

Е.А.Смолькова, Т.Н.Щуковская, А.Л.Кравцов, Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, А.К.Никифоров

## ДНК-ЦИТОМЕТРИЯ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК БИОМОДЕЛЕЙ В УСЛОВИЯХ ИММУНИЗАЦИИ ПРЕПАРАТАМИ С-КОМПЛЕКСА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗЛИЧНЫХ ПОДВИДОВ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В динамике на модели аутбредных белых мышей изучено влияние препаратов С-комплекса туляремиального микроба, выделенного из вакцинного штамма 15 НИИЭГ, относящегося к голарктическому подвиду, вирулентного штамма 503 этого же подvida, штамма Acole неарктического подvida и штамма A179 подvida *mediasiatica* на апоптоз и пролиферативную активность клеток центрального (тимус) и периферического (селезенка) органов иммунной системы. Установлено существование различий в соотношении клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, в разные сроки после иммунизации исследуемыми препаратами, что может быть связано с их структурой в зависимости от источника получения. Показано отсутствие повреждающего действия всех препаратов на генетический аппарат иммунокомпетентных клеток белых мышей. Перспективно использование данного антигенного комплекса при конструировании химических вакцин нового поколения.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, антигены, иммунокомпетентные клетки, цитометрия.

Существование эндемичных очагов туляремии на территории Российской Федерации и сопредельных государств, а также формирование их в ранее неэндемичных районах определяют актуальность вакцинопрофилактики данного заболевания [3].

В России для этой цели среди населения эндемичных и энзоотических территорий, по эпидпоказаниям, применяется лицензированная живая вакцина отечественного производства на основе штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. За рубежом лицензированная туляремиальная вакцина отсутствует. В США разрабатывается живая туляремиальная вакцина на основе штамма LVS, которая находится на этапе доклинических испытаний [2].

Однако применение живых вакцин для специфической профилактики туляремии имеет определенные ограничения:

- накожный метод вакцинации, в результате которого достаточно сложно стандартизировать дозу вакцины, а также наличие риска контаминации бактериальными и вирусными инфекциями при scarification кожных покровов;

- высокая реактогенность вакцины;

- существование пробела в расшифровке факторов, ответственных за вирулентность и генетическую стабильность *F. tularensis*;

- отсутствие полных знаний о молекулярных механизмах формирования иммунитета к туляремии.

В связи с этим стратегия создания нового поколения вакцин, в том числе туляремиальной, включает использование таких иммуногенов *F. tularensis*, как липополисахарид (ЛПС) и белки поверхностного слоя, в качестве потенциальных компонентов вакцинирующих препаратов. Эти компоненты могут быть выделены как непосредственно из микроорганизма, так и с применением рекомбинантных технологий. Так, ген, кодирующий мембранный белок *F. tularensis* – липопротейн массой 17 кДа, был клонирован в *Salmonella typhi murium*. В результате иммунизации

мышей этим рекомбинантным штаммом наблюдалось формирование напряженного противотуляремиального иммунитета [6].

С-комплекс туляремиального микроба, включающий ЛПС и белки наружной мембраны возбудителя, рассматривается как перспективный компонент разрабатываемых средств специфической профилактики туляремии. Установлено, что препарат С-комплекса, выделенный из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, обладает протективностью для белых мышей при заражении штаммами голарктического и неарктического подвидов, а также характеризуется отсутствием токсичности, пирогенности и повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки лабораторных животных [1].

Одним из показателей, позволяющих оценить влияние какого-либо препарата на иммунную систему, является соотношение количества клеток иммунной системы, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, в том числе на стадии апоптоза, которая характеризует повреждающее действие препарата. Активацию иммунокомпетентных клеток отражает их число в стадии пролиферации. Кроме того, имеет значение баланс количества клеток, находящихся в стадии апоптоза и пролиферации [4].

Сведения о влиянии на апоптоз и пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток С-комплексов туляремиального микроба других подвидов отсутствуют.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния С-комплексов туляремиального микроба различных подвидов на апоптоз и пролиферативную активность клеток органов центральной и периферической иммунной системы.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на аутбредных белых мышках массой 18–20 г. Животные были разделены на

4 группы, каждая из которых была иммунизирована однократно подкожно одним из 4 С-комплексов туляремиального микроба: первая группа – С-комплексом, выделенным из вакцинного штамма 15 НИИЭГ (С-15), относящегося к голарктическому подвиду, вторая – С-комплексом из вирулентного штамма 503 этого же подвида (С-503), третья – С-комплексом из штамма Acole неарктического подвида (С-Acole), четвертая – С-комплексом штамма A179 подвида *mediasiatica* (С-A179). Группу контроля составили интактные животные.

