

УДК 577.1:612.112.94:579

© Гайдаш И.С., Русалов В.Л., Салманова О.Н., Волобуева Л.Н., 2012

ИЗМЕНЕНИЯ В СИСТЕМЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ CD4+ ЛИМФОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТОКСИНОВ.**Гайдаш И.С., Русалов В.Л., Салманова О.Н., Волобуева Л.Н.**

ГУ «Луганский государственный медицинский университет»

Введение. Подавляющее большинство инфекционных процессов бактериальной этиологии протекает на фоне функциональной недостаточности фагоцитарного звена иммунной системы и формирования супрессорного варианта иммунодефицита [3, 5, 6, 8]. Недостаточность фагоцитарной системы, дефицит Т-хелперов/индукторов и их функциональная неполноценность являются основными критериями степени тяжести иммунодефицитного состояния [1, 2, 4].

Этиологическими факторами, обуславливающими развитие иммунодефицита при бактериальных инфекциях, являются структурные компоненты бактерий – тейхоевые кислоты (ТК), пептидогликаны (ПГН) и липополисахариды (ЛПС), способные стимулировать в иммунокомпетентных клетках апоптоз, влиять на их секреторную, фагоцитарную и метаболическую активность [9, 11, 12, 14, 15].

Известно, что разные виды иммунокомпетентных клеток различаются исходным уровнем своей метаболической активности, внутриклеточным содержанием циклических и адениловых нуклеотидов, спектром ферментов [13]. Изменение метаболических констант в иммунокомпетентных клетках влечёт за собой изменение их функциональной активности.

Недостаточно изученными остаются особенности систем циклических нуклеотидов в Т-хелперах/индукторах и цитотоксических Т-супрессорах. Выяснение этих особенностей создаст теоретическую базу для оптимизации фармакологической коррекции иммунодефицитных состояний при бактериальных инфекционных процессах.

Связь работы с научными программами, темами. Статья выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы (НИР) кафедры микробиологии ГУ «Луганский государственный медицинский университет» и представляет собой фрагмент темы НИР «Воспаление как результат действия бактерий» (№ госрегистрации № 0198U005713).

Цель исследования: Определить *in vitro* влияние пептидогликанов (ПГН) и тейхоевых кислот (ТК) *Staphylococcus aureus*, и липополисахаридов (ЛПС) *Escherichia coli* на систему циклического аденозина (цАМФ) и гуанозина (цГМФ) монофосфатов в CD4+-лимфоцитах.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были 146 культур Т-хелперов/индукторов периферической крови 47 практически здоровых доноров-мужчин в возрасте от 19 до 24 лет. Забор крови в объёме 20 мл проводили из локтевой вены в утреннее время (07.00-08.00) до еды. Кровь вносили в сте-

рильные стеклянные пробирки, содержавшие 0,2 мл гепарина, перемешивали и для получения плазмы отстаивали при 37 °С в течение 2 ч в термостате. Полученную плазму крови в дальнейшем использовали для выделения лимфоцитов.

ЛПС получали из клеточных стенок культур *Escherichia coli*, ПГН и ТК – из клеточных стенок *Staphylococcus aureus*, выделенных от 78 пациентов 19-24 лет с гнойно-воспалительными заболеваниями хирургического профиля.

Лимфоциты выделяли на двойном ($p=1,076$ и $p=1,095$) градиенте плотности фиколла-верографина по модифицированной методике Boyum [7].

ПГН получали из клеточных стенок *Staphylococcus aureus* по методу Р. К. Peterson и соавт. [16]. ТК экстрагировали из клеточных стенок *Staphylococcus aureus* 10 % трихлоруксусной кислотой. Экстракт очищали с помощью колонки с ДЕАЕ-целлюлозой и софадекса J-50. Рабочие концентрации ТК составили 10 и 100 мкг/мл. Препараты ЛПС получали водно-феноловой экстракцией из культуры *Escherichia coli* [10, 17]. Очистку препаратов проводили обработкой 50 нг/мл РНКазы (фирмы Sigma) и 16 нг/мл ДНКазы (фирмы Sigma) с последующим диализом через 50 М трис-буфер и центрифугированием при 20000 г в течение 30 минут.

