

УДК 579: 577.11 : 612. 112.9

© Янчевский А.В., 2013

## ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА SHIGELLA НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В Т-ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Янчевский А.В.

ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»

**Введение.** Перекисное окисление липидов (ПОЛ) играет важную роль в жизнедеятельности любой клетки, влияя как на состояние всех её мембранных структур, так и на функциональную активность клеточных органелл и прежде всего митохондрий [1, 8]. Активность ПОЛ регулируется системой антиоксидантной защиты (АОЗ), ключевыми ферментами которой являются каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) [2, 4]. Усиление ПОЛ при недостаточности системы АОЗ способно запустить в клетке программу апоптоза, в частности через митохондриальный путь [8]. Активацию ПОЛ способны вызвать гипоксия и токсические субстанции, к числу последних относятся и структурные компоненты клеточных стенок грамотрицательных бактерий – липополисахариды (ЛПС) [1, 8]. Нарушение баланса в системе ПОЛ/АОЗ в субпопуляциях иммунорегуляторных Т-лимфоцитов, вероятно, обуславливает развитие иммунодефицитного состояния, в том числе и при таком инфекционном заболевании как шигеллёз, возбудителями которого являются грамотрицательные виды бактерий из рода *Shigella*.

Влияние шигеллёзных ЛПС на ПОЛ и ферментативную систему АОЗ Т-лимфоцитов крови человека *in vitro* до настоящего времени не исследовалось. Работа является фрагментом плановой научной темы кафедры микробиологии ГУ «Луганский государственный медицинский университет» № 01110U007081 «Иммunosuppressивный и апоптогенный потенциал условно-патогенных бактерий и грибов».

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

**Материалы и методы исследования:** Изучение показателей ПОЛ и системы АОЗ проводилось на культурах нейтрофилов и моноцитов, выделенных из периферической крови 48 практически здоровых лиц мужского пола 19-24 лет (средний возраст – 22,4±1,3 года). Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики (Страсбург, 1985 год).

Лимфоциты выделяли градиенте плотности фикола-верографина ( $p=1,076$ ) по модифицированной методике Воуит [6]. 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  $2 \times 10^9$  л/л.

ЛПС получали из культур *Shigella flexneri* (серовары 1a, 1b, 2a, 2b) и *Shigella sonnei* по методу [3, 9]. Идентификацию шигелл проводили с использованием диагностических наборов «Энтеротест 24» производства фирмы Микро-ЛА-Тест, АО «Ляхема», Чехия. Идентификацию сероваров *Sh. flexneri* проводили в реакции агглютинации с шигеллёзными О-сыворотками. Для стимуляции *in vitro* нейтрофилов и моноцитов использовались ЛПС в концентрациях 1-10-100 мкг/мл.

Перед определением внутриклеточного содержания диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), активности каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), клеточные культуры нейтрофилов и моноцитов лизировали стерильной бидистиллированной водой в течение 15 мин при комнатной температуре. Определение ДК осуществляли по методу Стальной И.Д. (1977) [4], определение МДА по методу Стальной И.Д. и Гаришвили Т.Г. (1977) [5]. Активность каталазы изучали по Королук М.А. и соавт. (1988) [2], активность СОД спектрофотометрическим методом [7]. О балансе в системе ПОЛ/АОЗ судили по интегральному коэффициенту К (у.е.), который высчитывали по формуле:  $K = (ДК+МДА)/(каталаза+СОД)$ .

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

**Результаты исследования и их обсуждение:** В результате проведенного исследования было установлено, что взаимодействие *in vitro* шигеллёзных ЛПС с субпопуляциями Т-лимфоцитов вызывает изменение как активности ПОЛ, так и активности ферментативной системы АОЗ. При этом степень выраженности указанного влияния зависела от действующей концентрации шигеллёзных ЛПС и продолжительности их контакта с клетками-мишенями, и не зависела от видовой и антигенной принадлежности использованных ЛПС. Результаты проведенного исследования представлены в таблицах 1 и 2.

