервов миелопоэза). Реакция костного мозга может реализовываться и вследствие действия колониестимулирующих факторов, освобождающихся из активированных ЛПС фибробластов и эндотелиальных клеток, которые ускоряют пролиферацию и дифференцировку ряда клеток. Благодаря способности ЛПС активировать фагоцитирующие клетки происходит выброс лизосомальных энзимов, усиление метаболизма арахидоновой кислоты, ускорение кислородного метаболизма, что, с одной стороны, может быть причиной повреждения близлежащих клеток (в частности, эндотелиальных), а с другой – интенсификации процессов фагоцитоза. Последний может усиливаться способностью ЛПС обуславливать активацию синтеза гамма-интерферона, фибронектина и С3b-компонента комплемента, которые являются мощными опсонинами. Однако стимулирующим эффектом на мононуклеарные фагоциты обладают лишь низкие дозы ЛПС, тогда как более высокие, напротив, блокируют их основные функции. Дисфункция системы фиксированных макрофагов печени является одним из ключевых звеньев в развитии самой тяжелой системной реакции организма на ЛПС – эндотоксинового шока. Хорошо известны адьювантные эффекты ЛПС. Он способен вызывать пролиферацию, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, в результате чего стимулируется как клеточное, так и гуморальное звено иммунного ответа на любые антигены. Возникающие как следствие эндотоксиновой агрессии гиперпродукция цитокинов и медиаторный хаос сменяются глубокой депрессией системы фиксированных макрофагов со всеми вытекающими отсюда последствиями (включая угнетение синтетической и секреторной функции клеток-мишеней).

Учитывая высокую биологическую активность бактериальных ЛПС возникает необходимость оценки иммуностимулирующей активности этой группы иммуностимуляторов.

Известно, что при воздействии на иммунокомпетентные клетки различных иммуностимулирующих веществ происходит экспрессии поверхностных маркеров и изменения их иммунофенотипа.

Целью настоящих исследований является оценка иммуностимулирующего действия липолисахарида из *Saccharomyces cerevisi* по экспрессии поверхностных маркеров иммунокомпетентных клеток.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе кафедр микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и лаборатории иммунологии и вирусологии ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Объекты исследований

В исследованиях использовали ЛПС из *Saccharomyces cerevisi*, периферическую кровь доноров, дендритные клетки (ДК).

Материалы и реагенты

В работе использовали следующие реагенты:

- антикоагулянты: натриевая соль гепарина («Белмедпрепараты», РБ);

- питательные среды и буферные растворы:

1) DPBS для отмывки клеток, не содержащий ионов двухвалентных металлов (Biowest, Франция);

2) бессывороточная среда AIM-V для роста клеток (Gibco, США) с добавлением 0,3 г/л L-глутамина (Lonza, Швейцария), 10 mM HEPES (Gibco, США);



- ЛПС из *Bacillus subnilis* (10,2 mg/ml);
- другие реагенты: градиент плотности «фиколл-пак» (1077 г/л) (Biowest, Франция), АВ0-сыворотка (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий);
- моноклональные антитела к антигенам человека: CD80, конъюгированное с FITC; CD86, конъюгированное с PE; CD209, конъюгированное с APC; CD273, конъюгированное с PerCP-eFl1710; HLA-DR, конъюгированное с PE-Cy7.

Оборудование

- инкубатор углекислотный C150 (Bindder, США);
- шкаф ламинарный BA safe-1.2 (Белаквилон, РБ);
- центрифуга MPW (MPW-260R, Китай);
- микроскоп инвертированный (BestScope, Китай);
- цитометр Attune NxT (ThermoFisher, США).

В работе использовали следующее программы: Statistica, версия 12 (StatSoft, США); FCS Express, версия 7 (DeNovo Software, США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США).

