

РЕАКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОПОДОБНЫХ КЛЕТОК HL-60 ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПЕРСИСТИРУЮЩИМИ ФОРМАМИ *Escherichia coli*

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.09

УДК 579.61:615.33:615.015.8:615.155.3

Поступила 3.09.2019 г.



Н.А. Маянский, д.м.н., профессор РАН, зав. Центром лабораторной диагностики Российской детской клинической больницы¹;

Ю.А. Бочарова, к.м.н., младший научный сотрудник²;

Е.А. Бржозовская, младший научный сотрудник²;

А.В. Лазарева, д.м.н., зав. лабораторией микробиологии²;

И.В. Чеботарь, д.м.н., профессор кафедры общей патологии¹

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, ул. Островитянова, 1, Москва, 117997;

²Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Ломоносовский проспект, 2, стр. 1, Москва, 119296

Цель исследования — сравнить реактивность нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с персистерами и нативными клетками *Escherichia coli*, используя в качестве критерия интенсивность респираторного взрыва.

Материалы и методы. Персистирующие формы (персистеры) *E. coli* получали путем последовательной инкубации бактерий в растворах карбонил цианид 3-хлорфенилгидразона (СССР) и ципрофлоксацина. В качестве нейтрофилоподобных клеток использовали дифференцированные клетки линии HL-60 (ATCC CCL-240). Оценку респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток в реакции с нативными клетками и персистерами *E. coli* проводили на микропланшетном ридере Infinite M200 путем измерения интенсивности флуоресценции окисленных форм красителя Amplex Red.

Результаты. Количество жизнеспособных *E. coli* до и после инкубации с СССР и ципрофлоксацином было примерно одинаковым. Это свидетельствует о том, что данную технологию можно с успехом использовать для получения клеток *E. coli* в форме персистеров. Нативные клетки *E. coli* вызывали статистически значимое увеличение показателей респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток, составляя 14±4% от значений положительного контроля (в негативном контроле значения составляли 6±3%). Показатели респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток в системе с персистерами *E. coli* были существенно выше, чем это наблюдалось с нативными *E. coli*, и составляли 42±7% от положительного контроля.

Заключение. Персистеры *E. coli* могут стимулировать респираторный метаболизм фагоцитирующих нейтрофилоподобных клеток линии HL-60. Способность этих персистеров вызывать респираторный взрыв нейтрофилов выражена существенно сильнее, чем у нативных бактерий *E. coli*.

Ключевые слова: бактерии; *Escherichia coli*, персистеры; антибиотикорезистентность; фагоцитоз; проточная цитофлуориметрия; респираторный взрыв.

Как цитировать: Mayansky N.A., Bocharova Yu.A., Brzhozovskaya E.A., Lazareva A.V., Chebotar I.V. Reactivity of neutrophil-like HL-60 cells towards persistent forms of *Escherichia coli*. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 82–86, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.09>

English

Reactivity of Neutrophil-Like HL-60 Cells towards Persistent Forms of *Escherichia coli*

N.A. Mayansky, MD, DSc, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory Diagnostic Center, Russian Children's Clinical Hospital¹;

Yu.A. Bocharova, MD, PhD, Junior Researcher²;

E.A. Brzhozovskaya, Junior Researcher²;

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, e-mail: nizarnn@yandex.ru

A.V. Lazareva, MD, DSc, Head of the Laboratory of Microbiology²;
I.V. Chebotar, MD, DSc, Professor, Department of General Pathology¹

¹Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova St., Moscow, 117997, Russia;

²National Medical Research Center for Children's Health, 2/1 Lomonosovsky Avenue, Moscow, 119991, Russia

The aim was to study the reactivity of neutrophil-like HL-60 cells towards native *E. coli* and *E. coli* persisters by measuring the intensity of their respiratory burst.

Materials and Methods. Persistent forms (persisters) of *E. coli* were obtained by sequential incubation of bacteria in solutions of 3-chlorophenylhydrazone carbonyl cyanide (CCCP) and ciprofloxacin. Differentiated cells of the HL-60 line (ATCC CCL-240) were used as neutrophil-like cells. The reactive respiratory burst of neutrophil-like cells in response to native *E. coli* or *E. coli* persisters was evaluated by measuring fluorescence of the oxidized form of Amplex Red using an Infinite M200 microplate reader.

