

УДК: 577.151: 612.112.94

**И.С. Гайдаш, Р.В. Назаренко****ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ И КОРТЕКСИНА НА АПОПТОЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ IN VITRO***ГЗ «Луганский государственный медицинский университет»*

**Гайдаш И.С., Назаренко Р.В.** Изучение влияния бактериальных эндотоксинов и кортексина на апоптоз Т-лимфоцитов крови *in vitro* // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 14-18.

В статье представлены данные по изучению и анализу влияния бактериальных эндотоксинов на апоптоз Т-лимфоцитов крови *in vitro*. Показано, что кортексин в условиях *in vitro* проявляет выраженное антиапоптотное действие, независимо от вида бактериального эндотоксина.

**Ключевые слова:** апоптоз, пептидогликан, липополисахарид, тейхоевые кислоты, кортексин.

**Гайдаш І.С., Назаренко Р.В.** Вивчення впливу бактеріальних ендотоксинів і кортексину на апоптоз Т-лімфоцитів крові *in vitro* // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 14-18.

В статті представлені дані з вивчення та аналізу впливу бактеріальних ендотоксинів на апоптоз Т-лімфоцитів крові *in vitro*. Показано, що кортексин в умовах *in vitro* проявляє виражену антиапоптотну дію незалежно від виду бактеріального ендотоксину.

**Ключові слова:** апоптоз, пептидогликан, липополисахарид, тейхоевіе кислоти, кортексин.

**Gaydash I.S., Nazarenko R.V.** Study of the influence of bacterial endotoxins and cortexin apoptosis of T-lymphocytes *in vitro* // Український медичний альманах. – 2014. – Том 17, № 3. – С. 14-18.

The article presents data on the study and analysis of the effect of bacterial endotoxin on apoptosis of T-lymphocytes *in vitro*. It is shown that in the conditions cortexin *in vitro* manifests pronounced antiapoptotic effects, regardless of the type of bacterial endotoxin.

**Key words:** apoptosis, peptidoglycan, lipopolysaccharide, teichoic acid, cortexin.

**Актуальность темы.** Известно, что одним из ключевых механизмов, обеспечивающих поддержание структурно-функционального постоянства как отдельных органов и тканей, так и всего организма в целом, является апоптоз. Значительный интерес представляет исследование механизмов апоптоза Т-лимфоцитов, играющих важную роль в норме и при различных патологических состояниях организма человека [1, 3, 4, 10].

В настоящее время известно, что компоненты клеточной стенки бактерий – липополисахариды (ЛПС) и пептидогликаны (ПГН), освобождаясь из погибших бактерий, угнетают апоптоз нейтрофилов и моноцитов, а также модулируют секрецию ними ряда цитокинов (интерлейкинов – ИЛ, фактора некроза опухоли – ФНО) [2, 5, 6, 7]. С этим, вероятно, связан ряд осложнений в патогенезе многих заболеваний: активированные клетки довольно долго циркулируют в кровяном русле и атакуют собственные клетки и ткани организма, осложняя течение ряда заболеваний. Известны только отдельные детали механизма регуляции апоптоза и секреторной активности нейтрофилов и моноцитов при действии ЛПС и ПГН.

Нейрометаболический протектор кортексин относится к классу цитомединов и представляет собой комплекс L-аминокислот и полипептидов. Кортексин в определенных концентрациях обладает цитотоксическим и антипролиферативным действием по отношению к Т-лимфоцитам, регулирует процессы перекисного окисления в тканях и органах и препятствует образованию избыточного количества свободных радикалов [8, 9].

**Цель работы.** Изучить влияние бактериальных эндотоксинов и кортексина на апоптоз Т-лимфоцитов крови человека *in vitro*.

**Связь работы с научными программами, темами.** Диссертация является фрагментом комплексной плановой научной работы кафедр патофизиологии и микробиологии Государственного заведения «Луганский государственный медицинский университет» № 01110U007081 «Иммуносупрессивный и апоптогенный потенциал условно-патогенных бактерий и грибов». Автор является соисполнителем комплексной темы.

**Материал и методы исследования.** Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколла-верографина ( $\rho=1,076$ ) по модифицированной методике Boyum [6]. Препараты ЛПС получали из клеточных стенок *B. merdae* водно-феноловой экстракцией при 65°C. ПГН получали из клеточных стенок *S. haemolyticus* по методу Р. К. Peterson. ТК экстрагировали из клеточных стенок *S. haemolyticus* 10 % трихлоруксусной кислотой. Экстракт очищали с помощью колонки с ДЕАЕ-целлюлозой и софадекса J-50. Использовали рабочие концентрации ЛПС, ПГН и ТК, равные 100 мкг/мл.

