

УДК 579: 577.11 : 612. 112.9

© Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., Шабельник О.И., Гайдаш И.А., 2013

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ АНТИГЕННЫХ ВАРИАНТОВ *SHIGELLA FLEXNERI* НА СИСТЕМУ АДЕНИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ В НЕЙТРОФИЛАХ И МОНОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., Шабельник О.И., Гайдаш И.А.

ГЗ «Дуганский государственный медицинский университет»; ГЗ «Восточноукраинский национальный университет им. В. Даля»

Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., Шабельник О.И., Гайдаш И.А. Влияние липополисахаридов из антигенных вариантов *Shigella flexneri* на систему адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах крови человека in vitro // Украинський морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 70-72.

Статья посвящена изучению системы адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах крови человека, подвергшихся in vitro воздействию разных концентраций липополисахаридов из антигенных вариантов *Shigella flexneri*.

Ключевые слова: нейтрофилы, моноциты, адениловые нуклеотиды, липополисахарид, шигеллы.

Гайдаш О.И., Гайдаш И.С., Шабельник О.И., Гайдаш И.А. Вплив ліпополісахаридів із антигенних варіантів *Shigella flexneri* на систему аденілових нуклеотидів в нейтрофілах і моноцитах крові людини in vitro // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 70-72.

Стаття присвячена вивченню системи аденілових нуклеотидів в нейтрофілах і моноцитах крові людини, під впливом in vitro різної концентрації ліпополісахаридів із антигенних варіантів *Shigella flexneri*.

Ключові слова: нейтрофіли, моноцити, аденілові нуклеотиди, ліпополісахарид, шигелли.

Gaidash E.I., Gaidash I.S., Shabelnik O.I., Gaidash I.A. Influence of lipopolysaccharides from antigen's variants *Shigella flexneri* on the adenylic system in human blood neutrophiles and monocytes in vitro // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 1. – С. 70-72.

Article is dedicated to the study in vitro of adenylic system in human blood neutrophiles and monocytes been under the influence of lipopolysaccharides from antigen's variants *Shigella flexneri*.

Key words: neutrophiles, monocytes, adenylic nucleotides, lipopolisaccharide, shigella.

Введение. Система адениловых нуклеотидов является одной из главных систем энергообеспечения любого организма. Затраты на поддержание жизнедеятельности составляют 10-20% всех энергетических расходов [6]. Нарушения в системе энергообеспечения могут повлечь за собой изменения функциональной активности клеток, вплоть до их гибели [7]. Важное значение имеет не только абсолютное количество энергоресурсов в клетке и прежде всего аденозинатрифосфата (АТФ), но и соотношение компонентов адениловой системы, так как АТФ, АДФ и АМФ являются мощными регуляторами метаболических процессов [1, 4, 6]. Известно о негативном влиянии структурных компонентов бактериальных клеток – пептидогликанов, тейхоевых кислот и липополисахаридов (ЛПС) на энергетический потенциал иммунокомпетентных клеток [1, 4]. Однако, до настоящего времени система адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах крови человека, подвергшихся воздействию ЛПС антигенных вариантов (сероваров) *Shigella flexneri*, не исследовалась.

Целью настоящей работы явилось определение in vitro содержания фракций адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах крови человека под воздействием ЛПС антигенных вариантов *Shigella flexneri*.

Материалы и методы исследования: Изучение показателей системы адениловых нуклеотидов проводилось на культурах нейтрофилов и моноцитов, изолированных из периферической крови 47 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).

Популяции моноцитов и нейтрофилов из периферической крови выделяли при помощи центрифугирования на двойном градиенте плотности

1,077 и 1,093 фекол-верографина [3, 5]. 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.

Идентификацию шигелл проводили с использованием диагностических наборов «Энтеротест 24» производства фирмы Микро-ЛА-Тест, АО «Лаксма», Чехия. Идентификацию антигенных вариантов *Shigella flexneri* проводили в реакции агглютинации с О-сыворотками.

ЛПС получали из культур *Shigella flexneri* (серовары 1a, 1b, 2a, 2b) при 65°C водно-феноловой экстракцией [2, 8]. 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 г 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. Для стимуляции in vitro нейтрофилов и моноцитов использовались следующие концентрации шигеллезных ЛПС: 1-10-100 мкг/мл. Длительность инкубации клеток с ЛПС составляла 24 часа.