Results. The number of viable *E. coli* before and after incubation with the CCCP and ciprofloxacin was approximately the same, thus confirming the presence of persistent forms of *E. coli*. Native *E. coli* cells caused a statistically significant increase in respiratory burst of neutrophil-like cells reaching 14±4% of the positive control values (in the negative control, the values were 6±3%). The respiratory burst intensity of neutrophil-like cells mixed with *E. coli* persisters was significantly higher than that observed with native *E. coli*, and accounted for 42±7% of the positive control.

Conclusion. Persisters of *E. coli* can stimulate the respiratory metabolism of phagocytic neutrophil-like cells of the HL-60 line. The ability of these persisters to induce a respiratory burst of neutrophils is significantly greater than that of native *E. coli* bacteria.

Key words: bacteria; *E. coli* persisters; antibiotic resistance; phagocytosis; flow cytometry; respiratory burst.

Введение

Одной из самых актуальных проблем современной медицинской науки является прогрессирующая устойчивость бактерий к антимикробным препаратам. Известно несколько механизмов, позволяющих бактериям выживать в присутствии антибиотиков. До недавнего времени считалось, что существует пять типов механизмов резистентности: модификация мишени, инактивация антибиотика, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического «шунта» [1]. Сейчас этот перечень дополняют еще двумя механизмами резистентности, к которым относятся биопленочная резистентность [2] и формирование особых форм бактериальных клеток — персистеров, или персистирующих бактерий [3]. Персистеры (персистирующие бактерии) — это метаболически неактивные формы бактерий, которые толерантны к антибиотикам [4].

В настоящее время над исследованием персистирующих бактериальных клеток работает значительное количество научных коллективов: в 2018 г., по данным PubMed, было опубликовано более 150 научных работ, касающихся изучения персистирующих бактерий. Физиология их исследована достаточно детально. Изучены процессы формирования персистеров [3, 5], расшифрованы механизмы их обратной трансформации в нормально функционирующую бактерию [6]. Разработаны способы накопления персистеров — удалось добиться того, что в бактериальной популяции присутствует 80–90% персистеров [7–9]. Исследованы особенности «замороженного» метаболизма этих форм, расшифрованы молекулярные

основы устойчивости таких бактерий к антибиотикам [10, 11]. Изучены особенности поверхностных структур персистеров [12]. Предложены методы морфологического и функционального исследования бактерий-персистеров [13]. Однако остаются неясными вопросы, касающиеся вирулентности персистеров и особенностей их взаимоотношений с клеточными и тканевыми структурами организма человека. В частности, исследование взаимоотношений персистеров с иммунной системой является крайне актуальной задачей современной биомедицинской науки. Очень важно понимание механизмов реакций между наиболее значимыми иммунными эффекторами человека — нейтрофилами и персистирующими бактериями. К настоящему моменту исследована только одна сторона этого явления — фагоцит-индуцированное формирование персистеров [14]. Другая сторона, а именно вопрос, как фагоциты реагируют на бактерии-персистеры, остается неизученной.

Цель настоящей работы — сравнить реактивность нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с персистерами и нативными клетками актуального оппортунистического патогена *Escherichia coli*, используя в качестве критерия интенсивность респираторного взрыва.

Материалы и методы

Получение бактерий-персистеров. Клетки-персистеры получали по общепринятой методике культивирования бактерий. В нашем исследовании использовали референсные штаммы *E. coli* ATCC 25922 в среде с добавлением 200 мкг/мл карбонил цианид 3-хлорфенилгидразона (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine, CCCP) [15]. Суточную культуру бактерий

вносили в бульон Луриа–Бертани (бульон LB; Vecton Dickinson, США) до получения мутности 0,5 ед. по шкале МакФарланда, затем 0,5 мл полученной суспензии переносили в 5 мл бульона LB и инкубировали 18 ч при 37°C. Из 18-часовой культуры отбирали три пробы объемом 0,98 мл.

Обработка проб включала два этапа. На первом этапе в 1-ю пробу вносили 0,02 мл СССР (Sigma-Aldrich, США), растворенного в диметилсульфоксиде — dimethyl sulfoxide, DMSO (Molecular Probes, США) в концентрации 10 мг/мл, во 2-ю и 3-ю пробы — по 0,02 мл DMSO. Пробы инкубировали в шейкере при 37°C в течение 3 ч, затем дважды отмывали в физрастворе и ресуспендировали в 0,2 мл бульона LB.

