



**И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, Н.Р. Телесманич, Г.И. Васильева,
Е.П. Дорошенко, И.А. Беспалова, А.К. Киселева, А.В. Филлипенко,
Л.В. Судьина, Б.Н. Мишанькин**

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННОГО АНТИГЕНАМИ *VIBRIO CHOLERAЕ*, В ФОРМИРОВАНИИ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО КОРРЕКЦИИ

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Горького, 117. E-mail: plague@aaanet.ru*

Цель: Изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного микробными клетками *Vibrio cholerae* и холерным токсином, в формировании поствакцинального апоптотического иммунодефицита, а также возможности его коррекции иммуномодулятором имунофаном.

Материалы и методы: Апоптоз оценивали по морфологическим изменениям клеток в окрашенных гистологически красителями препаратах, а также методом проточной цитофлуориметрии с окраской пропидиумом иодида на цитофлуориметре «Navios™».

Результаты: Установлено, что возбудитель холеры и его холерный токсин обладают апоптогенной активностью в отношении мышиных Т-лимфоцитов. Выявлено, что в апоптоз вовлекаются преимущественно CD4⁺ Т-клетки. Показана роль программированной клеточной гибели иммунокомпетентных клеток в формировании поствакцинального иммунодефицита при холере. Предложен препарат для иммунокоррекции этих изменений.

Заключение: Результаты свидетельствуют о целесообразности использования имунофана при вакцинации против холеры и открывают новые перспективы совершенствования профилактики этой инфекции

Ключевые слова: антигены холерного вибриона, лимфоциты, апоптоз, иммунодефицит, иммуномодулятор имунофан.

**I.A. Ivanova, N.D. Omelchenko, N.R. Telesmanich, G.I. Vasilyeva,
Ye.P. Doroshenko, I.A. Bepalova, A.K. Kiselyova, A.V. Filippenko,
L.V. Sudyina, B.N. Mishankin**

THE STUDY OF LYMPHOCYTE APOPTOSIS INDUCED BY *VIBRIO CHOLERAЕ* ANTIGENS IN THE FORMATION OF IMMUNODEFICIENCY AND THE POSSIBILITY OF ITS CORRECTION

*Rostov Institute for Plague Control
117 Gorky st., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru*

Purpose: To study the role of lymphocyte apoptosis induced by *Vibrio cholerae* microbial cells and cholera toxin in the formation of the postvaccinal apoptotic immunodeficiency, as well as the possibility of its correction with the use of immunomodulator imunofan.

Materials and methods: The apoptosis has been evaluated on the base of characteristic morphological changes of cells in preparations stained by histological stains, as well as by the method of flow cytofluorometry with propidium iodide staining on the cytofluorometer «Navios™».

Results: It has been found that the etiological agent of cholera and its cholera toxin possess the apoptogenic activity towards murine T-lymphocytes. It has been shown that CD4⁺ T-cells are preferentially involved in the apoptosis. The role of scheduled cell death of immunocompetent cells in the formation of postvaccinal immunodeficiency in case of cholera is demonstrated. The preparation for immunocorrection of these changes is proposed.

Summary: These findings confirm the usefulness of immunomodulator imunofan in vaccination against cholera and also open new perspectives for the improvement of cholera infection prophylaxis.

Key word: *Vibrio cholerae* antigens, lymphocytes, apoptosis, immunodeficiency, imunophan immunomodulator.



Введение

Неэффективность специфической профилактики холеры существующими вакцинами исследователи объясняют формированием кратковременного иммунитета с невыраженной иммунологической памятью, а также возможностью развития вторичных поствакцинальных иммунодефицитов (ИД) [1], возникновение которых, в свою очередь, все чаще связывают с нарушениями процесса программированной клеточной гибели иммунокомпетентных клеток (ИКК). Появился даже термин апоптотический ИД [2].

В настоящее время идёт активный поиск фармакологических препаратов, регулирующих процесс программированной клеточной смерти: усиливающих его при лечении аутоиммунных, онкологических и нейротропных заболеваний или ингибирующих его при ИД, особенно апоптогенных.