Как оказалось, непосредственный контакт *in vitro* шигеллёзных ЛПС с CD4+ и CD8+ лимфоцитами (Т-хелперы/индукторы и Т-супрессоры/цитотоксиком, соответственно) вызывал в указанных клетках увеличение внутриклеточного содержания

## ОРИГІНАЛЬНІ СТАТТІ

и промежуточных (ДК) и конечных (МДА) продуктов ПОЛ, уровни которых возрастали по мере увеличения продолжительности контакта ЛПС с иммунными клетками. Наиболее высокие концентрации изучаемых метаболитов ПОЛ регистрировались на 24-м часу эксперимента, независимо от действующей концентрации использованных ЛПС. Однако активация ПОЛ под влиянием ЛПС в дозе 100 мкг/мл значительно превосходила таковую при ис-

пользовании шигеллезных ЛПС в дозе 10 мкг/мл. Так, в частности под воздействием ЛПС *Shigella sonnei* (10 мкг/мл) на 24-м часу опыта внутриклеточная концентрация ДК в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов была в 1,46 раза ниже таковой в опытах с *Shigella sonnei* (100 мкг/мл), а концентрация МДА – ниже в 2,14 раза ( $p < 0,05$  в обоих сравнениях). Сходные различия имели место и при использовании ЛПС *Shigella flexneri 1a* и *Shigella flexneri 1b*.

**Таблица 1.** Влияния ПГН, ТК и ЛПС бактерий на ПОЛ и ферментативную систему АОЗ CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов крови человека in-vitro.

Время инкубации (ч)	Референтная норма (n=37)	CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты					
		ЛПС <i>Shigella flexneri 1a</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri 1b</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=18)	100 (n=18)	10 (n=19)	100 (n=17)	10 (n=18)	100 (n=19)
ДК (мкмоль/л в 6lg клеток)							
0	0,45±0,015	0,44±0,015	0,47±0,015	0,45±0,015	0,45±0,015	0,46±0,016	0,45±0,014
6	0,56±0,017	0,92±0,023***	1,46±0,038***	0,95±0,029***	1,55±0,047***	0,90±0,027***	1,49±0,044***
24	0,88±0,026	2,09±0,042***	3,11±0,08***	2,15±0,07***	3,06±0,09***	2,19±0,063***	3,20±0,10***
МДА (мкмоль/л в 6lg клеток)							
0	0,66±0,023	0,65±0,023	0,67±0,024	0,65±0,024	0,66±0,025	0,66±0,025	0,65±0,024
6	0,95±0,029	1,19±0,036***	1,83±0,055***	1,22±0,037***	2,52±0,076***	1,13±0,034***	2,41±0,072***
24	1,44±0,043	2,15±0,059***	4,67±0,080***	2,19±0,074***	4,69±0,140***	2,14±0,070***	4,59±0,127***
Каталаза (мкмоль/ч*л в 6lg клеток)							
0	2,20±0,08	2,18±0,09	2,21±0,08	2,20±0,09	2,19±0,07	2,21±0,08	2,20±0,08
6	2,04±0,08	1,96±0,08	1,65±0,07	1,89±0,07*	1,63±0,07***	1,92±0,07**	1,58±0,06***
24	1,71±0,07	1,54±0,06	1,06±0,06*	1,49±0,06**	1,11±0,05***	1,51±0,05***	1,09±0,04***
СОД (МЕ/мг Нв в 6lg клеток)							
0	0,73±0,026	0,73±0,026	0,72±0,026	0,74±0,027	0,73±0,026	0,73±0,026	0,73±0,026
6	0,68±0,025	0,66±0,025	0,62±0,024	0,60±0,024*	0,57±0,023**	0,59±0,024*	0,55±0,022***
24	0,64±0,023	0,59±0,023	0,57±0,023*	0,55±0,025**	0,50±0,020***	0,51±0,020***	0,46±0,018***
К (y.e.)							
0	0,38±0,015	0,37±0,015	0,39±0,016	0,37±0,019	0,38±0,019	0,38±0,019	0,38±0,018
6	0,56±0,022	0,80±0,04***	1,45±0,070***	0,87±0,044***	1,85±0,093***	0,81±0,04***	1,83±0,09***
24	0,98±0,039	1,99±0,1***	4,77±0,24***	2,13±0,11***	4,81±0,24***	2,14±0,11***	5,03±0,25***

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с показателем соответствующей референтной нормы.

