

УДК 579: 577.11: 612. 112.9

А.В.Янчевский¹, И.С.Гайдаш¹, С.Т.Кохан², В.В.Дычко³

¹Луганский государственный медицинский университет, Украина;

²Забайкальский государственный университет, Чита, Россия;

³Донбасский государственный педагогический университет, Славянск, Украина
(E-mail: manara07@mail.ru)

Показатели перекисного окисления липидов и ферментативной системы антиоксидантной защиты Т-лимфоцитов крови человека под влиянием липополисахаридов бактерий рода *Shigella in vitro*

В статье изучены некоторые аспекты биохимии, в частности, определение *in vitro* активности перекисного окисления липидов и ферментативной системы антиоксидантной защиты нейтрофилов и моноцитов крови человека. Было проведено исследование крови, поскольку кровь является важным диагностическим методом при различных патологических состояниях организма. В ходе изучения показателей перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты на культурах нейтрофилов и моноцитов, выделенных из периферической крови у лиц мужского пола, было установлено, что взаимодействие *in vitro* липополисахаридов бактерий рода *Shigella* с субпопуляциями Т-лимфоцитов вызывает изменение как активности перекисного окисления липидов, так и активности ферментативной системы антиоксидантной защиты.

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

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, 2]. Активность ПОЛ регулируется системой антиоксидантной защиты (АОЗ), ключевыми ферментами которой являются каталаза и супероксиддисмутаза (СОД) [3, 4]. Усиление ПОЛ при недостаточности системы АОЗ способно запустить в клетке программу апоптоза, в частности, через митохондриальный путь [2]. Активацию ПОЛ способны вызвать гипоксия и токсические субстанции, к числу последних относятся и структурные компоненты клеточных стенок грамотрицательных бактерий — липополисахариды (ЛПС) [1, 2]. 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 шигелллёзных 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 «Иммуносупрессивный 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 — $22,4 \pm 1,3$ года). Работу выполняли с соблюдением всех положений биоэтики (Страсбург, 1985 г.).

Лимфоциты выделяли на градиенте плотности фиколла-верографина ($p = 1,076$) по модифицированной методике Bouum [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 мин 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 2×10^9 л/л.

ЛПС получали из культур *Shigella flexneri* (серовары 1a, 1b, 2a, 2b) и *Shigella sonnei* по методу [6, 7]. 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 шигеллезными 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 И.Д.Стальной (1977) [4], определение МДА — по методу И.Д.Стальной и Т.Г.Гаришвили (1977) [8]. Активность каталазы изучали по М.А.Королюк и соавт. (1988) [3], активность СОД — спектрофотометрическим методом [9]. О балансе в системе ПОЛ/АОЗ судили по интегральному коэффициенту K (у.е.), который высчитывали по формуле

$$K = (\text{ДК} + \text{МДА}) / (\text{каталаза} + \text{СОД}).$$

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенного исследования было установлено, что взаимодействие *in vitro* шигеллезных 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 шигеллезных 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* шигеллезных ЛПС с CD4+ и CD8+-лимфоцитами (Т-хелперы/индукторы и Т-супрессоры/цитотоксиксы, соответственно) вызывал в указанных клетках увеличение внутриклеточного содержания 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 использовании 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+-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.

Влияние ПГН, ТК и ЛПС бактерий на ПОЛ и ферментативную систему АОЗ CD4+-лимфоцитов крови человека *in vitro*

Время инкубации, ч	Референтная норма, n = 37	CD4+-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***
K (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.

Влияние ПГН, ТК и ЛПС бактерий на ПОЛ и ферментативную систему АОЗ CD8+-лимфоцитов крови человека *in vitro*

Время инкубации, ч	Референтная норма, n = 33	CD8+-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)
1	2	3	4	5	6	7	8
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***

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>K</i> (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 шигеллёзными 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 шигеллёзных ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл.

Так, в субпопуляции CD8+-лимфоцитов, находившихся в контакте с ЛПС *Shigella flexneri 1a* указанной дозы, активность каталазы и СОД на 24-м часу исследования оказалась в 1,24 и 1,45 раза ниже референтной нормы, соответственно ($p < 0,01$). В то же 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 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 *K*, характеризующего баланс в системе ПОЛ/АОЗ, что свидетельствовало о преобладании процессов ПОЛ над активностью ферментативной системы АОЗ. Наибольшие негативные изменения коэффициента *K* имели место при использовании шигеллёзных ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл и экспозиции с клетками-мишенями 24 ч.

При проведении сравнительного анализа видоспецифического влияния шигеллёзных 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 шигеллёзные ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл, умеренные изменения — ЛПС в дозе 10 мкг/мл. Шигеллёзные ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл негативного влияния на ПОЛ и ферментативную систему нейтрофилов и моноцитов крови человека *in vitro* не оказывают.

