

С.Н.Клюева, Т.Н.Щуковская, Т.П.Шмелькова, А.Л.Кравцов, С.А.Бугоркова, Н.И.Смирнова,
О.А.Волох, Т.Л.Захарова, Н.И.Белякова, С.А.Еремин, А.К.Никифоров

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

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

Проведена иммунобиологическая оценка препаратов В-субъединицы холерного токсина (ХТ), полученных различными экспериментально-производственными способами. Показано, что препараты В-субъединицы не токсичны для биомodelей и не вызывают в их органах и тканях значимых патоморфологических изменений. Отсутствие изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, а также способность исследуемых препаратов инициировать иммунитет по наличию синтеза антител к В-субъединице ХТ дают основание считать препараты В-субъединицы перспективными компонентами холерной вакцины.

Ключевые слова: В-субъединица холерного токсина, токсичность, протективность, апоптоз, антитоксические антитела.

S.N.Klyueva, T.N.Shchukovskaya, T.P.Shmel'kova, A.L.Kravtsov, S.A.Bugorkova, N.I.Smirnova, O.A.Volokh,
T.L.Zakharova, N.I.Belyakova, S.A.Eremin, A.K.Nikiforov

Immunobiological Characteristics of Cholera Toxin B-Subunit

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out was immunobiological evaluation of cholera toxin B subunit preparations obtained using different experimental and production methods. It was demonstrated that B subunit preparations were non-toxic for biomodels and did not cause significant pathological alterations in their organs and tissues. They also did not alter the condition of immunocompetent cells at different stages of their cycle, and promote anti-toxic antibodies production. Thus, B subunit preparations under study can be considered as promising components of cholera vaccine.

Key words: cholera toxin B-subunit, toxicity, protective ability, apoptosis, anti-toxic antibodies.

Высокий уровень заболеваемости холерой в мире диктует необходимость оценить с новых позиций потребность в создании эффективной экономической холерной вакцины, проведении массовой вакцинации против холеры [8].

Проводимая во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» модернизация производства холерной химической вакцины на основе внедрения новейших производственных биотехнологий с применением сконструированных и запатентованных авирулентных генно-инженерных штаммов-продуцентов основных протективных антигенов холерного вибриона (соматического О-антигена сероваров Инаба и Огава, О139 антигена, В-субъединицы холерного токсина) позволит повысить эффективность и качество холерной вакцины, способной инициировать у привитых формирование иммунитета против заражения всеми известными эпидемически опасными штаммами возбудителя холеры [3, 5, 10, 14].

Ключевым фактором вирулентности возбудителя холеры является ХТ с молекулярной массой 85 кДа. ХТ состоит из А-субъединицы, отвечающей за токсическую активность, и В-субъединицы, обеспечивающей связывание с рецепторами эпителиальных клеток тонкой кишки. В-субъединица нетоксична, является одним из основных иммуногенных компонентов, формирует антитоксический иммунитет. При добавлении В-субъединицы ХТ к оральным вакцинам стимулируется образование IgA в кишеч-

нике, что увеличивает защитный эффект вакцинации до 9 месяцев.

Целью исследования явилась комплексная иммунологическая и морфологическая оценка действия экспериментальных препаратов В-субъединицы ХТ в процессе формирования иммунного ответа.

Материалы и методы

В работе использовали препараты В-субъединицы ХТ: концентрат В-субъединицы, полученный с помощью технологии концентрирования «кросс-флоу» (Вк); В-«ультрафильтрат» (Ву), полученный с помощью технологии дифференциальной ультрафильтрации; хроматографически очищенная В-субъединица (Вх). Продуцентом для вышеперечисленных препаратов являлся рекомбинантный штамм *V. cholerae* non O1 KM93, содержащий гибридную плазмиду pJEM₃ с клонированными генами *vctB*, детерминирующими синтез В-субъединицы холерного токсина [4]. В качестве препарата сравнения использовалась хроматографически очищенная В-субъединица, полученная из ХТ производственного штамма *V. cholerae* 569В (Впр). Все исследуемые препараты прошли контроль специфической стерильности.

Исследования проводили на нелинейных белых мышах смешанного поголовья и мышах инбредной линии Balb/c, полученных из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб» и

отобранных методом случайной выборки.

