

Біохімія

УДК 579:161.71-018. 46-002

**ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛ CD95 НА ПОВЕРХНІ МОНОЦИТІВ І ЛІМФОЦИТІВ
IN VITRO ПІД ВПЛИВОМ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ ЗБУДНИКІВ ХРОНІЧНИХ
СИНУСИТІВ, ОТИТІВ І ТОНЗИЛІТІВ**

Н. Казімірко, І. Шумова, Н. Петруня, І. Стеріоні, А. Коновалов

*Луганський державний медичний університет
вул. 50-річчя Оборони Луганська, 1г, Луганськ 91045, Україна
e-mail: veronica-1970@list.ru*

Встановлено, що ліпополісахариди бактерій, які є збудниками хронічних синуситів, отитів і тонзилітів, стимулюють апоптоз моноцитів, Т- і В-лімфоцитів периферичної крові *in vitro*, що виявлялось підвищеною експресією маркера апоптозу CD95 на поверхні клітин. Кількість моноцитів і лімфоцитів, які експонували на своїй поверхні молекули CD95, збільшувалася в міру зростання концентрації ліпополісахаридів і була найбільшою при впливі факультативно анаеробних бактерій порівняно з суворо анаеробними.

Ключові слова: молекули CD95, моноцити, лімфоцити, ліпополісахариди.

Апоптоз – це фізіологічна, активна, програмована загибель клітин, інформація про яку закодована в клітинному геномі та піддається регуляції. Порушення процесу програмованої клітинної загибелі відіграє істотну роль у патогенезі імунopatологічних процесів у людини, в тому числі вторинних імунodefіцитів, аутоімунних і онкологічних захворювань, хронічних запальних процесів, вірусних і інших інфекцій [1]. Доведено, що в механізмі розвитку імунopatологічних реакцій, обумовлених суперантигенами, істотне значення має загибель лімфоцитів і фагоцитів у результаті апоптозу. Імуноцити (Т-лімфоцити, макрофаги і нейтрофіли) експресують рецептори CD95, які містять «домен смерті», що транслює апоптичний сигнал на внутрішньоклітинні структури. Такі клітини можуть подавати «сигнали небезпеки» іншим клітинам. У клітинних культурах на апоптоз впливають віруси, бактерії (та їх структурні компоненти), гриби, найпростіші [2–7]. У доступній літературі нами не були знайдені дані про комплексне вивчення дозозалежного і видоспецифічного впливу структурного компонента умовнопатогенних бактерій ліпополісахариду (ЛПС) на апоптоз моноцитів і лімфоцитів. Стаття є фрагментом планової наукової теми кафедри патофізіології ЛДМУ «Запалення як результат дії бактерій» (номер реєстрації 0198U005713). Мета дослідження – вивчити динаміку експонування молекул CD95 на поверхні моноцитів і лімфоцитів *in vitro* під впливом ЛПС збудників хронічних синуситів, отитів і тонзилітів.

Об'єктом дослідження були 150 культур моноцитів і 120 культур лімфоцитів периферичної крові практично здорових донорів-чоловіків віком від 20 до 30 років. Забір крові в об'ємі 20 мл проводили з ліктьової вени у ранковий час (7.00–8.00) до прийому їжі. Кров вносили у стерильні скляні пробірки, що містили 0,2 мл гепарину, перемішували і для одержання плазми відстоювали протягом 2 год у термостаті при 37°C. Отриману плазму крові надалі використовували для виділення моноцитів і лімфоцитів шляхом центрифугування на градієнті густини фікол-верографін. ЛПС грамнегативних бактерій одержували з культур мікроорганізмів родів *Moraxella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, ізольованих від 109 хворих на хро-

нічні синусити, отити і тонзиліти (віком від 18 до 39 років), які перебували на лікуванні в отоларингологічному відділенні міської багатoproфільної клінічної лікарні № 1 м. Луганська. Препарати ЛПС одержували з клітинних стінок бактерій водно-феноловою екстракцією та використовували у концентраціях 10, 50 та 100 мкг/мл [8]. Експресію молекул CD95 на поверхні моноцитів, Т- і В-лімфоцитів вивчали методом непрямой імунної флуоресценції з використанням моноклональних антитіл виробництва науково-виробничого центру «Медбіоспектр» (Москва, Російська Федерація). Т- та В-лімфоцити диференціювали при використанні моноклональних антитіл, відповідно, CD3 та CD22. Отримані цифрові результати обробляли статистично.

Дані про вплив ЛПС на апоптоз моноцитів *in vitro* наведені в таблиці.