Список литературы

- 1 Шабельник О.И., Гайдаш І.С., Флегонтова В.В. Вплив *in vitro* різних методів інактивації токсинів сальмонелл на метаболічний статус моноцитів, нейтрофілів та еритроцитів. — Львів: СПД Резніков В.С., 2011. — 116 с.
- 2 Ulevitch R.J., Tobias P.S. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system // *Current Opinions in Immunology*. — 2007. — № 11. — P. 19–22.
- 3 Королюк М.А., Иванова Л.И., Майоров И.Г. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. — 1988. — № 1. — С. 16–19.
- 4 Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // *Современные методы в биохимии*. — М.: Медицина, 1977. — С. 63–64.
- 5 Хейфец Л.Б., Абалакина В.А. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фикоид // *Лабораторное дело*. — 1973. — № 10. — С. 579–581.
- 6 Кульшин В.А., Яковлев А.А., Авиева С.Н. Улучшенный метод выделения липополисахаридов из грамотрицательных бактерий // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. — 1987. — № 5. — С. 44–46.
- 7 Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure // *Methods of Carbohydrate Chemistry*. — 1965. — № 5. — P. 83–91.
- 8 Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии*. — М.: Медицина, 1977. — С. 66–68.
- 9 Чивари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // *Лабораторное дело*. — 1985. — № 11. — С. 16–18.

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

***Shigella in vitro* тұқымдастағы липополисахаридті бактериялардың әсерінен адам қанының Т-лимфоцит асқынтотығу қорғаныстың ферментативті жүйесінің және липидтердің асқынтотығуларының көрсеткіштері**

Мақалада биохимияның кейбір мәселелері, яғни, адам қанының нейтрофилдер мен моноциттердің антиоксиданттық қорғаныста липидтер асқынтотығы мен ферментативтік жүйенің *in vitro* белсенділігі қарастырылған. Ағзаның әр түрлі патологиялық жағдайларында қанның зерттелуі маңызды диагностикалық тәсіл болып табылады. Ер адамдардың перифериялық қанынан бөлінген нейтрофилдер мен моноциттердің антиоксиданттық қорғаныс жүйесі және липидтердің асқынтотығу көрсеткіштерін анықтау барысында *Shigella* тұқымдастағы бактериялардың *in vitro* липополисахаридтерінің Т-лимфоциттердің субпопуляциясы липидтердің асқынтотығу белсенділігін және антиоксиданттық қорғаныстың ферментативтік жүйесінің белсенділігін туғызатындығы анықталды.

A.V.Yanchevskiy, I.S.Gaydash, S.T.Kokhan, V.V.Dychko

Indices of lipid peroxidation and enzymatic antioxidant system of T-lymphocytes of human blood under the influence of the lipopolysaccharides of *Shigella* bacteria *in vitro*

The article reveals the results of study of metabolic disorders in human blood T-lymphocytes under influence of lipopolysaccharides from bacteria of genus *Shigella*. A study of blood was undertaken, as blood is an important diagnostic method at the different pathosiss of organism. The study of lipid peroxidation and antioxidant system in crops of neutrophils and monocytes from peripheral blood of males, it was found that *in vitro* interaction liposaharidov of *Shigella* bacteria. with subpopulations of T lymphocytes causes a change in the activity of lipid peroxidation and activity of enzymatic antioxidant system.

References

- 1 Shabel'nik O.I., Gaydash I.S., Flegontova V.V. *Effect in vitro of different methods of inactivation of toxins salmonellas on metabolic status of monocytes, neutrophils and enterocytes*, L'vov: Publ. Reznikov V.D., 2011, 116 p.
- 2 Ulevitch R.J., Tobias P.S. *Current Opinions in Immunology*, 2007, 11, p. 19–22.
- 3 Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorov I.G. *Laboratory work*, 1988, 1, p. 16–19.
- 4 Stal'naya I.D. *Contemporary methods in biochemistry*, Moscow: Meditsina, 1977, p. 63–64.
- 5 Kheyfets L.B., Abalakina V.A. *Laboratory work*, 1973, 10, p. 579–581.
- 6 Kul'shin V.A., Yakovlev A.A., Avieva S.N. *Molecular genetics, microbiology and virology*, 1987, 5, p. 44–46.
- 7 Westphal O., Jann K. *Methods of Carbohydrate Chemistry*, 1965, 5, p. 83–91.
- 8 Stal'naya I.D. *Contemporary methods in biochemistry*, Moscow: Meditsina, 1977, p. 66–68.
- 9 Chivari S., Chaba I., Sekey I. *Laboratory work*, 1985, 11, p. 16–18.

Сведения об авторах

Янчевский А.В. — старший лаборант, Луганский государственный медицинский университет, Украина.

Гайдаш И.С. — доктор медицинских наук, профессор, Луганский государственный медицинский университет, Украина.

Кохан С.Т. — кандидат медицинских наук, доцент, Забайкальский государственный университет, Чита, Россия.

Дычко В.В. — доктор биологических наук, профессор, Донбасский государственный педагогический университет, Славянск, Украина.

Information about authors

Yanchevskiy A.V. — Senior laboratory assistant, Lugansk State Medical University, Ukraine.

Gaydash I.S. — Doctor of medical sciences, Professor, Lugansk State Medical University, Ukraine.

Kokhan S.T. — Candidate of medical sciences, Docent, Transbaikal State University, Chita, Russia.

Dychko V.V. — Doctor of biological sciences, Professor, Donbass State Pedagogical University, Slovyansk, Ukraine.

Репозиторий КарГУ