

УДК: 579: 577.11 : 612. 112.9

© Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., 2012

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA* НА СЕКРЕТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»

Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С. Влияние липополисахаридов бактерий рода *Shigella* на секреторную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека *in vitro* // Украинський морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 160-162.

Статья посвящена изучению секреторной активности нейтрофилов и моноцитов крови человека, подвергшихся *in vitro* воздействию разных концентраций липополисахаридов *Shigella flexneri* и *Shigella sonnei*. Установлено, что шигеллезные ЛПС стимулируют секрецию нейтрофилами и моноцитами ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- α дозозависимо и видонеспецифично.

Ключевые слова: нейтрофилы, моноциты, цитокины, липополисахарид, шигеллы.

Гайдаш О.И., Гайдаш И.С. Вплив ліпополісахаридів бактерій родини *Shigella* на секреторну активність нейтрофілів і моноцитів крові людини *in vitro* // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 160-162.

Стаття присвячена вивченню секреторної активності нейтрофілів і моноцитів крові людини, під впливом *in vitro* ліпополісахаридів *Shigella flexneri* і *Shigella sonnei* різної концентрації. Встановлено, що шигельозні ЛПС стимулюють секрецію нейтрофілами і моноцитами ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 та ФНО- α дозо залежно і видонеспецифічно.

Ключові слова: нейтрофіли, моноцити, цитокіни, ліпополісахарид, шигелли.

Gaidash E.I., Gaidash I.S. Influence of lipopolysaccharides from bacteria of genus *Shigella* on the secretory activity of human blood neutrophils and monocytes *in vitro* // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 4. – С. 160-162.

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, lipopolysaccharide, shigella.

Секреция 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*.

Материалы и методы исследования: Секреция 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 (фирмы Sigma) и 16 нг/мл ДНКазой (фирмы 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°C. Раствор хранили при -20°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 шигеллезных ЛПС: 1-10-100 мкг/мл.

Содержание ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α в средах культивирования нейтрофилов и моноцитов определяли иммуноферментным методом с

использованием тест-систем производства фирмы R&D Systems, США и коммерческих тест-систем производства фирмы «Gen-Probe Diacolor» (Франция), в соответствии с инструкциями о порядке проведения исследования для каждого из указанных медиаторов. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования 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 шигеллезных 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: 1. * - $p < 0,001$; 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: 1. * - $p < 0,001$; 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 шигеллезных ЛПС, как в культурах моноцитов, так и в культурах нейтрофилов секреция цитокинов прогрессивно возрастала. При этом статистически значимых различий между уровнями определяемых цитокинов в культурах клеток-мишеней, взаимодействующих с ЛПС *Sh. flexneri* и *Sh. sonnei* 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 сек-

реторную функцию указанных популяций иммунных клеток оказывали шигеллезные 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. sonnei*. 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. sonnei* в аналогичной действующей концентрации вызывали подъем 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). Абсо-

лютные показатели секреции тестированных цитокинов в культурах моноцитов заметно превышали подобные в культурах нейтрофилов.

Увеличение действующей концентрации шигеллезных 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 шигеллезными ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл.

Так, в присутствии ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. sonnei* 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 то же время, в культуральных средах моноцитов, также стимулированных ЛПС *Sh. flexneri* и ЛПС *Sh. sonnei* 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 иммуноцитов с шигеллезными 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. sonnei* 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. sonnei* 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. sonnei*, 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 sonnei*) 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 шигеллезных ЛПС на нейтрофилы и моноциты возрастает по мере увеличения действующей концентрации ЛПС. Наибольшим просекреторным потенциалом обладали шигеллезные ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, наименьшим – ЛПС в концентрации 1 мкг/мл. Стимулированная шигеллезными ЛПС секреторная активность моноцитов превышает таковую для нейтрофилов.

Перспективы дальнейших исследований. Планируется разработка фармакологических способов коррекции секреторной активности нейтрофилов и моноцитов крови человека, подвергшихся воздействию бактериальных ЛПС.

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 Резніков 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.

Надійшла 14.09.2012 р.

Рецензент: проф. А.М.Петруня