Тимоциты и спленоциты получали на 1, 7, 14-е и 21-е сутки иммуногенеза общепринятыми методами. Содержание ДНК для дифференцирования диплоидных, пролиферирующих и апоптотических клеток определяли на импульсном проточном цитофлюориметре ICP-22 PHUYE. Для этого предварительно фиксированные охлажденным 70 % этанолом клетки обрабатывали бромидом этидия и митрамицином по методу Barlogie *et al.* [5]. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Microsoft Excel».

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено достоверное снижение на 1-е сутки иммуногенеза количества спленоцитов в стадии апоптоза при иммунизации С-15 и С-Acole, и повышение его при иммунизации С-A179. Количество пролиферирующих клеток на 1-е сутки было достоверно выше у животных, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179. При этом увеличение числа пролиферирующих клеток при иммунизации С-15 и С-503 происходило за счет увеличения количества клеток в стадии митоза, а при иммунизации С-A179 – за счет клеток в стадии синтеза и митоза.

На 7-е сутки иммуногенеза количество спленоцитов в стадии апоптоза регистрировалось на уровне, или достоверно ниже (С-503) контрольных значений (рис. 1). Число пролиферирующих спленоцитов при иммунизации всеми препаратами, кроме С-503, отмечалось на уровне значений группы контроля, а при иммунизации С-503 было достоверно выше, чем в контрольной группе. При этом уровень клеток

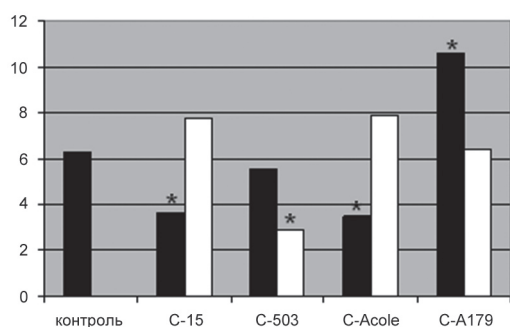


Рис. 1. Спленоциты в стадии апоптоза на 1-е и 7-е сутки иммуногенеза:

■ – 1-е сутки; □ – 7-е сутки; \* – различия достоверны

в стадии митоза оставался достоверно повышен по сравнению с контролем и соответствовал значениям 1-х суток иммуногенеза у белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179. При иммунизации С-503 также отмечалось снижение количества клеток в стадии синтеза.

На 14-е сутки иммуногенеза отмечалось достоверное снижение уровня апоптотических клеток при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса туляремиального микроба по сравнению с контрольными значениями. Количество пролиферирующих клеток регистрировалось на уровне контрольных показателей.

К 21-м суткам иммуногенеза число спленоцитов в стадии апоптоза и пролиферации сохранялось на прежнем уровне. Отмечалось достоверное увеличение числа диплоидных клеток при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса. Количество клеток в стадии синтеза и митоза соответствовало контрольным значениям.

Как на 1-е, так и на 7-е сутки иммуногенеза регистрируемое количество тимоцитов в стадии апоптоза при иммунизации С-A179 было достоверно выше контрольных значений. Количество пролиферирующих тимоцитов на 1-е сутки иммуногенеза достоверно снижалось при иммунизации С-503 и С-A179 за счет уменьшения количества клеток в стадии митоза.

На 7-е сутки отмечалось снижение количества пролиферирующих тимоцитов при иммунизации всеми четырьмя препаратами С-комплекса туляремиального микроба в сравнении с контролем (рис. 2), так же за счет уменьшения количества тимоцитов в митозе, хотя при иммунизации С-A179 отмечалось достоверное по сравнению с контрольными показателями увеличение количества тимоцитов в стадии синтеза. У белых мышей, иммунизированных С-Acole, на 7-е сутки иммуногенеза, в сравнении с 1-ми, отмечалось снижение уровня тимоцитов в стадии пролиферации за счет уменьшения количества клеток в митозе и увеличение числа диплоидных клеток.

На 14-е сутки иммуногенеза регистрировалось достоверное снижение в 2 раза количества тимоцитов в стадии апоптоза у белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-A179, по сравнению с контролем. Снижение количества тимоцитов в ста-

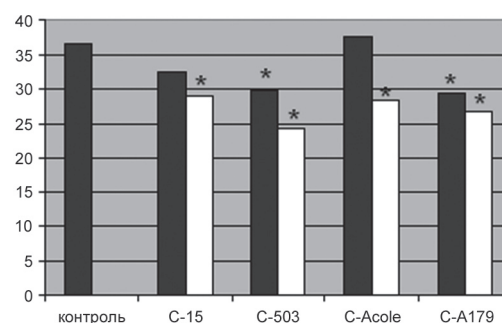


Рис. 2. Тимоциты в стадии пролиферации на 1-е и 7-е сутки иммуногенеза:

■ – 1-е сутки; □ – 7-е сутки; \* – различия достоверны

дии апоптоза у белых мышей, иммунизированных С-Аcole, было также двукратным, но недостоверным по сравнению с контрольными показателями. Однако в сравнении со значениями 7-х суток иммуногенеза, регистрировалось достоверное снижение уровня апоптотических тимоцитов, а также увеличение количества пролиферирующих тимоцитов за счет повышения уровня клеток в стадии митоза. У белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-А179, снижалось по сравнению с контролем количество пролиферирующих тимоцитов во всех случаях за счет уменьшения числа клеток в стадии митоза. У биомоделей, иммунизированных перечисленными препаратами, также возрастало количество диплоидных клеток.

