

П.Ю.Попова, С.А.Бугоркова, Н.И.Микшис, А.П.Семакова, Ю.А.Попов, Т.Н.Щуковская

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ У БИМОДЕЛЕЙ В ОТВЕТ НА ВВЕДЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

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

Проведена оценка изменений в органах и тканях морских свинок в динамике иммуногенеза после однократной подкожной иммунизации протективным антигеном, выделенным из аспорогенного рекомбинантного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻). Объектом гистологического исследования служили кусочки печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи из места введения препарата и органов лимфоидной системы – тимуса, селезенки, регионарных и отдаленных лимфатических узлов. Полутонкие парафиновые срезы исследуемого материала окрашивали раствором гематоксилина и эозина. Установлено, что наблюдаемые в первые 7 сут после иммунизации изменения обусловлены стресс-реакцией организма биомодели на введение препарата, бесследно проходящей в последующие сроки наблюдения. Выявлена функциональная активация клеток ретикулоэндотелиальной системы печени и органов центральной и периферической иммунной системы в форме нарастания гиперпластических процессов в период с 14-х по 27-е сутки, максимум которых приходился на 21-е сутки. Полученные данные подтверждают отсутствие выраженного повреждающего эффекта рекомбинантного протективного антигена на клетки и ткани макроорганизма и возможность его применения в качестве основного компонента химической сибирезвеной вакцины.

Ключевые слова: сибирская язва, вакцина, протективный антиген, морфометрические исследования.

P.Yu.Popova, S.A.Bugorkova, N.I.Mikshis, A.P.Semakova, Yu.A.Popov, T.N.Shchukovskaya

Pathomorphological Changes in Biomodels in Response to Recombinant Protective Anthrax Antigen Inoculation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Investigated have been the changes in organs and tissues of Guinea pigs, registered over immuno-genesis progression, after a single subcutaneous immunization with protective antigen, isolated from asporogenic recombinant *B. anthracis* 55 ΔTPA-1(Spo⁻) strain. Histological examination has been performed using liver, heart, kidney, adrenal, and skin fragments sampled from the site of inoculation, and organs of lymphoid system – thymus, spleen, regional and remote lymph glands. Semi-fine paraffin sections of the material under study have been stained with hematoxylin and eosin solution.

Established is the fact that changes, registered within 7 days after inoculation, are driven by stress-reaction of biomodels organism to the preparation administration, progressing without visible manifestations over the follow-up period of observation. Identified is the functional activation of cells of the liver reticuloendothelial system and organs of central and peripheral immune system by way of hyper-plastic process intensification within the period from 14th to 27th day, with an apex on the 21st one. The data obtained has substantiated the lack of an expressed damaging effect of the recombinant protective antigen on the cells and tissues of the macroorganism, as well as possibility of its application as one of the core components of the chemical anthrax vaccine.

Key words: anthrax, vaccine, protective antigen, morphometric investigations.

Иммунопрофилактика сибирской язвы является ключевым мероприятием, направленным на предупреждение возникновения и распространения инфекции. Основным компонентом существующих и конструируемых вакцин является высокоиммуногенная субъединица токсина *Bacillus anthracis* – протективный антиген [7, 12]. В большинстве зарубежных стран для вакцинации населения, имеющего высокий риск заражения возбудителем сибирской язвы, применяются лицензированные химические препараты. Американская вакцина Biothrax изготавливается из бесклеточного фильтрата бескапсульного токсигенного штамма *B. anthracis* V770-NP1-R. В Российской Федерации иммунизация против сибирской язвы проводится в соответствии с Национальным календарем профилактических прививок с использованием живой аттенуированной сибирезвеной вакцины. Существует также отечественная комбинированная

вакцина, состоящая из спор штамма *B. anthracis* СТИ-1 и полученного из него протективного антигена. В качестве прототипа рекомбинантной химической сибирезвеной вакцины в РосНИПЧИ «Микроб» был создан препарат, содержащий протективный антиген, выделенный из аспорогенного генно-инженерного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻). Ранее нами была изучена эффективность и иммуногенность препарата в экспериментах на различных лабораторных животных. Показано, что иммунитет, формирующийся при введении рекомбинантного протективного антигена, характеризуется высокими значениями титров специфических антител. Двукратная иммунизация протективным антигеном обеспечивает эффективную защиту экспериментальных животных от заражения диплоидным штаммом *B. anthracis* 71/12. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* при подкожном пути введения препарат не токсичен для мышей

линии VALB/c и морских свинок [5].