Изучение потенциальной апоптогенной активности ЛПС, ПГН и ТК в отношении Т-лимфоцитов 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 % фосфатном буфере до pH=6,0-6,5 добавлением 0,1 М раствора  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Предметное стекло покрывали крашащим раствором на 15 мин., далее удаляли его фильтровальной бумагой и промывали свежей порцией закисленного фосфатного бу-

фера. 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 %).

Статистическую обработку выполняли на компьютере IBM Pentium-IV пакетом Microsoft Excel Professional for Windows XP.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведенные исследования позволили отметить, что бактериальные эндотоксины способны существенно влиять на апоптоз субпопуляций Т-лимфоцитов. При этом степень выявленного воздействия значительно различалась, в зависимости от вида используемого в эксперименте эндотоксина.

Так, было установлено, что непосредственный контакт ТК, ПГН *S. haemolyticus* и ЛПС *B. merdae* в действующих концентрациях 100 мкг/мл стимулируют *in vitro* апоптоз CD4+-лимфоцитов и CD8+-лимфоцитов перифериче-

ской крови человека, что выражалось в увеличении количества клеток с морфологическими признаками апоптоза, о чём свидетельствовало повышение ИА, а также в увеличении количества клеток, экспонирующих на поверхности своих цитоплазматических мембран неспецифические (CD38) и специфические (CD95) маркеры апоптоза, указывающие на готовность, как CD4+-лимфоцитов, так и CD8+-лимфоцитов к реализации апоптозной программы.

Наибольший апоптогенный потенциал был присущ ЛПС *B. merdae*, умеренный – ПГН и ТК *S. haemolyticus*. Наиболее чувствительной к апоптогенному действию бактериальных эндотоксинов оказалась субпопуляция CD4+-лимфоцитов, тогда как субпопуляция CD8+-лимфоцитов характеризовалась большей резистентностью к влиянию бактериальных эндотоксинов.

Полученные результаты исследования воздействия ЛПС, ПГН и ТК бактерий на показатели апоптоза CD4+-лимфоцитов и CD8+-лимфоцитов *in vitro* представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Влияние бактериальных эндотоксинов (100 мг/л) на апоптоз Т-лимфоцитов *in vitro*

Показатель, %	Референтная норма, n=43	Действие ТК (n=34)	Действие ПГН (n=37)	Действие ЛПС (n=35)
<b>CD4+-лимфоциты</b>				
ИА	4,2±0,21	12,3±0,6***	14,5±0,7***	19,9±0,9***
CD38	8,3±0,42	23,7±1,2***	31,5±1,6***	42,6±2,0***
CD95	5,7±0,29	18,4±0,9***	21,8±1,1***	30,1±1,5***
<b>CD8+-лимфоциты</b>				
ИА	2,9±0,15	6,1±0,31***	7,6±0,4***	9,7±0,5***
CD38	4,7±0,24	11,7±0,6***	17,3±0,8***	25,4±1,3***
CD95	2,8±0,14	6,8±0,3***	9,2±0,5***	13,8±0,7***

**Примечание:** \*\*\* -  $p < 0,001$  относительно референтной нормы.

Как следует из материалов, приведенных в табл. 1, наименьшее негативное воздействие на субпопуляции Т-лимфоцитов оказывали ТК. Так, под влиянием последних, использованных в действующей концентрации 100 мг/л и экспозиции 6 ч ИА CD4+-лимфоцитов (Т-хелперы/индукторы), составив в среднем 12,3±0,6%, оказался в 2,93 раза выше референтной нормы ( $p < 0,001$ ). При использовании аналогичных доз ПГН и ЛПС ИА CD4+-лимфоцитов превысил референтную норму в 3,45 и 4,74 раза соответственно (в обоих сопоставлениях  $p < 0,001$ ).

Весьма сходная динамика изменений ИА под воздействием ТК, ПГН и ЛПС регистрировалась и в культурах CD8+-лимфоцитов, идентифицируемых как субпопуляцию Т-супрессоров/цитотоксиков. Под влиянием ТК ИА CD8+-лимфоцитов в конце опытов превысил референтную норму в 2,18 раза, а под воздействием ПГН и ЛПС – в 2,94 и в 3,73 раза, соответственно ( $p < 0,001$  во всех случаях сопоставления).

