

ПОКАЗАТЕЛИ АПОПТОЗА СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SHIGELLA IN VITRO*

А.В. ЯНЧЕВСКИЙ¹, И.С. ГАЙДАШ¹, В.В. ДЫЧКО², С.Т. КОХАН³

¹Луганский государственный медицинский университет,

г. Луганск, Украина

²Донбасский государственный педагогический университет,

г. Славянск, Украина

³Забойкальский государственный университет,

г. Чита, Российская Федерация

Введение. Недостаточность Т–системы иммунитета является основным фактором развития иммунодефицитного состояния [1, 9]. Подавляющее большинство инфекционных процессов бактериальной этиологии протекает на фоне формирования супрессорного варианта иммунодефицита [4, 10]. Основной причиной данного состояния является интоксикация, обусловленная действием бактериальных токсинов, в том числе и липополисахаридов (ЛПС) – структурных компонентов всех грамотрицательных бактерий [9].

В последние годы активно изучается влияние разных субстанций бактериальной природы на функциональную, метаболическую активность иммунокомпетентных клеток [6, 8]. Особое место в этом исследовании занимает аспект апоптоза иммуноцитов под влиянием бактериальных компонентов. Установлено апоптогенное воздействие на лимфоциты крови человека пептидогликанов, тейхоевых кислот, экзотоксинов и ЛПС отдельных представителей родов *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* [2, 3, 7]. Влияние липополисахаридов (ЛПС) бактерий рода *Shigella* на апоптоз Т–лимфоцитов крови человека ранее не изучалось.

Целью настоящего исследования явилось определение воздействия ЛПС бактерий рода *Shigella* на апоптоз Т–лимфоцитов крови человека *in vitro*.

Методика и объекты исследования. Показатели апоптоза изучались на культурах нейтрофилов и моноцитов, выделенных из крови 37 практически здоровых доноров 19–24 лет (средний возраст – 22,5±1,2 года). Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики (Страсбург, 1985 год).

Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколла–верографина ($\rho=1,076$) по модифицированной методике Воуит [5]. Сепарацию Т–лимфоцитов от популяций НК–лимфоцитов и В–лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов осуществляли с помощью моноклональных антител CD14, CD16 и CD22 (производства НПЦ «Медбиоспектр», Москва, РФ). Для этого в суспензию лимфоцитов вносили указанные антитела в разведении 0,1–0,2 мкг/мл в количестве 0,025 мл с последующим через 40 минут добавлением комплемента морской свинки, разведенного изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:1. Смесь инкубировали 60 мин в термостате, после чего Т–лимфоциты трижды отмывали при центрифугировании в среде 199. Сепарацию Т–лимфоцитов на субпопуляции Т–хелперов/индукторов и Т–супрессоров/цитотоксиков осуществляли при помощи моноклональных антител CD4 и CD8 по аналогичной методике. Рабочая концентрация суспензий Т–лимфоцитов составляла $2 \cdot (9 \text{ Ig})/\text{л}$.

Препараты ЛПС получали водно–феноловой экстракцией из культур *Shigella flexneri* (1a, 1b) *Shigella sonnei* [11]. 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 G в течение 30 мин. Осадок сушили лиофильно. Для восстановления активности ЛПС использовали 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 на водяной бане в течение 5 мин. Использовали следующие рабочие концентрации ЛПС (мкг/мл): 10 и 100.

Изучение потенциальной апоптогенной активности ЛПС в отношении нейтрофилов и моноцитов проводили морфологическим методом. Для морфологической оценки апоптоза взвесь клеток (нейтрофилов или моноцитов) наносили на предметное стекло, подсушивали и окрашивали акридин–оранжевым следующим образом. Раствор акридин–оранжевого в дистиллированной воде (0,1

% разводили перед использованием в 10 % фосфатным буфером до pH=6,0–6,5 добавлением 0,1 М раствора NaH₂PO₄). Предметное стекло покрывали красящим раствором на 15 мин., далее удаляли его фильтровальной бумагой и промывали свежей порцией закисленного фосфатного буфера. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа с синим светофильтром. Рассчитывали индекс апоптоза (ИА) как количество апоптозных клеток на 100 нейтрофилов или моноцитов в образце (значение выражали в %).

Экспонирование рецепторов к моноклональным антителам CD95 на цитоплазматических мембранах нейтрофилов и моноцитов изучали методом непрямой иммунной флуоресценции с использованием моноклональных антител производства научно-производственного центра «Медбиоспектр» (Москва, Российская Федерация).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Апоптогенное действие ЛПС бактерий рода *Shigella* выражалось в увеличении количества апоптирующих клеток, а также в увеличении количества клеток, экспонирующих специфические маркеры апоптоза – CD95, что в последнем случае свидетельствовало о готовности таких клеток к реализации апоптозной программы. С увеличением действующих концентраций шигеллёзных ЛПС, а также с увеличением продолжительности их контакта с клетками-мишенями происходило значительное усиление апоптогенного воздействия. Наибольший уровень апоптирующих клеток регистрировался при концентрациях ЛПС 100 мкг/мл и экспозиции 24 ч (таблицы 1 и 2).

