

## ИММУНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

### БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТ-ПЕКТИНА В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ *E. COLI* И НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

М.А.Галямина<sup>1</sup>, О.В.Побегуц<sup>1</sup>, Р.Х.Фирова<sup>1</sup>, Д.В.Мосиевич<sup>1,2</sup>, З.Ф.Хараева<sup>3</sup>,  
О.М.Панасенко<sup>1</sup>, Н.Г.Балабушевич<sup>1,2</sup>, Е.В.Михальчик<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России, Москва, РФ; <sup>2</sup>Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; <sup>3</sup>ФГБОУ ВО Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М.Бербекова, Нальчик, Кабардино-Балкарская Республика, РФ

Взаимодействие с микробиотой гибридных микрочастиц ватерит-пектина как перспективного многофункционального средства для мукозальной доставки не должно провоцировать воспаление. Изучали реакцию бактерий *E. coli* лабораторного штамма Mg1655 и изолята от пациента с болезнью Крона SharL на культивирование с гибридными микрочастицами и микрочастицами ватерита и последующую активацию нейтрофилов. Микрочастицы ватерит-пектина увеличивали выход АТФ из бактерий. Для *E. coli* Mg1655 концентрация ДНК снижалась, а концентрация внутриклеточного АТФ возрастала, для *E. coli* SharL, наоборот, концентрация внутриклеточного АТФ снижалась с ростом концентрации ДНК. Бактерии и микрочастицы в смеси не усиливали активацию нейтрофилов по сравнению с частицами в среде без сыворотки и с бактериями в среде с сывороткой, а сами микрочастицы не снижали функциональную активность нейтрофилов.

**Ключевые слова:** гибридные микрочастицы ватерит-пектина; *E. coli*; нейтрофилы; АТФ

Микрочастицы ватерита (СС) и гибридные микрочастицы ватерита с включением различных биополимеров, в том числе пектина (ССР), являются перспективными многофункциональными носителями для мукозальной доставки [1,2]. Для их безопасного применения необходимо, чтобы в присутствии компонентов слизистой оболочки и микробиоты микрочастицы не оказывали провоспалительного действия — в первую очередь при воспалительных заболеваниях кишечника. Известно, что при инфильтрации нейтрофилами слизистой оболочки [3] контакт с бактериями может вызывать активацию нейтрофилов с быстрым выбросом активных форм

кислорода и галогенов [4], высвобождением бактерицидных белков (миелопероксидаза, лизоцим, лактоферрин) в результате дегрануляции, образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек и фагоцитозом [5]. Эти реакции зависят от опсонизации бактерий белками системы комплемента и иммуноглобулинами, обнаруживающимися и в кишечнике [6]. При болезни Крона патогенетическую роль адгезивно-инвазивных штаммов *E. coli* связывают с их способностью провоцировать воспаление [7-9], поэтому важно представлять характер взаимодействия между микрочастицами, бактериями и нейтрофилами. Выбор в качестве объекта исследования микрочастиц ССР обусловлен описанными антиоксидантными [10] и противовоспалительными [11] свойствами включённого в их состав пектина.

Микрочастицы СС имеют диаметр  $3.9 \pm 0.6$  мкм и практически не заряжены, а мик-

Адрес для корреспонденции: mrogova@gmail.com. Галямина М.А.

рочастицы ССР с диаметром  $2.1 \pm 0.5$  мкм обладают отрицательным поверхностным зарядом и меньшим размером пор. Адсорбция муцина микрочастицами СС усиливала активацию ими нейтрофилов, а включение в частицы пектина значительно ослабляло этот эффект [2]. Микрочастицы ватерита характеризуются высокой биосовместимостью с бактериями *E. coli* и не токсичны по отношению к ним [12]. Однако нельзя исключить возможность взаимодействия между экспонированным на поверхности частиц ССР пектином и компонентами клеточной оболочки *E. coli* и, следовательно, реакцию бактерий на культивирование их в присутствии ССР. Особый интерес представляет сравнение реакции на частицы лабораторного штамма *E. coli* K12 Mg1655 и изолята с вирулентным фенотипом от пациента с болезнью Крона SharL. Кроме того, важно понимать, может ли контакт с бактериями повлиять на активность частиц в отношении нейтрофилов, например, за счёт адсорбции липополисахаридов [13].