На втором этапе к 1-й и 2-й пробам добавляли 0,2 мл бульона LB с ципрофлоксацином («Синтез», Россия) в концентрации 10 мкг/мл, к 3-й пробе — 0,2 мл бульона LB без антибиотика. Инкубацию выполняли при условиях, описанных в 1-м этапе. Пробы дважды отмывали и ресуспендировали в 1 мл буфера HEPES (Sigma-Aldrich). Для подтверждения наличия в 1-й пробе бактерий-персистеров без примеси нативных бактерий делали контрольные высевы из пробы до и после инкубации с ципрофлоксацином. По 0,02 мл 100-кратных разведений пробы рассеивали на чашки с агаром Мюллера–Хинтона (Bio-Rad Laboratories, США). Чашки инкубировали в течение 24 ч при 37°C, затем проводили подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ). Критерием наличия персистеров служил рост примерно одинакового числа КОЕ в пробах до и после инкубации с ципрофлоксацином [15]. После инкубации выполняли стандартизацию концентрации бактериальных клеток на проточном цитофлуориметре NovoCyte (ACEA Biosciences, США). Анализ полученных данных о популяции бактериальных клеток осуществляли при помощи программного обеспечения NovoExpress software. Для каждого образца анализировали минимум $1 \cdot 10^6$ /мл бактериальных клеток. Количественное определение исследуемых бактерий проводили без применения флуоресцентных красителей, измеряя прямое светорассеивание и боковое светорассеяние каждой бактериальной клетки.

Получение фагоцитирующих клеток: культивирование и дифференцировка клеточной линии HL-60. В качестве источника фагоцитирующих нейтрофилоподобных клеток использовали промиелоцитарную линию клеток HL-60 (ATCC CCL-240), находящуюся на стадии развития миелобласта. Для создания среды культивирования к минимальной питательной среде (IMDM) добавляли фетальную бычью сыворотку (HI FBS; Gibco, США) до конечной концентрации 20%, L-глутамин (Glutamax; Gibco) до конечной концентрации 1% и пенициллин-стрептомицин (Pen Strep; Gibco) до конечной концентрации 1%. Клеточную линию выращивали до уровня $(5-8) \cdot 10^5$ кл./мл в полной среде и пересевали каждые 3–4 дня путем центрифугирования при 1500 об./мин

в течение 5 мин. Для запуска дифференцировки доводили концентрацию культуры клеток до плотности $3 \cdot 10^5$ кл./мл и инкубировали в течение ночи, чтобы получить популяцию экспоненциально растущей культуры клеток. Затем доводили экспоненциально растущие клетки до плотности $3 \cdot 10^5$ кл./мл в полной питательной среде, дополненной до конечной концентрации 1,25% DMSO с целью индукции дифференцировки и созревания нейтрофилоподобных клеток в течение 5 дней. После 5 дней дифференцировки HL-60 отмывали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 5 мин, отбирали супернатант и отмывали клеточную взвесь центрифугированием при тех же условиях в HEPES-буфере, обогащенном Ca^{2+} и человеческим сывороточным альбумином. После такой промывки клетки разводили в этом же буфере, оценивали их жизнеспособность и осуществляли подсчет при помощи клеточного счетчика с использованием трипанового синего. После подсчета культуры клеток для достижения реакции респираторного взрыва HL-60 доводили до концентрации $1 \cdot 10^6$ /мл в полном HEPES-буфере.

Оценка респираторного взрыва. Для оценки респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток HL-60 в реакции с нативными клетками *E. coli* и *E. coli*-персистерами (соотношение бактерии/фагоциты — 40/1) использовали известный метод, основанный на флуоресценции окисленных форм красителя Amplex Red (Molecular Probes, США). В качестве положительного контроля реакции использовали форбол-12-миристан-13-ацетат, а в качестве отрицательного — HEPES-буфер. Результаты выражали в процентах относительно показателей стимуляции (средний угол наклона кривой за 30 мин реакции) нейтрофилоподобных клеток HL-60 форбол-12-миристан-13-ацетатом. Количественную оценку респираторного взрыва проводили на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Швейцария). Кинетическое определение флуоресценции респираторного взрыва между изучаемыми микроорганизмами и эффекторными клетками осуществляли в течение 40 мин с детекцией флуоресценции каждую минуту в течение 40 циклов, при возбуждении 545 нм и излучении 590 нм. Все эксперименты были выполнены в 4–6 повторениях, все пробы были включены в эксперимент в триплетах.

Полученная информация была статистически обработана при помощи штатного программного обеспечения, управляющего работой ридера Infinite M200.