Бактериальный липополисахаридиз штамма-производителя *Saccharomyces cerevisi* получают путем термогидролиза в 1 %-ном растворе гидроксида натрия при 100 °С в течение 60 мин, после остывания реакционной смеси до 20-22 °С осуществляют центрифугирование при 8000-10000 об/мин в течение 10 мин, доводят рН надосадочной жидкости до 1,0- 2,0 с помощью 5 %-ного раствора соляной кислоты, После образования осадка, который отделяют от надосадочной жидкости центрифугированием при 8000-10000 об/мин в течение 10 мин, а полученный липополисахарид растворяют в деионизированной воде при рН 9,0 при следующем соотношении ингредиентов, мас. %: липополисахарид штамма-производителя *Saccharomyces cerevisi* - 50 мг и деионизированная вода остальное, После, чего полученный раствор стерилизуют путем мембранной фильтрации под давлением 0,1-0,5 атм через фильтровальную установку, снабженную мембраной с размером пор 0,2 мкм. (5,6,7).

Забор донорской крови был проведен на базе Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Образцы венозной крови, объемом 50 мл каждый, помещали в маркированные стерильные полипропиленовые пробирки с антикоагулянтом – 100 мкл гепарина натрия.

Выделение мононуклеаров из периферической крови и получение незрелых ДК

В пропиленовые пробирки объемом 15 мл разливали стерильный градиент фиколл-пак с плотностью 1077 г/л в количестве 4 мл на пробирку. На градиент фиколл-пак аккуратно наслаивали 8 мл разведенной крови. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при 500g для разделения фракций. После центрифугирования слой плазмы удаляли, затем собирали кольцо МПК (мононуклеары периферической крови). Клетки переносили в чистую пропиленовую пробирку, доводили объем клеточной взвеси до 15 мл DPBS и отмывали дважды полученную суспензию клеток от градиента и тромбоцитов путем центрифугирования, 10 минут при 300g, производили подсчет в камере с сеткой Горяева.

Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии. Взвесь мононуклеаров (3×10^6 /мл) в питательной среде разливали по 12-луночным планшетах. Клетки инкубировали в CO² инкубаторе 45 минут для полной адгезии моноцитов. После чего, среду с не прикрепившимися клетками удаляли и отмывали лунки от лимфоцитов DPBS. Выделенные МПК культивировали в питательной среде AIM-V с добавлением цитокинов: 100 нг/мл ГМ-КСФ и 50 нг/мл ИЛ-4 при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ в течение 6 суток. Затем добавляли исследуемые полисахариды

Через сутки анализировали иммунофенотип и морфологию клеток.

Инкубация клеток с бактериальным ЛПС Saccharomyces cerevisi

Исследования проводили в 3–6-кратных повторях. Взвесь культуры ДК разливали по лункам 12-луночного планшета. В лунки помещали следующие вещества: лунка 1 – отрицательный контроль ДК, лунки 2–4 – ДК с рабочими растворами исследуемых веществ



бактериального ЛПС из *Saccharomyces cerevisi* в концентрации 10 мкг/мл Рабочие растворы с полученной концентрацией готовили непосредственно перед исследованием.

Для *in vitro* исследований использовали концентрации на порядок ниже, поэтому для ЛПС из *Saccharomyces cerevisi* делали несколько разведений, после чего оценивали их влияние на отвечаемость полисахаридов.

Планшеты с ДК инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ на протяжении 24 часов.

По завершении времени культивирования культуры суспендировали в лунках, взвесь помещали в пробирки, отмывали дважды в DPBS и суспендировали в 1 мл DPBS.

Определение поверхностных и внутриклеточных маркеров клеток

На поверхности ДК была исследована экспрессия следующих молекул:

- 1) молекул ГКС II класса – HLA-DR,
- 2) костимуляторных молекул CD80 и CD86,
- 3) коингибиторных молекул CD273,
- 4) маркер дифференцировки ДК – CD209.