Цель данной работы — изучить реакцию бактерий *E. coli* лабораторного штамма Mg1655 и изолята от пациента с болезнью Крона SharL на культивирование с микрочастицами ССР и СС и последующую активацию нейтрофилов. Для этого проводили сравнительный анализ ДНК и внутри/внеклеточной концентрации АТФ при выращивании бактерий в присутствии микрочастиц СС и ССР и оценивали дыхательный взрыв нейтрофилов *in vitro* под действием бактерий и частиц по отдельности и в смеси.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали лабораторный штамм *E. coli* K12 Mg1655 и изолят *E. coli* SharL, выделенный при диагностической эндоскопии у пациента с болезнью Крона [14]. Кровь здоровых добровольцев получали на основании информированного согласия с одобрения комитета по этике ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина (Протокол 534 код Н-012, 05.02.2020 г.).

Нейтрофилы выделяли из крови здоровых добровольцев ( $N=3$ ) методом центрифугирования на двойном градиенте плотности Histopaque 1.077/1.119 г/л, как описано ранее [14].

Микрочастицы СС синтезировали, смешивая растворы  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 0.05 М трис-буфере pH 7.0. Для получения микрочастиц ССР в реакционную смесь добавляли пектин из яблок (до 5 мг/мл). Получившиеся частицы промывали бидистиллированной водой и лиофильно высушивали [2].

Культуры клеток *E. coli* выращивали в среде LB при  $37^\circ\text{C}$  и встряхивании (180 об/мин) в течение ночи. Ночную культуру разводили до 1% в среде LB и переносили по 200 мкл в лунки 96-луночного планшета. Затем к культуре добавляли образцы СС, ССР или только пектин (Р) до конечной концентрации 3 мг/мл и выращивали при  $37^\circ\text{C}$  в течение ночи. Рост бактерий оценивали по концентрации ДНК. Для этого из 200 мкл культуры выделяли ДНК с помощью бромида цетилтриметиламмония [15], концентрацию ДНК измеряли по протоколу Qubit с использованием набора для измерения ДНК (Invitrogen).

Внеклеточную концентрацию АТФ ( $\text{АТФ}_{\text{ex}}$ ) оценивали в суспензиях бактерий, а внутриклеточную ( $\text{АТФ}_{\text{in}}$ ) — после лизиса бактерий 10-кратным объёмом ДМСО. Измерения проводили с использованием люциферин-люциферазы [16] на хемилюминесцентном Lum-1200 "Дисофт".

Клеточную хемилюминесценцию (ХЛ) измеряли в пробах объёмом 0.25 мл в среде Кребса—Рингера pH 7.4 с 0.2 мМ люминола при концентрации нейтрофилов  $0.25\text{--}0.35 \times 10^6$  клеток/мл. ХЛ активировали добавлением 25 мкл образца и регистрировали амплитуду ХЛ-ответа при  $37^\circ\text{C}$ .

Для оценки секреции миелопероксидазы (МПО) нейтрофилами оценивали её остаточную активность в нейтрофилах после измерения ХЛ. Для этого микрочастицы и клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 3000 об/мин). После лизиса клеток 1% раствором Тритона X-100 оценивали активность МПО по окислению о-дианизидина, регистрируя образование окрашенного продукта после остановки реакции о-фосфорной кислотой.

Полученные результаты обрабатывали с использованием MS Excel (Microsoft Corp.) и пакета программ Statistica 12.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены в виде среднего арифметического ( $M$ )  $\pm$  стандартное отклонение ( $SD$ ). Достоверность различий между группами оценивали с использованием  $t$  критерия Стьюдента для несвязанных величин. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микрочастицы СС в концентрации 3 мг/мл не препятствовали росту бактерий штамма Mg1655 и изолята SharL, о чём свидетельствует отсутствие снижения концентрации ДНК в пробах с частицами (рис. 1, а). Пектин в этой же кон-

центрации достоверно, но в разной степени усиливал рост бактерий. По сравнению с контрольными культурами (без добавок) в присутствии микрочастиц ССР рост бактерий штамма Mg1655 усиливался, а рост бактерий изолята SharL, напротив, снижался.