Испытание препаратов В-субъединицы ХТ на острую токсичность (действие препарата, проявляющееся после его однократного применения) проводили на нелинейных белых мышах (19±1) и (11±1) г [7]. Препараты В-субъединицы ХТ (Вк, Ву, Вх, Впр) вводили внутривентриально 4 группам нелинейных белых мышей (по 10 животных в каждой группе) в дозе 50 мкг в объеме 0,5 мл. 5-й группе мышей вводили препарат Вк в дозе 33 мкг/0,5 мл. Контрольной группе внутривентриально вводили физиологический раствор в количестве 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляли ежедневно в течение 7 сут.

Протективные свойства препаратов В-субъединицы ХТ определяли в тесте активной защиты мышшей, подсчитывали LD₅₀ и ее доверительные интервалы с вероятностью 95 %. 16 групп нелинейных белых мышшей (11±1) г (по 6 мышшей каждая) иммунизировали внутривентриально препаратами В-субъединицы ХТ в дозах 0,4, 2, 10, 50 мкг. Контрольной группе из 10 животных вводили физиологический раствор. На 21-е сутки после иммунизации препаратами В-субъединицы ХТ заражали мышшей внутривентриально взвесью штамма *V. cholerae* Eltor Ogawa P-3122 дозой 300 LD₅₀. Контрольной группе из 10 мышшей вводили то же количество LD₅₀, что и иммунным животным. Наблюдения за зараженными животными проводили в течение 3 сут. В группах иммунных и зараженных белых мышшей для определения ImD₅₀ (средняя иммунизирующая доза) подсчитывали количество выживших животных [1].

Клетки костного мозга и селезенки получали общепринятыми методами. Лейкоциты крови выделяли из гепаринизированной крови экспресс-методом путем осмотического шока эритроцитов с последующим восстановлением водно-солевого баланса. Для цитофлуориметрического исследования лейкоциты, спленоциты и клетки костного мозга отмывали, помещали в 70 % раствор этилового спирта для перфорации клеточной и ядерной мембран и окрашивали смесью флуоресцирующих красителей митрамицина и этидиум бромид [11].

Определение титра антител к В-субъединице ХТ в сыворотке крови нелинейных белых мышшей, иммунизированных экспериментальными сериями препаратов В-субъединицы, проводили на 21-е сутки после иммунизации методом ИФА [12]. Для этого лунки микротитрационных планшетов сенсibilizировали ганглиозидом GM-1 при комнатной температуре (22±2) °С в течение 18 ч. После блокировки свободных сайтов на шейкере при температуре 37 °С раствором BSA вносили В-субъединицу ХТ (Вх или препарат контрольной В-субъединицы – SBL Vaccin AB, Швеция, лот KV7240B3). Связанные антитела выявляли с помощью конъюгата антимышиных иммуноглобулинов IgG(H+L), меченных пероксидазой хрена (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи) в рабочем разведении в буфере для конъюгата. В качестве хромогенного субстрата использовали диамониевую

соль АВТS – 2, 2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота). Результаты учитывали по оптической плотности образцов при длине волны 405 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США), считая позитивными лунки, в 1,5 и более раза превышающие по интенсивности окраски контрольные. Полученные данные обрабатывали согласно методу определения среднего геометрического титра [2].

Для гистологического исследования забирали кусочки органов (сердце, легкие, печень, селезенка, почки с надпочечниками, мезентериальные лимфатические узлы, по три отрезка тонкого и толстого кишечника). Материал фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, обезвоживали, пропитывали и заливали в парафин по общепринятой схеме [9]. Полутонкие срезы органов окрашивали гематоксилином и эозином [6] и просматривали в световом микроскопе Olympus CX31 при увеличениях ×100 и 200. Для морфометрического анализа подсчитывали среднее количество клеток (бокаловидных клеток, элементов клеточного инфильтрата – лейкоцитов, лимфоцитов, плазматиков, эозинофилов) в 10 полях зрения срезов тонкого и толстого кишечника при увеличении ×200; количество межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ) тонкого кишечника и лимфоцитов покровного эпителия толстого кишечника определяли на 1000 ядер энтероцитов при увеличении ×200; количество звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) подсчитывали в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов печени при увеличении ×200. Степень активности отдельных структур лимфоидных органов (Т- и В-зон) оценивали полуколичественным методом по 3-балльной шкале (от 0 до 3): 0 баллов – отсутствие активности; 1 балл – слабо выраженная активность; 2 балла – умеренно выраженная активность; 3 балла – резко выраженная активность.