Результаты исследования и их обсуждение. Как следует из материалов таблицы 1, под воздействием ТК *Staphylococcus aureus* в дозе 10 мкг/мл концентрация цАМФ в CD4+-лимфоцитах на 6 ч опыта оказалась в 1,27 раза выше показателя интактных клеток. На 24 ч опыта аналогичное различие составило 1,35 раза (в обоих случаях различия статистически значимы).

Содержание цГМФ в CD4+-лимфоцитах в опыте с ТК в дозе 10 мкг/мл на 6 ч оказалось ниже показателя интактных клеток в 1,2 раза, а на 24 ч – ниже в 1,28 раза, что в обоих случаях было статистически достоверно, против соответствующих показателей интактных клеток.

При воздействии ТК в концентрации 100 мкг/мл изменения внутриклеточного содержания цАМФ и цГМФ в CD4+-лимфоцитах оказались ещё более выраженными. Так, на 6 ч эксперимента увеличение уровня цАМФ против показателя интактных клеток составило 1,71 раза, на 24 ч – 1,97 раза ($p<0,001$ в обоих случаях). В то же время, содержание цГМФ в CD4+-лимфоцитах на 6 и 24 ч опыта оказалось сниженным относительно соответствующих показателей интактных клеток в 1,3 и в 1,41 раза.

Таблица 1. Влияние пептидогликанов, тейхоевых кислот и липополисахаридов бактерий на циклические нуклеотиды CD4+-лимфоцитов крови человека *in vitro*

| Время, ч | Интактные клетки (n=37) | ТК, мкг/мл | | ПГН, мкг/мл | | ЛПС, мкг/мл | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| | | 10 (n=18) | 100 (n=18) | 10 (n=19) | 100 (n=17) | 10 (n=18) | 100 (n=19) |
| цАМФ (пкмоль/1 миллион клеток) | | | | | | | |
| 0 | 1,50±0,13 | 2,69±0,13 | 2,76±0,14 | 2,71±0,12 | 2,7±0,12 | 2,74±0,13 | 2,7±0,14 |
| 6 | 1,62±0,14 | 2,05±0,10* | 2,77±0,14** | 2,64±0,13** | 3,91±0,19** | 2,86±0,14** | 4,51±0,2** * |
| 24 | 1,86±0,15 | 2,51±0,13* * | 3,66±0,18** | 3,46±0,17** | 5,43±0,27** | 4,11±0,21** | 7,26±0,4** * |
| цГМФ (пкмоль/1 миллион клеток) | | | | | | | |
| 0 | 2,70±0,12 | 2,67±0,13 | 2,72±0,12 | 2,68±0,13 | 2,69±0,11 | 2,67±0,14 | 2,68±0,1 |
| 6 | 2,62±0,13 | 2,18±0,10* | 2,01±0,10*** | 2,11±0,1** | 1,75±0,09*** | 2,04±0,10*** | 1,63±0,1*** |
| 24 | 2,31±0,11 | 1,81±0,09** | 1,64±0,08*** | 1,59±0,08*** | 1,41±0,07*** | 1,52±0,08*** | 1,34±0,1*** |
| цАМФ/цГМФ (у.е.) | | | | | | | |
| 0 | 0,60±0,03 | 0,55±0,03 | 0,56±0,03 | 0,56±0,03 | 0,57±0,03 | 0,56±0,03 | 0,56±0,03 |
| 6 | 0,62±0,03 | 0,94±0,05*** | 1,38±0,06*** | 1,25±0,06*** | 2,23±0,11*** | 1,40±0,07*** | 2,77±0,1*** |
| 24 | 0,81±0,04 | 1,38±0,07*** | 2,23±0,11*** | 2,18±0,11*** | 3,85±0,19*** | 2,70±0,14*** | 5,41±0,3*** |

Примечание. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по сравнению с показателем интактных клеток.

ПГН *Staphylococcus aureus* вызывают в CD4+-лимфоцитах увеличение внутриклеточного содержания цАМФ и снижение содержания цГМФ, что сопровождалось увеличением значения интегрального коэффициента цАМФ/цГМФ. Указанное влияние ПГН *Staphylococcus aureus* является дозо- и времязависимым, то есть с увеличением действующей концентрации ПГН и времени его контакта с CD4+-лимфоцитами указанные ранее изменения цАМФ и цГМФ усиливаются. Под влиянием ПГН *Staphylococcus aureus* сдвиги в системе циклических нуклеотидов в CD4+-лимфоцитах более выражены, чем это имеет место в случае равных условий эксперимента.