Под влиянием бактериальных эндотоксинов существенно возрастало количество CD38+-клеток. Так, в присутствии ТК удельный вес CD38+-CD4+-лимфоцитов на 6 ч опыта оказался

выше показателя референтной нормы в 2,86 раза ( $p < 0,001$ ). В то же время, в присутствии ПГН и ЛПС увеличение количества CD38+-CD4+-лимфоцитов составило 3,8 и 5,13 раза, соответственно. То есть, наибольший апоптогенный потенциалом из числа тестируемых эндотоксинов обладали ЛПС *B. merdae*.

Аналогичные по направленности изменения регистрировались и в культурах CD8+-лимфоцитов, взаимодействовавших с бактериальными эндотоксинами. Как выяснилось в конце опытов, относительно референтной нормы удельный вес CD38+-CD8+-лимфоцитов контактировавших с ТК был повышенным в 2,49 раза, а после взаимодействия с ПГН и ЛПС – в 3,68 раза и в 5,4 раз, соответственно ( $p < 0,001$  во всех случаях сопоставления).

Под влиянием бактериальных эндотоксинов удельный вес CD95+-CD4+-лимфоцитов и CD95+-CD8+-лимфоцитов также повышался, при этом под влиянием ЛПС *B. merdae* – наиболее значительно. Так, непосредственный контакт CD4+-лимфоцитов с ТК, ПГН и ЛПС сопровождался увеличением удельного веса CD95+-CD4+-лимфоцитов относительно референтной нормы в 3,23, 3,82 и в 5,28 раза, соответственно.

Для CD95<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов подобные степени увеличения удельного веса составили в присутствии ТК 2,43 раза, в присутствии ПГН – 3,29 раз, а в присутствии ЛПС – 4,93 раза ( $p < 0,001$  во всех случаях сравнения).

Как следует из приведенного выше сопоставительного анализа, кратности прироста клеток с маркерами апоптоза в субпопуляции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов были существенно выше аналогичных в субпопуляции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Это даёт основание говорить о том, что субпопуляция CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов наиболее чувствительна к воздействию бактериальных эндотоксинов, по сравнению с субпопуляцией CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов.

**Таблица 2.** Влияние предварительной экспозиции с кортексином на апоптоз CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, подвергшихся действию эндотоксинов бактерий *in vitro*

Показатель, %		ИА	CD38	CD95
Референтная норма (n=43)		4,2±0,21	8,3±0,42	5,7±0,29
Действие ТК	Интактные CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=34)	12,3±0,6***	23,7±1,2***	18,4±0,9***
	CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=37)	6,1±0,3***###	11,4±0,6***###	8,7±0,4***###
Действие ПГН	Интактные CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=37)	14,5±0,7***	31,5±1,6***	21,8±1,1***
	CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=40)	8,4±0,4***###	14,7±0,7***###	10,1±0,5***###
Действие ЛПС	Интактные CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=35)	19,9±0,9***	42,6±2,0***	30,1±1,5***
	CD4 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=41)	9,2±0,5***###	17,6±0,9***###	13,8±0,7***###

**Примечания:** 1. \*\*\* -  $p < 0,001$  относительно референтной нормы. 2. ### -  $p < 0,001$ , рассчитано между интактными и преэкспонированными с кортексином CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами соответствующих групп.

Как следует из приведенных в табл. 2 данных, предварительная экспозиция субпопуляций Т-лимфоцитов с раствором кортексина существенно ослабляла апоптогенное действие бактериальных эндотоксинов, однако полного устранения их апоптогенного воздействия при этом не происходило. Наибольший позитивный эффект от использования кортексина отмечался в опытах с ТК, тогда как наименьший – в опытах с ЛПС. Более детальный анализ полученных результатов исследования позволил отметить следующее.

Как оказалось, предварительная экспозиция CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с кортексином вызывала уменьшение ИА под влиянием ТК в 2,02 раза, по сравнению с культурами интактных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, которые взаимодействовали *in vitro* только с ТК. Кроме того, если ИА интактных CD4<sup>+</sup>-клеток в конце опыта был выше референтной нормы в 2,93 раза, то для CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, предварительно инкубированных с кортексином и контактировавших с ТК, ИА превышал референтную норму в 1,45 раза.

