

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

УДК 579:577.11:612. 112.9

ПОКАЗАТЕЛИ СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA* IN VITRO**Е.И. ГАЙДАШ¹, И.С. ГАЙДАШ¹, Е.А. ДЫЧКО², С.Т. КОХАН³**¹Луганский государственный медицинский университет,
г. Луганск, Украина²Донбасский государственный педагогический университет,
г. Славянск, Украина³Забойкальский государственный университет,
г. Чита, Российская Федерация

Введение. Секретция цитокинов – одна из важных функций нейтрофилов и моноцитов [1–4, 6]. Вовлекаясь в воспалительные процессы и представляя собой авангардную линию противoinфекционной защиты, нейтрофилы и моноциты посредством цитокинов запускают воспалительные и иммунные реакции [8]. Спектр секретируемых цитокинов нейтрофилами и моноцитами весьма разнообразен, что обуславливает мультипотентность их биологических эффектов [1, 6]. К числу секретируемых цитокинов относятся интерлейкины (ИЛ), из которых мощным провоспалительным действием обладают ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α [2, 6, 8]. Главными стимуляторами секреторной активности моноцитов и нейтрофилов являются соединения микробного происхождения, нередко несущие признаки генетической чужеродности. К числу таких субстанций относятся и структурные компоненты клеточных стенок грамотрицательных бактерий – липополисахариды (ЛПС). В настоящее время достаточно изучена секреторная активность нейтрофилов и моноцитов под влиянием ЛПС таких условно-патогенных видов бактерий, как *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* [1–4]. Просекреторный потенциал ЛПС бактерий рода *Shigella* в культурах нейтрофилов и моноцитов до настоящего времени не исследовался. Работа является фрагментом плановой научной темы кафедры микробиологии ГУ «Луганский государственный медицинский университет» № 01110U007081 «Иммуносупрессивный и апоптогенный потенциал условно-патогенных бактерий и грибов».

Целью настоящего исследования явилось определение in vitro секреторной активности нейтрофилов и моноцитов крови человека под воздействием ЛПС бактерий рода *Shigella*.

Методика и объекты исследования. Секретция цитокинов изучалась на культурах нейтрофилов и моноцитов, изолированных из периферической крови 44 практически здоровых лиц мужского пола 19–24 лет (средний возраст – 22,7 \pm 1,3 года). Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики (Страсбург, 1985 год).

Популяции моноцитов и нейтрофилов из периферической крови выделяли при помощи центрифугирования на двойном градиенте плотности 1,077 и 1,093 фекол-верографина [7]. Чистоту суспензии моноцитов (89–98 %) подтверждали иммунофлуоресцентным методом с использованием моноклональных антител к рецепторам CD14. Жизнеспособность клеток в суспензии подтверждали в тесте с трипановым синим (она составляла 89–93 %). Рабочая концентрация суспензий нейтрофилов и моноцитов – 2*10⁶/мл.

ЛПС получали из культур *Shigella flexneri* (серовары 1a, 1b, 2a, 2b) и *Shigella sonnei* [5, 9]. Идентификацию шигелл проводили с использованием диагностических наборов «Энтеротест 24» производства фирмы Микро-ЛА-Тест, АО «Ляхема», Чехия. Препараты ЛПС получали при 65 $^{\circ}$ C водно-феноловой экстракцией. Очищение выполняли обработкой 50 нг/мл РНКазой (фирма Sigma) и 16 нг/мл ДНКазой (фирма Sigma) с последующим диализом через 50 М трис-буфер и центрифугированием при 20 000 g в течение 30 мин. Осадок сушили лиофильно. Для восстановления активности ЛПС и их структурных компонентов применяли редокс-обработку. Растворы ЛПС обрабатывали 2-меркаптоэтанолом с конечной концентрацией 0,1 М в течение 18 ч при 4 $^{\circ}$ C. Раствор хранили при –20 $^{\circ}$ C. Перед использованием раствор обрабатывали ультразвуком в водной бане в течение 5 мин.

Идентификацию сероваров *Sh. flexneri* проводили в реакции агглютинации с шигеллезными О–

сыворотками.