**Таблица 2.** Влияния ПГН, ТК и ЛПС бактерий на ПОЛ и ферментативную систему АОЗ CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов крови человека in-vitro.

Время инкубации (ч)	Референтная норма (n=33)	CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты					
		ЛПС <i>Shigella flexneri 1a</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella flexneri 1b</i> , мкг/мл		ЛПС <i>Shigella sonnei</i> , мкг/мл	
		10 (n=18)	100 (n=19)	10 (n=17)	100 (n=17)	10 (n=18)	100 (n=17)
ДК (мкмоль/л в 6lg клеток)							
0	0,32±0,011	0,33±0,011	0,31±0,011	0,31±0,011	0,32±0,011	0,33±0,011	0,32±0,012
6	0,39±0,012	0,43±0,013*	0,59±0,03***	0,48±0,015***	0,66±0,03***	0,45±0,014***	0,62±0,03***
24	0,58±0,017	0,70±0,021***	1,20±0,06***	0,74±0,029***	1,25±0,06***	0,72±0,027***	1,17±0,05***
МДА (мкмоль/л в 6lg клеток)							
0	0,51±0,017	0,52±0,017	0,50±0,017	0,51±0,018	0,51±0,017	0,52±0,016	0,50±0,017
6	0,58±0,017	0,73±0,022***	1,01±0,030***	0,81±0,024***	1,43±0,043***	0,89±0,035***	1,64±0,049***
24	0,76±0,023	1,46±0,032***	2,39±0,07***	1,49±0,040***	2,35±0,07***	1,51±0,053***	2,37±0,071***
Каталаза (мкмоль/ч*л в 6lg клеток)							
0	1,80±0,06	1,78±0,07	1,81±0,07	1,80±0,07	1,81±0,07	1,79±0,07	1,80±0,07
6	1,75±0,06	1,68±0,07	1,61±0,06	1,66±0,06	1,56±0,06*	1,54±0,06*	1,49±0,06**
24	1,60±0,06	1,56±0,06	1,29±0,06***	1,58±0,06	1,31±0,06***	1,54±0,06*	1,33±0,05***
СОД (МЕ/мг Нв в 6lg клеток)							
0	0,68±0,026	0,69±0,027	0,67±0,026	0,68±0,027	0,69±0,027	0,68±0,026	0,68±0,026
6	0,65±0,025	0,66±0,026	0,53±0,025***	0,63±0,025	0,56±0,022**	0,61±0,024	0,54±0,022***
24	0,61±0,024	0,54±0,024	0,42±0,024***	0,57±0,023	0,45±0,020**	0,55±0,022	0,43±0,019***
К (y.e.)							
0	0,33±0,013	0,34±0,014	0,33±0,013	0,33±0,013	0,33±0,013	0,34±0,014	0,33±0,01
6	0,40±0,016	0,49±0,020***	0,69±0,028***	0,56±0,022***	0,99±0,040***	0,62±0,025***	1,11±0,04***
24	0,61±0,024	1,03±0,04***	2,10±0,08***	1,08±0,05***	2,05±0,08***	1,08±0,05***	2,11±0,1***

**Примечание.** \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$  по сравнению с показателем соответствующей референтной нормы.

Активность каталазы и СОД в CD4+-лимфоцитов и в CD8+-лимфоцитах с увеличением длительности их контакта с шигеллезными ЛПС, а также с увеличением действующей концентрации последних, напротив, снижалась. Нарушения в ферментативной системе изучаемых субпопуляций Т-лимфоцитов были наибольшими на 24-м часу эксперимента, при воздействии на Т-клетки шигеллезных ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл.

