Российский иммунологический журнал
2025, Т. 28, № 3, стр. 415-420

Краткие сообщения
Short communications

Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal
2025, Vol. 28, № 3, pp. 415-420

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ БИОПЛЕНОК UPEC И ИХ СУПЕРНАТАНТОВ НА СЕКРЕЦИЮ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗЫ И КАТЕПСИНА G НЕЙТРОФИЛАМИ И МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Масленникова И.Л.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Резюме. Способность уропатогенных *Escherichia coli* (UPEC) образовывать биопленки является одним из факторов, обусловливающих рецидивы при инфекциях мочевыводящих путей. Миелопероксидаза (МПО) и катепсин G фагоцитов образуют противомикробную защиту при воспалении. Не исключено существование перекрестных взаимодействий между бактериями UPEC, внеклеточным матриксом биопленок и эффекторными клетками иммунной системы. Цель исследования – оценить секрецию МПО и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами референтного и клинического UPEC. В работе использовали нейтрофилы и мононуклеарные клетки периферической крови здоровых мужчин (n = 6), выделенных на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл). Референтный штамм *E. coli* DL82 (*fimH, papC, papGII, sfa, hlyA, usp, fyuA, iucD,iroCD, iroN)* и клинический изолят *E. coli* R44 (*fimH)* (10^6 кл/мл) выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах на среде LB в течение 24 ч. Супернатант биопленок стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм). Клетки бактерий освобождали из биопленок ультразвуком. Нейтрофилы культивировали с бактериями биопленок или их супернатантами в течение 1 ч, затем откручивали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при -20 °C. Активность МПО и катепсина G оценивали с использованием О-фенилендиамин дигидрохлорида и N-бензоил-L-тирозин этилового эфира, соответственно, по оптической плотности в супернатантах нейтрофилов и мононуклеарных клеток. Статистическая обработка проведена с использованием программы Excel. Показано, что секреция МПО нейтрофилами увеличивалась при взаимодействии с супернатантами биопленок *E. coli* DL82 в отличие от супернатантов *E. coli* R44. Клетки биопленок *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 не влияли на секрецию МПО. Секреция МПО мононуклеарными клетками периферической крови человека оставалась на уровне контроля при действии клеток и супернатантов UPEC. Контакт нейтрофилов с бактериями и супернатантами штамма *E. coli*

Адрес для переписки:
Масленникова Ирина Леонидовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-84-31.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Address for correspondence:
Irina L. Maslennikova
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-84-31.
E-mail: I.Maslennikova1974@gmail.com

Образец цитирования:
И.Л. Масленникова «Влияние бактерий биопленок UPEC и их супернатантов на секрецию миелопероксидазы и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека» // Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28, № 3. С. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

© Масленникова И.Л., 2025
Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

For citation:
I.L. Maslennikova "Effects of uropathogenic E. coli biofilms and their supernates on myeloperoxydase and cathepsin G secretion by human neutrophils and blood mononuclears", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskiy Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3, pp. 415-420.
doi: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

© Maslennikova I.L., 2025
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17128-EOU

R44 приводил к уменьшению концентрации катепсина G в среде по сравнению с контролем. Экзометаболиты бактериальных биопленок UPEC, по-видимому, оказывают более значительное влияние на секреторную активность нейтрофилов, чем сами бактерии.

Ключевые слова: биопленки, E.coli, UPEC, МПО, катепсин G, нейтрофилы, мононуклеары

EFFECTS OF UROPATHOGENIC *E. COLI* BIOFILMS AND THEIR SUPERNATES ON MYELOPEROXYDASE AND CATHEPSIN G SECRETION BY HUMAN NEUTROPHILS AND BLOOD MONONUCLEARS