Таблица 1– Влияние липополисахаридов на апоптоз CD4+–лимфоцитов человека in – vitro

Время, ч	Интактные клетки (n=37)	ЛПС <i>Shigella flexneri</i> Ia, мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri</i> Ib, мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=15)	100 (n=17)	10 (n=16)	100 (n=19)	10 (n=15)	100 (n=17)
ИА (%)							
0	4,4±0,23	4,3±0,18	4,5±0,21	4,2±0,2 3	4,4±0,20	4,4±0,19	4,3±0,19
6	7,0±0,35	8,3±0,3 *	13,4±0,6 ***	8,5±0,5 ***	14,3±1,1* **	8,2±0,5 ***	14,7±1,4***
24	16,8±0,82	21,9±1,3* *	38,8±1,9 ***	23,0±1,5 ***	41,6±2,4* **	22,5±1,6 ***	37,9±2,5***
Экспрессия CD95–рецепторов (%)							
0	4,0±0,20	4,2±0,20	4,4±0,25	4,1±0,2 1	4,3±0,25	4,3±0,25	4,5±0,26
6	6,5±0,33	9,5±0,52***	17,9±0,81* **	10,2±0,8 ***	19,2±1,3* **	9,8±1,15 ***	18,7±1,5***
24	11,7±0,59	26,5±2,0***	50,5±2,6** *	28,1±2,4 ***	54,0±3,0* **	25,9±2,3 ***	49,6±2,8***

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

Таблица 2 – Влияние липополисахаридов на апоптоз CD8⁺–лимфоцитов человека in-vitro

Время, ч	Интактные клетки (n=33)	ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>1a</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri</i> <i>1b</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=14)	100 (n=13)	10 (n=16)	100 (n=14)	10 (n=13)	100 (n=15)
ИА (%)							
0	2,7±0,12	2,9±0,13	2,7±0,12	2,6±0,14	2,8±0,13	2,9±0,13	2,6±0,14
6	3,8±0,17	4,4±0,3	9,3±0,2*	4,3±0,21	9,7±0,6*	4,4±0,2	9,5±0,3*
24	6,9±0,31	11,2±0,4 ***	23,6±0,4 ***	10,8±0,4 ***	22,3±1,0 ***	10,2±0,4 ***	22,6±0,6* **
Экспрессия CD95–рецепторов (%)							
0	1,9±0,1	2,0±0,1	1,8±0,1	1,9±0,1	2,0±0,1	1,9±0,1	2,1±0,1
6	3,1±0,16	3,7±0,18*	13,7±0,2 ***	3,7±0,19 *	14,4±0,2* **	3,8±0,2 *	14,3±0,2 ***
24	5,8±0,30	16,6±0,8 ***	32,7±0,9 ***	17,3±0,9 ***	33,5±1,0 ***	17,7±0,9 ***	39,1±1,0 ***

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

Как следует из приведенных данных, воздействие шигеллёзных ЛПС в дозе 10 мкг/мл вызывало в субпопуляции CD4⁺–лимфоцитов, идентифицируемых как Т–хелперы/индукторы, увеличение ИА на 6–м часу эксперимента в 1,19–1,28 раза (p<0,05), а на 24–м часу – увеличение в 1,30–1,37 раза (p<0,001), по сравнению с интактными клетками. В присутствии ЛПС в концентрации 100 мкг/мл подобные степени увеличения ИА для CD4⁺–лимфоцитов составили 1,91–2,1 и 2,26–2,48 раза, соответственно (p<0,01).

В тоже время, степень увеличения ИА для субпопуляции CD8⁺–лимфоцитов на 6–м часу взаимодействия с шигеллёзными ЛПС в дозе 10 мкг/мл составила 1,13–1,16 раза, а на 24–м часу – 1,48–1,62 раза, в зависимости от разновидности использованных ЛПС. Увеличение действующей концентрации ЛПС до 100 мкг/мл вызывало в CD8⁺–лимфоцитах повышение ИА на 6–м часу взаимодействия в 2,4–2,6 раза, а на 24–м часу – в 3,2–3,4 раза. То есть, субпопуляция CD8⁺–лимфоцитов к действию на них шигеллёзных ЛПС была более чувствительной, чем субпопуляция CD4⁺–лимфоцитов.

Динамика изменения экспрессии маркера апоптоза CD95 на лимфоцитах под влиянием шигеллёзных ЛПС была следующей.