Целью настоящего исследования явилось изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного микробными клетками (м.к.) *Vibrio cholerae* и холерным токсином (ХТ), в формировании вторичного транзитного поствакцинального ИД, а также возможности его коррекции с помощью иммуномодулятора имунофана.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы беспородные белые мыши весом 16 – 20 г в возрасте 6-10 недель. Пероральную иммунизацию животных проводили с помощью хирургических игл с насаженными на них полиэтиленовыми оливодами. Мышей иммунизировали культурой *V. cholerae* 1129 (2,5-5x10⁷ м.к.), выращенной при 37° С в течение 24 час на агаре Мартена (рН 7,6-7,8), и ХТ (2,5 мкг).

ХТ выделяли по методу Qu et al. [3] из штамма *V. cholerae* 569В. Очистку токсина проводили гelfильтрацией через ультрагель А-4 (Pharmacia, Швеция) и хроматографией на ДЕ-52- и фосфоцеллюлозе (Whatman, Англия). Фракции, дававшие преципитацию с антитоксической сывороткой, анализировали на чистоту в электрофорезе в ПААГ.

Спленциты выделяли путем мягкой деструкции селезенки на холоду в гомогенизаторе типа Даунса в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 10мМ HEPES, 5·10⁻⁵ М 2-меркаптоэтанол, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки дважды отмывали, центрифугировали при 800-1000 об/мин в течение 7-10 мин и суспендировали в среде с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Difco Lab., США). Далее суспензию спленцитов разделяли на фракции Т- и В-лимфоцитов (Лф) в чашках Петри (Медполимер, Санкт-Петербург) диаметром 90 мм с помощью коммерческой сыворотки кролика против иммуноглобулинов мыши (Calbiochem), удаляя таким образом В-клетки. Т-Лф получали осторожным трехкратным смыванием культуральной средой или раствором Хэнкса. Количество полученных клеток и их жизнеспособность в тесте с трипановым синим оценивали в клеточном анализаторе «Countess™».

Определение популяционного и субпопуляционного состава Лф осуществляли прямым иммунофлуоресцентным методом кроличьими антимышиными моноклональными антителами, мечеными флуоресцеином, к мембранным маркерам CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺. Подсчитывали процент светящихся клеток на 100 лимфоцитов.

Постановку реакции бласттрансформации Лф (РБТЛ)

осуществляли в микромодификации по Хоробрых В.В. с соавт. [4].

Апоптогенную активность препаратов оценивали окрашиванием по Май-Грюнвальду [5] с дополнительным окрашиванием по Романовскому-Гимза и методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре «Navios™». Для проточной цитофлуориметрии активированные мононуклеары, фиксированные 70% спиртом в течение 1 часа и отмытые, окрашивали на ДНК в течение 15 мин 0,5% раствором пропидиума иодида (Sigma) на забуференном фосфатом физиологическом растворе (рН 7,4), содержащем 0,1% тритона X100 и 0,1% цитрата натрия. Определяли процент клеток, содержащихся в гиподиплоидной зоне гистограммы (она выявляется в виде фракции, расположенной левее основного пика, соответствующего диплоидным клеткам), в которой сосредотачиваются клетки, подвергшиеся апоптозу [6].

Иммунокоррекцию проводили фармпрепаратом имунофаном, который вводили белым мышам подкожно по 0,2 мл 0,0005% раствора одновременно с пероральной иммунизацией. Контролем служили иммунизированные мыши, не получавшие имунофан, а также интактные животные. У всех мышей проводили мониторинг апоптотических изменений в Т-Лф селезенки. Оценку относительного содержания апоптотических клеток осуществляли на 3, 7, 14, 21, 28 сутки после иммунизации.

Статистический анализ материалов осуществляли с помощью таблиц для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала [7]. Определяли значения доверительных интервалов (L), среднеарифметического (M) и средней ошибки (m) для уровня достоверности (P) 95%.

Результаты исследования

Изучение влияния антигенов *V. cholerae* на пролиферативную активность Лф селезенки выявило, что у мышей, независимо от того, каким препаратом они были иммунизированы, индексы стимуляции (ИС) пролиферации Лф в ответ на специфические Т- и В-митогены - конканавалин А и м.к. *Francisella tularensis* - были на уровне этих препаратов, что свидетельствует об отсутствии нарушений пролиферативных процессов у спленцитов иммунизированных животных.