Maslennikova I.L.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. The ability of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) to form biofilms is one of the factors causing recurrent urinary tract infections. Myeloperoxidase and cathepsin G of phagocytic cells contribute to antimicrobial protection during inflammation. The existence of cross-reactions between UPEC bacteria, extracellular matrix of biofilms and effector immune cells also cannot be excluded. The aim of our study was to evaluate the secretion of myeloperoxidase and cathepsin G by neutrophils and mononuclear cells of human peripheral blood upon their interaction with bacteria from biofilms, and supernatants of reference cultures and clinical UPEC isolates. Neutrophils and mononuclear cells of peripheral blood of healthy men (n = 6) were isolated in a double Ficoll-Urografin gradient (1.077 g/mL and 1.112 g/mL). The reference DL82 strain of *E. coli* (*fimH, papC, papGII, sfa, hlyA, usp, fyuA, iucD, iroCD, iroN*), and the *E. coli* R44 clinical isolate (*fimH*) (10^6 cell/mL) were grown in 96-well polystyrene plates on LB medium for 24 h. The biofilm supernatants were sterilized by filtration (0.22 μM). Bacterial cells were released from the biofilm by sonication. Neutrophils were cultured with biofilm bacteria or their supernatants for 1 h, then centrifuged at 400 g, the supernatant was collected and frozen at -20 °C. MPO and cathepsin G activity was assessed using O-phenylenediamine dihydrochloride and N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, respectively, by optical density measured in supernatants of neutrophil and mononuclear cell cultures. Statistical processing was performed using Excel software. It was shown that MPO secretion by neutrophils increased upon interaction with *E. coli* DL82 biofilm supernatants, in contrast to *E. coli* R44 supernatants. *E. coli* DL82 and *E. coli* R44 cells of biofilm did not affect MPO secretion. MPO secretion by human peripheral blood mononuclear cells remained at the control level when exposed to UPEC cells and supernatants. Contact of neutrophils with bacteria and supernatants of the *E. coli* R44 strain led to a decrease in the concentration of cathepsin G in the medium compared to the control. Exometabolites of UPEC bacterial biofilms seem to provide a more significant impact on neutrophil secretory activity than the bacteria *per se*.

Keywords: biofilms, E.coli, uropathogenic, myeloperoxidase, Cathepsin G, granulocytes, blood mononuclears

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием 124020500027-7.

Введение

Уропатогенные штаммы *Escherichia coli* (UPEC) являются основным этиопатогеном при инфекциях мочевыводящих путей (ИМП). Важным фактором, обусловливающим рецидивы ИМП, является способность UPEC образовывать биопленку с высокоупорядоченным и сложным внеклеточным матриксом [9], который защищает бактерий от антибиотиков и иммунной системы хозяина.

Миелопероксидаза (МПО) – это фермент азурофильных гранул, который вместе с H_2O_2 образует мощную антимикробную систему, предназначенную для уничтожения бактерий. Растворимая

МПО напрямую участвует в модуляции клеточных реакций и гомеостаза тканей. В основном этот фермент содержится в нейтрофилах (до 5% сухого веса клетки), а также в моноцитах и некоторых типах тканевых макрофагов и их предшественниках [5]. Катепсин G принадлежит к семейству сериновых протеаз, известных своей функцией уничтожения патогенов. Катепсин G присутствует в азурофильных гранулах нейтрофилов [7], а также в моноцитах периферической крови человека в пероксидаза-положительных цитоплазматических гранулах [1, 10].

Привлечение нейтрофилов к местам поражения при ИМП является частью воспалительного ответа организма [4]. Способность нейтрофилов проникать в биопленки во многом зависит от активности секретируемого катепсина G [11]. Инфильтрация мононуклеарных фагоцитов в пораженные ткани дополнительно способствует активации нейтрофилов, что в совокупности усиливает фагоцитарные и цитокин-секретирующие функции этих клеток в условиях ИМП [6]. Не исключено существование перекрестных взаимодействий между бактериями UPEC, их внеклеточным матриксом и эффекторными клетками иммунной системы, что влияет на их секреторную активность. В связи с этим целью работы явилось оценить секрецию МПО и катепсина G нейтрофилами и мононуклеарами периферической крови человека при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами референтного и клинического уропатогенных штаммов *E. coli*.