К 21-м суткам после иммунизации описанные изменения сохранялись для тимоцитов белых мышей, иммунизированных С-15, С-503 и С-А179, и регистрировались у иммунизированных С-Аcole в сравнении как с контрольными показателями, так и со значениями, отмечавшимися на 14-е сутки иммуногенеза. В то же время коэффициент отношения апоптотических клеток к пролиферирующим во всех случаях был меньше единицы, что свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемых препаратов на иммунокомпетентные клетки.

Таким образом, нами установлено неоднозначное влияние препаратов С-комплекса *F. tularensis* различных подвидов на распределение по клеточному циклу иммунокомпетентных клеток органов центральной и периферической иммунной системы биомоделей в ранние сроки наблюдения, что может быть обусловлено структурными особенностями антигенного комплекса, связанными с источником его получения. Возвращение всех регистрируемых показателей к контрольным значениям в последующие сроки с момента иммунизации (14 и 21-е сутки) свидетельствует об отсутствии повреждающего действия исследуемых препаратов на иммунокомпетентные клетки.

Работа выполнена по государственному контракту № 52-Д/1 от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Шепелев И.А., Фирстова В.В., Храмкова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. и др. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремии микроба, как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:16–21.
2. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофи-

лактики особо опасных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.

3. Топорков В.П., Величко Л.Н., Васенин А.С. Состояние заболеваемости туляремией в Федеральных округах Российской Федерации с 1998 по 2005 год. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):46–8.

4. Щуковская Т.Н., Ключева С.Н., Кравцов А.Л., Козлова Е.А., Кутырев В.В. Модулирующее действие серотонина на развитие апоптоза лейкоцитов крови человека, индуцированного иерсиниями. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 6:43–6.

5. Barlogie B., Spidzer G., Hart G.S., et al. DNA histogram analysis of human haemopoietic cells. Blood. 1976; 2(48):245–58.

6. Sjöstedt A., Sandström G., Tärnvik A. Humoral and Cell-Mediated Immunity in Mice to a 17-Kilodalton Lipoprotein of *Francisella tularensis* Expressed by *Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. 1992; 7(60):2855–62.

E.A.Smol'kova, T.N.Shchukovskaya, A.L.Kravtsov, E.M.Kuznetsova,  
O.A.Volokh, A.K.Nikiforov

#### DNA Cytometry of Immunocompetent Cells of Biomodels under Conditions of Immunization by S-Complex Preparations of Different Tularemia Microbe Subspecies

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The effect of S-complex preparations of tularemia microbe upon apoptosis and proliferative activity of cells of central (thymus) and peripheral (spleen) organs of immune system has been studied in dynamics on the outbred white mice model. S-complex preparations were isolated from vaccine strain 15 NIEG of *holarctica* subspecies, virulent strain 503 of the same subspecies, strain Acole of *nearctica* subspecies and strain A 179 of *mediasiatica* subspecies. The ratio of cells being at different stages of cell cycle was shown to vary in different periods of time after immunization with the studied preparations. That can be associated with the structure of preparations depending on the source they were obtained from. All preparations demonstrated the lack of harmful effect upon genetic apparatus of white mice' immune cells. The application of the present antigenic complex in the construction of chemical vaccines of new generation is thought to be promising.

Key words: *Francisella tularensis*, antigens, immunocompetent cells, cytometry.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Volokh O.A., Shepelev I.A., Firstova V.V., Khramkova E.M., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. et al. [Evaluation of Immunobiological Activity of *Francisella tularensis* C complex preparations as promising component of subunit vaccines]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 3:16–21.
2. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present Status of the Researches in the Sphere of Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Bacterial Infections]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 92:18–24.
3. Toporkov V.P., Velichko L.N., Vasenin A.C. [Present Status of Tularemia Morbidity in the Federal Districts of the Russian Federation from 1998 to 2005]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 93:46–8.
4. Shchukovskaya T.N., Klyueva S.N., Kravtsov A.L., Kozlova E.A., Kutyrev V.V. [Modulating Effect of Serotonin on the Development of Human Leukocytes Apoptosis Induced by *Yersinia*]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 6:43–6.

#### Authors:

Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Kravtsov A.L., Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

#### Об авторах:

Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Кравцов А.Л., Кузнецова Е.М., Волох О.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 30.11.10.