

Т.П.Шмелькова, С.Н.Клюева, С.А.Бугоркова, А.Л.Кравцов, О.В.Громова, О.А.Волох,  
С.А.Еремин, А.К.Никифоров, Т.Н.Щуковская

## ОЦЕНКА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ O1 И O139 АНТИГЕНОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Проведена оценка иммунобиологических свойств экспериментальных препаратов O-антигена *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп на лабораторных мышах: определение токсичности, анализ морфологических изменений в органах и проточно-цитометрический мониторинг клеточного цикла лейкоцитов, спленцитов и клеток костного мозга. Показано, что в дозе 100 мкг на мышь O-антиген не вызывает значимых повреждений паренхиматозных органов, нарушения баланса апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток. Комплексная оценка иммунобиологических свойств препаратов позволяет получить представление об их влиянии на макроорганизм, возможности дальнейшего изучения и использования в качестве компонентов химической вакцины.

*Ключевые слова:* O1 и O139 антигены холерного вибриона, токсичность, морфологический анализ, апоптоз, пролиферация.

T.P.Shmel'kova, S.N.Klyueva, S.A.Bugorkova, A.L.Kravtsov, O.V.Gromova, O.A.Volokh, S.A.Eremin,  
A.K.Nikiforov, T.N.Shchukovskaya

## Evaluation of Immunobiological Properties of Cholera Vibrio O1 and O139 Antigens

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Evaluated are immunobiological properties of experimental preparation on the basis of *Vibrio cholerae* O-antigen, O1 and O139 serogroups on the mouse model: determination of toxicity, analysis of morphological changes in organs, and flow-cytometric monitoring of cell cycle of leukocytes, splenocytes and bone marrow cells. It is demonstrated that O-antigen 100 µg dose per mouse does not initiate either significant changes in parenchymatous organs, or imbalance of apoptosis and proliferation of immune-competent cells. Comprehensive assessment of immunobiological properties of the preparations allows to get an insight about their effect on macroorganism, possibility for further studies and their application as chemical vaccine components.

*Key words:* cholera vibrio O1 and O139 antigens, toxicity, morphological analysis, apoptosis, proliferation.

Согласно мнению экспертов Независимой группы ООН по расследованию причин вспышки холеры на Гаити в 2011 г. вакцинация – один из наиболее действенных способов предотвращения эпидемий холеры [8]. Разработка безопасных, эффективных, простых в применении и экономичных вакцин нового поколения с использованием современных достижений молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии является приоритетным направлением развития вакцинологии [2, 7]. Особое внимание уделяют исследованиям, направленным на разработку химической вакцины против холеры, вызываемой как *V. cholerae* O1 серогруппы, так и *V. cholerae* O139. Так, по данным ВОЗ, в странах Азии холера, обусловленная *V. cholerae* O139, ежегодно составляет до 30 % и более от общей заболеваемости холерой [3]

O-антиген *V. cholerae* – важный протективный антиген, ответственный за выработку противобактериального иммунитета [1]. Использование O1 и O139 антигенов в качестве компонентов химической вакцины предполагает их тщательное изучение, в первую очередь, с позиции токсичности и безопасности.

Цель работы – оценка иммунобиологических свойств экспериментальных препаратов O-антигена

холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп как компонентов химической вакцины против холеры.

### Материалы и методы

Экспериментальные препараты O-антигена получены из культур *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара серовара Огава (штамм М-41) и эльтор биовара серовара Инаба (штамм М-569), *V. cholerae* O139 серогруппы (штамм М 377/1) с использованием установки по ультрафильтрации на различных мембранных модулях и последующим осаждением сульфатом аммония. Все препараты прошли контроль специфической стерильности. Лиофильно высушенные антигены растворяли в физиологическом растворе и вводили аутбредным и инбредным мышам в дозах 100 или 250 мкг/мышь. В контрольную группу вводили мыши, которым вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Токсичность препаратов оценивали в классическом тесте на смешанном поголовье аутбредных мышей массой 18–20 г по следующим признакам: особенность поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покровов, консистенция фекальных масс, изменению массы тела, уровень смертности. Наблюдение за животными осуществля-