Для стимуляции *in vitro* нейтрофилов и моноцитов использовались следующие концентрации шигеллёзных ЛПС: 1–10–100 мкг/мл.

Содержание ИЛ–1 β , ИЛ–6, ИЛ–8, ФНО– α в средах культивирования нейтрофилов и моноцитов определяли иммуоферментным методом с использованием тест–систем производства фирмы R&D Systems, США и коммерческих тест–систем производства фирмы «Gen–Probe Diacclone» (Франция), в соответствии с инструкциями о порядке проведения исследования для каждого из указанных медиаторов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что непосредственный контакт *in vitro* ЛПС бактерий рода *Shigella* с нейтрофилами и моноцитами крови человека существенно увеличивал секреторную активность данных клеток. При этом степень повышения секреции изучаемых цитокинов зависела как от вида клеток–мишеней, так и от действующей концентрации шигеллёзных ЛПС (таблицы 1 и 2).

Таблица 1 – Влияние ЛПС бактерий рода *Shigella* на секреторную активность нейтрофилов крови человека *in vitro* (M \pm m)

Вид бактерий	ИЛ– β (пг/мл)	ИЛ–6 (пг/мл)	ИЛ–8 (пг/мл)	ФНО– α (пг/мл)
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	6,05 \pm 0,30*	6,12 \pm 0,31*	8,49 \pm 0,42*	9,60 \pm 0,48*
<i>S. sonnei</i>	5,36 \pm 0,27*	6,33 \pm 0,32*	7,38 \pm 0,35*	9,70 \pm 0,49*
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	14,78 \pm 0,74*	24,57 \pm 1,23*	24,72 \pm 1,24*	17,95 \pm 0,90*
<i>S. sonnei</i>	13,93 \pm 0,70*	24,26 \pm 1,21*	25,93 \pm 1,29*	17,39 \pm 0,87*
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	32,63 \pm 1,63*	50,64 \pm 2,53*	62,29 \pm 3,11*	45,45 \pm 2,27*
<i>S. sonnei</i>	30,33 \pm 0,06*	51,61 \pm 2,62*	60,13 \pm 3,00*	41,52 \pm 2,08*
Референтная норма (n=45)	3,65 \pm 0,15	3,7 \pm 0,19	4,7 \pm 0,2	6,4 \pm 0,32

Примечание – * p<0,001; 2. p рассчитано по отношению к референтной норме.

Таблица 2 – Влияние ЛПС бактерий рода *Shigella* на секреторную активность моноцитов крови человека *in vitro* (M \pm m)

Вид бактерий	ИЛ– β (пг/мл)	ИЛ–6 (пг/мл)	ИЛ–8 (пг/мл)	ФНО– α (пг/мл)
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	20,13 \pm 1,00*	14,73 \pm 0,74*	12,16 \pm 0,61*	17,86 \pm 0,89*
<i>S. sonnei</i>	20,20 \pm 1,00*	15,11 \pm 0,76*	10,86 \pm 0,54*	16,31 \pm 0,81*
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	57,43 \pm 2,87*	42,17 \pm 2,11*	35,11 \pm 1,76*	56,77 \pm 2,84*
<i>S. sonnei</i>	56,40 \pm 2,85*	39,52 \pm 1,98*	32,44 \pm 1,63*	55,42 \pm 2,77*
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	189,50 \pm 9,48*	131,59 \pm 6,58*	71,54 \pm 3,55*	149,40 \pm 7,47*
<i>S. sonnei</i>	180,00 \pm 9,05*	124,35 \pm 6,22*	71,65 \pm 3,58*	151,02 \pm 7,55*
Референтная норма (n=45)	6,8 \pm 0,4	4,4 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	7,5 \pm 0,3

Примечание – * p<0,001; 2. p рассчитано по отношению к референтной норме.

Наибольшую чувствительность к воздействию ЛПС проявляли моноциты, что выражалось в существенно более высоких уровнях продукции всех исследуемых цитокинов, независимо от действующих концентраций ЛПС. Вместе с тем, по мере увеличения концентрации шигеллёзных ЛПС как в культурах моноцитов, так и в культурах нейтрофилов секреция цитокинов прогрессивно возрастала. При этом статистически значимых различий между уровнями определяемых цито-

кинов в культурах клеток–мишеней, взаимодействующих с ЛПС *Sh. flexneri* и *Sh. zonnei* равной концентрации, выявлено не было, что свидетельствовало об отсутствии видоспецифического влияния ЛПС данных видов шигелл на секреторную активность моноцитов и нейтрофилов крови человека.