Результаты и обсуждение

Количество жизнеспособных бактерий в пробах до и после инкубации с ципрофлоксацином было примерно одинаковым и составляло $3,3 \cdot 10^5$ и $3,2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл соответственно ($p > 0,05$). Согласно критериям L. Grassi и соавт. [15], такие результаты свидетельствуют о том, что 1-я проба после обработки

ципрофлоксацином содержала преимущественно клетки *E. coli* в форме персистеров.

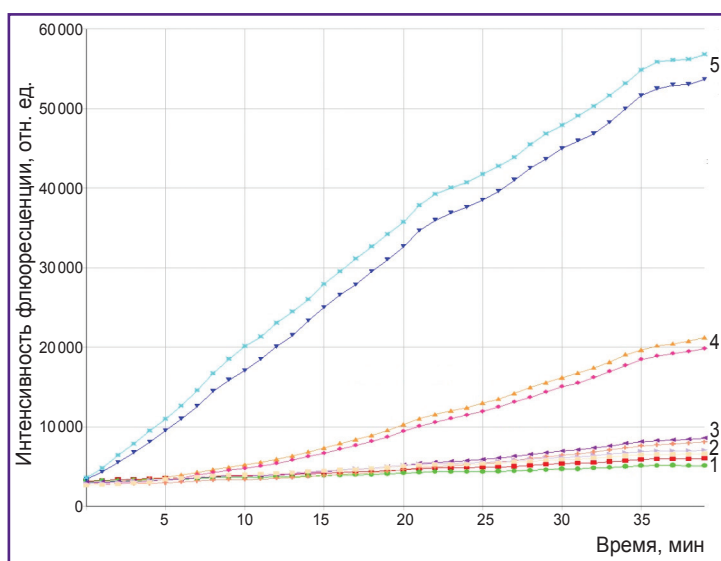
Динамика типовой реакции респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с разными формами (персистерами и нативными бактериями) *E. coli* показана на рисунке.

Количественные показатели активации респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с разными формами (персистерами и нативными бактериями) *E. coli* представлены в таблице. Нативные клетки *E. coli* вызвали статистически значимое ускорение окисления флюорофора Amplex Red в системе с нейтрофилоподобными клетками: угол наклона кривой составлял более 14% от значений положительного контроля (в негативном контроле — $6 \pm 3\%$). Скорость окисления Amplex Red в системе «*E. coli*-персистеры–нейтрофилоподобные клетки» была существенно выше, чем это наблюдалось с нативными *E. coli*, и составляла $42 \pm 7\%$ от положительного контроля.

Результаты показали, что и нативные бактерии *E. coli*, и *E. coli*-персистеры обладают способностью активировать респираторный метаболизм фагоцитов. Однако нейтрофилоподобные клетки отвечали на контакт с бактериями-персистерами *E. coli* более интенсивно, чем в случае взаимодействия с нативными бактериями. Это может быть связано со сниженным метаболическим профилем персистеров [8]. Угнетение метаболизма неизбежно ведет к замедлению всех энергозависимых реакций бактериальной клетки, включая механизмы ускользания от иммунных эфффекторов. Нативные бактерии с нормальным производством энергии сохраняют и проявляют антифагоцитарные свойства, снижая фагоцитоз и респираторный взрыв нейтрофилов. Это доказано для всех бактерий, обладающих патогенным потенциалом [16]. Клетки *E. coli* не являются исключением, реализация вирулентности у них служит энергозависимым процессом, блокада которого приводит к угнетению антифагоцитарной защиты [17]. Обнаруженная закономерность внушает оптимизм: бактерии-персистеры не являются неуязвимыми и могут быть элиминированы за счет фагоцитарных реакций.

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать несколько важных выводов. Во-первых, бактерии-персистеры *E. coli* могут стимулировать респираторный метаболизм фагоцитирующих нейтрофилоподобных клеток линии HL-60. Во-вторых, способность персистеров *E. coli* стимулировать респираторный взрыв нейтрофилов выра-



Примеры динамики типовой реакции респираторного взрыва у нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с нативными бактериями *E. coli* (3) и персистерами *E. coli* (4). Положительный контроль (5) — стимуляция форбол-12-миристат-13-ацетатом; отрицательный контроль — HEPES-буфер (2). Нестимулированные нейтрофилоподобные клетки HL-60 (1)

Показатели активации респираторного взрыва нейтрофилоподобных клеток HL-60 при взаимодействии с нативными бактериями и персистерами (средний угол наклона кривой за 30 мин реакции)

