

Гайдаш Е.И., Гайдаш И.С., Дычко Е.А., Кохан С.Т.

ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ И МОНОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА SHIGELLA IN VITRO*E.I. Gaidash, I.S. Gaidash, E.A. Dychko, S.T. Kokhan***INDICATORS OF PHAGOCYTOSIS OF HUMAN BLOOD MONOCYTES AND NEUTROPHILS BY LIPOPOLYSACCHARIDES BACTERIA SHIGELLA IN VITRO**

УДК: 579: 577.11 : 612. 112.9

Статья посвящена изучению фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов крови человека, подвергшихся in vitro воздействию разных концентраций липополисахаридов Shigella flexneri и Shigella sonnei. Установлено, что малые концентрации ЛПС стимулируют фагоцитоз нейтрофилов и моноцитов, а большие – фагоцитоз угнетают. ЛПС проявляли дозозависимое и видонеспецифическое действие. Ключевые слова: нейтрофил, моноцит, фагоцитоз, липополисахарид, шигелла.

Article is dedicated to the study in vitro of phagocytosis activity of human blood neutrophils and monocytes been under the influence of lipopolysaccharides of bacteria genus Shigella. It was found that small concentrations of LPS stimulates phagocytosis human neutrophils and monocytes, but large concentrations of LPS inhibits phagocytosis. LPS should dose-dependent and species-nonspecific action. Keywords: neutrophile, monocyte, phagocytosis, lipopolisaccharide, shigella.

Нейтрофилы и моноциты являются уникальными мультипотентными популяциями клеток иммунной системы, которые вовлекаются в воспалительные процессы и осуществляют первую линию противоинфекционной защиты [1, 3]. Приобретенные дисфункции нейтрофилов и моноцитов имеют критическое значение в патогенезе различных осложнений, влияют на течение и исход гнойно-септических процессов [1, 8, 14].

Качество фагоцитоза, как и продолжительность жизни нейтрофилов и моноцитов, после поглощения бактерий, зависит от степени токсичности поглощённого объекта [4, 12]. При низкой степени токсичности бактерий фагоцитоз является завершённым, тогда как в противном случае фагоциты погибают [9, 14, 15].

Основной токсической субстанцией грамотрицательных бактерий является липополисахариды (ЛПС) – структурные компоненты бактериальной клеточной стенки [1, 3, 5]. Наиболее изучен токсический потенциал ЛПС таких видов грамотрицательных бактерий, как Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, установлено дозозависимое воздействие их ЛПС на фагоцитарную активность моноцитов и нейтрофилов [2-4]. Влияние ЛПС бактерий рода Shigella на показатели фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов

крови человека ранее не изучалось.

Целью настоящего исследования явилось определение воздействия ЛПС бактерий рода Shigella на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека in vitro.

Материалы и методы исследования: Изучение показателей фагоцитоза проводилось на культурах нейтрофилов и моноцитов, выделенных из периферической крови 37 практически здоровых лиц мужского пола 19-24 лет (средний возраст – 22,5±1,2 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 [10, 11]. 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.

ЛПС получали из культур Shigella flexneri (серовары 1a, 1b, 2a, 2b) и Shigella sonnei [6, 13]. Идентификацию шигелл проводили с использованием диагностических наборов «Энтеротест 24» производства фирмы Микро-ЛА-Тест, АО «Ляхема», Чехия. Препараты ЛПС получали при 65°С водно-феноловой экстракцией. 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 g 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° С. Раствор хранили при -20°С. Перед использованием раствор обрабатывали ультразвуком в водной бане в течение 5 мин. Для стимуляции in vitro нейтрофилов и моноцитов использовались следующие концентрации шигеллёзного ЛПС: 1-10-100 мкг/мл.