При исследовании популяционного и субпопуляционного состава Лф селезенки у иммунизированных м.к. и ХТ мышей выяснилось, что количество CD3⁺Т-Лф и В-Лф во все сроки исследования оставалось на уровне контроля. Однако наблюдалось статистически достоверное изменение количественного состава субпопуляций Т-Лф, особенно при введении ХТ: снижение числа CD4⁺Т-Лф и повышение численности CD8⁺Т клеток, начиная с 14 дня до 28 суток после иммунизации (табл.1). Такое неадекватное перераспределение субпопуляций Т-Лф привело, в свою очередь, к снижению (ниже нормы) иммунорегуляторного индекса (ИРИ), важного иммунологического показателя, представляющего собой соотношение CD4⁺/CD8⁺Лф.

Морфологический анализ полученных результатов показал, что большинство погибших CD4⁺клеток при обработке по Май-Грюнвальду с дополнительным окрашиванием по Романовскому-Гимза имело морфологические изменения, характерные для апоптоза: уменьшение размеров, четко очерченную мембрану с выпячиванием, фрагментацию ядра, лишь небольшая часть погибших клеток имела признаки некротической гибели – разбухшие диффузно-окрашенные клетки без видимой мембраны.



Таблица 1.

Влияние антигенов холерного вибриона и иммуномодулятора имунофана на относительное содержание субпопуляций Т-лимфоцитов селезенки в процессе формирования противохолерного иммунитета

Показатели	Срок после иммунизации (сутки)	Животные, иммунизированные:			
		м.к.* V. cholerae	м.к. V. cholerae +имунофан	ХТ**	ХТ+имунофан
		Количество клеток, %			
CD4 ⁺	3	34,1±1,3	34,5±0,9	32,1±1,5	33,8±0,6
	7	33,2±1,3	34,8±1,2	31,4±1,5	34,4±1,0
	14	30,0±0,8	34,1±1,0	30,0±1,3	34,6±0,8
	21	30,2±1,1	35,0±0,6	28,1±1,7	35,0±0,7
	28	31,1±0,8	35,4±1,5	29,4±1,7	35,6±1,0
Контроль		34,3±0,8			
CD8 ⁺	3	23,3±1,3	22,3±1,2	23,1±1,5	22,1±1,0
	7	23,2±1,3	22,4±1,0	23,3±1,7	22,0±1,0
	14	27,6±1,5	22,5±0,9	28,2±1,7	22,3±1,1
	21	26,3±1,4	21,0±1,3	30,0±1,5	21,6±0,9
	28	25,7±1,3	20,3±0,7	29,3±1,5	21,0±1,0
Контроль		21,8±1,6			

Примечание: * - микробные клетки
 ** - холерный токсин

Гибель большинства клеток по механизму апоптоза была подтверждена с помощью цитофлуориметрического анализа окрашенных пропидиумом иодида клеток на проточном цитофлуориметре. Клетки, подвергшиеся апоптозу, сосредоточивались в гиподиплоидной зоне гистограммы (в виде фракции, расположенной левее основного пика, соответствующего диплоидным клеткам).

Анализ влияния иммунизации антигенами холерного вибриона на количественное содержание Лф в состоянии апоптоза выявил, что формирование противохолерного иммунитета (во все сроки наблюдения) сопровождается нарушением процесса программированной клеточной

гибели, выражающемся в увеличении процента апоптотических Т-клеток, особенно при введении ХТ (табл.2).

Изучение возможности коррекции выявленных нарушений с помощью иммуномодулятора имунофана показало, что во все сроки исследования, независимо от иммунизирующего препарата, у животных, получавших имунофан, не наблюдалось негативного перераспределения субпопуляций CD4⁺/CD8⁺, значения CD4⁺Т-Лф и CD8⁺Т-Лф оставались на уровне контроля во все сроки наблюдения (табл. 1). Процент клеток в состоянии апоптоза также был на уровне показателей интактных контрольных мышей (табл. 2).

Таблица 2.

Влияние антигенов холерного вибриона и иммуномодулятора имунофана на апоптоз лимфоцитов селезенки в процессе формирования противохолерного иммунитета