Цель данного исследования – охарактеризовать изменения в органах и тканях морских свинок, иммунизированных препаратом рекомбинантного протективного антигена, в динамике иммуногенеза.

Материалы и методы

Исследования проводили на 18 морских свинках массой от 250 до 300 г. Биомоделей содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [3].

Протективный антиген выделяли из штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻). Антиген очищали двухэтапной хроматографией [2]. Морских свинок, подкожно однократно иммунизированных 50 мкг препарата очищенного протективного антигена, умерщвляли (по 3 особи на срок) хлороформом через 1, 3, 7, 21 и 27 сут после иммунизации. Контролем служили интактные морские свинки. Для морфологического исследования были взяты кусочки печени, сердца, легких, почек, надпочечников, кожи из места введения препарата, органов лимфоидной системы – тимуса, селезенки, регионарных (РЛУ) и отдаленных (ОЛУ) лимфатических узлов. Выполняли макрометрическое исследование, определяя массу и размеры органов подопытных животных. Гистологический материал фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Дальнейшую обработку проводили по стандартной методике, готовые полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином [1]. Гистологический материал просматривали в биологическом микроскопе Olympus CX31 с видеокамерой при увеличении в 40–200 раз. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситометрической программы аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (версия 2.1.0.0), определяя количество клубочков в поле зрения среза почек, звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) в поле зрения среза печени, количество лимфатических фолликулов в лимфоидных органах, характеризуя их активность полуколичественным методом (в баллах от 0 до 3). За 0 баллов принимали отсутствие активности; 1 балл – слабо выраженная; 2 балла – умеренно выраженная; 3 балла – резко выраженная активность. Количество почечных телец (клубочков почек) в различном функциональном состоянии (полнокровие капиллярной сети, сморщенные клубочки, отек сосудистых петель) представляли в процентном отношении к клубочкам без видимых изменений.

Результаты и обсуждение

Вакцинный процесс при иммунизации очищенным препаратом рекомбинантного протективного антигена моделировали на морских свинках, так как данный вид лабораторных животных широко при-

меняется для экспериментальных и доклинических характеристик разрабатываемых сибиреязвенных вакцин в зарубежных и отечественных исследованиях [4, 9, 10, 11]. Выбор иммунизирующей дозы, в 2 раза превышающей подобранную ранее экспериментальную дозу, обусловлен необходимостью оценить развитие возможных нежелательных реакций тканей и клеток макроорганизма.

По результатам исследования установлено, что подкожное введение рекомбинантного протективного антигена морским свинкам не вызывало гибели животных и не влияло на их общее состояние.

В месте введения препарата в первые сутки наблюдения отмечали незначительный отек подкожной клетчатки и очаговую инъекцию сосудов. При гистологическом исследовании на фоне умеренного отека и очагового полнокровия сосудов подкожной клетчатки выявляли небольшие участки лимфоцитарной инфильтрации дермы. К 3-м суткам после иммунизации изменений в месте введения не наблюдали, при гистологическом исследовании в тканях полностью исчезал экссудативно-инфильтративный компонент.

Общая стресс-реакция организма на введение испытуемого препарата заключалась в некотором снижении массы надпочечников в течение первых 3 сут наблюдения до (0,054±0,0100) г, в контроле – (0,095±0,04) г. При гистологическом исследовании отмечали умеренное расширение пучковой зоны с изменением ядерно-цитоплазматического соотношения у отдельных клеток, очаговое опустошение клеток клубочковой зоны и некоторое снижение феохромии мозгового вещества на фоне нормального соотношения коркового и мозгового вещества в органе. Изменения, характеризующие умеренное напряжение клеток, обеспечивающих синтез кортикостероидов, выброс минералокортикоидов на фоне незначительного «истощения» хромоаффинной системы, укладывались по объему, характеру, срокам их развития и угасания в картину стресс-реакции биомодели на вводимый препарат.

