

УДК 615.371/.372

## Изучение апоптогенной активности коклюшных препаратов

С.Ю.Тюкавкина, А.А.Сависько, Г.Г.Харсеева

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

## The investigation of apoptogenic activity of pertussis preparations

S.U.Tyukavkina, A.A.Savisko, G.G.Charseeva

Medical University, Rostov-on-Don, Russia

### Аннотация

Изучена апоптогенная активность коклюшных препаратов в отношении иммунокомпетентных клеток мышей и морских свинок. Апоптоз оценивали по характерным морфологическим изменениям клеток в препаратах, окрашенных гистологическими красителями, и с помощью цитофлюориметрического анализа окрашенных пропидиумом иодида клеток на цитофлюориметре «Coulter». Сравнительная оценка изученных препаратов показала, что наибольшей апоптогенной активностью в отношении иммунокомпетентных клеток обладает коклюшный токсин и АКДС-вакцина. Установлено, что более чувствительны к апоптозу иммунокомпетентные клетки мышей, особенно лимфоциты. Высокая апоптогенная активность АКДС-вакцины может привести к формированию поствакцинального иммунодефицита, который, хотя и носит транзиторный характер, будет способствовать нарушению формирования клеток памяти и снижению эффективности вакцинации.

### Ключевые слова

Апоптоз, иммуногенез коклюша, поствакцинальный иммунодефицит

Благодаря неослабевающему всемирному интересу к проблеме апоптоза накопилось достаточно сведений, подтверждающих концепцию Керра и позволяющих рассматривать апоптоз как фундаментальную генетическую программу, такую же, как пролиферация, дифференцировка или пребывание клетки в покоящемся состоянии, а также демонстрирующих ключевую роль этого процесса в судьбе всех ядродержащих клеток организма животных [1, 2, 3, 4, 5].

### Summary

The object of this study was to investigate apoptogenic activity of pertussis preparation to immunocompetent cells of mice and pigs. Apoptosis was evaluated by characteristic morphological changes of cells in preparations stained with histological dyes as well as cytofluorimetric analysis with propidium iodide coloring on cytofluorimeter «Coulter». The comparative investigation of pertussis preparations established that pertussis toxin and AKDC possess most high apoptogenic activity. It was established that immunocompetent cells of mice, particular macrophages, most sensitive to apoptosis. It is possible that high apoptogenic activity of AKDC leads to development of postvaccinal immunodeficit.

### Key words

Apoptosis, immunogenes of pertussis, postvaccinal immunodeficit

Апоптоз — генетически запрограммированная смерть клетки, деликатный способ уйти из жизни, при котором клетка аккуратно разбирает саму себя на составляющие молекулы, используя другие клетки того же организма. По контрасту с изящной стройностью системы апоптоза некроз представляется хаосом, и все еще трудно разобраться в том, существуют ли какие-то законы, управляющие этой незапрограммированной смертью. Апоптоз, наоборот,

характеризуется контролируемым и упорядоченным саморазрушением клетки [4].

В многоклеточных организмах гомеостаз поддерживается посредством баланса между клеточной пролиферацией и клеточной смертью. Регуляция клеточной смерти сложна также, как и регуляция клеточной пролиферации. Апоптоз может быть запущен большим количеством внешних и внутренних сигналов [3, 6, 7].

Стало ясно, что с позиции апоптоза можно объяснить развитие многих заболеваний человека, в том числе инфекционных. Большинство патогенных микроорганизмов выработали совершенные механизмы, управляющие гибелью клеток [10]. Для внеклеточных микроорганизмов, к которым относится *Bordetella pertussis*, активация апоптоза является необходимым этапом вызванного ими инфекционного процесса. Индукция апоптоза макрофагов защищает бактерии от фагоцитоза, способствуя их выживанию [2].

В последние годы развитие поствакцинальных реакций также все чаще связывают с нарушениями процесса программированной клеточной гибели иммунокомпетентных клеток (ИКК). Появился термин поствакцинальный апоптотический иммунодефицит (ИД) [8].

В связи с вышеизложенным понимание роли программированной клеточной смерти, ее регуляция и иммунокоррекция очень важны, поскольку открывают новые подходы к лечению и профилактике этой инфекции.