Сходные с ПГН *Staphylococcus aureus*, но более выраженные изменения циклических нуклеотидов в CD4+-лимфоцитах вызывали ЛПС *Escherichia coli*. Как следует из приведенных в таблице 1 данных, под влиянием ЛПС *Escherichia coli* в действующей концентрации 10 мкг/мл внутриклеточная концентрация цАМФ в CD4+-лимфоцитах на 6 ч опыта оказалась выше соответствующего показателя интактных клеток в 1,77 раза, и в 1,08 раза выше аналогичного показателя в опыте с ПГН в дозе 10 мкг/мл. На 24 ч эксперимента внутриклеточная концентрация цАМФ превысила показатель интактных клеток и показатель в опыте с CD4+-лимфоцитами и ПГН в дозе 10 мкг/мл в 2,21 и в 1,19 раза (в обоих случаях сравнения различия статистически значимы).

Динамика изменений содержания цГМФ в CD4+-лимфоцитах под влиянием ПГН в дозе 100 мкг/мл была следующей. На 6 ч опыта уро-

вень цГМФ в указанных клетках оказался ниже показателя интактных клеток в 1,5 раза, на 24 ч – ниже в 1,64 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях сравнения).

Разнонаправленные сдвиги содержания цАМФ и цГМФ в CD4+-лимфоцитах вели к увеличению значения интегрального показателя цАМФ/цГМФ, который на 6 ч эксперимента оказался в 3,6 раза выше соответствующего показателя интактных клеток, а на 24 ч – выше в 4,75 раза ($p < 0,001$ в обоих случаях сравнения). Кроме того, зарегистрированные значения коэффициента цАМФ/цГМФ на 6 и 24 ч эксперимента в 1,78 и в 1,76 раза превышали аналогичные показатели в опытах с CD4+-лимфоцитами и ПГН в дозе 10 мкг/мл.

Выводы: 1. ЛПС *Escherichia coli*, ПГН и ТК *Staphylococcus aureus* при непосредственном их контакте с CD4+-лимфоцитами увеличивают внутриклеточную концентрацию цАМФ и снижают содержание цГМФ, в связи с чем значение интегрального коэффициента цАМФ/цГМФ увеличивается.

2. Наиболее выраженные изменения в системе циклических нуклеотидов CD4+-лимфоцитов наблюдались при их контакте с ЛПС, менее выраженные – при контакте с ТК.

3. Наибольшие изменения уровней циклических нуклеотидов имели место на 24 ч взаимодействия CD4+-лимфоцитов со структурными компонентами бактерий в действующей концентрации 100 мкг/мл, наименьшие изменения регистрировали на 6 ч опыта с действующей концентрацией бактериальных токсинов 10 мкг/мл.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Гебеш В.В. Цитокинова теорія патогенезу інфекцій і принципи лікування хворих / В.В. Гебеш //

Інфекційні хвороби. – 1998. – № 1. – С. 29-32.