Профили распределения эукариотических клеток по фазам клеточного цикла (ДНК-гистограммы) получали путем количественного измерения уровня свечения каждого из клеточных элементов в области спектра свыше 550 нм на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUYWE (Германия), оснащенном 2048 канальным амплитудным анализатором импульсов Orto Instruments (Westwood, Mass USA) для автоматической сортировки клеток и построения гистограмм. В каждом образце анализировалось не менее 20000 клеток. Клетки в апоптозе, несущие <2С ДНК, подсчитывали (в %) как отношение площади участка ДНК гистограммы (слева от диплоидного пика G₁/G₀) к площади всей гистограммы (суммарное число зарегистрированных клеток), умноженное на 100 %. Делящиеся (пролиферирующие) клетки (S+G₂+M), несущие >2С ДНК, подсчитывали (в %) как отношение площади участка ДНК гистограммы (справа от диплоидного пика G₁/G₀) к площади всей гистограммы (суммарное число зарегистрированных клеток), умноженное на 100 %. Для количественного учета процессов апоптоза и пролиферации использовали

коэффициент, который равен отношению апоптотических клеток к пролиферирующим и отражает баланс этих процессов [13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Office Excel 2010.

Результаты и обсуждение

В течение всего срока наблюдения при фиксации общего состояния животных, особенностей их поведения, интенсивности и характера двигательной активности, состояния волосяного и кожного покрова, положения хвоста, консистенции фекальных масс, окраски мочи, изменения массы тела отклонений от нормы не выявлено. Исследуемые препараты В-субъединицы в дозах 50 мкг/0,5 мл и 33 мг/0,5 мл не являлись токсичными для животных.

Установлено, что наибольшей протективной активностью обладали хроматографически очищенные препараты В-субъединицы ХТ (Вх и Впр). ImD_{50} этих препаратов в среднем в 1,6 раза меньше ImD_{50} других испытуемых препаратов В-субъединицы ХТ (Вк и Ву), что свидетельствовало об их большей иммунологической эффективности. Оптимальная доза Вк, Ву, Впр, защищающая лабораторных животных от развития инфекционного процесса при заражении высоковирулентным штаммом *V. cholerae* Eltor Ogawa P-3122 в дозе $3,3 \cdot 10^3$ м.к./0,5 мл, составила 10 мкг.

При патолого-анатомическом исследовании мышцей во всех случаях отмечали лишь умеренные гемодинамические нарушения в органах, в большей степени обусловленные способом выведения животных из эксперимента. В кишечнике мышцей наблюдали содержимое обычного характера и объема, незначительное полнокровие сосудов. При гистологическом исследовании регистрировали незначительные изменения со стороны внутренних органов в виде умеренного полнокровия и функционального напряжения паренхимных элементов в печени и почках, чаще характерных для введения препаратов Вк, Вх. Реакцию со стороны звездчатых ретикулоэндотелиоцитов печени (клеток Купфера) характеризовали умеренные процессы активации. Наиболее высокий показатель активности (увеличение количества клеток Купфера) встречался у животных, которым вводили 10 мкг препарата Впр. В то же время препарат Ву в дозе 50 мкг чаще вызывал даже некоторое уменьшение количества клеток Купфера. Со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) во всех случаях нарушений не выявлено. Отмечали некоторое усиление пролиферативных процессов в эпителии, при этом инфильтративный компонент был незначительным. Так, на введение 10 мкг препарата Вк повышалось количество эозинофилов (до $3,1 \pm 0,98$) в тонком кишечнике подопытных животных. Препараты Ву, Вк, Вх вызывали относительную активацию МЭЛ – ($4,9 \pm 0,92$), ($3,8 \pm 0,92$), ($6,5 \pm 1,17$) клеток соответственно – по сравнению с контрольной группой – ($2,1 \pm 0,32$) кле-

ток. На введение препарата Вх незначительно снижалась митотическая активность клеток в кишечных криптах. В лимфоидных органах мышцей не регистрировали признаков достоверной активности отдельных структур (Т- и В-зон), но на ряд препаратов в дозе 50 мкг (Ву, Вк, Вх) в селезенке наблюдали реакцию со стороны мегакариоцитов, косвенно свидетельствующую о характерном для процессов иммуногенеза раздражении костного мозга.