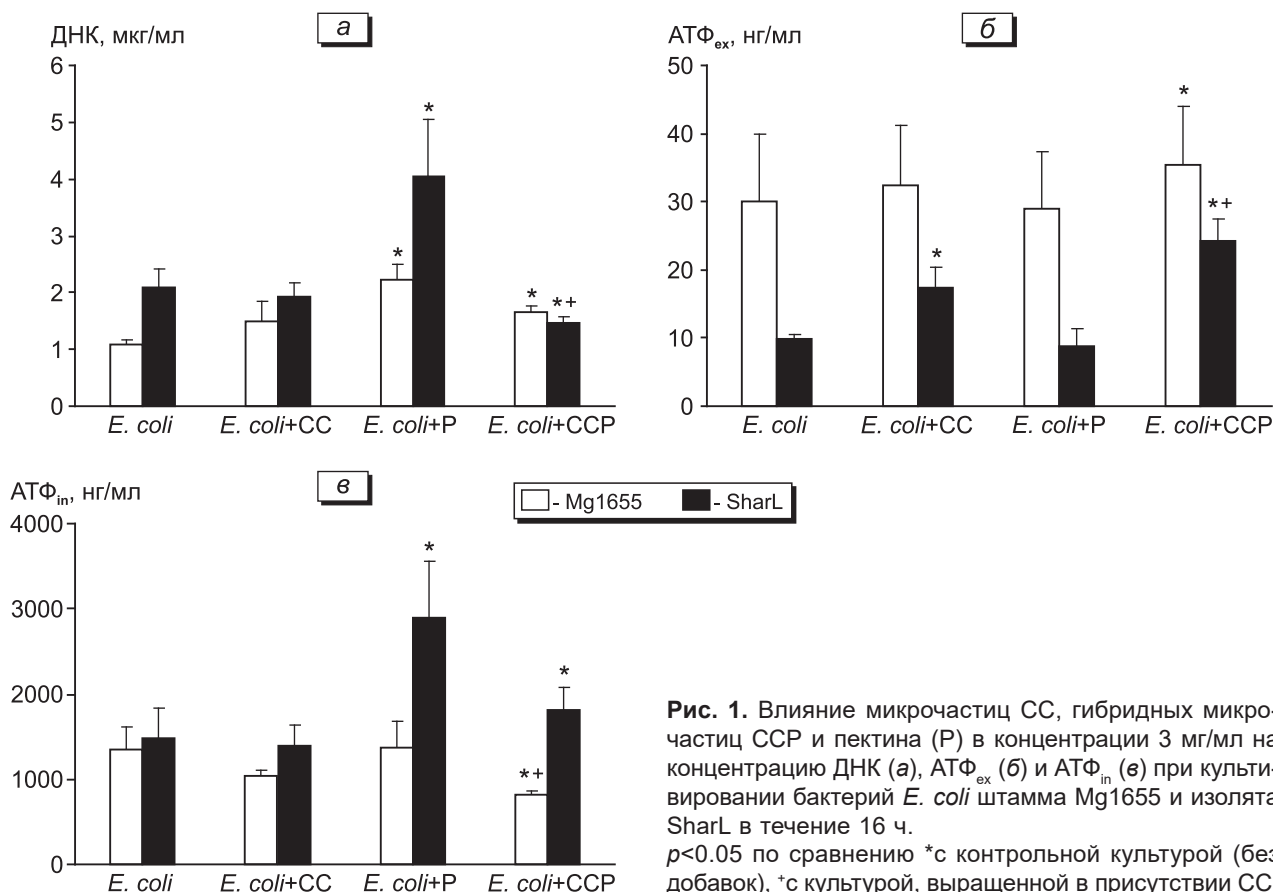
Под действием микрочастиц ССР повышалась концентрация  $АТФ_{ex}$  по сравнению с контрольной культурой; в меньшей степени аналогичный эффект оказывали микрочастицы СС в отношении изолята SharL (рис. 1, б). В то же время концентрация  $АТФ_{in}$  статистически значимо увеличивалась только при выращивании изолята SharL в присутствии пектина и микрочастиц ССР (рис. 1, в). У *E. coli* Mg1655 микрочастицы ССР вызывали снижение показателя относительно контроля (культуры без добавок) и культуры, выращенной в присутствии микрочастиц СС.