Материалы и методы

Нейтрофилы и мононуклеары периферической крови здоровых мужчин (n = 6) выделяли на двойном градиенте фиколл-урографина (1,077 г/мл и 1,112 г/мл). Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (97%).

Референтный штамм *Escherichia coli* DL82 (*fimH, papC, papGII, sfa, hlyA, usp, fyuA, iucD, iroCD, iroN)* [13] и клинический изолят *E. coli* R44 (*fimH)*, выделенный от пациентов с ИМП [12] (10^6 кл/мл) выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах на среде LB (Sigma-Aldrich, США) в течение 24 ч. Биопленочный супернатант стерилизовали фильтрацией (0,22 мкм). Клетки бактерий освобождали из биопленок ультразвуком (Elma Ultrasonic 30S; 5 раз по 1 мин).

Нейтрофилы и мононуклеары периферической крови (250 мкл в RPMI; 10^6 кл/мл) культивировали с бактериями биопленок (100 мкл суспензии) в течение 1 ч, затем откручивали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при –20 °C. Нейтрофилы (250 мкл в RPMI; 106 кл/мл) культивировали с биопленочными супернатантами UPEC (250 мкл) в течение 1 ч, пробы откручивали при 400 g, супернатант отбирали и замораживали при -20 °C.

Активность МПО и катепсина G оценивали с использованием О-фенилендиамин дигидрохлорида (Sigma, США) и N-бензоил-L-тирозин этилового эфира (Sigma, США), соответственно, по оптической плотности в супернатантах нейтрофилов и мононуклеарных клеток, согласно И.Л. Масленниковой и соавт. [2]. Статистическая обработка проведена с использованием программы Excel.

Результаты и обсуждение

Как показано на рисунке 1А, секреция МПО нейтрофилами увеличивалась при взаимодействии с супернатантами биопленок *E. coli* DL82, в отличие от супернатантов *E. coli* R44, где изменений по сравнению с контролем не наблюдалось. Взаимодействие с клетками указанных штаммов также не оказывало влияния на секрецию МПО.

Секреция МПО мононуклеарными клетками периферической крови человека оставалась на уровне контроля после взаимодействия с клетками биопленок и их супернатантами штаммов *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 (рис. 1Б).

Секреция сериновой протеазы катепсина G нейтрофилами не изменялась при взаимодействии с клетками биопленок и их супернатантами штамма *E. coli* DL82, в то время как контакт нейтрофилов со штаммом *E. coli* R44 (клетки бактерий и их супернатанты) приводил к уменьшению концентрации катепсина G в среде по сравнению с контролем (рис. 1В).

Секреторная активность мононуклеарных клеток в отношении катепсина G при контакте с штаммами *E. coli* DL82 и *E. coli* R44 под воздействием клеток биопленок и их супернатантов оставалась на уровне контрольных значений (рис. 1Г).

В патогенезе ИМП участвуют различные факторы вирулентности штаммов UPEC. В рамках данного исследования биопленочные штаммы различны по своим факторам вирулентности: штамм *E. coli* DL82 обладает набором генов, кодирующих адгезины (*fimH, sfaDE, papC, papGII, Afa, afa/draBC*), инвазины (*ibeA*), системы захвата железа (*iroN, fyuA, iucD, iroCD*), а также токсины, такие как цитотоксический некротизирующий фактор-1 (cnf1) и гемолизин α (*hlyA*), в отличие от невирулентного штамма *E. coli* R44.