Вплив ЛПС на експонування молекул CD95 на поверхні моноцитів і лімфоцитів (%) *in vitro* (M±m)

Вид бактерій	Доза ЛПС, мкг/мл	CD95 ⁺ -моноцити	CD95 ⁺ -Т-лімфоцити	CD95 ⁺ -В-лімфоцити
<i>Moraxella lacunata</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,2±0,3	7,3±0,4	7,6±0,5*
	50,0	5,8±0,4	9,9±0,7*	10,5±0,7*
	100,0	7,8±0,45*	15,4±0,9*	10,5±0,7*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,4±0,3	7,0±0,4	7,3±0,4*
	50,0	6,2±0,35	9,6±0,5*	9,7±0,5*
	100,0	7,4±0,4*	13,8±0,8*	13,8±0,7*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,7±0,3	9,0±0,5*	8,5±0,45*
	50,0	6,2±0,4	11,4±0,8*	12,7±0,9*
	100,0	8,1±0,5*	14,6±0,8*	16,2±1,1*
<i>Haemophilus influenzae</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,9±0,3	9,3±0,5*	8,1±0,45*
	50,0	6,8±0,5*	11,2±0,7*	12,3±0,7*
	100,0	8,5±0,5*	15,1±0,9*	15,7±0,9*
<i>Bacteroides gracilis</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,3±0,3	7,2±0,4	6,9±0,4*
	50,0	5,7±0,4	8,0±0,55*	9,3±0,65*
	100,0	6,7±0,4*	9,9±0,6*	11,6±0,8*
<i>Prevotella intermedium</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,6±0,3	7,1±0,4	6,6±0,35*
	50,0	5,2±0,35	7,8±0,55*	2,6±0,6*
	100,0	6,3±0,4*	10,0±0,6*	11,0±0,7*
<i>Fusobacterium varium</i>	0 (контроль)	5,6±0,2	6,5±0,5	4,6±0,2
	10,0	5,8±0,3	7,2±0,5	6,9±0,4*
	50,0	5,9±0,4	8,3±0,6	9,0±0,6*
	100,0	7,5±0,5*	10,3±0,7*	11,4±0,8*

Примітка. * – p<0,05. Р розраховано відносно середовища 199 (ЛПС у середовищі відсутній, контрольний показник).

Кількість моноцитів, які *in vitro* експонували на своїй поверхні молекули CD95 при відсутності впливу ЛПС, становила $5,6 \pm 0,2\%$, що і було прийнято за контрольний показник. Встановлено, що, незалежно від видової приналежності, ЛПС у концентраціях 10,0–50,0 мкг/мл не викликали ймовірного збільшення експресії молекул CD95 на поверхні моноцитів *in vitro*. Виняток становили ЛПС *H. influenzae*, які у дозі 50,0 мкг/мл викликали підвищення експресії CD95 на поверхні моноцитів до рівня $6,8 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$). Внесення до середовища культивування моноцитів ЛПС у концентрації 100,0 мкг/мл супроводжувалося помірним збільшенням рівня клітин, які несли на своїй поверхні CD95. Кратність збільшення моноцитів із посиленою експресією молекул CD95 порівняно зі спонтанною експресією становила 1,13 разу для *P. intermedius*, 1,2 рази для *B. gracilis*, 1,32 рази для *K. pneumoniae*, 1,34 разу для *F. varium*, 1,4 разу для *M. lacunata*, 1,45 разу для *P. aeruginosa*, 1,52 разу для *H. influenzae*.

ЛПС *M. lacunata*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *B. gracilis*, *P. intermedius* і *F. varium* посилювали експонування молекул CD95 на поверхні Т- і В-лімфоцитів (див. таблицю). Кількість Т- і В-лімфоцитів, які експонували на своїй поверхні молекули CD95, за відсутності в середовищі культивування ЛПС, була прийнята як контрольний показник, який для загальної кількості Т- і В-лімфоцитів становив $6,5 \pm 0,5$ і $4,6 \pm 0,2\%$. Рівень лімфоцитів, які експонували на своїй поверхні молекули CD95, істотно підвищувався у міру збільшення концентрації ЛПС і був найбільшим при дозі ЛПС 100,0 мкг/мл.

Так, відносно Т-лімфоцитів кількість CD95+–клітин при концентрації ЛПС 10,0 мкг/мл перевищувала показник контролю залежно від видової приналежності ЛПС, у середньому у 1,2 разу (в 1,1–1,45 разу), при дозі ЛПС 50,0 і 100,0 мкг/мл – відповідно в 1,48 разу (коливання – 1,2–1,8 разу).