Определение содержания аденозина фосфатов (АТФ, АДФ и АМФ) в нейтрофилах и моноцитах проводили методом тонкослойной хроматографии с использованием пластин «Силуфол» [6]. К 1 мл выделенным и трижды отмывым в течение 20 минут

холодным изотоническим раствором натрия хлорида при скорости 3000 оборотов в минуту нейтрофилов и моноцитам добавляли 1 мл раствора хлорной кислоты, перемешивали и через несколько минут осадок отделяли центрифугированием. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляли 0,1 мл раствора калия карбоната и оставляли на холоде, пока полностью не выпадут кристаллы образовавшегося перхлората калия. 0,05-0,1 мл холодной надосадочной жидкости наносили в виде полоски на пластину «Силуфола» и проводили восходящую хроматографию в течение 60-90 минут в смеси диоксана, изопропилового спирта и аммиака. Вынутые из камеры пластины высушивали на воздухе и просматривали в коротком ультрафиолетовом свете на ультрамикроскопе Блюмберга, находили пятна нуклеотидов и обводили их острым предметом. Порошок с отмеченных мест пластины соскабливали и элюировали 3 мл 0,1 N HCl, после чего определяли светопоглощение надосадочной жидкости при длине волны 260 нм. Расчёт проводили исходя из молярных коэффициентов экстинкции.

Энергетический заряд (ЭЗ) нейтрофилов или моноцитов рассчитывали по формуле: $ЭЗ = (АТФ + 0,5АДФ) / (АТФ + АДФ + АМФ)$, полученный результат выражали в условных единицах (у.е.).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Таблица 1. Влияние ЛПС из антигенных вариантов *Shigella flexneri* на систему адениловых нуклеотидов в нейтрофилах крови человека *in vitro* ($M \pm m$).

Вид бактерий	Антигенный вариант	АТФ (мкмоль/л)	АДФ (мкмоль/л)	АМФ (мкмоль/л)	ЭЗ (у.е.)
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	679±33	217±11	55±3	0,828±0,041
	1b	685±34	214±10	58±3	0,827±0,041
	2a	681±34	221±11	51±3	0,831±0,042
	2b	673±32	209±10	56±3	0,828±0,041
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	603±30	269±13***	73±4***	0,780±0,039
	1b	596±29	275±14***	79±4***	0,772±0,038
	2a	611±31	263±13***	70±4***	0,787±0,039
	2b	607±30	270±14***	68±3***	0,785±0,039
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	499±25****	325±16****	89±5****	0,724±0,036*
	1b	502±25****	321±15****	93±6****	0,723±0,036*
	2a	495±24****	329±17****	98±6****	0,715±0,035*
	2b	491±24****	324±16****	94±5****	0,718±0,036*
Референтная норма		683±34	211±10	52±4	0,834±0,042

Примечания: 1) *- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$, ****- $p < 0,00001$; 2) р рассчитано к референтной норме.

Как выяснилось, шигеллёзные ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл вызывали несущественные изменения в системе циклических нуклеотидов, все изучаемые показатели находились в пределах соответствующих референтных норм. Вместе с тем, следует отметить, что средние показатели ЭЗ нейтрофилов в конце эксперимента имели тенденцию к снижению, относительно референтной нормы, в 1,0036-1,0085 раза, тогда как в культурах моноцитов, напротив, имела место тенденция к увеличению ЭЗ в 1,017-1,019 раза (в обоих сопоставлениях $p > 0,1$).

Увеличение действующей концентрации шигеллёзных ЛПС до 10 мкг/мл сопровождалось существенными сдвигами в системе адениловых нуклеотидов как нейтрофилов, так и моноцитов.

Результаты исследования и их обсуждение:

Установлено, что непосредственный контакт *in vitro* нейтрофилов и моноцитов крови человека с ЛПС антигенных вариантов *Shigella flexneri* (антигенные варианты 1a, 1b, 2a, 2b) сопровождался изменениями в системе адениловых нуклеотидов указанных клеток. Это выражалось в снижении ЭЗ как нейтрофилов, так и моноцитов, за счёт уменьшения внутриклеточного содержания АТФ и увеличения содержания АДФ и АМФ. Наиболее значительные сдвиги в системе адениловых нуклеотидов имели место при воздействии на клетки-мишени шигеллёзных ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, тогда как наименьшие сдвиги наблюдались при использовании ЛПС в дозе 1 мкг/мл. Следует также отметить, что специфического антигеновариантного влияния шигеллёзных ЛПС на систему адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах выявлено не было. Об этом свидетельствовало отсутствие статистически достоверных различий между одинаковыми изучаемыми показателями в культурах однотипных клеток, подвергавшихся воздействию равных концентраций ЛПС из разных антигенных вариантов *Shigella flexneri*. Результаты проведенного исследования представлены в таблицах 1 и 2.

Более детальный анализ полученных данных позволил отметить следующее.

Так, при указанном условии эксперимента и независимо от антигенной разновидности использованных шигеллёзных ЛПС, в культурах нейтрофилов наблюдалось снижение уровня АТФ в 1,12-1,15 раза, при увеличении уровней АДФ и АМФ в 1,25-1,30 и в 1,31-1,52 раза, соответственно. В тоже время, в культурах моноцитов степень снижения внутриклеточной концентрации АТФ колебалась в диапазоне 1,09-1,11 раза, тогда как степень увеличения концентрации АДФ была в пределах 1,27-1,32 раза, а для АМФ – в пределах 1,16-1,28 раза. Степени снижения показателей ЭЗ для нейтрофилов и моноцитов составили, соответственно, 1,06-1,08 и 1,05-1,06 раза, что в обоих сравнениях статистически достоверным не являлось.