При определении экспрессии поверхностных молекул клетки инкубировали с моноклональными антителами 15 мин при +4°С в темноте. Несвязавшиеся антитела отмывали путем центрифугирования в DPBS, после чего супернатант удаляли, а клетки ресуспендировали в 250 мкл DPBS. Учет производили на проточном цитофлуориметре.

Методы статистической обработки данных

Для статистической обработки полученных данных применяли программное обеспечение «Statistica», версия 10–12 («StatSoft», США), «StatPlus» 4.9 («AnalystSoft», США). Значения показателей, преимущественно, представлены в виде Me (25 – 75), где Me – медиана, а 25 и 75 – интерквартильный размах в виде 25-й и 75-й перцентилей. Для сравнения двух независимых выборок использовали U-критерий Манна-Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимался уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты исследований

При оценке стимулирующего действия ЛПС из *Saccharomyces cerevisi* учитывали следующие поверхностные маркеры иммунокомпетентных клеток:

HLA-DR (MHC-II) – главный комплекс гистосовместимости (MHC) класса II, антигенпредставляющая молекула для представления пептидных антигенов.

CD80 (B7-1) – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, связывается с CD28 и CTLA-4 с низкой аффинностью и быстрой кинетикой связывания, что позволяет быстрые взаимодействия между коммуницирующими клетками, экспрессируется на дендритных клетках

CD86 – мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов, экспрессированный на антиген-представляющих клетках, который действует как ко-стимулирующий сигнал для активации Т-лимфоцитов.

CD209 маркер дифференцировки ДК, представляющий собой рецептор лектина С-типа.

CD273 (B7-DC, PD-L2) Молекула B7-DC экспрессируется на ДК, регуляторных В-клетках, макрофагах, мезенхимальных стволовых клетках, клетках опухолей, в том числе, некоторых и перевиваемых клеточных линиях.