Частота встречаемости маркеров апоптоза – CD38 и CD95 в субпопуляции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, преинкубированных с кортексином, также была значительно ниже аналогичной в сравняваемой группе. Так, если частота выявления CD38<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов в культурах клеток, подвергавшихся обработке кортексином, составила в среднем 11,4±0,6 %, то в культурах интактных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов этот показатель был выше в 2,08 раза ( $p < 0,001$ ). Аналогичная

Данный факт объясняет нередкую ситуацию, когда при разных бактериальных заболеваниях наибольший дефицит в периферической крови больных имеют Т-хелперы/индукторы, в связи с чем формируется относительный супрессорный вариант иммунодефицита.

С целью снижения апоптогенного воздействия эндотоксинов бактерий на субпопуляции Т-лимфоцитов было проведено изучение протективного (антиапоптозного) действия кортексина. Для этого осуществлялась предварительная экспозиция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с кортексином. Результаты данного исследования представлены в таблице 2.

кратность различия для сопоставляемых CD95<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов составила 2,11 раза.

То есть, предварительная экспозиция CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов с кортексином существенно уменьшила апоптогенное влияние последующего действия ТК, что проявлялось снижением количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, как с морфологическими признаками апоптоза, так и количества CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, экспонирующих на своей цитоплазматической мембране рецепторы к неспецифическим и специфическим маркерам апоптоза.

Сходный позитивный эффект кортексина регистрировался и в отношении культур CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, взаимодействовавших с бактериальными ПГН. Вместе с тем отмеченные сдвиги были менее выраженными, чем это имело место в экспериментах с бактериальными ТК.

Так, ИА в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, контактировавших с кортексином, оказался в 1,73 раза ниже, чем у не контактировавших клеток, а количество CD38<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов было ниже в 2,14 и 2,16 раза соответственно. Во всех приведенных сопоставлениях различия составили  $p < 0,001$ .

Однако следует отметить, что зарегистрированные в конце эксперимента изучаемые показатели апоптоза в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, предварительно инкубированных с кортексином и контактировавших в последующем с ПГН, не смотря на положительную динамику их изменений, тем не менее, оставались существенно выше соответствующих показателей референтной

нормы. А именно, ИА оставался повышенным относительно референтной нормы в 2,00 раза, а количества CD38<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>- CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов оставались увеличенными в 1,77 раза в обоих случаях, что было статистически значимым. То есть, полного устранения апоптогенного эффекта бактериальных эндотоксинов в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов кортексин не обеспечивал.

Позитивное влияние кортексина регистрировалось и в опытах с бактериальными ЛПС. Воздействие последних на CD4<sup>+</sup>-лимфоциты, предварительно инкубированные с кортексином, сопровождалось существенным уменьшением ИА, а также удельного веса CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, имевших рецепторы к маркерам апоптоза CD38 и CD95. Так, под влиянием кортексина ИА в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, в последующем подвергшихся воздействию ЛПС, оказался ниже, чем в культурах интактных CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, в 2,16 раза, но оставался в 2,19 раза выше референтной нормы, а также был в 1,51 и в 1,1 раза выше, чем в культурах CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, так-

же контактировавших с кортексином, но в последующем подвергшихся действию ТК и ПГН, соответственно.

Вместе с тем, все изучаемые показатели апоптоза в субпопуляции CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов, вследствие более высокого апоптогенного потенциала ЛПС, оставались наиболее высокими, по сравнению с таковыми для референтной нормы, чем в экспериментах с использованием бактериальных ПГН и ТК. В целом, результаты исследования, приведенные в таблице 3.1.2, свидетельствуют о выраженном антиапоптозном действии кортексина, которое существенно снижает проапоптозное влияние на CD4<sup>+</sup>-лимфоциты крови человека таких бактериальных эндотоксинов, как ЛПС, ПГН и ТК.