Утечка  $АТФ$  из клеток *E. coli* свидетельствует о нарушении проницаемости клеточной стенки вследствие её повреждения [16,17]. Действительно, в случае лабораторного штамма Mg1655 рост внеклеточной концентрации  $АТФ_{ex}$  регистрировался при повышенной относительно контрольной культуры концентрации ДНК, но сопровождался снижением  $АТФ_{in}$ . Для изо-

лята SharL, напротив, увеличение  $АТФ_{ex}$  при повышенной концентрации  $АТФ_{in}$  сопровождалось снижением количества ДНК в пробах с микрочастицами ССР, указывая на бактериостатический эффект.

Взаимодействие микрочастиц с компонентами бактериальных клеточных оболочек может влиять на последующую активацию нейтрофилов, например, за счёт адсорбции белков или липополисахаридов частицами.

При отсутствии сыворотки величина ХЛ-ответа нейтрофилов на суспензии бактерий с микрочастицами двух видов или отдельно с пектином не превышала величину ответа на сами частицы, что свидетельствует об отсутствии их модификации, усиливающей активацию нейтрофилов (рис. 2, а). В то же время ответ на бактерии в присутствии микрочастиц в некоторых случаях был выше, чем ответ на контрольные образцы бактерий, за счёт вклада самих частиц в активацию нейтрофилов. Это означает, что в среде без сыворотки нейтрофилы отвечали образованием АФК преимущественно на микрочастицы, а бактерии ослабляли эту реакцию, возможно, реагируя с нейтрофилами без стимуляции дыхательного взрыва. Пектин

