

Петракова О. В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Гурманчук И. Е.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Харламова А. Н.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Соколовская Е. В.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

Черношей Д. А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск*

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА E. COLI НА СОДЕРЖАНИЕ P65 В ЦИТОПЛАЗМЕ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

NF- κ B играет важную роль в регуляции множества функций клеток. Этот фактор принадлежит к категории быстродействующих первичных транскрипционных факторов, т. е. транскрипционных факторов, которые почти всегда присутствуют в клетках в неактивном состоянии и не требуют для своей активации синтеза новых белков (например, c-Jun и система факторов STAT). Это позволяет NF- κ B реализовывать быстрый ответ на различные стимулы.

NF- κ B представляет собой гомо- или гетеродимеры различных субъединиц: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB, c-Rel, p100, p105. Классический NF- κ B является гетеродимером, состоящим из p50 (NF κ B1) и p65 (RelA), однако в некоторых случаях состав NF- κ B может изменяться, что влияет на набор регулируемых генов [1].

NF- κ B является распространенным транскрипционным фактором, важным для нормальной функции иммунной системы. Он присутствует в цитоплазме неиндуцированных клеток в неактивном виде [2]. Неактивное состояние цитозольного NF- κ B является результатом присоединения к нему белка (60–70 кД), названного I κ B. Обычно в цитоплазме существует неактивный гетеромерный комплекс NF- κ B, ассоциированный с одним из нескольких ингибиторов I κ B: I κ B α , I κ B β или др. Активация в различных случаях сводится к разрушению тримерного комплекса и отщеплению ингибитора с последующим его протеолизом и образованию димерного комплекса, состоящего из одинаковых или различных субъединиц NF- κ B, который может транслоцироваться в ядро, связываться с ДНК и изменять транскрипцию. Выделяют 2 пути активации NF- κ B — классический и альтернативный. В классическом принимают участие RelA, RelB, and c-Rel, т. е. те белки, которые не имеют трансактивационного домена. В случае альтернативного пути NF- κ B в цитоплазме находится в виде предшественника p100 и p105.

Активация NF- κ B приводит к синтезу различных регуляторных белков, хемокинов и цитокинов, изменяющих метаболизм на уровне одной клетки, ткани, органа и даже всего организма. Протекающие реакции можно разделить на 2 группы: внутриклеточные — апоптоз, дифференцировка самой клетки, и внеклеточные — системный и локальный воспалительные ответы (синдром системного воспалительного ответа, сепсис, тяжелый сепсис, септический шок). Неадекватно сильная или длительная активация NF- κ B приводит к гиперэкспрессии медиаторов воспаления, что является одной из причин повреждения организма при сепсисе и синдроме системного воспалительного ответа.

ЛПС является одним из факторов, приводящих к активации NF- κ B. Он связывается с TLR 4, вызывая активацию двух сигнальных путей, каждый из которых приводит в свою очередь к активации NF- κ B. MyD88-зависимый путь опосредуется киназами IRAK1 и IRAK4, которые фосфорилируют TRAF6, приводя к активации IKK комплекса [3]. В тоже время молекулярные особенности MyD88-независимого пути на сегодняшний момент не до конца ясны. Известно, что данный путь включает в себя TIR-домен, содержащий адаптерный протеин TRIF, TRAM, RIP1 и RIP3 [3]. Однако оба пути приводят в конечном итоге к активации транскрипции гена I κ B α и деградации I κ B [3].

MyD88-независимый путь также включает IRF-3-зависимую экспрессию ФНО α , что приводит к активации NF- κ B. Активация NF- κ B посредством MyD88-зависимого пути происходит раньше, чем активация через MyD88-независимый путь, поскольку синтез ФНО α требует времени [3]. Установлено, что действие ЛПС на клетки вызывает стабильную активацию NF- κ B, тогда как при обработке клеток непосредственно ФНО α активация транскрипционного фактора носит изменчивый характер [3]. Таким образом, было показано, что устойчивая активация NF- κ B обусловлена одновременной активацией и взаимодействием обоих сигнальных путей [3].