Выявленные незначительные и умеренные изменения со стороны внутренних органов подопытных мышцей в ответ на введение всех исследуемых препаратов являются допустимыми с точки зрения их безопасности (безвредности) для макроорганизма, а имеющие место колебания выраженности или частоты этих изменений у отдельных животных не выходили за пределы допустимых.

Процессы индукции апоптоза клеток эффекторной системы врожденного иммунитета имеют ключевое значение в регуляции иммунного и воспалительного ответа на бактериальные антигены. В связи с этим с использованием метода проточной цитофлуориметрии проведено изучение *in vivo* влияния препаратов В-субъединицы ХТ на процессы апоптоза и пролиферации как двух альтернативных составляющих ответа иммунокомпетентных клеток на 1-е и 7-е сутки после иммунизации.

Клетки в апоптозе идентифицировали как клетки с пониженным содержанием ДНК (<2С), пролиферативные клетки с дифференцировкой по фазам митотического цикла характеризовались повышенным содержанием ДНК (>2С).

В таблице представлены результаты влияния антигенов холерного вибриона на баланс апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток белых мышцей. Установлен дозозависимый эффект Вк и Ву в отношении гибели иммунокомпетентных клеток биомоделей. При повышении дозы Вк до 50 мкг происходило статистически достоверное увеличение как апоптотических, так и пролиферирующих клеток костного мозга на раннем этапе иммуногенеза (1-е сутки), лейкоцитов крови и спленоцитов на 1-е и 7-е сутки иммунного ответа относительно контрольных значений. Иммунизация животных хроматографически очищенными препаратами В-субъединицы (Вх и Впр) в дозе 2 мкг вызывала повышение ($p < 0,05$) относительного количества апоптотических и пролиферирующих клеток костного мозга на 1-е сутки иммуногенеза с восстановлением баланса апоптоза и пролиферации к 7-м суткам.

Следует отметить, что подавляющее большинство лейкоцитов крови, клеток костного мозга и селезенки находились в предмитотической и митотической фазах клеточного цикла (G_2+M) и меньшее количество – в фазе синтеза (S).

Проведенный цитофлуориметрический мониторинг процесса иммуногенеза показал, что баланс апоптоза и пролиферации, дифференцировка и элиминация клеток костного мозга, лейкоцитов крови

Влияние антигенов холерного вибриона на баланс апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток

Иммунизирующий препарат	Доза, мкг	Штамм-продуцент	Лейкоциты		Спленоциты		Клетки костного мозга	
			1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут
Концентрат В-субъединицы (Вк)	2	<i>V. cholerae</i> поп О1 КМ93	0,17±0,006	0,22±0,015	0,45±0,02*	0,14±0,15	0,06±0,006	0,11±0,01
	50		0,39±0,01*	0,58±0,1*	0,52±0,02*	0,59±0,18*	0,18±0,03*	0,06±0,006
В-ультрафильтрат (Бу)	2		0,36±0,03*	0,19±0,01	0,56±0,06*	0,18±0,01	0,03±0,002	0,11±0,006
	50		0,48±0,03*	0,25±0,01	0,49±0,045	0,24±0,03*	0,025±0,003	0,08±0,006
Хроматографически очищенная В-субъединица (Вх)	2		0,17±0,01	0,28±0,02	0,11±0,006	0,15±0,015	0,08±0,003*	0,04±0,0002
	50		0,19±0,01	0,25±0,015	0,17±0,002	0,13±0,003	0,07±0,002*	0,05±0,002
Хроматографически очищенная В-субъединица (Впр)	2	<i>V. cholerae</i> 569В	0,32±0,03	0,17±0,01	0,14±0,01*	0,06±0,002	0,07±0,015*	0,095±0,01
	50		0,12±0,015	0,2±0,02	0,18±0,01	0,06±0,003	0,05±0,006	0,04±0,001
Контроль (физиологический раствор)			0,21±0,01	0,22±0,003	0,29±0,02	0,09±0,006	0,03±0,006	0,07±0,003

* Достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05).