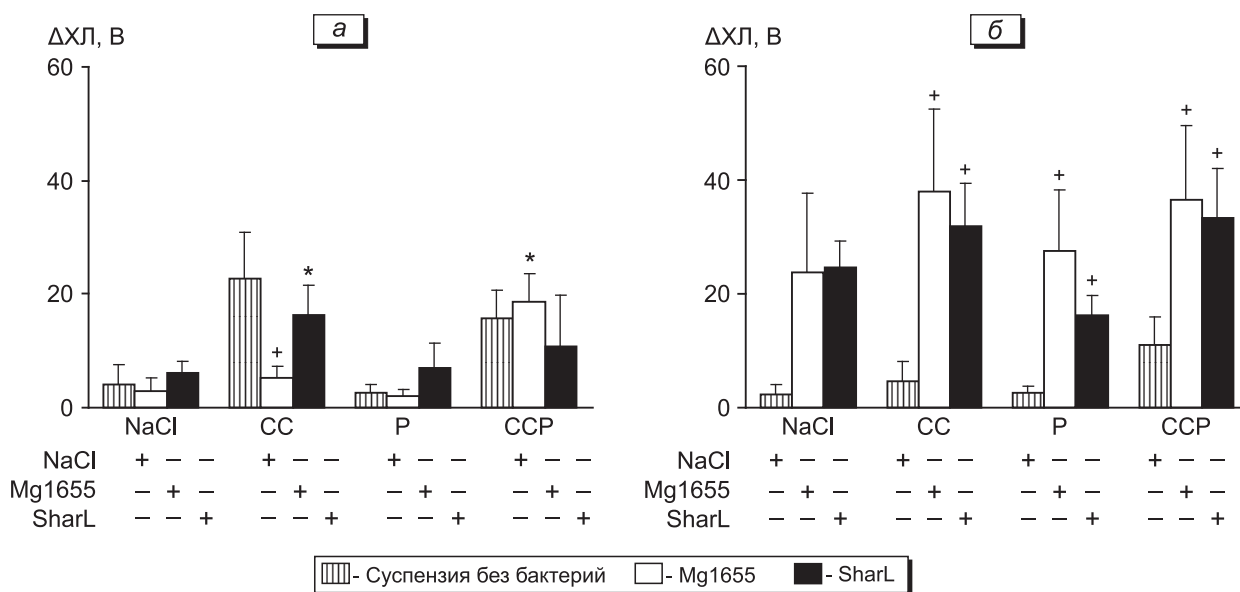


**Рис. 1.** Влияние микрочастиц СС, гибридных микро-частиц ССР и пектина (Р) в концентрации 3 мг/мл на концентрацию ДНК (а),  $АТФ_{ex}$  (б) и  $АТФ_{in}$  (в) при культивировании бактерий *E. coli* штамма Mg1655 и изолята SharL в течение 16 ч.  $p < 0.05$  по сравнению \* с контрольной культурой (без добавок), \* с культурой, выращенной в присутствии СС.

и микрочастицы СС добавляли к бактериям в той же концентрации, что и ССР, моделируя тем самым локальные эффекты, обусловленные контактом бактерий с поверхностью ватерита без пектина или с экспонированным на частицах пектином.

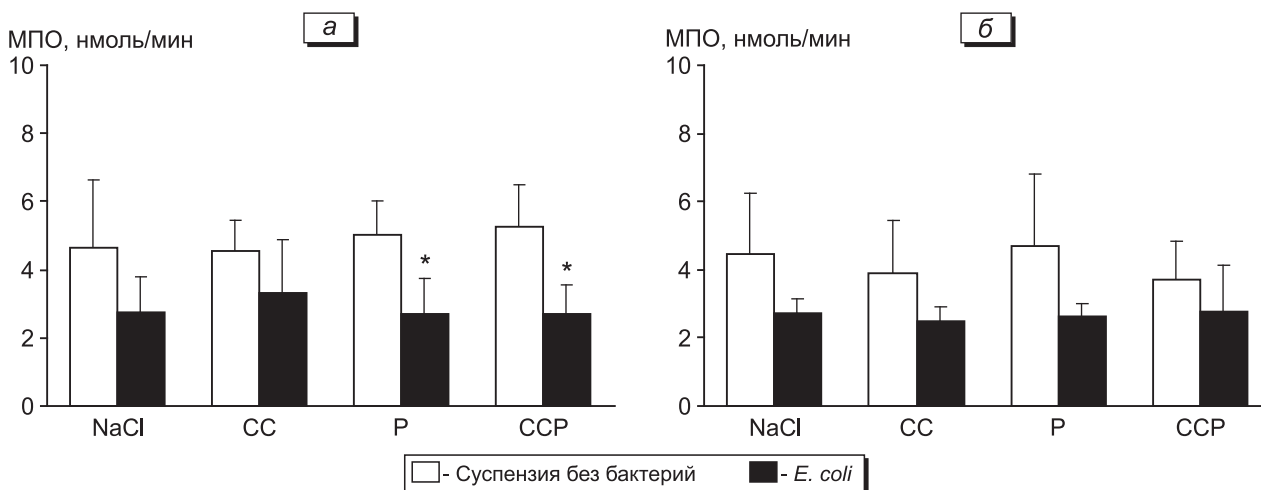
Добавление сыворотки в среду измерений приводило к значительному увеличению ХЛ-ответа нейтрофилов на бактерии как в контрольных пробах, так и в пробах с микрочастицами СС, ССР и пектином (рис. 2, б). По-видимому,

опсонизация бактерий способствовала эффективному распознаванию их нейтрофилами и быстрому запуску дыхательного взрыва. Следует отметить, что микрочастицы СС и ССР не влияли на активацию нейтрофилов бактериями в присутствии сыворотки, т.е. не изменяли их функциональную активность. Кроме того, из сопоставления эффектов микрочастиц СС и ССР без бактерий следует, что помимо различий в их физико-химических свойствах, включая диаметр и дзета-потенциал, важную роль в активации



**Рис. 2.** Амплитуда люминолзависимого ХЛ-ответа нейтрофилов на образцы суспензии бактерий *E. coli* штамма Mg1655 и изолята SharL, содержащие микрочастицы СС и ССР или пектин (P), в среде без сыворотки (а) или с 1% аутологичной сыворотки (б).