Материалы и методы. Мононуклеары получали из стабилизированной гепарином периферической крови условно здоровых доноров после центрифугирования ее на градиенте плотности (1,077 г/см³). Полученные клетки отмывали, после чего из них готовили суспензию в концентрации 10⁷ клеток в 1 мл. Для оценки влияния ЛПС на содержание p65 в цитоплазме клеток их инкубировали в течение 60 минут в присутствии ЛПС *E. coli* (0111:B4) в конечной концентрации 20 мкг/мл. Для постановки контрольной пробы клетки инкубировали в полной культуральной среде без добавления ЛПС.

После окончания инкубации клетки центрифугировали и выделяли цитоплазматические лизаты согласно протоколу производителя (Active motif). В полученных лизатах определяли концентрацию белка spot-методом и окраской амидочерным [4]. Разделение белков проводили в полиакриламидном геле, после чего переносили на PVDF мембрану. Мембрану инкубировали с первыми антителами к p65 (*Stressgen*). Проявляли связавшиеся антитела с помощью антикроличьих антител, меченных пероксидазой (*Rockland*) с последующей инкубацией мембраны в субстратном растворе, содержащем тетраметилбензидин (*Sigma*). Проводили денситометрию, результаты стандартизировали по уровню белка в пробах.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования содержания р65 в цитоплазматических экстрактах мононуклеаров периферической крови доноров представлены в таблице.

Содержание р65 в цитоплазматических лизатах мононуклеаров крови человека

Эксперимент (n = 5)	Содержание р65 (ЕД), M ± m	Минимум	Максимум	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Контроль	12,47 ± 5,4	5,50	28,44	5,64	19,30
ЛПС <i>E. coli</i> (20 мкг/мл)	3,68 ± 3,68	0,00	14,73	0,00	7,37

Как видно из приведенных данных, содержание р65 в цитоплазме мононуклеаров периферической крови разных доноров значительно отличается. Это вполне соответствует данным литературы, согласно которой NF-κB присутствует в цитоплазме неиндуцированных клеток в неактивном виде [2].

При анализе действия ЛПС на содержание р65 в цитоплазме клеток было выявлено, воздействие ЛПС в течение 60 минут в концентрации 20 мкг/мл приводит к полному исчезновению р65 из цитоплазмы клеток в 80 % случаев. Это, по всей видимости, является результатом деградации комплекса белков NF-κB в цитоплазме и переходу р65 в ядро клеток. Однако в 1 случае было зарегистрировано увеличение содержания р65 в цитоплазме мононуклеаров по сравнению с пробой без ЛПС (в 2,6 раза). На наш взгляд это может быть связано с индивидуальными особенностями регуляции активности НК-κB у этого донора, а также возможной преактивацией клеток *in vivo*.

Заключение. Таким образом, результатом действия ЛПС *E. coli* в дозе 20 мкг/мл на мононуклеары периферической крови человека *in vitro* является исчезновение р65 из цитоплазмы клеток после 60 минут воздействия. Также на основании полученных данных можно говорить о наличии индивидуальных особенностей реализации NF-κB-опосредованного ответа клеток на ЛПС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham, E. NF-κB activation / E. Abraham // Critical Care Medicine. Vol. 28. 2000. P. 100–104.
2. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid / O. I. Aruoma [et al.] // Free Radic. Biol. Med. 1989. Vol. 6. № 6. P. 593–597.
3. Achieving Stability of Lipopolysaccharide-Induced NF-κB Activation / M. W. Covert [et al.] // Science. 2005. Vol. 309. № 5742. P. 1854–1857.
4. Chapdelaine, P. Protein estimation directly from SDS-PAGE loading buffer for standardization of samples from cell lysates or tissue homogenates before Western blot analysis / P. Chapdelaine, K. Vignola, M. A. Fortier // BioTechniques. 2001. Vol. 31. № 3. P. 478–482.