Цель настоящего исследования — сравнительная оценка апоптогенной активности *Bordetella pertussis*, коклюшного токсина (КТ) и АКДС-вакцины.

### Материалы и методы

Исследования выполнены на беспородных мышках массой 18-20г и морских свинках массой 250-300г

В работе исследовали :

1. Бактерии *Bordetella pertussis* штамма 345 (коллекция ГИСК им.Тарасевича), выращенные на казеиново-угольном агаре (КУА) в течение 48ч и убитые формалином; содержание убитых коклюшных бактерий 20 млрд.м.т./мл
2. Коклюшный токсин (КТ) из *B.pertussis* (коллекция НИИВС АМН РФ)
3. Адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина (АКДС) (ОАО «Биомед» им. И.И.Мечникова), содержание убитых коклюшных бактерий 20 млрд.м.т./мл

4. Адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС), использованный в качестве контроля (препарата, не содержащего коклюшного компонента) (ОАО «Биомед» им. И.И.Мечникова)

Апоптогенную активность препаратов изучали в разведении 1:10 на модели перитонеальных макрофагов и лимфоцитов селезенки мышей.

Перитонеальные макрофаги (Мф) мышей и морских свинок получали на 5-е сутки после внутрибрюшинного введения им 1 и 5 мл 1% пептона соответственно. Экспериментальным животным промывали брюшную полость средой 199 с гепарином (5 ед/мл), содержащей 20% инактивированной сыворотки крови крупного рогатого скота. Обычно Мф составляли не менее 95% клеток (концентрацию клеток определяли подсчетом в камере Горяева) Жизнеспособность определяли в пробе с трипановым синим (процент жизнеспособных клеток составлял не менее  $94 \pm 1$ ).

Лимфоциты (Лф) селезенки экспериментальных животных получали на холоду путем мягкой деструкции селезенки в гомогенизаторе типа Даунса в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 10мМ HEPES,  $510^{-5}$  М 2-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл бензилпенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки дважды отмывали, центрифугировали при 800-1000об/мин в сыворотке крови человека. Концентрацию клеток определяли подсчетом в камере Горяева, а жизнеспособность оценивали по окрашиванию трипановым синим (процент жизнеспособных клеток составлял не менее  $94 \pm 1$ ).

По 1 мл получаемых таким способом эксудатов соединяли *in vitro* с 0,1 мл коклюшных препаратов, разведенных 1:10, и содержащих соответственно  $2 \times 10^8$  м.т./мл для АКДС и взвеси *B.pertussis* и 0,5 мкг для КТ с последующей инкубацией при температуре 37°C и приготовлением микропрепаратов.

Апоптоз оценивали по морфологическим изменениям при окраске по Май-Грюнвальду с дополнительным докрасиванием по Романовскому-Гимзе по морфологическим изменениям и уменьшению размеров, четко очерченной мембране с выпячиванием, фрагментации ядра. Дополнительно гибель клеток по механизму апоптоза была подтверждена с помощью цитофлюориметрического анализа окрашенных пропидиумом иодида (Sigma) клеток на точном цитофлюориметре (Coulter): учитыва-

ли процент клеток с гиподиплоидной ДНК, которые сосредотачивались в гиподиплоидной зоне гистограммы в виде фракции, расположенной левее основного пика, соответствующего диплоидным клеткам.

Статистическую обработку материала проводили с помощью таблиц для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала Р.Б.Стрелкова [10]. Определяли значения доверительных интервалов (L) для среднего арифметического (M) при уровне достоверности (P) 99%.

### Результаты исследования

Изучение апоптогенной активности препаратов на модели макрофагов.

Сравнительная оценка апоптогенной активности изученных препаратов в отношении Мф мышей показала, что по своей активности КП располагаются в следующем порядке: КТ, АКДС, В.pertussis. Адсорбированный дифтерийно-столбнячный анатоксин (АДС) существенно уступает им (в 2 - 3 раза) по своей активности. Аналогичная закономерность была получена нами в отношении Мф морских свинок. Однако апоптогенная активность препаратов была несколько ниже (табл.1).