и спленоцитов в ответ на исследуемые препараты В-субъединицы ХТ, независимо от способа получения и степени очистки, находились в пределах нормальных показателей, что свидетельствовало об отсутствии их повреждающего действия на организм биомоделей.

Данные экспериментальные серии В-субъединицы ХТ не вызывают значимых изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, что можно использовать как дополнительный критерий оценки качества препаратов – кандидатов в иммунобиологические.

Иммуноферментным анализом установлено, что введение препаратов В-субъединицы ХТ индуцировало синтез антител к В-субъединице ХТ в сыворотках крови мышей. Титры антител к В-субъединице ХТ при иммунизации всеми препаратами В-субъединицы значимо не различались. Использование в ИФА в качестве антигена Бу вызвало образование антител к В-субъединице ХТ в титрах, 640 (0÷2176), сравнимых с титрами, зарегистрированных в ответ на контрольную В-субъединицу – 1920 (64÷2048).

Таким образом, испытания иммунобиологических свойств препаратов В-субъединицы ХТ дают основание считать препараты В-субъединицы перспективными компонентами холерной вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Ворошилова М.К., Жевандрова В.И., Балаян М.С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. М.: Медицина; 1964. 152 с.
3. Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. Биотехнология. 2003; 5:53–6.
4. Ильина Т.С., Смирнов Г.Б., Смирнова Н.И., Ливанова Л.Ф. Рекомбинантная плазмидная ДНК рJEM₃, кодирующая синтез В-субъединицы холерного токсина, способ ее конструирования и штамм бактерий *V. cholerae* – продуцент В-субъединицы холерного токсина. А.с. 1505022, опублик. 15.10.1991.
5. Кутырев В.В., Шуковская Т.Н. Холерные вакцины. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 431–45.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
7. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. М.; 1998. 128 с.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова

Н.И., Никифоров А.К. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):5–12.

9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 542 с.

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

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

12. Chang Y.S., Sack D.A. Development of a novel in vitro assay (ALS assay) for evaluation of vaccine-induced antibody secretion from circulating mucosal lymphocytes. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001; 8(3):482–8.

13. 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.

14. Rhie G., Jung H., Park J. et al. Construction of cholera toxin B subunit-producing *Vibrio cholerae* strains using the Mariner-FRT transposon delivery system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008; 52:23–8.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 180 p.
2. Voroshilova M.K., Zhevandrova V.I., Balayan M.S. [Methods of Laboratory Diagnostics of Enteroviral Infections]. M.; 1964. 152 p.
3. Zakharova T.L., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Obtaining of purified cholera toxin B-subunit from the recombinant *Vibrio cholerae* strain]. Biotechnologiya. 2003; 5:53–6.
4. Il'ina T.S., Smirnov G.B., Smirnova N.I., Livanova L.F. [Recombinant plasmid рJEM₃, DNA, encoding cholera toxin B-subunit, the method of its construction, and *V. cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit]. AS 1505022.
5. Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N. [Cholera vaccines]. In: [Vaccines and Vaccination: National Manual]. M.; 2011. P. 431–45.
6. Lilly R. [Pathohistological Technique and Practical Hystochemistry]. M.; 1969. 645 p.
7. [Methods of Control of Immunobiological Preparations Administered to Humans]. MR. M.; 1998. 128 p.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforova A.K. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2011; (107):5–12.
9. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. [Microscopic Technique: Manual]. M.; 1996. 542 p.
10. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Cholera vaccino-prophylaxis: present day state]. Epidemiol. Vaktzynoprof. 2009; 2(45):62–7.

Authors:

Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Smirnova N.I., Volokh O.A., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Об авторах:

Клюева С.Н., Шуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Смирнова Н.И., Волох О.А., Захарова Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Получила 10.01.12.