ли ежедневно в течение 7 сут [4]. Морфологическую оценку изменений у мышей на введение О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, а также проточно-цитометрический мониторинг клеточно-го цикла иммунокомпетентных клеток проводили на инбредных мышах линии BALb/c массой 18–20 г на 1-е и 7-е сутки после иммунизации. Для морфологического исследования у декапитированных животных были забраны кусочки внутренних органов (сердца, легких, почки, печени, селезенки, тонкого и толстого кишечника), которые фиксировали в 10 % водном растворе формалина. Приготовленные по стандартной методике [5] полутонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и просматривали на световом микроскопе. Количество клеточных элементов подсчитывали в 10 полях зрения правильно ориентированных срезах органов. При проточно-цитометрическом анализе в качестве показателя безопасности препаратов определяли баланс процессов апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в процессе формирования иммунного ответа посредством распределения лейкоцитов крови, спленоцитов и клеток костного мозга по клеточному циклу с определением коэффициента соотношения апоптотических и пролиферирующих клеток [10]. Клетки в апоптозе идентифицировали как клетки с пониженным содержанием ДНК (<2С), пролиферирующие клетки характеризовались повышенным содержанием ДНК (>2С). Содержание ДНК в клетках соотносили с интенсивностью флуоресценции клеток, выделенных и окрашенных смесью красителей митрамицина и этидиум бромид [8].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. Определяли среднее значение (М), стандартную ошибку (m). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Разница считалась достоверной при значении  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Все препараты О-антигена холерного вибриона О1 и О139 серогрупп не обладали токсичностью в дозе 100 мкг/мышь. При увеличении дозы О-антигена в 2,5 раза мыши, иммунизированные О-антигеном О1 серогруппы серовара Огава или О-антигеном О139 серогруппы, к концу срока наблюдения имели обычное поведение, удовлетворительный внешний вид, не отказывались от пищи, прибавили в весе. Однако первые 2 сут у животных, иммунизированных О-антигеном О1 серогруппы серовара Огава, наблюдали внешние признаки интоксикации – взъерошенный вид, сонливость, снижение массы тела на  $(3,2 \pm 1,7) \%$ . В последующие дни периода наблюдения мыши возвратились к исходному состоянию, отмечалось увеличение массы тела на  $(7,6 \pm 2,6) \%$ . Через 1 сут после иммунизации О-антигеном О1 серогруппы серовара Инаба регистрировалась гибель 4 мышей из 5. Общее состояние оставшейся мыши из

данной группы оставалось в пределах нормы, прибавка в весе в конце эксперимента составила 11 %.

Дальнейшие морфологические и проточно-цитометрические исследования О-антигена холерного вибриона О1 и О139 серогрупп проводили с заведомо нетоксичной дозой для всех препаратов – 100 мкг/мышь.

Выявленные при морфологическом исследовании изменения у мышей, иммунизированных препаратами О-антигена, носили адаптационно-компенсаторный характер и заключались в умеренном полнокровии сосудов внутренних органов, очаговом функциональном напряжении отдельных паренхимных элементов на фоне относительной активации звездчатых ретикулоэндотелиальных клеток в печени (клеток Купфера), различной степени выраженности гиперпластических процессов в селезенке и отсутствии альтеративно-экссудативных реакций в кишечнике. При этом установлены некоторые колебания описываемых адаптационно-компенсаторных процессов у животных в ответ на введение препаратов О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп. Так, на введение О139 антигена были отмечены компенсированные гемодинамические нарушения и очаговые дистрофические изменения эпителия извитых канальцев почек и признаки функционального напряжения гепатоцитов, сохраняющиеся до 7-х суток наблюдения, более выраженные гиперпластические процессы в селезенке регистрировались при введении О-антигена холерных вибрионов О1 серогруппы сероваров Инаба и Огава. Сравнивая реакцию клеток эффекторной зоны иммунной системы кишечника: клеток собственной пластинки слизистой (СПС) и межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), отмечали умеренную лимфогистиоцитарную инфильтрацию и появление зрелых плазматических клеток в СПС тонкого кишечника всех иммунизированных мышей, но при введении О-антигена холерного вибриона О139 серогруппы регистрировали в этой зоне еще и незначительное увеличение количества лейкоцитов и эозинофилов. Активация МЭЛ в тонком кишечнике животных была достоверной в ответ на введение О-антигенов холерного вибриона О1 серогруппы. Со стороны клеток Панета – клеток кишечника, обеспечивающих антибактериальную защиту [6], в указанные сроки отмечали на введение О-антигена холерных вибрионов О1 серогруппы сероваров Инаба и Огава умеренное опустошение, в то время как при введении О-антигена холерного вибриона О139 серогруппы регистрировали гипертрофию этих элементов.

Проточно-цитометрический мониторинг распределения лейкоцитов крови, спленоцитов и клеток костного мозга показал, что под влиянием О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп происходило повышение количества клеток пролиферирующих и в апоптозе среди спленоцитов и клеток костного мозга. Наибольшей способностью вызывать изменения в клеточном цикле иммунокомпетентных

Показатели апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток мышей под воздействием О-антигена *V. cholerae* (n=6)