Наименьший стимулирующий эффект на секреторную функцию указанных популяций иммунных клеток оказывали шигеллёзные ЛПС, использованные в действующей концентрации 1 мкг/мл. Под их влиянием секреция ИЛ-1 β в культуральной среде нейтрофилов увеличивалась относительно референтной нормы в 1,66 раза при использовании ЛПС *Sh. flexneri* и в 1,47 раза при использовании ЛПС *Sh. zonnei*. Для ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α подобные степени изменения составили 1,65 и 1,71, 1,81 и 1,57, 1,50 и 1,52 раза, соответственно ($p < 0,001$ во всех сопоставлениях). В культурах моноцитов крови человека ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. zonnei* в аналогичной действующей концентрации вызывали подъём секреции ИЛ-1 β , соответственно, в 2,96 и в 2,97 раза, ИЛ-6 – в 3,35 и в 3,43 раза, ИЛ-8 – в 4,34 и в 3,88 раза, ФНО- α – в 2,38 и в 2,17 раза ($p < 0,001$ для всех случаев сравнения). Абсолютные показатели секреции тестируемых цитокинов в культурах моноцитов заметно превышали подобные в культурах нейтрофилов.

Увеличение действующей концентрации шигеллёзных ЛПС до 10 мкг/мл сопровождалось усилением секреторного ответа нейтрофилов и моноцитов, по сравнению как с референтной нормой, так и по сравнению с уровнями секреции цитокинов с шигеллёзными ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл.

Так, в присутствии ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. zonnei* в дозе 10 мкг/мл средние уровни ИЛ-1 β в культуральной среде нейтрофилов превысили референтную норму в 4,05 и в 3,82 раза, уровни ИЛ-6 – в 6,61 и в 6,56 раза, ИЛ-8 – в 5,26 и в 5,52 раза, ФНО- α – в 2,80 и в 2,72 раза, соответственно. В тоже время, в культуральных средах моноцитов, также стимулированных ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. zonnei* в дозе 10 мкг/мл, средние уровни ИЛ-1 β превысили показатель референтной нормы, соответственно, в 8,45 и в 8,29 раза, ИЛ-6 – в 9,58 и в 8,3 раза, ИЛ-8 – в 12,5 и в 11,59 раза, а ФНО- α – в 7,57 и в 7,39 раза. Во всех приведенных сравнениях различия статистически значимы.

Наибольший подъём секреторной активности нейтрофилов и моноцитов крови человека был зарегистрирован при взаимодействии данных иммунных клеток с шигеллёзными ЛПС, использованными в действующей концентрации 100 мкг/мл.

Так, в присутствии ЛПС *Sh. flexneri* (100 мкг/мл) степень прироста секреции ИЛ-1 β в культуральной среде нейтрофилов в конце опыта составила, относительно референтной нормы, 8,94 раза, ИЛ-6 – 13,68 раза, а ИЛ-8 и ФНО- α – соответственно 13,25 и 7,10 раза. В присутствии ЛПС *Sh. zonnei* аналогичной действующей концентрации кратность увеличения секреции ИЛ-1 β нейтрофилами составила 8,31 раза, ИЛ-6 – 13,95 раза, ИЛ-8 – 12,79 раза, а ФНО- α – 6,49 раза. Во всех приведенных сопоставлениях $p < 0,001$.

Под влиянием ЛПС *Sh. flexneri* в действующей концентрации 100 мкг/мл секреция моноцитами ИЛ-1 β увеличилась, против референтной нормы, в 27,87 раза ($p < 0,001$). Для ИЛ-6 подобное изменение составило 29,91 раза, для ИЛ-8 – 25,55 раза, а для ФНО- α – 19,92 раза. Сходные изменения были зарегистрированы и в эксперименте с ЛПС *Sh. zonnei* аналогичной действующей дозы. При этом средний уровень секреции ИЛ-1 β в культурах моноцитов превысил референтную норму в 26,47 раза, а уровни ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α – в 28,26 раза, в 25,59 и в 20,14 раза, соответственно (во всех сравнениях $p < 0,001$).