Так, в субпопуляции CD8+-лимфоцитов, находившихся в контакте с ЛПС *Shigella flexneri 1a* указанной дозы, активности каталазы и СОД на 24-м часу исследования оказались в 1,24 и в 1,45 раза ниже референтной нормы, соответственно ( $p < 0,01$ ). В тоже время, показатели активности каталазы и СОД, зарегистрированные также на 24-м часу опытов, но с ЛПС *Shigella flexneri 1a* в дозе 10 мкг/мл, были ниже референтной нормы, соответственно в 1,02 и в 1,13 раза ( $p > 0,05$  в обоих сопоставлениях).

Указанные разнонаправленные сдвиги показателей ПОЛ и ферментативной системы АОЗ в субпопуляциях CD4+- и CD8+-лимфоцитов сопровождалось увеличением коэффициента К, характеризующего баланс в системе ПОЛ/АОЗ, что свиде-

тельствовало о преобладании процессов ПОЛ над активностью ферментативной системы АОЗ. Наибольшие негативные изменения коэффициента К имели место при использовании шигеллезных ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл и экспозиции с клетками-мишенями 24 часа.

При проведении сравнительного анализа, видоспецифического влияния шигеллезных ЛПС на субпопуляции Т-лимфоцитов выявлено не было.

**Выводы:** ЛПС бактерий рода *Shigella* (*Shigella flexneri*, *Shigella zonnei*) оказывают *in vitro* дозозависимое и видонеспецифическое влияние на активность ПОЛ и ферментативной системы АОЗ нейтрофилов и моноцитов крови человека. Наиболее выраженную активацию ПОЛ и недостаточность ферментативной системы АОЗ инициируют шигеллезные ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, умеренные изменения – ЛПС в дозе 10 мкг/мл. Шигеллезные ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл негативного влияния на ПОЛ и ферментативную систему нейтрофилов и моноцитов крови человека *in vitro* не оказывают.

**Перспективы дальнейших исследований.** Планируется разработка методов фармакологической коррекции нарушений ПОЛ и системы АОЗ в Т-лимфоцитах.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Вплив *in vitro* різних методів інактивації токсинів сальмонелл на метаболічний статус моноцитів, нейтрофілів та еритроцитів / [О.І. Шабельник, І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова та ін.]. – Л.: СПД Резніков В.С., 2011. – 116 с.
2. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майоров [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19.
3. 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.
4. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И.Д. Стальная // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 63 – 64.
5. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты /

- И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66 – 68.
6. 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.
7. Чивари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чивари, И. Чаба, И. Секей // Лабораторное дело. – 1985. – № 11. – С. 16-18.
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.

**Янчевский А.В.** Влияние липополисахаридов бактерий рода *Shigella* на перекисное окисление липидов и систему антиоксидантной защиты в Т-лимфоцитах крови человека *in vitro* // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 199-201.

В статье представлены результаты изучения метаболических нарушений в Т-лимфоцитах крови человека под влиянием липополисахаридов бактерий рода *Shigella*.

**Ключевые слова:** Т-лимфоциты, перекисное окисление липидов, липополисахарид.

**Янчевський О.В.** Вплив ліпополісахаридів бактерій родини *Shigella* на перекисне окислення ліпідів та систему антиоксидантного захисту нейтрофілів в Т-лімфоцитах крові людини *in vitro* // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 199-201.

В статті подані результати вивчення метаболічних порушень у Т-лімфоцитах крові людини під впливом ліпополісахаридів бактерій роду *Shigella*.

**Ключові слова:** Т-лімфоцити, перекисне окислення ліпідів, ліпополісахарид.

**Yanchevsky A.V.** Influence of lipopolysaccharides from bacteria of genus *Shigella* on the lipid peroxidation and antioxidant system in human blood T-lymphocytes *in vitro* // Український медичний альманах. – 2013. – Том 16, № 1. – С. 199-201.

The article reveals the results of study of metabolic disorders in human blood T-lymphocytes under influence of lipopolysaccharides from bacteria of genus *Shigella*.

**Key words:** T-lymphocytes, lipid peroxidation, lipopolisaccharide.

Надійшла 11.10.2012 р.

Рецензент: проф. І.В.Лоскутова