

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. ГАЙДАШ<sup>1</sup>, И.С. ГАЙДАШ<sup>1</sup>, Е.А. ДЫЧКО<sup>2</sup>, С.Т. КОХАН<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Луганский государственный медицинский университет,  
г. Луганск, Украина

<sup>2</sup>Донбасский государственный педагогический университет,  
г. Славянск, Украина

<sup>3</sup>Забойкальский 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 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- $\alpha$  [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 «Иммunosупрессивный 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\*10<sup>6</sup>/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 шигелл $\zeta$ ными О–

сыворотками.

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

Содержание ИЛ–1β, 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±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±0,30*	6,12±0,31*	8,49±0,42*	9,60±0,48*
<i>S. sonnei</i>	5,36±0,27*	6,33±0,32*	7,38±0,35*	9,70±0,49*
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	14,78±0,74*	24,57±1,23*	24,72±1,24*	17,95±0,90*
<i>S. sonnei</i>	13,93±0,70*	24,26±1,21*	25,93±1,29*	17,39±0,87*
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	32,63±1,63*	50,64±2,53*	62,29±3,11*	45,45±2,27*
<i>S. sonnei</i>	30,33±0,06*	51,61±2,62*	60,13±3,00*	41,52±2,08*
Референтная норма (n=45)	3,65±0,15	3,7±0,19	4,7±0,2	6,4±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±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±1,00*	14,73±0,74*	12,16±0,61*	17,86±0,89*
<i>S. sonnei</i>	20,20±1,00*	15,11±0,76*	10,86±0,54*	16,31±0,81*
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	57,43±2,87*	42,17±2,11*	35,11±1,76*	56,77±2,84*
<i>S. sonnei</i>	56,40±2,85*	39,52±1,98*	32,44±1,63*	55,42±2,77*
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
<i>S. flexneri</i>	189,50±9,48*	131,59±6,58*	71,54±3,55*	149,40±7,47*
<i>S. sonnei</i>	180,00±9,05*	124,35±6,22*	71,65±3,58*	151,02±7,55*
Референтная норма (n=45)	6,8±0,4	4,4±0,2	2,8±0,1	7,5±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 $\beta$  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- $\alpha$  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 $\beta$ , 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- $\alpha$  – 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 $\beta$  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- $\alpha$  – 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 $\beta$  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- $\alpha$  – 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 $\beta$  в культуральной среде нейтрофилов в конце опыта составила, относительно референтной нормы, 8,94 раза, ИЛ-6 – 13,68 раза, а ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  – соответственно 13,25 и 7,10 раза. В присутствии ЛПС *Sh. zonnei* аналогичной действующей концентрации кратность увеличения секреции ИЛ-1 $\beta$  нейтрофилами составила 8,31 раза, ИЛ-6 – 13,95 раза, ИЛ-8 – 12,79 раза, а ФНО- $\alpha$  – 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 $\beta$  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- $\alpha$  – 19,92 раза. Сходные изменения были зарегистрированы и в эксперименте с ЛПС *Sh. zonnei* аналогичной действующей дозы. При этом средний уровень секреции ИЛ-1 $\beta$  в культурах моноцитов превысил референтную норму в 26,47 раза, а уровни ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$  – 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 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и ФНО- $\alpha$ . 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 $\beta$ , IL–6, IL–8, and TNF– $\alpha$  dose–dependedly 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.*