Следует также отметить, что концентрации изучаемых цитокинов, выявленные в опытах с ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. zonnei*, независимо от их действующих концентраций в однотипных культурах клеток–мишеней, достоверных различий между собой не имели, что указывало на отсутствие их видоспецифического действия на секреторную активность, как нейтрофилов, так и моноцитов.

Выводы. ЛПС бактерий рода *Shigella* (*Shigella flexneri*, *Shigella zonnei*) оказывают *in vitro* дозозависимое и видонеспецифическое влияние на секреторную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека, стимулируя продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α . Просекреторное влияние шигеллёзных ЛПС на нейтрофилы и моноциты возрастает по мере увеличения действующей концентрации ЛПС. Наибольшим просекреторным потенциалом обладали шигеллёзные ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, наименьшим – ЛПС в концентрации 1 мкг/мл. Стимулированная шигеллёзными ЛПС секреторная активность моноцитов превышает таковую для нейтрофилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние *in vitro* пептидогликанов, тейхоевых кислот и липополисахаридов бактерий – этиологических агентов хронических функциональных колостазов у детей на функциональную, метаболическую активность и апоптоз моноцитов и нейтрофилов / [Г.Н. Давидчук, Н.К. Казимирко, И.С. Гайдаш и др.]. – Л. : СПД Резников В.С., 2010. – 108 с.
2. Вовк, О.О. Вплив ліпополісахаридів *Pseudomonas aeruginosa* на функціональну активність моноцитів крові людини / Вовк О.О., М.Ю. Перфільєва, Т.О. Журба // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2011. – Том 6, №2. – С. 55 – 57.
3. Вплив *in vitro* різних методів інактивації токсинів сальмонелл на метаболічний статус моноцитів, нейтрофілів та ентероцитів / О.І. Шабельник, І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова [та ін.]. – Л. : СПД Резников В.С., 2011. – 116 с.
4. Гайдаш, І.С. Вплив ліпополісахаридів *Escherichia coli* на функціональну активність моноцитів крові людини / І.С. Гайдаш, М.Ю. Перфільєва, О.О. Вовк, Т.О. Журба // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2011. – Том 6, №3. – С. 27 – 30.
5. Кульшин, В.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / В.А. Кульшин, А.А. Яковлев, С.Н. Авиева // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1987. – № 5. – С. 44 – 46.
6. Липополисахарид–опосредованная активация нейтрофилов периферической крови у больных острой дизентерией / И.М. Рослый, В.А. Малов, В.Б. Полуэктов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 1. – С. 52 – 54.
7. Михеенко, Т.В. Два метода получения обогащённой популяции моноцитов периферической крови / Т.В. Михеенко // Лабораторное дело. – 1987. – № 10. – С. 763 – 766.
8. Ulevitch, R.J. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system / R.J. Ulevitch, P.S. Tobias // Current Opinions in Immunology. – 2007. – № 11. – P. 19 – 22.
9. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol–water and further application of the procedure / O. Westphal, K. Jann // Methods of Carbohydrate Chemistry. – 1965. – № 5. – P. 83 – 91.

INDICES OF SECRETORY ACTIVITY OF HUMAN BLOOD NEUTROPHILES AND MONOCYTES BEEN UNDER THE INFLUENCE OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES OF GENUS SHIGELLA IN VITRO

E.I. GAIDASH, I.S. GAIDASH, E.A. DICHKO, C.T. KOKHAN

Summary

Article is dedicated to the study *in vitro* of secretory activity of human blood neutrophils and monocytes been under the influence of lipopolysaccharides of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei*. It was found that of *Shigella's* LPS stimulates secretion human neutrophils and monocytes IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α dose-dependently and species-nonspecifically.

Key words: neutrophils, monocytes, cytokines, lipopolisaccharide, shigella.

© Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., Дычко Е.А., Кохан С.Т.

Поступила в редакцию 2 сентября 2013г.