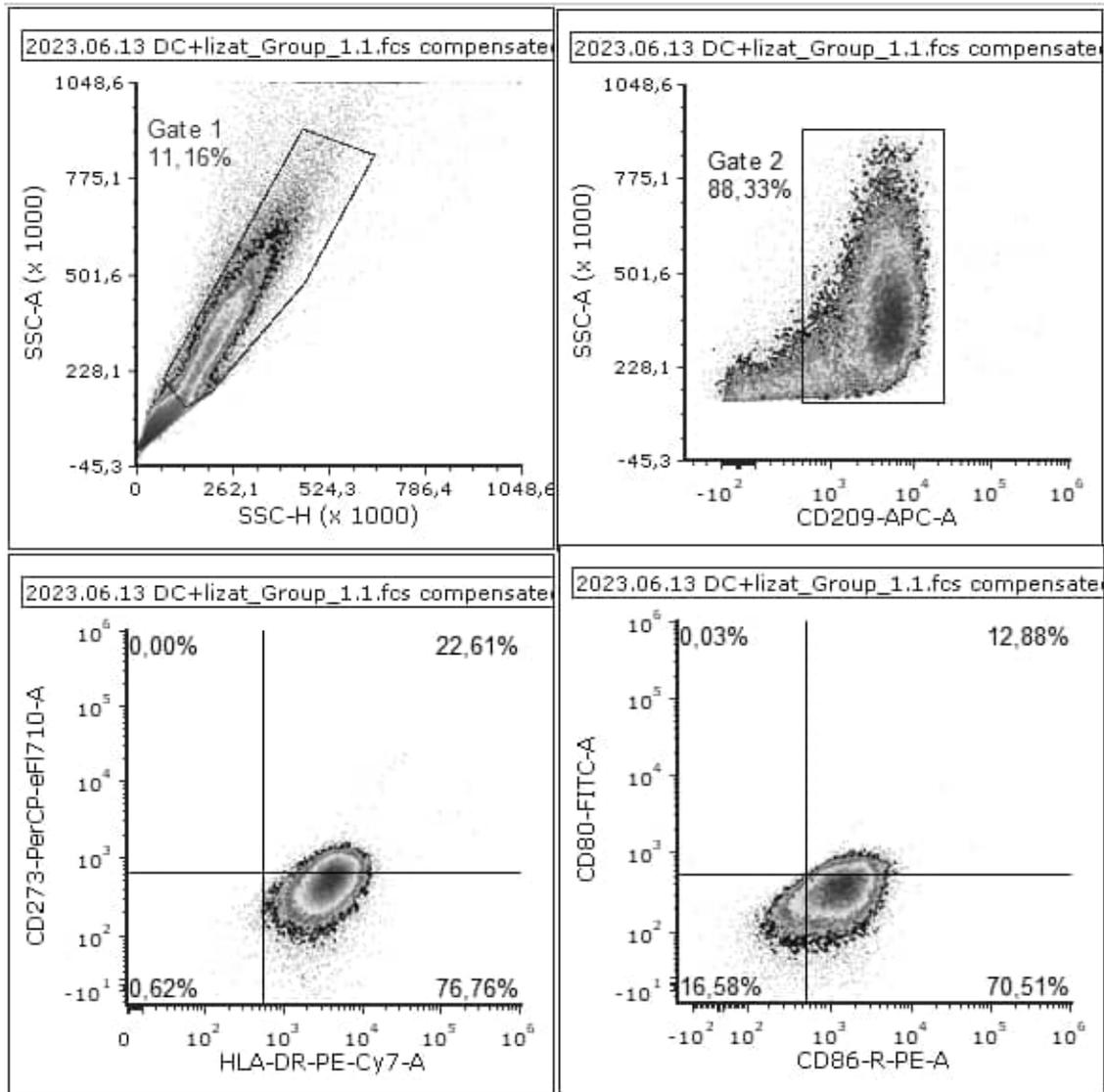


Рисунок 1. Анализ иммунофенотипа ДК, культивированных с полисахаридом из *Saccharomyces cerevisi*