Изучение апоптогенной активности препаратов на модели лимфоцитов.

Сравнительная оценка апоптогенной активности изученных препаратов в отношении Лф как мышей, так и морских свинок выявила закономерность, аналогичную установленной в отношении Мф. Но апоптогенный эффект КП в отношении Лф был несколько ниже, чем для Мф.(табл.2).

Учитывая, что в последние годы развитие поствакцинальных реакций все чаще связывают с апоптозом [2, 3], понимание роли программированной клеточной смерти в пато- и иммуногенезе коклюша очень важны, так как открывают новые подходы к лечению и профилактике этой инфекции.

Проведенные нами исследования показали, что все изученные коклюшные препараты обладают апоптогенной активностью в отношении макрофагов и лимфоцитов как мышей, так и морских свинок, причем указанные клетки мышей более чувствительны к апоптогенному эффекту КП, чем эти же клетки морских свинок. По своей апоптогенной активности изученные КП располагаются в следующем порядке: КТ, АКДС, В.pertussis; при этом дифтерийно-столбнячный анатоксин существенно уступает коклюшным препаратам по своей апоптогенной активности. АКДС-вакцина, используемая для плановой профилактики коклюша, обладает достаточно выраженной апоптогенной актив-

**Таблица 1. Апоптогенная активность препаратов в отношении макрофагов мышей и морских свинок**

Препараты	% макрофагов, поврежденных в результате апоптоза	
	у мышей	у морских свинок
АКДС	26 ± 0,9	19 ± 0,5
В.pertussis	22 ± 1,2	16 ± 0,4
КТ	29 ± 1,1	22 ± 0,8
АДС	9 ± 0,7	6 ± 0,2
Контроль	3 ± 0,2	4 ± 0,5

**Таблица 2. Апоптогенная активность препаратов в отношении лимфоцитов мышей и морских свинок**

Препараты	% лимфоцитов, поврежденных в результате апоптоза	
	у мышей	у морских свинок
АКДС	21 ± 1,1	17 ± 0,9
В.pertussis	17 ± 0,7	14 ± 1,2
КТ	25 ± 1,4	20 ± 1,3
АДС	11 ± 0,9	8 ± 0,4
Контроль Лф	4 ± 0,3	3 ± 0,5

ностью в отношении иммунокомпетентных клеток, обусловленной, по всей видимости, наличием в ней КТ — наиболее активного, по нашим данным, индуктора апоптоза. Высокий уровень апоптоза может приводить к формированию поствакцинального ИД, который, хотя и носит транзиторный характер, может приводить к нарушениям формирова-

ния клеток памяти и снижению эффективности вакцинации.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о необходимости совершенствования вакцины против коклюша с целью снижения ее апоптогенного эффекта или проведения в поствакцинальном периоде соответствующей иммунокоррекции.

## Литература

1. Владимирская Е.Б. Механизмы апоптоза клеток крови. Лаб.медицина.. 2001; №4: 47-54.
2. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Абаджиди М.А. Апоптоз: начало будущего. Журн.микробиол. 1997; №2: 88-94
3. Ярилин А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме. Патол.физиол.эксперим.терапия. 1998; №2: 38-48
4. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Brit.J.Cancer. 1972; Vol.26: 239-257
5. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997; Vol.88: 355-365
6. Jacobson M.D., Weit M., Raff M.C. Programmed cell death in animal development Cell. 1997; Vol.88: 347-354
7. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995; Vol.267: 1456-1462
8. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Апоптогенные механизмы возникновения иммунодефицитных заболеваний. Журн.-микробиол.эпидемиол.и иммунобиол. 1999; №5: 47-52
9. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Новые иммунопатогенетические взгляды: апоптотические иммунодефициты. Аллергология и иммунология. 2000; Том 1, №1: 24-3
10. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального клинического материала.- Обнинск. 1980

## Сведения об авторах:

Тюкавкина Светлана Юрьевна. 344082, г. Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, д. 8, кв. 92.  
тел. 8(863)240-84-50, 89044447721

Поступила 19.06.2012 г.