Позитивное антиапоптозное влияние кортексина было зарегистрировано и в отношении субпопуляции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, которые также подвергались воздействию указанных ранее бактериальных эндотоксинов. Результаты этого исследования представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Влияние предварительной экспозиции с кортексином на апоптоз CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, подвергшихся действию эндотоксинов бактерий *in vitro*

Показатель, %		ИА	CD38	CD95
Референтная норма (n=38)		2,9±0,15	4,7±0,24	2,8±0,14
Действие ТК	Интактные CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=34)	6,1±0,31***	11,7±0,6***	6,8±0,3***
	CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=36)	3,0±0,14###	4,9±0,25###	3,3±0,17####
Действие ПГН	Интактные CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=37)	7,6±0,4***	17,3±0,8***	9,2±0,5***
	CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=38)	3,6±0,18*###	5,6±0,27*####	3,4±0,17*####
Действие ЛПС	Интактные CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты (n=35)	9,7±0,5***	25,4±1,3***	13,8±0,7***
	CD8 <sup>+</sup> -лимфоциты, инкубированные с кортексином (n=34)	4,1±0,20***###	8,3±0,42***###	5,2±0,26***###

**Примечания:** 1. \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001 относительно референтной нормы; 2. # - p<0,05; ## - p<0,01; ### - p<0,001, рассчитано между интактными и инкубированными с кортексином CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами соответствующих групп.

Как следует из данных, приведенных в таблице 3.1.3, предварительная экспозиция CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов с кортексином существенно уменьшала апоптогенное действие всех использованных в эксперименте бактериальных эндотоксинов. При этом наибольший антиапоптозный эффект от применения кортексина наблюдался в культурах CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, подвергавшихся в последующем действию ТК *S. haemolyticus*, тогда как наименьший позитивный эффект имел место в опытах с ЛПС *B. merdae*. Результаты исследования, полученные в опытах с ПГН *S. haemolyticus* оценены как позитивно умеренные.

Более детальный анализ полученных данных позволил отметить следующее. Как оказалось, ИА CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, проходивших инкубирование с кортексином и взаимодействующих в последующем с ТК *S. haemolyticus* в конце опыта, составляя в среднем 3,0±0,14 %, оказался ниже аналогичного показателя в культурах CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, не подвергавшихся влиянию кортексина, в 2,03 раза (p<0,001). Аналогичные степени различия для CD38<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-

лимфоцитов составили 2,39 и 2,06 раза, соответственно (p<0,001 в обоих сопоставлениях). Вместе с тем, полной нормализации уровня CD95<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в опытах с кортексином не произошло, зарегистрированный при этом показатель превышал аналогичный показатель референтной нормы в 1,18 раза, что являлось статистически значимым. В противоположность этому ИА и уровень CD38<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, под влиянием кортексина находились в пределах соответствующих референтных норм.

Антиапоптозный эффект кортексина четко прослеживался и в культурах CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов, прошедших инкубацию с кортексином и ПГН *S. haemolyticus*. Как оказалось, в конце опыта ИА оказался в 2,11 раза ниже аналогичного показателя в группе интактных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов (контактировавших только с ПГН), но оставался выше показателя референтной нормы в 1,24 раза (p<0,01 и p<0,001, соответственно). Для CD38<sup>+</sup>- и CD95<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов подобные кратности различия составили соответственно 3,09 и 1,19, а также 2,71 и 1,21 раза (во всех приведенных сравнениях различия стати-

стически достоверны). Следует также отметить, что зарегистрированный показатель ИА, в культурах CD8+-лимфоцитов, инкубированных с кортексином и ПГН, был достоверно выше аналогичного показателя в культурах CD8+-лимфоцитов подвергшихся воздействию кортексина и ТК, чего не выявлялось в отношении CD38+- и CD95+-CD8+-лимфоцитов. Это, по-видимому, связано с тем, что апоптотный потенциал ПГН превосходит таковой для ТК.

Не смотря на позитивный в целом эффект от применения кортексина, наиболее высокие остаточные показатели апоптоза CD8+-лимфоцитов в конце эксперимента были отмечены в культурах CD8+-лимфоцитов, контактировавших на заключительном этапе с ЛПС *B. merdae*. Так, ИА в культурах CD8+-лимфоцитов, предварительно инкубированных с кортексином и взаимодействующих в последующем с ЛПС, составляя в среднем  $4,1 \pm 0,2$  %, оказался в 2,37 раза ниже подобного показателя в культурах интактных CD8+-лимфоцитов, взаимодействовавших только с ЛПС. В тоже время, приведенный показатель в 1,41 раза оставался выше референтной нормы, а также был в 1,14 и в 1,37 раза выше подобных показателей в опытах с CD8+-лимфоцитами, имевшими контакт с кортексином, ПГН и ТК соответственно ( $p < 0,001$ ,  $p > 0,05$  и  $p < 0,001$ ).