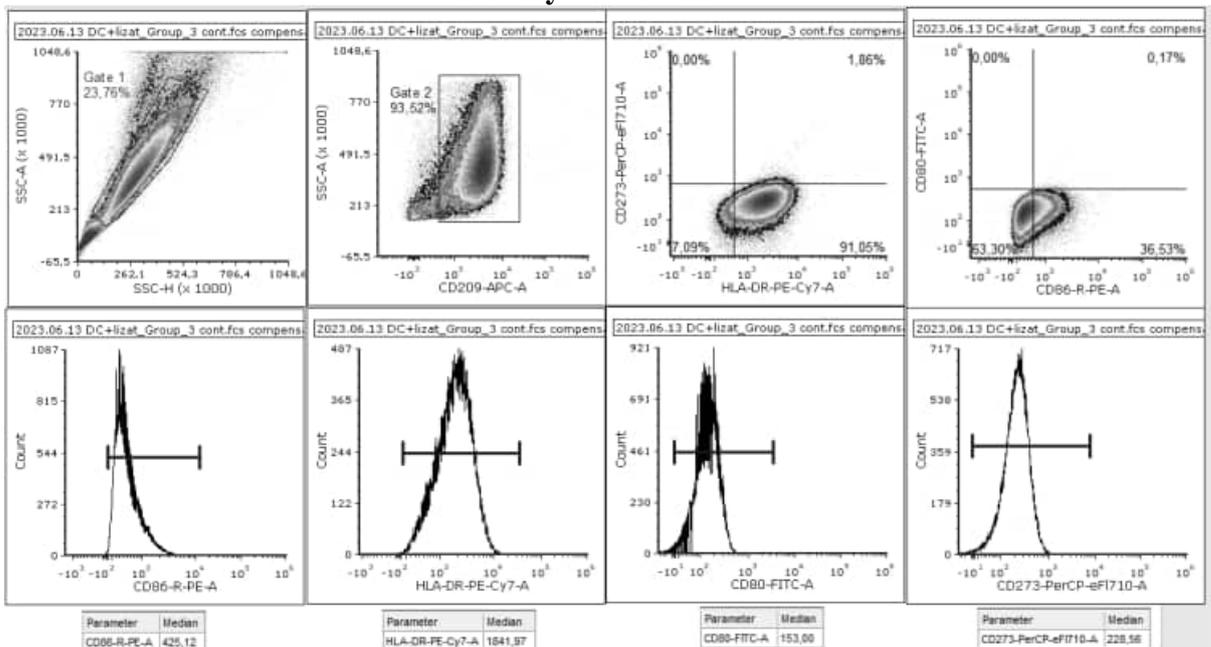


Рисунок 2. Анализ иммунофенотипа ДК (контроль)



Таблица 1. Сравнительные данные иммунофенотипирования ДК ЛПС из *Saccharomyces cerevisi*

Образцы	CD86	HLA-DR	CD80	CD273
контроль				
Me(25-75)	421(338-495)	1829(1056-1844)	151(122-163)	244(226-353)
Saccharomyces cerevisi (4,5 mg/ml)				
Me(25-75) усл. ед.	872(771-1809)	2263(2118-4284)	203(181-233)	236(230-338)
Mann-Whitney U Test	0,049534613	0,049534613	0,049534613	0,976212649

Полученные результаты проведенных исследований, представленные в таблице, показали иммунобиологическую активность исследованного ЛПС из *Saccharomyces cerevisi*.

Уровень экспрессии молекул CD80, CD86, CD273 и HLA-DR на дендритных клетках (ДК) был в 1,5-2 раза выше ($p < 0,05$) при сравнении с соответствующей контрольной группой

Библиография:

1. Патент Республики Беларусь № 22861. Иммуностимулирующий препарат для сельскохозяйственных животных // П.А.Красочко, М.В. Якубовский, Д.С.Борисовец, И.А. Красочко, Н.Ю., Щемелева, Г.Е. Толяронок, Е.С. Журавлева, Т.А.Зуйкевич . / Заявл. № а 20140748 от 31.12.2014 г., Опубликовано: 28.02.2020, Минск, 2020. – 6 с
2. Патент Республики Беларусь № 22883. Способ получения иммуностимулирующего препарата для сельскохозяйственных животных / П.А.Красочко, М.В. Якубовский, Д.С.Борисовец, И.А. Красочко, Н.Ю., Щемелева, Г.Е. Толяронок, Е.С. Журавлева, Т.А.Зуйкевич . / Заявл. № а20140749 от 31.12.2014 г., Опубликовано: 28.02.2020, Минск, 2020. – 6 с.
3. Патент Республики Беларусь № 22882 Штамм *Bacillus subtilis* – продуцент липополисахаридов, используемых для получения иммуностимулирующих препаратов для животных / П.А.Красочко, М.В. Якубовский, Д.С.Борисовец, И.А. Красочко, Н.Ю., Щемелева, Г.Е. Толяронок, Е.С. Журавлева, Т.А.Зуйкевич // Заявл. № а 20140747 от 31.12.2014 г., Опубликовано: 28.02.2020, Минск, 2020. – 6 с.
4. Amodio G., Gregori S. The discovery of HLA-G-bearing extracellular vesicles: new perspectives in HLA-G biology // *Ann Transl Med.* 2017. Vol. 5(6). P.148.
5. Li J.-G., Du Y.-M., Yan Z.-D. et al. CD80 and CD86 knockdown in dendritic cells regulates Th1/Th2 cytokine production in asthmatic mice // *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2016. Vol. 11(3). P. 878–884.
6. Rajesh K., Gupta G.S. DC-SIGN Family of Receptors // *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications.* 2012. Vol. 20. P. 773-798.
7. Hancharou A.Y., Buschik O., Prokhorov A. et al. Expression of B7-family co-inhibitory molecules by dendritic cells from pancreatic cancer patients // *J. Allergy and Clinical Immunology.* 2019.