Апоптоз Т-лімфоцитів певним чином залежав від видової приналежності ЛПС. Найбільшу апоптогенну активність виявляли ЛПС *H. influenzae*: ЛПС у концентрації 10,0 мкг/мл викликали експресію на поверхні молекул CD95 у $9,3 \pm 0,5\%$ Т-лімфоцитів, що перевищувало показник контролю в 1,43 разу і було вище аналогічного ефекту ЛПС інших видових приналежностей. При збільшенні дози ЛПС *H. influenzae* до 50,0 мкг/мл збільшення Т-лімфоцитів із маркерами CD95 становило проти контролю 1,72 разу. При концентрації ЛПС *H. influenzae* 100,0 мкг/мл кількість Т-лімфоцитів із маркером CD95 виявилась у 2,32 разу вищою контролю.

Менший апоптогенний потенціал порівняно з ЛПС *H. influenzae* мали ЛПС *P. aeruginosa*, хоча виявлені відмінності не були ймовірними. На третьому місці за здатністю індукувати апоптоз Т-лімфоцитів були ЛПС *M. lacunata*: при дозі ЛПС 10,0 мкг/мл рівень Т-лімфоцитів із маркерами CD95 підвищувався до $7,3 \pm 0,4\%$, що не мало відмінностей порівняно з показниками контролю ($p > 0,05$). При дії на Т-клітини ЛПС *M. lacunata* у дозі 50,0 мкг/мл збільшення Т-лімфоцитів із маркером CD95 становило 1,52 разу, а при дозі 100,0 мкг/мл – 2,37 разу.

ЛПС *K. pneumoniae* виявилися менш активними порівняно з ЛПС *M. lacunata*. Найменше впливали на експонування Т-лімфоцитами молекул CD95 на власній поверхні ЛПС суворо анаеробних бактерій. Так, при концентрації ЛПС бактерій даної групи, яка дорівнювала 10,0 мкг/мл, ступінь збільшення Т-лімфоцитів із маркерами CD95 коливався від 1,1 до 1,4 разу, що не мало ймовірних розходжень порівняно з аналогічним показником контролю ($p > 0,05$). При дозі ЛПС 50,0 мкг/мл збільшення кількості Т-клітин із маркером CD95 становила 1,2–1,3 разу і була більш вираженою у *F. varium*, менш – у *P. intermedius*.

ЛПС *in vitro* посилювали експресію маркерів апоптозу CD95 на поверхні В-лімфоцитів периферичної крові людини (див. таблицю). Якщо внесення до середовища культивування В-клітин ЛПС у дозі 10,0 мкг/мл вело до збільшення кількості CD95⁺-лімфоцитів у середньому в 1,65 рази проти контролю, то при дозі ЛПС 50,0 і 100,0 мкг/мл ступінь збільшення CD95⁺-В-лімфоцитів становив 2,3 і 3,0 рази відповідно ($p < 0,05$). Аналіз отриманих даних дав змогу відзначити, що В-лімфоцити є чутливішими до апоптогенної дії ЛПС. При концентрації ЛПС 10,0 мкг/мл кратність збільшення кількості В-лімфоцитів із маркером CD95 перевищувала таку для Т-лімфоцитів у 1,38 рази, при 50,0 і 100,0 мкг/мл – відповідно в 1,55 і 1,50 рази.

Аналіз впливу ЛПС на експонування В-лімфоцитами молекул CD95 залежно від видової приналежності ЛПС показав, що найбільший потенціал мали ЛПС *P. aeruginosa*, при цьому апоптогенний вплив ЛПС збільшувався в міру підвищення діючої на В-клітини дози ЛПС. Практично однаковий з ЛПС *P. aeruginosa* потенціал мали ЛПС *H. influenzae*. Виражене, але менш значне порівняно з ЛПС *P. aeruginosa* і *H. influenzae*, посилення експресії маркерів апоптозу В-клітинами зареєстровано при тестуванні ЛПС *M. lacunata*.

Найменшу спроможність посилювати експресію маркерів апоптозу на поверхні В-лімфоцитів виявляли ЛПС суворо анаеробних бактерій. Так, підвищення кількості В-лімфоцитів із маркером апоптозу CD95 під впливом 10,0 мкг/мл ЛПС даних видів бактерій у середньому становило 1,51 рази відносно контролю, при 50,0 і 100,0 мкг/мл – 1,99 і 2,52 рази відповідно. Істотних розходжень між потенціалами ЛПС *B. gracilis*, *P. intermedius* і *F. varium* не виявлено.