Активация внешней секреции нейтрофилов может происходить под воздействием внешних факторов, таких как липополисахарид (LPS) [14]. Это может объяснить повышение уровня МПО в среде после воздействия супернатантов штамма

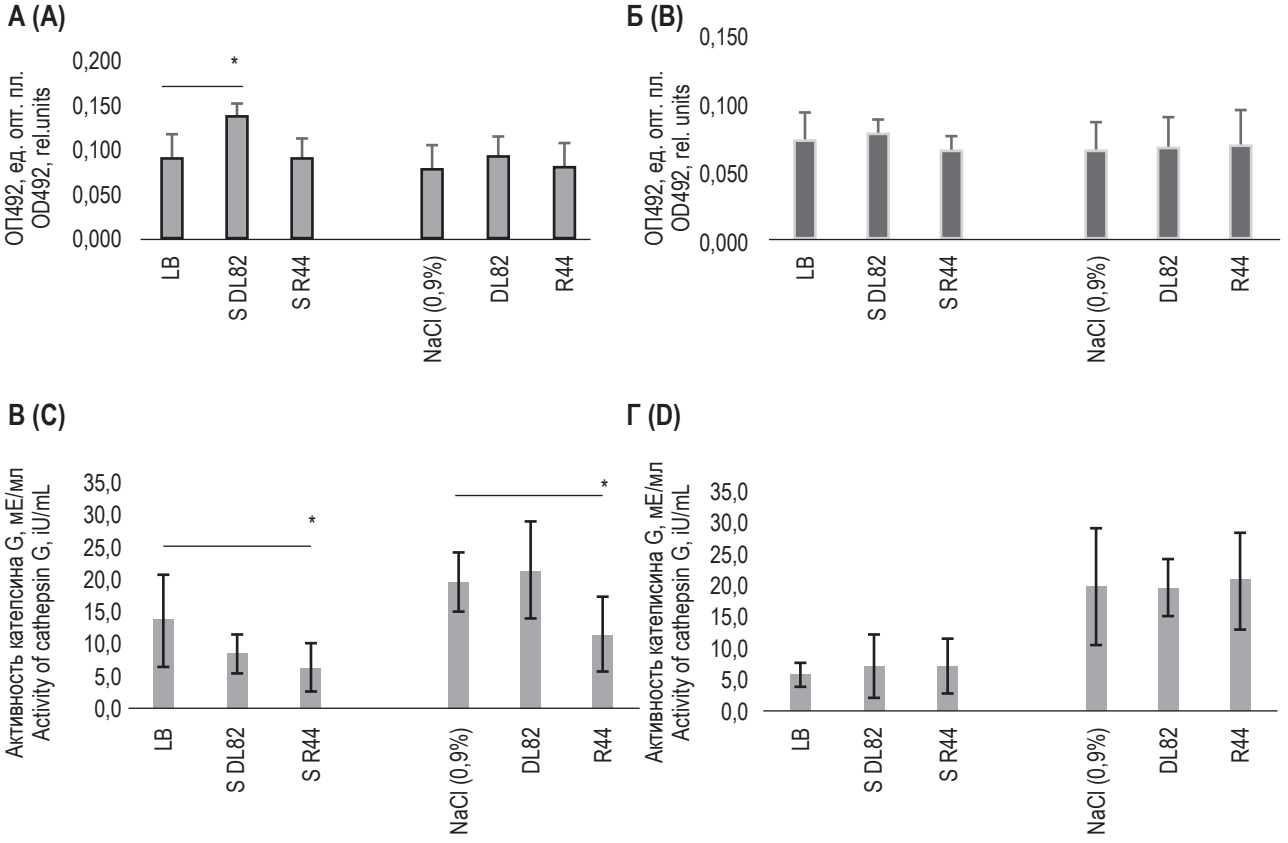

Рисунок 1. Секреция МПО (А, В) и катепсина G (Б, Г) нейтрофилами (А, В) и мононуклеарными клетками (Б, Г) при взаимодействии с клетками и супернатантами (S) UPEC штаммов DL82 и R44

Figure 1. Secretion of MPO (A, B) and cathepsin G (C, D) by neutrophils (A, C) and mononuclear cells (B, D) upon interaction with cells and supernatants (S) of UPEC DL82 and R44

DL82, так как присутствие вирулентных факторов может активировать нейтрофилы и иммунный ответ.