Со стороны паренхиматозных органов при макроскопическом исследовании за весь период наблюдения не отмечали грубых дистрофических изменений, инфильтративных процессов, резкого нарушения кровенаполнения сосудов. В период с 1-х по 7-е сутки при гистологическом исследовании регистрировали признаки умеренного функционального напряжения клеток паренхимы печени, почек, кардиомиоцитов на фоне очаговых явлений полнокровия сосудов.

В почках подопытных животных отдельные клетки эпителия извитых канальцев находились в состоянии гидропической дистрофии, в просвете дистальных канальцев обнаруживали клетки слущенного эпителия. У нескольких животных отмечали очаговую лимфоцитарную инфильтрацию стромы. Изменения со стороны гломерулярного аппарата характеризовались умеренным полнокровием капиллярных петель сосудистых клубочков почечных

телец (рис. 1). Количество почечных телец с полнокровием капилляров достигало у морских свинок 52 % (в контроле – 4–6 %) в 1-е сутки наблюдения, но постепенно снижалось к 7-м суткам и в дальнейшем не превышало 20 %. Описанные изменения гломерулярного аппарата не касались уменьшения количества функционально активных почечных телец в поле зрения среза. Во всех случаях этот показатель был даже несколько выше, чем у животных из группы интактного контроля и колебался от (7,9±3,2) до (6,4±2,38), в контроле – (6,3±1,17), на протяжении периода наблюдения.

В печени у лабораторных животных наблюдаемый в ранние сроки (1–3 сут) умеренный застой в системе циркуляции (внутридольковые синусоидальные гемокапилляры) и системе оттока (центральные вены) крови сочетался с функциональным напряжением светлых гепатоцитов центра печеночных долек, но к 7-м суткам функциональное состояние органа достоверно не отличалось от наблюдаемого у животных из группы интактного контроля. Интересной была реакция со стороны клеток Купфера (звездчатых ретикулоэндотелиоцитов), заключающаяся в их активации. Количество этих элементов увеличивалось в первые 7 сут в среднем в 3 раза и достигало (21,5±2,1), а в последующие сроки составляло (13,0±1,29), что превышало аналогичный показатель в группе интактного контроля (6,7±0,94) в 2 раза, свидетельствуя о функциональной активации ретикулоэндотелиальной системы.

Со стороны лимфоидных органов не отмечали угнетения их функции ни в одном случае. В ранние сроки (до 7-х суток) при макроскопическом исследовании не наблюдали резкой гипертрофии органов с выраженными проявлениями гиперплазии отдельных структур. Увеличение массы селезенки в 2 раза по отношению к аналогичному показателю у интактных животных и умеренную гиперплазию фолликулярных структур (появление зернистости) реги-

стрировали на 21-е сутки наблюдения. Изменения в регионарных лимфатических узлах у животных характеризовались планомерным увеличением массы органа в период с 3-х по 21-е сутки от (0,03±0,01) до (0,06±0,01) г с возвратом к значениям показателя у контрольных морских свинок на 27-е сутки – (0,025±0,005) г. Масса отдаленных лимфатических узлов также увеличивалась с 3-х по 27-е сутки от (0,035±0,005) до (0,045±0,01) г, данный показатель в 3 раза выше, чем у интактных животных (0,01±0) г.

В тимусе при гистологическом исследовании с 7-х по 27-е сутки со стороны лимфоидных элементов наблюдали умеренные гиперпластические процессы и относительную активацию митотической активности в мозговом веществе. Соотношение коркового и мозгового вещества оставалось нормальным.

Функциональное состояние органов периферической иммунной системы после введения животным протективного антигена, полученного из аспорогенного рекомбинантного штамма, укладывалось в картину иммуногенеза, что проявлялось последовательной активацией Т- и В-зон в них. В селезенке и лимфатических узлах у подопытных животных наблюдали умеренное нарастание пролиферативной активности от 1 до 3 баллов и изменение клеточного состава органов в период с 3-х по 27-е сутки. В целом реакция в лимфатических узлах заключалась в регистрации различной степени активации отдельных фолликулов (В-зон), появлении фолликулов со светлыми центрами, богатыми бластными формами клеток, увеличении количества митозов на фолликулах, наличии макрофагов, содержащих осколки ядер и умеренной гиперплазии паракортикальных (Т-) зон с преобладанием в них бластных форм клеток или смешанного клеточного состава (умеренное количество бластов, неактивированные лимфоциты и единичные зрелые плазматические клетки) начиная с 21-х суток (рис. 2). В мозговом веществе (мозговые тяжи) лимфатических узлов после 7-х