$p < 0.05$  по сравнению \* с контрольной культурой (без добавок), \* с соответствующей пробой без бактерий.



**Рис. 3.** Активность МПО в осадках нейтрофилов с бактериями *E. coli* штамма Mg1655, микрочастицами СС и ССР или пектином (P) после измерения ХЛ в среде без сыворотки (а) или с 1% аутологичной сыворотки (б).

\* $p < 0.05$  по сравнению с пробой без бактерий.

нейтрофилов играют белки сыворотки, по-разному взаимодействующие с поверхностью двух видов частиц.

Дегрануляция нейтрофилов и фагоцитоз бактерий не всегда коррелируют с дыхательным взрывом [18]. Снижение активности МПО в осадке клеток после измерения ХЛ наблюдалось во всех пробах с бактериями по сравнению с пробами после активации нейтрофилов одними частицами или пектином, как в среде без сыворотки (рис. 3, а), так и в присутствии сыворотки (рис. 3, б). Полученные результаты показывают, что микрочастицы СС и ССР, как и пектин, не влияют на высвобождение МПО нейтрофилами в ответ на добавление бактерий. При этом некоторое снижение ХЛ в пробах с пектином (рис. 2) объясняется скорее его антиоксидантными свойствами [19].

Таким образом, гибридные микрочастицы ватерит-пектина увеличивают выход АТФ из бактерий *E. coli*. В случае с изолятом SharL выход АТФ сопровождался снижением концентрации ДНК при повышении концентрации АТФ<sub>in</sub>, тогда как для лабораторного штамма *E. coli* K12 Mg1655, напротив, концентрация АТФ<sub>in</sub> снижалась при повышенном уровне ДНК. Выявленные различия между лабораторным штаммом и клиническим изолятом *E. coli* требуют дальнейшего исследования, а также могут использоваться при разработке средств мукозальной доставки с бактериостатическим эффектом в отношении адгезивно-инвазивных *E. coli* при болезни Крона. При этом взаимодействие между бактериями и микрочастицами не усиливало активацию нейтрофилов по сравнению с самими частицами (в среде без сыворотки) и с бактериями (в среде с сывороткой), а сами микрочастицы не снижали функциональную активность нейтрофилов в отношении бактерий.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-45-10026) и при частичной поддержке МГУ им. М.В.Ломоносова (регистрационная тема 121041500039-8).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Trushina D.B., Borodina T.N., Belyakov S., Antipina M.N. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // *Mater. Today Adv.* 2022. Vol. 14. ID 100214. doi: 10.1016/j.mtadv.2022.100214
2. Mikhalchik E.V., Maltseva L.N., Firova R.K., Murina M.A., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Ivanov V.A., Obraztsova E.A., Klinov D.V., Shmeleva E.V., Gusev S.A., Panasenko O.M., Sokolov A.V., Gorbunov N.P., Filatova L.Y., Balabushevich N.G. Incorporation of pectin into vaterite microparticles prevented effects of adsorbed mucin on neutrophil activation // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, N 21. ID 15927. doi: 10.3390/ijms242115927
3. Naito Y., Takagi T., Yoshikawa T. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease // *J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 42, N 10. P. 787-798. doi: 10.1007/s00535-007-2096-y
4. Alzoghaibi M.A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease // *World J. Gastroenterol.* 2013. Vol. 19, N 39. P. 6540-6547. doi: 10.3748/wjg.v19.i39.6540
5. Chen H., Wu X., Xu C., Lin J., Liu Z. Dichotomous roles of neutrophils in modulating pathogenic and repair processes of inflammatory bowel diseases // *Precis. Clin. Med.* 2021. Vol. 4, N 4. P. 246-257. doi: 10.1093/pcmedi/pbab025
6. Kopp Z.A., Jain U., Van Limbergen J., Stadnyk A.W. Do antimicrobial peptides and complement collaborate in the intestinal mucosa? // *Front. Immunol.* 2015. Vol. 6. P. 17. doi: 10.3389/fimmu.2015.00017
7. Agus A., Massier S., Darfeuille-Michaud A., Billard E., Barnich N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies // *Biomed. Res. Int.* 2014. Vol. 2014. ID 567929. doi: 10.1155/2014/567929
8. Alemany-Cosme E., Sáez-González E., Moret I., Mateos B., Iborra M., Nos P., Sandoval J., Beltrán B. Oxidative stress in the pathogenesis of Crohn's disease and the interconnection with immunological response, microbiota, external environmental factors, and epigenetics // *Antioxidants (Basel)*. 2021. Vol. 10, N 1. ID 64. doi: 10.3390/antiox10010064
9. Xu S., Li X., Zhang S., Qi C., Zhang Z., Ma R., Xiang L., Chen L., Zhu Y., Tang C., Bourgonje A.R., Li M., He Y., Zeng Z., Hu S., Feng R., Chen M. Oxidative stress gene expression, DNA methylation, and gut microbiota interaction trigger Crohn's disease: a multi-omics Mendelian randomization study // *BMC Med.* 2023. Vol. 21, N 1. ID 179. doi: 10.1186/s12916-023-02878-8
10. Wikiera A., Grabacka M., Byczyński Ł., Stodolak B., Mika M. Enzymatically extracted apple pectin possesses antioxidant and antitumor activity // *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 5. ID 1434. doi: 10.3390/molecules26051434
11. Markov P.A., Volkova M.V., Khasanshina Z.R., Martinson E.A., Popov S.V. Anti-inflammatory activity of high and low methoxylated apple pectins, in vivo and in vitro // *Vopr. Pitan.* 2021. Vol. 90, N 6. P. 92-100. doi: 10.33029/0042-8833-2021-90-6-92-100
12. Harpaz D., Barhom H., Veltman B., Ginzburg P., Eltzov E. Biocompatibility characterization of vaterite with a bacterial whole-cell biosensor // *Colloids Surf.*