Позитивные сдвиги, вызванные действием кортексина, имели место и в отношении других показателей, характеризующих выраженность апоптоза в субпопуляции CD8+-лимфоцитов. Так, количество CD38+- и CD95+-CD8+-лимфоцитов, инкубированных с кортексином и ЛПС, были значительно ниже, чем у интактных CD8+-лимфоцитов, в 3,06 и в 2,65 раза, соответственно

( $p < 0,001$  в обоих сопоставлениях). Наряду с этим, зарегистрированные показатели превышали таковые в опытах с кортексином и ТК, а также с кортексином и ПГН *S. haemolyticus*.

**Выводы:** 1. Бактериальные эндотоксины, а именно ТК и ПГН *S. haemolyticus*, а также ЛПС *B. merdae* в действующих дозах 100 мкг/мл и при непосредственном контакте с CD4+-лимфоцитами и CD8+-лимфоцитами периферической крови человека стимулируют в них апоптоз, что выражается в увеличении количества клеток с морфологическими признаками апоптоза, а также количества клеток, несущих на себе, как неспецифические, так и специфические маркеры апоптоза - CD38 и CD95. При этом наибольший апоптогенный потенциал проявляли ЛПС, умеренный - ПГН, наименьший - ТК. По сравнению с CD8+-лимфоцитами, CD4+-клетки оказались более чувствительны к апоптогенному влиянию использованных бактериальных эндотоксинов. 2. Кортексин в условиях *in vitro* проявляет выраженное антиапоптотное действие, независимо от вида бактериального эндотоксина, воздействующего на субпопуляцию CD4+-лимфоцитов. Предварительная обработка последних кортексином способствует снижению ИА при последующем контакте CD4+-лимфоцитов с бактериальными эндотоксинами в 1,73-2,16 раза, снижению удельного веса CD38+-CD4+-лимфоцитов в 2,08-2,42 раза, а также падению удельного веса CD95+-CD8+-лимфоцитов в 2,11-2,18 раза.

**Перспективы дальнейших исследований.** Изучить влияние бактериальных эндотоксинов и кортексина на секреторную активность Т-лимфоцитов крови человека *in vitro*.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Апоптозіндукуюча активність пептидогліканів облігатно анаеробних грампозитивних збудників гнійно-запальних захворювань гінекологічного профілю / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, С.В. Бірюкова [та ін.] // Галицький лікарський вісник. – 2001. – № 3. – С. 29-31.
2. Апоптозіндукуюча активність тейхоевих кислот збудників гнійно-запальних захворювань у гінекологічних хворих / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, Н.К. Казимірко [та ін.] // Український медичний альманах. – 2000. – № 5. – С. 174-176.
3. Барышников А.Ю. Программированная клеточная смерть (апоптоз) / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58-60.
4. Белушкина Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкина, Алм Хасан Хамад, С.Е. Северин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1998. – № 4. – С. 15-23.
5. Видовий склад збудників шпитальних інфекцій у відділеннях хірургічного профілю та їх вплив на апоптоз лімфоцитів / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, Р.В. Назаренко [та ін.] // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2008. – № 2. – С. 44-47.
6. Видовий склад збудників шпитальних інфекцій у відділеннях хірургічного профілю та вплив стафіло-

- кокового токсину *in vitro* на апоптоз імунокомпетентних клітин / В.В. Флегонтова, Є.О. Гаргат, С.О. Білокобильський [та ін.] // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – № 4. – С. 39-44.
7. Гайдаш І.С. Апоптозіндукуюча активність ліпополісахаридів збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих / І.С. Гайдаш, В.В. Флегонтова, Є.В. Суглобов // Вісник морської медицини. – 2000. – № 3. – С. 24-28.
8. Кортексин (нейропротекція на молекулярному рівні) / О.К. Гранстрем, Е.Г. Сорокіна, М.А. Салыкіна, [та ін.] // Нейроіммунологія. – 2010. – Т. VIII, № 1–2. – С. 34–40.
9. Макаренко А.Н. Цитопротекторное действие нейропептидов на иммунокомпетентные клетки (исследование *in vitro*) / А.Н. Макаренко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – N. 4. – С. 28-32.
10. Ivanova S.A. Spontaneous and *in vitro* induced apoptosis of lymphocytes and neutrophils in patients with alcohol dependence / S.A. Ivanova, N.M. Vyalyova, E.V. Zhernova, N.A. Bokhan // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2010. – T. 149, № 2. – С. 246–249.

Надійшла 12.03.2014 р.

Рецензент: проф. В.В.Сіморк