Определение фагоцитарной активности нейтро-

филов и моноцитов периферической крови проводили чашечным методом [7]. Предварительно в суспензии нейтрофилов и моноцитов вносили шигеллёзные ЛПС в дозах 1, 10 и 100 мкг/мл, инкубировали при 37°C в течение 60 мин в термостате, после чего добавляли 0,01 мл суспензии культуры *Staphylococcus sargrophyticus*, инактивированной нагреванием до 70°C на водяной бане (рабочая концентрация по стандарту оптической мутности – 9lg бактериальных тел/мл). Через 60 мин, после завершения инкубации, из культур нейтрофилов и моноцитов готовили препараты-мазки, сушили при комнатной температуре, фиксировали 10 мин. в абсолютном метиловом спирте, и окрашивали по методу Романовского-Гимзы. После окрашивания мазки изучали под световым микроскопом в иммерсионной системе (учитывали не менее 200 клеток). Подсчитывали фагоцитарный индекс (ФИ) – процент фагоцитирующих клеток, фагоцитарное число (ФЧ) – количество поглощенных стафилококков на 1 фагоцитирующую клетку.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение: Установлено, что непосредственный контакт *in vitro* ЛПС бактерий рода *Shigella* с нейтрофилами и моноцитами крови человека существенно изменяет фагоцитарную активность данных клеток. При этом направленность и степень выраженности изменения, изучаемых показателей фагоцитоза нейтрофилов и моноцитов, зависела от действующей концентрации шигеллёзных ЛПС, и не зависела от их видовой и серовариантной принадлежности.

Как оказалось, низкие концентрации ЛПС бактерий рода *Shigella* (1мкг/мл) при непосредственном контакте с культурами нейтрофилов и моноцитов стимулируют фагоцитарную активность, тогда как высокие концентрации ЛПС (10мкг/мл и, особенно, 100 мкг/мл) фагоцитарную активность подавляют.

Результаты исследования влияния ЛПС бактерий рода *Shigella* на ФИ нейтрофилов крови человека представлены в таблице 1.

Таблица 1
Влияние ЛПС бактерий рода *Shigella* на ФИ нейтрофилов крови человека *in vitro*

Вид бактерий	Серовар	ФИ(%)	t	P
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
S. flexneri	1a	95,7±2,9	2,35	<0,02
	1b	94,8±2,8	2,19	<0,05
	2a	96,4±3,0	2,47	<0,02
	2b	95,2±2,8	2,28	<0,05
S. sonnei	-	94,3±2,7	2,10	<0,05
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
S. flexneri	1a	74,7±3,7	2,02	<0,05
	1b	72,4±3,6	2,51	<0,02
	2a	73,9±3,7	2,18	<0,02
	2b	74,3±3,8	2,07	<0,05
S. sonnei	-	71,9±3,6	2,61	<0,01
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
S. flexneri	1a	41,7±2,1	10,61	<0,0001
	1b	44,2±2,4	9,61	<0,0001

	2a	40,6±2,3	10,60	<0,0001
	2b	43,1±2,2	10,15	<0,0001
S. sonnei	-	39,5±2,0	11,29	<0,0001
Референтная норма (n=45)		85,0±3,5	-	-

Примечание: критерии t и P рассчитаны по отношению к референтной норме

Под влиянием шигеллёзных ЛПС в концентрации 1мкг/мл ФИ нейтрофилов увеличивался, относительно референтной нормы, в 1,11-13 раза ($p<0,05$ - $p<0,02$), при этом показатели ФИ в опытах с ЛПС сероваров S. flexneri 1a, 1b, 2a, 2b и ЛПС S. sonnei существенно между собой не различались. Шигеллёзные ЛПС в дозе 10 мкг/мл, напротив, вызывали снижение ФИ нейтрофилов в 1,14-1,18 раза, а в дозе 100 мкг/мл – в 1,92-2,15 раза ($p<0,05$ - $p<0,001$), статистически значимое видоспецифическое и серовариантное различие при этом также не выявлялось.