2. Косенко Ю.В. Влияние липополисахаридов

- этиологических агентов хронического пародонтита на фагоцитарную активность моноцитов / Ю.В. Косенко // Украинский медицинский альманах. – 2005. – № 5. – С. 66-68.
3. **Моисеева Е.Г.** Метаболический гомеостаз и иммунная реактивность организма в динамике воспаления в тканях пародонта (экспериментальное исследование): автореф. дис. на соискание учёной степени доктора мед. наук: спец: 14.00.16 «Патологическая физиология» / Е.Г. Моисеева. – М., 2008. – 32 с.
4. Секреція інтерлейкінів-1 β та -6 моноцитами *in vitro* при експериментальному сепсисі / **М.Ф. Даченко, Є.В. Суглобов, О.М. Салманова** // Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О. Можасва. – 2001. – № 3. – С. 71-73.
5. **Спивак Н.Я.** Сепсис: иммунология и иммунокоррекция / Н.Я. Спивак, С.М. Белоцкий, В.А. Карлов. – К.: Фитосоциоцентр, 2007. – 304 с.
6. **Фомин В.В.** Функциональное состояние фагоцитарного, гуморального, клеточного звеньев иммунитета при стрептококковой инфекции / В.В. Фомин, С. В. Пустынникова // Уральский медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 532-533.
7. **Хейфец Л.Б.** Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл / Л.Б. Хейфец, В.А. Абалакина // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 579-581.
8. Foster T.J. Immune evasion by staphylococci / T.J. Foster // *Natural Reviews in Microbiology*. – 2005. – № 3. – P. 948-958.
9. Francisella tularensis genes required for inhibition of the neutrophil respiratory burst and intramacrophage growth identified by random transposon mutagenesis of LVS // **G.S. Schulert, R.L. McCaffrey, B.W. Buchan [et al.]** // *Infection and Immunity*. – 2009. – № 2. – P. 9-18.
10. **Galanos C.** A new method for the extraction of R-lipopolysaccharides / C. Galanos, O. Luderitz, O. Westphal // *European Journal of Biochemistry*. – 1969. – № 2. – P.245-249.
11. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate Helicobacter pylori-mediated interleukin-8 release from macrophages / **A. Bhattacharyya, S. Pathak, S. Datta [et al.]** // *Biochemical Journal*. – 2002. – № 368 (Pt. 1). – P. 121-129.
12. Neutrophil-derived metalloproteinase-9 predicts healing quality after sinus surgery / **J.B. Watelet, P. Demetter, C. Claeys [et al.]** // *Laryngoscope*. – 2005. – № 1. – P. 56-61.
13. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects / **V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha [et al.]** // *Laboratory Investigations*. – 2000. – № 80. – P. 617-653.
14. NOD2 engagement induces proinflammatory cytokine production, but not apoptosis, in leukocytes isolated from patients with Crohn's disease / **E. Bodar, M.G. Netea, D.J. de Jong [et al.]** // *European Cytokine Network*. – 2008. – № 4. – P. 185-189.
15. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation / **S.H. Rhee, E. Im, M. Riegler [et al.]** // *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*. – 2005. – № 38. – P. 13610-13615.
16. **Peterson P.K.** The key role of peptidoglycan in the opsonization of *Staphylococcus aureus* / P.K. Peterson, B.J. Wilkinson, Y. Kim // *Journal of Clinical Investigations*. – 1978. – № 3. – P. 597-609.
17. **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.

Гайдаш І.С., Русалов В.Л., Салманова О.М., Волобуєва Л.М. Зміни в системі циклічних нуклеотидів CD4 +-лімфоцитів під впливом бактеріальних токсинів // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 49-51.

Вивчено вплив структурних компонентів бактерій на систему циклічних нуклеотидів CD4 +-лімфоцитів. Встановлено, що найбільш виражені зміни в системі циклічних нуклеотидів CD4 +-лімфоцитів спостерігалися при їх контакті з ЛПС, менш виражені - при контакті з ТК.

Ключові слова: бактеріальні токсини, циклічні нуклеотиди, лімфоцити.

Гайдаш И.С., Русалов В.Л., Салманова О.Н., Волобуева Л.Н. Изменения в системе циклических нуклеотидов CD4+-лимфоцитов под влиянием бактериальных токсинов // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 49-51.

Изучено влияние структурных компонентов бактерий на систему циклических нуклеотидов CD4+-лимфоцитов. Установлено, что наиболее выраженные изменения в системе циклических нуклеотидов CD4+-лимфоцитов наблюдались при их контакте с ЛПС, менее выраженные – при контакте с ТК.

Ключевые слова: бактериальные токсины, циклические нуклеотиды, лимфоциты.

Gaidash I.S., Rusalov V.L., Salmanov O.M., Volobueva L.M. Changes in cyclic nucleotide CD4 + lymphocytes under the Influence of bacterial toxins // Украинский медицинский альманах. – 2012. – Том 15, № 3. – С. 49-51.

The influence of the structural components of bacteria in the system of cyclic nucleotides in CD4 + lymphocytes. Found that the most pronounced changes in the system of cyclic nucleotides CD4 + lymphocytes were observed when exposed to LPS, less pronounced - in contact with TA.

Key words: bacterial toxins, cyclic nucleotides, lymphocytes.

Надійшла 02.02.2012 р.
Рецензент: проф. І.В.Лоскутова