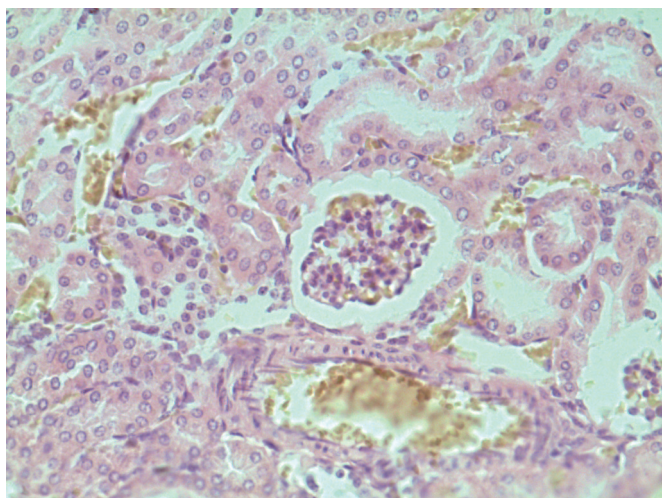


Рис. 1. Морская свинка. Почки. 1-е сутки после подкожного введения 50 мкг рекомбинантного протективного антигена. Очаговые дистрофические изменения эпителия извитых канальцев. Умеренное полнокровие капиллярных петель сосудистого клубочка почечного тельца. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×200

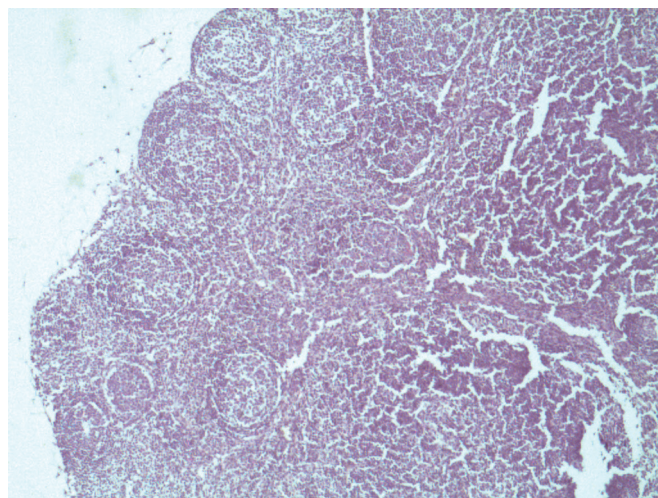


Рис. 2. Морская свинка. Регионарный лимфатический узел. 21-е сутки после подкожного введения 50 мкг рекомбинантного протективного антигена. Гиперпластические процессы в фолликулах и паракортикальных зонах. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение ×40

суток регистрировали появление незначительного количества эозинофильных лейкоцитов. В селезенке нарастание гиперпластической активности в Т- и В-зонах отмечали после 7-х суток. Количество функционально активных фолликулов в срезе органа увеличивалось к 27-м суткам до 20, в то время как в контроле обнаруживали до 8 неактивных фолликулов на срез. Начиная с 21-х суток у животных регистрировали появление в селезеночных тяжах умеренного количества эозинофильных лейкоцитов, что, вероятно, свидетельствовало о проявлениях аллергического порядка. Данный факт может быть обусловлен особенностями взаимодействия рекомбинантного протективного антигена с толл-подобными рецепторами врожденного иммунитета, так как известно, что в зависимости от дозы лиганда происходит стимуляция Th2-лимфоцитов, что ведет к развитию аллергического воспаления [8]. Важным подтверждением участия рецепторов врожденного иммунитета в развитии аллергии являются результаты опытов на Toll-дефицитных мышах [6], поэтому получение окончательного ответа на возникший вопрос составляет перспективу наших дальнейших исследований.

Таким образом, однократное подкожное введение морским свинкам препарата рекомбинантного протективного антигена в дозе 50 мкг не приводило к развитию грубых морфологических изменений, а наблюдаемые на микроскопическом уровне изменения проходили к 7-м суткам. По результатам оценки реакции иммунокомпетентных органов регистрировали умеренные проявления иммуногенеза к 21-м суткам наблюдения, что позволяет рекомендовать применение протективного антигена, полученного из аспорогенного штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻), в качестве основного компонента прототипа химической сибиреязвенной вакцины.