Под влиянием ЛПС в действующей концентрации 10 мкг/мл степень увеличения CD95⁺–хелперов/индукторов, против интактных клеток, на 6–м часу опыта составила 1,46–1,57 раза, а на 24–м часу – 2,21–2,40 раза. Для субпопуляции CD8⁺–лимфоцитов подобные кратности оказались равны 1,19–1,22 и 2,9–3,05 раза, соответственно. При использовании шигеллёзных ЛПС в дозе 100 мкг/мл кратность увеличения уровня CD95⁺–хелперов/индукторов колебалась на 6–м часу эксперимента от 2,80–2,95 раза, а на 24–м часу – от 4,24 до 4,60 раза. В субпопуляции CD8⁺–лимфоцитов аналогичные изменения составили 4,42–4,65 и 5,64–6,74 раза, соответственно. То есть, как и в случае с ИА, субпопуляция CD8⁺–лимфоцитов к действию на них шигеллёзных ЛПС оказалась более чувствительной, чем субпопуляция CD4⁺–лимфоцитов. Этот феномен объясняет особенности патогенеза шигеллёзов, при которых наряду с развитием относительного супрессорного варианта вторичного иммунодефицита имеют место и аллергические реакции, выявляемые в кожных пробах с дизентеринном.

Следует также отметить, что видоспецифическое и серовариантно–специфическое влияние шигеллёзных ЛПС на апоптоз субпопуляций Т–лимфоцитов выявлено не было. При равных условиях эксперимента все тестируемые разновидности ЛПС оказывали сходное, статистически недостоверное между собой влияние на изучаемые показатели апоптоза.

Выводы. ЛПС бактерий рода *Shigella* в действующих концентрациях 10 и 100 мкг/мл и при экспозиции до 24 ч in vitro стимулируют апоптоз Т–хелперов/индукторов и цитотоксических Т–супрессоров, что проявляется увеличением количества клеток с морфологическими признаками апоптоза, а также количества клеток с маркером апоптоза CD95. Апоптозстимулирующее действие шигеллёзных ЛПС является видонеспецифическим, дозо– и времязависимым. Наиболее чувствительны к апоптогенному действию шигеллёзных ЛПС являются Т–супрессоры/цитотоксики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза / А.В. Пасечник, В.А. Фролов, Н.Г. Гвоздь [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. – 2004. – № 1. – С. 103 – 105.
2. Русалов, В.Л. Влияние пептидогликанов, тейхоевых кислот и липополисахаридов бактерий на метаболическую активность и апоптоз нейтрофилов и субпопуляций Т-лимфоцитов *in vitro*: дис. ... кандидата мед. наук: 14.03.04 / Русалов Виталий Леонидович. – Луганск, 2009. – 142 с.
3. Русалов, В.Л. Влияние структурных компонентов бактерий на апоптоз и метаболизм нейтрофилов и субпопуляций Т-лимфоцитов / В.Л. Русалов // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – Т. 3, № 5. – С. 34 – 36.
4. Рябиченко, Е.В. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов / Е.В. Рябиченко, Л.Г. Веткова, В.М. Бондаренко // Журнал микробиологии. – 2004. – № 3. – С. 98 – 105.
5. 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.
6. Evaluation of apoptotic activity of new condensed pyrazole derivatives / E. Tonon, E Ignatowicz, M.K. Bernard [et al.] // Journal of Physiology and Pharmacology. – 2013. – № 1. – P. 350 – 368.
7. Fas/FasL pathway-mediated alveolar macrophage apoptosis involved in human silicosis / S. Yao, L.W. Rojanasakul, Z. Chen [et al.] // Apoptosis. – 2011. – № 16(12) – P. 1195 – 1204.
8. Flegontova, V.V. Morphological signs of apoptosis induced by bacteria – causative agents of inflammatory infections / V.V. Flegontova, I.S. Gaidash, N.K. Kasimirko [et al.] // Annals of Anatomy. – 2002. – № 184 (Supplment). – S. 210 – 211.
9. In vivo apoptosis in *Shigella flexneri* infection / A. Zychlinsky, K. Thirumalai, J. Arondel [et al.] // Apoptosis. – 2010. – № 15(9). – P. 1098 – 1113.
10. In vivo versus in vitro protein abundance analysis of *Shigella dysenteriae* type 1 reveals changes in the expression of proteins involved in virulence, stress and energy metabolism [Электронный ресурс]. S. Kuntumalla, Q. Zhang, J.C. Braisted, R.D. Fleischmann [et al.] // BioMed Central Microbiology. – 2011. – № 11. – P. 147. – Режим доступа к журн. : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/147>.
11. 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 APOPTOSIS OF HUMAN BLOOD SUBPOPULATIONS OF LYMPHOCYTES BEEN UNDER THE INFLUENCE OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES OF GENUS SHIGELLA IN VITRO

A.V. YANCHEVSKY, I.S. GAIDASH, V.V. DICHKO, S.T. KOKHAN

Summary

Article is devoted to the study *in vitro* of apoptosis of human blood T-lymphocytes been under the influence of lipopolysaccharides of bacteria genus *Shigella*.

Key words: T-lymphocytes, apoptosis, lipopolysaccharide, shigella.

© Янчевский А.В., Гайдаш И.С., Дычко В.В., Кохан С.Т.

Поступила в редакцию 7 октября 2013г.