Цитотоксический некротизирующий фактор, секретируемый бактериями UPEC, может приводить к изменению проницаемости клеточной мембраны нейтрофилов, что рассматривается как механизм, препятствующий элиминации патогена. Гемолизин α имеет цитолитическое действие по отношению к нейтрофилам и мононуклеарам, при сублитических концентрациях проявляет иммуномодулирующие эффекты [15]. Повышение внешней секреции МПО нейтрофилами при взаимодействии с супернатантами штамма *E. coli* DL82, вероятно, связано с лизисом нейтрофилов, поскольку при контакте с супернатантами *E. coli* R44, геном которого не характеризуется наличием факторов патогенности, внешняя секреция нейтрофилов оставалась неизменной. Эти механизмы играют ключевую роль в процессе элиминации UPEC при ИМП.

Секреторная МПО активность нейтрофилов не изменялась при взаимодействии с бактериями биопленок обоих штаммов *E. coli* DL82 и R44, вероятно, вследствие их фагоцитоза.

Нейтрофильные сериновые протеазы человека, к которым относится катепсин G, активируются на поверхности нейтрофилов. Они в основном остаются связанными с плазматической мембраной во время экзоцитоза гранул, позволяя нейтрофилам модулировать свой воспалительный ответ посредством сохранения своей каталитической активности [8]. С этим может быть связано снижение активности катепсина G при действии бактерий биопленок и их супернатантов штамма *E. coli* R44 (рис. 1В).

Штаммы с низким вирулентным потенциалом часто являются причиной хронической инфекции, т. к. быстро запускают апоптотические механизмы нейтрофилов [2]. Вероятно, уход в апоптоз нейтрофилов при контакте с бактериями

E. coli R44 также является причиной снижения внешней секреции катепсина G.

Неклассические функции нейтрофилов, включая их взаимодействие с различными типами иммунных клеток, такими как макрофаги и моноциты, играют важную роль в связывании врожденного и адаптивного иммунитета [14]. Вне зависимости от уровня вирулентности штаммов UPEC, в рамках нашего исследования мононуклеары периферической крови не продемонстрировали изменений в секреции МПО и катепсина G в ответ на воздействие биопленочных бактерий и их супернатантов. Это может свидетельствовать о том, что при инфекциях мочевыводящих путей (ИМП) данный тип иммунных клеток не демонстрирует секреторных эффектов при контакте с биопленками UPEC.

Заключение

Таким образом, показано, что экзометаболиты бактерий и, вероятно, компоненты межклеточного матрикса бактериальных биопленок UPEC, включая экзополисахариды, белки, липиды, тейхоевые кислоты и внеклеточную ДНК, а также вирулентные факторы, оказывают более значительное влияние на фагоциты, чем сами бактерии.

Список литературы / References

1. Замолодчикова Т.С., Толпыго С.М., Шойбонов Б.Б., Котов А.В. Катепсин G человека – многофункциональная протеаза иммунитета // Иммунология, 2018. Т. 39, № 2-3. С. 151-157. [Zamolodchikova T.S., Tolpygo S.M., Shoibonov B.B., Kotov A.V. Human catheptsin G – multifunctional immunity protease. *Immunologiya = Immunologiya, 2018, Vol. 39, no. 2-3, pp. 151-157.* (In Russ.)]

2. Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л., Ширшев С.В. Взаимодействие нейтрофилов, предобработанных гормонами, с биопленками комменсального и уропатогенного штаммов *Escherichia coli in vitro* // Инфекция и иммунитет, 2020. Т. 10, № 1. С. 64-72. [Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Orlova E.G., Gorbunova O.L., Shirshev S.V. *In vitro* interaction of hormone-conditioned neutrophils with commensal and uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 64-72.* (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IVI-1146.

3. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Некрасова И.В., Ширшев С.В. Влияние супернатантов смешанной культуры *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* на апоптоз, некроз и окислительную активность нейтрофилов // Доклады Академии наук, 2015. Т. 461, № 1. С. 110-113. [Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Nekrasova I.V., Shirshev S.V. Effect of mixed culture supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* on apoptosis, necrosis, and oxidative activity of neutrophils. *Doklady Akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences, 2015, Vol. 461, no. 1, pp. 112-115.* (In Russ.)]

4. Abraham S.N., Miao Y. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat. Rev. Immunol., 2015, Vol. 15, no. 10, pp. 655-663.*

5. Atwal M., Lishman E.L., Austin C.A., Cowell I.G. Myeloperoxidase enhances etoposide and mitoxantrone-mediated DNA damage: a target for myeloprotection in cancer chemotherapy. *Mol. Pharmacol., 2017, Vol. 91, no. 1, pp. 49-57.*

6. Berry M.R., Mathews R.J., Ferdinand J.R., Jing C., Loudon K.W., Wlodek E., Dennison T.W., Kuper C., Neuhofer W., Clatworthy M.R. Renal sodium gradient orchestrates a dynamic antibacterial defense zone. *Cell, 2017, Vol. 170, no. 5, pp. 860-874.e19.*

7. Gao S., Zhu H., Zuo X., Luo H. Cathepsin G and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch. Rheumatol., 2018, Vol. 33, no. 4, pp. 498-504.*

8. Gigon L., Yousefi S., Karaulov A., Simon H.U. Mechanisms of toxicity mediated by neutrophil and eosinophil granule proteins. *Allergol. Int., 2021, Vol. 70, no. 1, pp. 30-38.*

9. Hung C., Zhou Y., Pinkner J.S., Dodson K.W., Crowley J.R., Heuser J., Chapman M.R., Hadjifrangiskou M., Henderson J.P., Hultgren S.J. Escherichia coli biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *mBio, 2013, Vol. 4, no. 5, e00645-13.* doi: 10.1128/mBio.00645-13.

10. Kargi H.A., Campbell E.J., Kuhn C. 3rd. Elastase and cathepsin G of human monocytes: heterogeneity and subcellular localization to peroxidase-positive granules. *J. Histochem. Cytochem., 1990, Vol. 38, no. 8, pp. 1179-1186.*

11. Kavanaugh J.S., Leidal K.G., Nauseef W.M., Horswill A.R. Cathepsin G degrades Staphylococcus aureus biofilms. *J. Infect. Dis., 2021, Vol. 223, no. 11, pp. 1865-1869.*

12. Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Pospelova J.S., Žgur Bertok D., Starčič Erjavec M. Differences in recipient ability of uropathogenic Escherichia coli strains in relation with their pathogenic potential. *Infect. Genet. Evol., 2022, Vol. 97, 105160.* doi: 10.1016/j.meegid.2021.105160.

13. Kuznetsova M.V., Pospelova J.S., Maslennikova I.L., Starčič Erjavec M. Dual-species biofilms: biomass, viable cell ratio/cross-species interactions, conjugative transfer. *Int. J. Mol. Sci., 2023, Vol. 24, no. 19, pp. 76-82.*

14. Melbouci D., Haidar Ahmad A., Decker P. Neutrophil extracellular traps (NET): not only antimicrobial but also modulators of innate and adaptive immunities in inflammatory autoimmune diseases. *RMD Open, 2023, Vol. 9, no. 3, e003104.* doi: 10.1136/rmdopen-2023-003104.

15. Olson P.D., Hunstad D.A. Subversion of host innate immunity by uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens, 2016, Vol. 5, no. 1, 2.* doi: 10.3390/pathogens5010002.

Автор:

Масленникова И.Л. *— к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия*

Author:

Maslennikova I.L., *PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

Поступила 19.03.2025
Отправлена на доработку 20.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 19.03.2025
Revision received 20.03.2025
Accepted 25.05.2025