В умовах *in vitro* ЛПС бактерій видів *M. lacunata*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *B. gracilis*, *P. intermedius* і *F. varium*, які є етіологічними агентами хронічних синуситів, отитів і тонзилітів, спроможні стимулювати апоптоз моноцитів, Т- і В-лімфоцитів, виділених з периферичної крові здорових осіб. Апоптогенна активність ЛПС мала прояв в експонуванні маркера апоптозу CD95 на поверхні клітин-мішеней. Кількість CD95⁺-клітин збільшувалася в міру зростання концентрації ЛПС і була найбільшою при дії факультативних анаеробів порівняно з суворо анаеробними бактеріями. Серед лімфоцитів найбільш чутливими до впливу ЛПС виявилися В-клітини.

Перспективи подальших досліджень. Дані, отримані нами в результаті дослідження, будуть використані для подальшого висвітлення патогенезу порушень, які виникають при хронічних синуситах, отитах і тонзилітах бактеріальної етіології (особливо викликаних грамнегативною мікрофлорою), та для розробки патогенетично обґрунтованих методів лікування даної патології ЛОР-профілю.

1. Гайдаш І. С., Флегонтова В. В., Вітрищак С. В. та ін. Склад умовно-патогенних бактерій – збудників гнійно-запальних захворювань жіночих статевих органів та їхній вплив на апоптоз моноцитів та нейтрофілів // Вісн. асоціації акушерів-гінекологів України. 2000. № 4. С. 33–37.
2. Гайдаш І. С., Флегонтова В. В., Стеріони І. В. Влияние пептидогликанов и липополисахаридов условно-патогенных бактерий на апоптоз нейтрофилов *in vitro* // Укр. мед. альманах. 2004. № 6. С. 195–197.
3. Гайдаш І. С., Флегонтова В. В., Суглобов Є. В. Апоптозіндукуюча активність липополисахаридів збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих // Вісн. морської медицини. 2000. № 3. С. 24–28.

4. Коновалов А., Стериони И., Копельян Е. Экспрессия молекул CD95 на поверхности нейтрофилов под влиянием структурных компонентов и токсинов бактерий *in vitro* // Матеріали XI Ювілейного міжнар. мед. конгресу студентів і молодих вчених, присв. 50-річчю заснування Терноп. держ. мед. ун-ту імені І.Я. Горбачевського (Тернопіль, 2007). Тернопіль, 2007. С. 214.
5. Коновалов А. Ю., Стериони И. В. Влияние липополисахаридов на экспрессию молекул CD95 на поверхности моноцитов *in vitro* // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы межгород. конф. молодых учёных. СПб., 2007. С. 68–70.
6. Косенко Ю. В. Влияние липополисахаридов бактерий на апоптоз моноцитов // Укр. мед. альманах. 2004. № 6. С. 66–68.
7. Стериони И. В., Коновалов А. Ю. Влияние *in vitro* пептидогликанов и липополисахаридов условно-патогенных бактерий на экспрессию молекул CD38 и CD95 на поверхности нейтрофилов // Загальна патологія та патологічна фізіологія. 2006. № 2, додаток А. С. 50–52.
8. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure // Methods of Carbohydrate Chem. 1965. N 5. P. 83–91.

CD95 MOLECULES EXPRESSION ON THE MONOCYTES AND LYMPHOCYTES SURFACE *IN VITRO* UNDER THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF CHRONIC SINUSITIS, OTITIS AND TONSILLITIS CAUSATIVE AGENTS

N. Kasimirko, I. Shumova, N. Petrunya, I. Sterioni, A. Konovalov

*Lugansk State Medical University
1g, 50 let Oborony Luganska St., Lugansk 91045, Ukraine
e-mail: veronica-1970@list.ru*

It has been established that bacterial lipopolysaccharides of chronic sinusitis, otitis and tonsillitis causative agents are able to stimulate apoptosis of peripheral blood monocytes, T and B cells *in vitro* what is manifested by increased expression of apoptic CD95 markers on the cell surface. The count of monocytes and lymphocytes which expressed CD95 molecules on their surface had increased proportionally to the lipopolysaccharide concentration and was the largest at influence of facultative anaerobes in comparison with strict anaerobic bacteria.

Key words: CD95 molecules, monocytes, lymphocytes, lipopolysaccharides.

Стаття надійшла до редколегії 14.12.07

Прийнята до друку 15.02.08