Клетки в состоянии апоптоза:	Срок после иммунизации (сутки)	Животные, иммунизированные:			
		м.к.* V. cholerae	м.к. V. cholerae +имунофан	ХТ**	ХТ+имунофан
процент от общего числа Лф***	3	10±0,4	8±0,4	13±0,6	8±1,0
	7	15±0,2	8±0,4	18±0,8	8±0,8
	14	19±1,0	8±0,8	22±1,2	8±0,6
	21	20±0,9	7±0,6	28±1,0	8±0,8
	28	21±1,2	7±0,9	27±1,0	7±1,0
Контроль		8±0,8			
процент от числа поврежденных Лф	3	58±1,6	54±1,8	61±1,3	53±1,4
	7	60±1,8	53±1,4	78±1,2	54±1,6
	14	74±1,4	53±1,6	84±1,4	53±1,2
	21	83±1,8	52±1,8	90±1,2	52±1,8
	28	85±2,0	49±1,5	91±2,0	50±1,5
Контроль		52±1,5			

Примечание: * - микробные клетки
 ** - холерный токсин
 *** - лимфоциты



Обсуждение

Сохранение пролиферативной активности Лф в антигенспецифической РБТЛ, а также при взаимодействии с митогенами и гетерологичными антигенами на фоне уменьшения их численности навело нас на мысль о том, что мы имеем дело с феноменом, получившим название AICD – (activation induced cell death) – «смерть клетки, спровоцированная активацией», то есть «активация» - негативный процесс [8]. Он характерен, в частности, для суперантигенов, к которым относится ХТ. Суперантигены индуцируют апоптоз активированных ими Т-Лф, вызывая гибель пролиферирующих клеток, что приводит к делеции распознающих их клонов Т-Лф и ИД. По-видимому, именно такие негативные последствия активации ИКК (апоптоз) наблюдались под влиянием м.к. *V. cholerae* и ХТ.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют об участии апоптоза, индуцированного м.к. и ХТ холерного вибриона, в гибели Лф, а, следовательно, в уменьшении их численности, в частности CD4⁺T клеток. На наш взгляд, преобладание активационного апоптоза CD4⁺Лф по сравнению с CD8⁺, а, следовательно, и снижение ИРИ, наблюдаемые в период инициации иммунного

ответа на антигены холерного вибриона, приводят к неадекватности его формирования и развитию апоптотического ИД. Коррекция таких изменений возможна с помощью препаратов, блокирующих развитие апоптоза, а также активирующих защиту от него. Таким препаратом является иммуномодулятор имунофан, синтетический пептид нового поколения, в 1000 раз превосходящий по своей активности пептидные комплексы тимуса [9]. Он оказывает блокирующее действие на апоптоз, индуцирует конститутивные факторы защиты от него [10] и широко используется при иммунодефицитных состояниях. Иммунокорректирующее восстановление нарушенных показателей иммунитета под влиянием имунофана проявляется на 3 -7 сутки и продолжается 4-6 месяцев.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования иммуномодулятора имунофана в качестве потенциального корректора апоптотических изменений в ИКК, вызванных антигенами холерного вибриона и приводящих к формированию вторичного транзиторного поствакцинального иммунодефицита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимова К.И., Ледванов М.Ю. Вторичные иммунодефицитные состояния – возможная реакция организма человека на введение чумной и холерной вакцины. Поствакцинальные осложнения: патогенез, профилактика, лечение //Матер. Всесоюз. науч.-практ. конф. – Л., 1991. – С. 17.
2. Ковальчук Л.В., Чередеев А.Н. Новые иммунопатогенетические взгляды: апоптотические иммунодефициты //Аллергология и иммунология. – 2000. – Том 1, № 1. – С. 24-30.
3. Qu Z.-H. Boesman, Finkelstein R.A. Urea-induced release of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* //J. Clin. Microbiol. – 1991. – Vol.29. – P.773-777.
4. Хоробрых В.В., Понин А.В., Киркин А.Ф., Санин А.В. Методы постановки реакции бласттрансформации в микромодификации //Иммунология. – 1983. - № 3. – С. 76-79.
5. Смирнова Л.Г., Кост Е.А. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям. – М.: Медгиз, 1960. – С. 31-32 (963 с.).
6. McConkey D., Aguilar-Santelises M., Zell P. et al. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells //J. Immunol.- 1991. – Vol. 146. – P. 1072.
7. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. – Обнинск, 1980. – 15 с.
8. Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В. Апоптоз как важный этап оценки иммунной системы по патогенетическому принципу //Клин. лаб. диагност. – 1997. - № 7. – С. 31-35.
9. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств //Под ред. Вышковского Г.Л. – М., 2006. – 446 с.
10. Korsmeyer S. Regulators of cell death //Trends Genet. – 1995.- Vol.11. – P. 101-105.

ПОСТУПИЛА: 13.02.2013