- B. Biointerfaces. 2023. Vol. 222. ID 113104. doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.113104
13. Lu Q., Wang J., Faghihnejad A., Zeng H., Liu Y. Understanding the molecular interactions of lipopolysaccharides during *E. coli* initial adhesion with a surface forces apparatus // *Soft Matter*. 2011. Vol. 7, N 19. P. 9366-9379. doi: 10.1039/C1SM05554B
14. Mikhalechik E., Balabushevich N., Vakhrusheva T., Sokolov A., Baykova J., Rakitina D., Scherbakov P., Gusev S., Gusev A., Kharaeva Z., Bukato O., Pobeguts O. Mucin adsorbed by *E. coli* can affect neutrophil activation in vitro // *FEBS Open Bio*. 2020. Vol. 10, N 2. P. 180-196. doi: 10.1002/2211-5463.12770
15. Pobeguts O.V., Ladygina V.G., Evsyutina D.V., Ere-meev A.V., Zubov A.I., Matyushkina D.S., Scherbakov P.L., Rakitina D.V., Fisunov G.Y. Propionate induces virulent properties of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* // *Front. Microbiol.* 2020. Vol. 11. ID 1460. doi: 10.3389/fmicb.2020.01460
16. Lomakina G.Y., Ugarova N.N. Bioluminescent test systems based on firefly luciferase for studying stress effects on living cells // *Biophys. Rev.* 2022. Vol. 14, N 4. P. 887-892. doi: 10.1007/s12551-022-00978-y
17. Ukuku D.O., Geveke D.J., Cooke P., Zhang H.Q. Membrane damage and viability loss of *Escherichia coli* K-12 in apple juice treated with radio frequency electric field // *J. Food Prot.* 2008. Vol. 71, N 4. P. 684-690. doi: 10.4315/0362-028x-71.4.684
18. Nguyen G.T., Green E.R., Meccas J. Neutrophils to the ROScues: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. Vol. 7. ID 373. doi: 10.3389/fcimb.2017.00373
19. Nikolova M., Ambrozova G., Kratchanova M., Denev P., Kussovski V., Ciz M., Lojek A. Effects of pectic polysaccharides isolated from leek on the production of reactive oxygen and nitrogen species by phagocytes // *J. Med. Food.* 2013. Vol. 16, N 8. P. 711-718. doi: 10.1089/jmf.2012.0234

Получено 17.11.23

---