Шигеллёзные ЛПС оказывали дозозависимое влияние и на поглотительную способность нейтрофилов (таблица 2). В присутствии ЛПС в концентрации 1 мкг/мл ФЧ нейтрофилов увеличивалось, против референтной нормы, в 1,14-1,19 раза, а в присутствии ЛПС в концентрации 10 и 100 мкг/мл ФЧ нейтрофилов снижалось в 1,15-1,23 и в 2,12-2,41 раза, соответственно. Серовариантные и видоспецифические особенности влияния шигеллёзных ЛПС на ФЧ нейтрофилов были несущественными.

Таблица 2
Влияние ЛПС бактерий рода *Shigella* на ФЧ нейтрофилов крови человека *in vitro*

Вид бактерий	Серовар	ФЧ(у.е.)	t	P
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
S. flexneri	1a	8,0±0,40	2,00	<0,05
	1b	8,3±0,42	2,52	<0,02
	2a	8,1±0,41	2,17	<0,02
	2b	8,0±0,37	2,10	<0,05
S. sonnei	-	8,2±0,40	2,40	<0,02
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
S. flexneri	1a	5,9±0,30	2,59	<0,01
	1b	5,7±0,28	3,17	<0,002
	2a	6,1±0,31	2,09	<0,05
	2b	5,9±0,32	2,50	<0,02
S. sonnei	-	5,8±0,30	2,83	<0,01
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
S. flexneri	1a	3,2±0,16	11,18	<0,0001
	1b	2,9±0,14	12,39	<0,0001
	2a	3,0±0,15	11,94	<0,0001
	2b	3,1±0,16	11,47	<0,0001
S. sonnei	-	3,3±0,17	10,72	<0,0001
Референтная норма (n=45)		7,0±0,3	-	-

Примечание: критерии t и P рассчитаны по отношению к референтной норме

Взаимодействие ЛПС бактерий рода *Shigella* с моноцитами крови человека также оказывало дозозависимое влияние на фагоцитарную активность данных клеток (таблицы 3, 4).

В присутствии шигеллёзных ЛПС в действующей концентрации 1 мкг/мл регистрировалось увеличение ФИ моноцитов в 1,15-1,19 раза ($p<0,05$), а ФЧ моноцитов – в 1,16-1,19 раза ($p<0,05$). Внесение в культуры моноцитов шигеллёзных ЛПС в дозе 10 мкг/мл вызывало снижение ФИ и ФЧ моноцитов в

1,22-1,26 и в 1,17-1,23 раза, соответственно.

Таблица 3

Влияние ЛПС бактерий рода Shigellana ФИ моноцитов крови человека in vitro

Вид бактерий	Серовар	ФИ(%)	t	P
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
S. flexneri	1a	88,3±4,42	2,05	<0,05
	1b	90,1±4,51	2,33	<0,05
	2a	87,9±4,40	1,98	<0,05
	2b	89,4±4,47	2,22	<0,05
S. sonnei	-	91,3±4,57	2,52	<0,02
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
S. flexneri	1a	62,8±3,14	2,82	<0,01
	1b	61,5±3,08	3,12	<0,01
	2a	62,2±3,11	2,96	<0,01
	2b	60,9±3,05	3,25	<0,002
S. sonnei	-	61,4±3,07	3,14	=0,002
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
S. flexneri	1a	38,3±1,91	9,17	<0,0001
	1b	38,7±1,94	9,05	<0,0001
	2a	39,9±1,90	8,80	<0,0001
	2b	38,1±1,91	9,22	<0,0001
S. sonnei	-	37,6±1,88	9,37	<0,0001
Референтная норма (n=45)				
		76,5±3,7	-	-