Таблица 2. Влияние ЛПС из антигенных вариантов *Shigella flexneri* на систему адениловых нуклеотидов в моноцитах крови человека *in vitro* (M±m).

Вид бактерий	Антигенный вариант	АТФ (мкмоль/л)	АДФ (мкмоль/л)	АМФ (мкмоль/л)	ЭЗ (y.e.)
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	683±34	207±10	50±3	0,837±0,042
	1b	689±34	211±11	47±2	0,839±0,042
	2a	678±33	220±11	42±2	0,838±0,042
	2b	680±34	215±11	45±2	0,837±0,042
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	613±31	285±14***	71±4*	0,779±0,039
	1b	608±30	279±14**	67±3	0,784±0,039
	2a	603±30	288±14***	74±4*	0,774±0,038
	2b	597±29	281±14**	70±4	0,778±0,039
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл					
<i>S. flexneri</i>	1a	473±24***	335±17****	89±5****	0,414±0,035*
	1b	481±24***	330±17****	92±5****	0,715±0,035*
	2a	468±23***	341±17****	94±5****	0,707±0,034*
	2b	477±24***	337±17****	96±5****	0,709±0,035*
Референтная норма		668±32	219±13	58±5	0,823±0,041

Примечания: 1) *-p<0,05, **- p<0,01. ***-p<0,001, ****-p<0,00001; 2) p рассчитано к референтной норме.

Взаимодействие нейтрофилов и моноцитов с пшгеллёзными ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл сопровождалось значительными изменениями всех изучаемых показателей системы адениловых нуклеотидов.

Так, в культурах нейтрофилов в конце эксперимента внутриклеточное содержание АТФ оказалось сниженным, относительно референтной нормы, в 1,36-1,39 раза (p<0,00001). Уровни АДФ и АМФ, напротив, превысили соответствующие показатели референтной нормы в 1,52-1,56 раза и в 1,71-1,88 раза, соответственно. Среднее значение ЭЗ нейтрофилов при этом составило 0,720±0,036 y.e., что было ниже показателя референтной нормы в 1,16 раза (p<0,001).

В культурах моноцитов, также взаимодействовавших с пшгеллёзными ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, внутриклеточное содержание АТФ в конце эксперимента оказалось ниже референтной нормы в 1,39-1,43 раза (p<0,0001), а содержание АДФ и АМФ было выше в 1,51-1,54 и в 1,53-1,66 раза, соответственно (p<0,00001). Указанные изменения фракционного состава адениловых нуклеотидов сопровождалось снижением ЭЗ моноцитов в 1,15-1,16 раза (p<0,05).

Таким образом, являясь эндотоксинами, пшгеллёзные ЛПС при непосредственном контакте *in vitro* с моноцитами и нейтрофилами крови человека вызывают в указанных клетках метаболические реакции, сопряжённые со значительными энергетическими затратами. Потребность клеток в энергоресурсах прогрессивно возрастала по мере увеличения действующей концентрации пшгеллёзных ЛПС.

Выводы: ЛПС *Shigella flexneri* (антигенные варианты 1a, 1b, 2a, 2b) оказывают *in vitro* дозозависимое и антигеновариантное неспецифическое влияние на систему адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах крови человека. Изменения в системе адениловых нуклеотидов характеризуются снижением ЭЗ клеток, за счёт уменьшения внутриклеточного содержания АТФ и увеличения содержания АДФ и АМФ. Наибольший дисбаланс в системе адениловых нуклеотидов вызывает пшгеллёзные ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, наименьший – ЛПС в концентрации 1 мкг/мл.

Перспективы дальнейших исследований.

Планируется разработка фармакологических способов коррекции нарушений в системе адениловых нуклеотидов в нейтрофилах и моноцитах 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. Кульпин В.А. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий / В.А. Кульпин, А.А. Яковлев, С.Н. Авиева // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1987. – № 5. – С. 44 – 46.
3. Михеенко Т.В. Два метода получения обогащённой популяции моноцитов периферической крови / Т.В. Михеенко // Лабораторное дело. – 1987. – № 10. – С. 763 – 766.
4. Русалов В.А. Влияние структурных компонентов бактерий на апоптоз и метаболизм нейтрофилов и субпопуляций Т-лимфоцитов / В.А. Русалов // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – Т. 3, № 5. – С. 34 – 36.
5. Хейфец Л.Б. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фикола / Л.Б. Хейфец, В.А. Абалакина // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 579 – 581.
6. Cohn W.E. The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paper chromatography / W.E. Cohn, C.E. Carter // Journal of American Chemical Society. – 1950. - № 2 – P. 4273-4275.
7. 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.
8. 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 11.10.2012 р.
Рецензент: доц. В.М.Волошин