Работа выполнена по государственному контракту № 40-Д/1 от 29.07.12 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: ООО «Издательство СпецЛит»; 2010. 96 с.
2. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Шулепов Д.В., Новикова Л.В., Попов Ю.А., Щуковская Т.Н., Дроздов И.Г., Кутырев В.В. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2007; 3:15–21.
3. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная академия; 1996.
4. Основные требования к вакцинным штаммам сибиреязвенного микроба для иммунизации людей. Методические указания МУ 3.3.1.1112-02. М., 2002. 47 с.

5. Попова П.Ю., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Гончарова А.Ю., Новикова Л.В., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А., Смолькова Е.А., Кравцов А.Л., Щуковская Т.Н. Влияние протективного антигена, синтезируемого аспорогенным рекомбинантным штаммом *Bacillus anthracis*, на иммунную систему экспериментальных животных. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):84–7.
6. Bashir M.E., Louie S., Shi H.N., Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J. Immunol.* 2004; 172:6978–87.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1):221–36.
8. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196(12):1645–51.
9. Fellows P., Linscott M., Ivins B., Pitt M., Rossi C., Gibbs P., Friedlander A. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine.* 2001; 19:3241–7.
10. Goossens P. Animal models of human anthrax: the quest for the Holy Grail. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):467–80.
11. Ivins B., Fellows P., Nelson G. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine.* 1994; 12(10): 872–4.
12. Scorpio A., Blank T., Day W., Chabot D. Anthrax vaccines: Pasteur to present. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:2237–48.

References

1. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamental Principles of Histological Technique]. St. Petersburg; 2010. 96 p.
2. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Shulepov D.V., Novikova L.V., Popov Yu.A., Shchukovskaya T.N., Drozdov I.G., Kutyrav V.V. [Immunogenicity of recombinant bacilli strains with cloned gene responsible for *Bacillus anthracis* protective antigen synthesis]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2007; 3:15–21.
3. National Research Council. [Guidelines on care and use of laboratory animals]. Washington: National Academy; 1996.
4. [Basic requirements to anthrax microbe vaccine strains used for immunization of humans]. Methodological recommendations. MR 3.3.1.1112-02. М., 2002. 47 p.
5. Popova P.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Goncharova A.Yu., Novikova L.V., Kashtanova T.N., Popov Yu.A., Smol'kova E.A., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N. [Influence of the protective antigen, produced by *Bacillus anthracis* asporogenic recombinant strain, on the immune system of laboratory animals]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):84–7.
6. Bashir M.E., Louie S., Shi H.N., Nagler-Anderson C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J. Immunol.* 2004; 172:6978–87.
7. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1):221–36.
8. Eisenbarth S., Piggott D., Huleatt J., Visintin I., Herrick C., Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, Toll-like Receptor 4-dependent T Helper Cell Type 2 Responses to Inhaled Antigen. *J. Exp. Med.* 2002; 196(12):1645–51.
9. Fellows P., Linscott M., Ivins B., Pitt M., Rossi C., Gibbs P., Friedlander A. Efficacy of a human anthrax vaccine in guinea pigs, rabbits and rhesus macaques against challenge by *Bacillus anthracis* isolates of diverse geographical origin. *Vaccine.* 2001; 19:3241–7.
10. Goossens P. Animal models of human anthrax: the quest for the Holy Grail. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30(6):467–80.
11. Ivins B., Fellows P., Nelson G. Efficacy of a standard human anthrax vaccine against *Bacillus anthracis* spore challenge in guinea pigs. *Vaccine.* 1994; 12(10): 872–4.
12. Scorpio A., Blank T., Day W., Chabot D. Anthrax vaccines: Pasteur to present. *Cell Mol. Life Sci.* 2006; 63:2237–48.

Authors:

Popova P.Yu., Bugorkova S.A., Mikshis N.I., Semakova A.P., Popov Yu.A., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Об авторах:

Попова П.Ю., Бугоркова С.А., Микшис Н.И., Семакова А.П., Попов Ю.А., Щуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Поступила 23.09.13.