Условия стимуляции клеток	Средний угол наклона кривой, процент относительно положительного контроля
Отрицательный контроль (клетки HL-60 + HEPES-буфер)	$6 \pm 3^*$
Положительный контроль (клетки HL-60 + форбол-12-миристат-13-ацетат)	100
Клетки HL-60 + <i>E. coli</i> , нативные клетки	$14 \pm 4^{**}$
Клетки HL-60 + <i>E. coli</i> -персистеры	$42 \pm 7^*$

* — статистически значимые различия значений между показателями отрицательного контроля и респираторного взрыва при контакте с нативными *E. coli*, $p=0,048$; ** — статистически значимые различия значений между показателями респираторного взрыва при контакте с нативными *E. coli* и *E. coli*-персистерами, $p=0,017$.

жена существенно сильнее, чем у нативных бактерий *E. coli*. Это свидетельствует о том, что важнейшие эфффекторы иммунитета, нейтрофилы, способны распознавать персистеры *E. coli* и атаковать их.

Финансирование исследования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-015-00301 «Реактивность нейтрофилов при взаимодействии с грамотрицательными бактериями-персистерами»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Литература/References

1. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Страчунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. Смоленск: НИИАХ СГМА; 2002; 586 с. *Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii* [A practical guide to anti-infectious chemotherapy]. Pod red. Strachunskogo L.S., Belousova Yu.B., Kozlova S.N. [Strachunskiy L.S., Belousov Yu.B., Kozlov S.N. (editors)]. Smolensk: NIIAKh SGMA; 2002; 586 p.
2. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2012; 14(1): 51–58. Chebotar I.V., Mayansky A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V., Chistyakova V.P. Antimicrobial resistance of bacteria in biofilms. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2012; 14(1): 51–58.
3. Lewis K. Persister cells. *Annu Rev Microbiol* 2010; 64(1): 357–372, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>.
4. Евдокимова Н.В., Черненькая Т.В. Персистирующие клетки микроорганизмов — новый взгляд на старую проблему. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2013; 15(3): 192–197. Evdokimova N.V., Tchernenkaya T.V. Persister microbial cells: a novel view on the old problem. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2013; 15(3): 192–197.
5. Wood T.K., Knabel S.J., Kwan B.W. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(23): 7116–7121, <https://doi.org/10.1128/aem.02636-13>.
6. Jøers A., Kaldalu N., Tenson T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 2010; 192(13): 3379–3384, <https://doi.org/10.1128/jb.00056-10>.
7. Kaldalu N., Jøers A., Ingelman H., Tenson T. A general method for measuring persister levels in *Escherichia coli* cultures. *Methods Mol Biol* 2016; 1333: 29–42, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_3.
8. Fisher R.A., Gollan B., Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 2017; 15(8): 453–464, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.
9. Helaine S., Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol* 2014; 22(7): 417–424, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.03.008>.
10. Prax M., Bertram R. Metabolic aspects of bacterial persisters. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4: 148, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00148>.
11. Amato S.M., Fazan C.H., Henry T.C., Mok W.W., Orman M.A., Sandvik E.L., Volzing K.G., Brynildsen M.P. The role of metabolism in bacterial persistence. *Front Microbiol* 2014; 5: 70, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00070>.
12. Molina-Quiroz R.C., Lazinski D.W., Camilli A., Levy S.B. Transposon-sequencing analysis unveils novel genes involved in the generation of persister cells in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60(11): 6907–6910, <https://doi.org/10.1128/aac.01617-16>.
13. Orman M.A., Brynildsen M.P. Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(9): 4398–4409, <https://doi.org/10.1128/aac.00372-13>.
14. Fisher R.A., Cheverton A.M., Helaine S. Analysis of macrophage-induced salmonella persisters. *Methods Mol Biol* 2016; 1333: 177–178, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_15.
15. Grassi L., Di Luca M., Maisetta G., Rinaldi A.C., Esin S., Trampuz A., Batoni G. Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents. *Front Microbiol* 2017; 8: 1917, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01917>.
16. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука; 1989; 344 с. Mayansky A.N., Mayansky D.N. *Ocherki o neyetrofile i makrofage* [Essays on neutrophil and macrophage]. Novosibirsk: Nauka; 1989; 344 p.
17. Santos A.S., Finlay B.B. Bringing down the host: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cell Microbiol* 2015; 17(3): 318–332, <https://doi.org/10.1111/cmi.12412>.