Препараты О-антигена	Лейкоциты крови, %				Спленциты, %				Клетки костного мозга, %			
	апоптоз		пролиферация		апоптоз		пролиферация		апоптоз		пролиферация	
	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут
Инаба	1,8±0,5	1,9±0,7	11,1±2,5	5,9±1,3	6,8±1,1*	5,4±1,3*	17,3±2,3	20,3±2,9*	1,5±0,2*	2,2±0,4	32,2±3,4	26,1±3,5
Огава	2,3±0,6	1,9±0,4	13,1±0,8	4,7±0,4	4,5±1,4	4,5±0,4**	18,6±2,0	20,8±5,4	0,7±0,2	1,1±0,2	34,3±2,0	30,7±1,8
O139	1,8±0,4	1,6±0,2	16,3±0,9	5,5±0,8	3,3±0,8	3,1±0,3*	20,2±2,3	16,6±1,4	0,8±0,2	2,6±0,2**	31,1±1,7	27,4±0,7
Контроль	2,3±1,0	1,9±0,1	13,3±3,0	6,2±0,3	3,7±1,0	1,7±0,5	17,0±2,6	12,7±0,7	1,0±0,1	1,3±0,3	28,1±2,7	27,1±1,2

Примечание. Достоверность различия между опытом и контролем: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ .

клеток обладал О-антиген холерного вибриона O1 серогруппы серовара Инаба. Все зарегистрированные показатели пролиферации и апоптоза (таблица) являются реакцией макроорганизма на введение препарата, обладающего иммунобиологической активностью. В целом, препараты О-антигена холерных вибрионов O1- и O139 серогрупп не вызывали нарушения баланса апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в процессе иммуногенеза (коэффициент соотношения  $< 1$ , т.е. количество клеток в апоптозе не превысило количество пролиферирующих клеток).

Интересно отметить, что О-антиген O1 серогруппы серовара Инаба обладал токсичностью в дозе 250 мкг/мышь и способностью вызывать наибольшие изменения в клеточном цикле спленцитов и клеток костного мозга в нетоксичной для мышей дозе 100 мкг, в отличие от О-антигена O1 серогруппы серовара Огава и O139 антигена. Установление связи между этими событиями требует дальнейших наблюдений.

Таким образом, в дозе 100 мкг/мышь все перечисленные препараты O1 и O139 антигенов холерных вибрионов не обладали токсичностью на уровне макроорганизма, не вызывали значимых изменений во внутренних органах и нарушения баланса процессов апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в условиях данного эксперимента, что может служить обоснованием их дальнейшего изучения и использования в качестве компонентов холерной химической вакцины.

Работа проведена в рамках выполнения Распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426-р от 02.10.2009 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):68–71.
2. Кутырев В.В., Шуковская Т.Н. Холерные вакцины. В кн.: Вакцина и вакцинация: национальное руководство. М.; 2011.

С. 431–45.

3. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире, странах СНГ и России. Прогноз. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):11–3.

4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. МУК 4.1/4.2.588-96. М., 1996.

5. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л., редакторы. Микроскопическая техника. Руководство. М.: Медицина; 1996. 544 с.

6. Шахламов В.А., Солнышкова Т.Г. Ультраструктурный и морфологический анализ реакции клеток Панета на введение холерного токсина. Бюл. эксп. биол. и мед. 1992; 63(4):415.

7. Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. 2009; 2(45):62–7.

8. Barlogie B., Spidzer G., Hart G. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. Blood. 1976; 48(2):245–57.

9. Final Report of the Independent Panel of Experts on the Cholera Outbreak in Haiti. 04 May 2011. Available from: <http://www.un.org/News/dh/infocus/haiti/UN-cholera-report-final>

10. Lotzmanova E.Yu., Kravtsov A.L., Livanova L.F. et al. Flow cytometric monitoring of leukocyte apoptosis in experimental cholera. Proc. SPIE. 2002; 5068:462–6.

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

1. Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. [Recombinant strains application for simultaneous preparation of several purified cholera vibrio antigens]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (100):68–71.
2. Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N. [Cholera vaccines]. In: [Vaccine and Vaccination: National Guidelines]. M.; 2011. P. 431–45.
3. Lomov Yu.M., Moskvitina E.A. [Epidemiologic situation on cholera in the world, CIS countries and Russia. Prognosis]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (104):11–3.
4. [Methods of quality control over immunobiological preparations administered to humans. MR 4.1/4.2.588-96]. M.; 1996.
5. Sarkisova D.S., Perova Yu.L., editors. [Microscopy Equipment: Operating Manual]. M.: Meditsina; 1996. 544 p.
6. Shakhlov V.A., Solnyshkova T.G. [Ultra-structural and morphological analysis of Paneth cell reaction to cholera toxin administration]. Byul. Eksp. Biol. Med. 1992; 63(4):415.
7. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Vaccine prophylaxis of cholera: current state of the issue]. Epidemiol. Vaksino profilakt. 2009; 2(45):62–7.

#### Authors:

Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L., Gromova O.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Nikiforov A.K., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

#### Об авторах:

Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л., Громова О.В., Волох О.А., Еремин С.А., Никифоров А.К., Шуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Поступила 10.01.12.