Примечание: критерии t и P рассчитаны по отношению к референтной норме

Таблица 4

Влияние ЛПС бактерий рода Shigella на ФЧ моноцитов крови человека in vitro

Вид бактерий	Серовар	ФЧ(у.е.)	t	P
Действующая концентрация ЛПС 1 мкг/мл				
S. flexneri	1a	6,20±0,31	2,01	<0,05
	1b	6,40±0,32	2,46	<0,02
	2a	6,45±0,32	2,58	<0,01
	2b	6,25±0,31	2,13	<0,05
S. sonnei	-	6,30±0,32	2,21	<0,05
Действующая концентрация ЛПС 10 мкг/мл				
S. flexneri	1a	4,30±0,22	3,30	<0,002
	1b	4,60±0,23	2,36	<0,02
	2a	4,50±0,23	2,65	<0,01
	2b	4,40±0,22	3,00	<0,01
S. sonnei	-	4,5±0,21	2,76	<0,01
Действующая концентрация ЛПС 100 мкг/мл				
S. flexneri	1a	2,50±0,16	10,28	<0,0001
	1b	2,30±0,12	11,19	<0,0001
	2a	2,10±0,13	12,27	<0,0001
	2b	2,40±0,12	11,15	<0,0001
S. sonnei	-	2,20±0,11	11,72	<0,0001
Референтная норма (n=45)				
		5,4±0,25	-	-

Примечание: критерии t и P рассчитаны по отношению к референтной норме

Наиболее выраженное угнетение фагоцитарной активности моноцитов крови человека возникало при их взаимодействии in vitro с шигеллезными ЛПС в действующей концентрации 100 мкг/мл. При данном условии эксперимента ФИ моноцитов снижался, относительно референтной нормы, в 1,92-2,3 раза, а ФЧ моноцитов – в 2,16-2,57 раза.

В пределах, использованных в опытах, действующих концентраций шигеллезных ЛПС, достоверных различий между ФИ и ФЧ моноцитов выявлено не было, что указывало на отсутствие видоспецифического и серовариантного влияния

ЛПС бактерий рода Shigella на изучаемые показатели. Это, по-видимому, обусловлено сходством химической структуры ЛПС S. sonnei и S. flexneri, а также сероваров последнего вида.

Выводы: ЛПС бактерий рода Shigella оказывают in vitro видо- и серовариантнонеспецифическое дозозависимое влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов крови человека. Низкие концентрации шигеллезных ЛПС (1 мкг/мл) стимулируют фагоцитоз моноцитов и нейтрофилов, высокие концентрации шигеллезных ЛПС (10 и 100 мкг/мл) фагоцитоз угнетают.

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. Вовк О.О. Вплив ліпополісахаридів Pseudomonas aeruginosa на функціональну активність моноцитів крові людини / Вовк О.О., М.Ю. Перфільєва, Т.О. Журба // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2011. – Том 6, №2. – С. 55-57.
3. 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.
4. Гайдаш І.С. Вплив ліпополісахаридів Escherichia coli на функціональну активність моноцитів крові людини / І.С. Гайдаш, М.Ю. Перфільєва, О.О. Вовк, Т.О. Журба // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2011. – Т.6, №3. – С.27-30.
5. Косенко Ю.В. Влияние липополисахаридов этиологических агентов хронического пародонтита на фагоцитарную активность моноцитов / Ю.В. Косенко // Український медичний альманах. – 2005. – № 5. – С. 66-68.
6. 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.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / [Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др.]; под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
8. Липополисахарид-опосредованная активация нейтрофилов периферической крови у больных острой дизентерией / И.М. Рослый, В.А. Малов, В.Б. Полуэтов [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 1. – С. 52-54.
9. Миргородская А.В. Влияние пептидогликанов и липополисахаридов бактерий на апоптоз нейтрофилов in vitro / А.В. Миргородская // Український журнал екстремальної медицини ім. Г.О.Можасва. – 2008. - №2. – С. 86-89.
10. Михеенко Т. В. Два метода получения обогащённой популяции моноцитов периферической крови / Т.В. Михеенко // Лабораторное дело. – 1987. – № 10. – С. 763-766.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Xu D.X. Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor / D.X. Xu // Toxicology. – 2007. – № 3. – P. 167-175.
15. Zychlinsky A. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages / A. Zychlinsky, M.C. Prevost, P.J. Sansonetti // Nature. – 1992. – № 358. – P. 167-168.

Рецензент: д.м.н., профессор Белеков Ж.О.