

С.А.Бугоркова, Т.В.Бугоркова, В.В.Кутырев

**ПРИНЦИПЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ ВАКЦИН***ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Разработан алгоритм оценки качества противохолерных вакцин, базирующийся на возможности применения методов количественного учета формализованных признаков, характеризующих патологический или адаптивный процесс в кишечнике иммунизированных лабораторных животных. В качестве формализованных признаков отобраны показатели: количество межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), морфофункциональное состояние апудоцитов и бокаловидных клеток. Для взаимосвязанной оценки отдельных звеньев гомеостаза, морфометрические параметры представлены в виде ассоциаций показателей в форме индексов и коэффициентов. Установлено, что если определяемые показатели не выходят за определенные у соответствующих контролей пределы, то состояние адаптации организма и изменения, описываемые при гистологическом исследовании, рассматриваются как доброкачественные, характеризующие безвредность или эффективность испытываемых противохолерных вакцин.

*Ключевые слова:* холерные вакцины, морфометрические параметры.

S.A.Bugorkova, T.V.Bugorkova, V.V.Kutyrev

**Principles of Quantitative Morphometric Assessment of Cholera Vaccines Safety***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Worked out is the algorithm of cholera vaccines quality based on application of the methods of quantitative registration of formalized parameters which characterize pathologic and adaptive processes in the intestine of the immunized laboratory animals. The following parameters were selected as formalized ones: quantity of interepithelial lymphocytes, morpho-functional condition of apudocytes and scyphiform cells. Morphometric parameters are presented as associations of indicators in the form of indices and coefficients in order to carry out interrelated assessment of separate parts of homeostasis. It was determined that in case the assessed parameters were in the limits identified in corresponding controls, adaptation condition of the organism and alterations described in histological assay were considered as benign and characterized safety or efficiency of tested cholera vaccines.

*Key words:* cholera vaccines, morphometric parameters.

Разработка эффективных противохолерных вакцин продолжает оставаться актуальной научной проблемой [6, 13]. Создание новых и усовершенствование уже имеющихся вакцин для профилактики холеры тесно связано с формированием современной методологии оценки их качества. Принципы количественных морфологических исследований реакций макроорганизма на вакцинный препарат разрабатываются с учетом возможности применения аппаратно-программного компьютерного обеспечения и формируются на основе внедрения в схему традиционного морфологического исследования целого ряда современных методов (гистохимического, иммуногистохимического, морфометрического и морфофункционального анализа), объединенных системным подходом к оценке выявляемых изменений [2, 3].

В существующих нормативных документах [11] основной принцип характеристики вакцин при проведении морфологического исследования заключается в верификации тканевых изменений, без учета количественной оценки их степени выраженности. Такой подход в определенной степени нивелирует связь конкретных изменений с функциональными расстройствами отдельных систем, участвующих в реализации защиты организма и нуждается в совершенствовании [7].

Известно, что процессы клеточного обновления эпителиоцитов [13], изменение активности бокаловидных клеток [4] и соотношения элементов гистиоцитарного барьера и эффекторной зоны иммунной системы ЖКТ [9] лежат в основе формирования адапционно-компенсаторных реакций макроорганизма.

Цель работы заключалась в разработке единого алгоритма оценки качества противохолерных вакцин, базирующегося на возможности применения методов количественного учета формализованных признаков, характеризующих патологический или адаптивный процесс в кишечнике иммунизированных лабораторных животных.

**Материалы и методы**

Гистологический материал (отрезки кишечника – двенадцатиперстной, подвздошной кишки тонкого и восходящего отдела ободочной кишки толстого) получали от взрослых кроликов и крольчат-сосунков, используемых для оценки безвредности и протективных свойств противохолерных препаратов. Испытуемые образцы: коммерческую хо-

лнерную химическую бивалентную таблетированную вакцину производства РосНИПЧИ «Микроб» (1 человекодоза – 3 таблетки); коммерческую вакцину Cholera-Impstoff (1 человекодоза –  $1 \cdot 10^9$  м.к.); препараты «теней клеток» *Vibrio cholerae* O1 eltor – VCG/O1 с пиллями адгезии (TCP) и без них; препараты «теней клеток» *V. cholerae* O139 – VCG/O139 с TCP и без них (20 мг); *V. cholerae* KM 182 и KM 184 авирулентных рекомбинантных штаммов (в дозе  $5 \cdot 10^9$  м.к.) вводили перорально с помощью зонда. Контрольным животным вводили в качестве плацебо 0,9 % раствор натрия хлорида (интактный контроль) или заражали вирулентными холерными вибрионами O1- (*V. cholerae* P3122, 569 B) и O139- (*V. cholerae* P16064) серогрупп по методу RITARD в дозе  $1 \cdot 10^9$  м.к. (контроль заражения). Гистологический материал фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, его обработку выполняли по общепринятой в гистологии схеме [8]. Полученные полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином, сочетанной окраской – альциановый синий и Шифф-реактив, импрегнировали серебром по Гримелиусу и по Массону в модификации Гамперля [12]. Готовые препараты просматривали на биологическом микроскопе Olimpus CX 31 с видеокамерой JVC, морфометрическое исследование выполняли с помощью аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц с приложением денситометрической программы ДММ версия 2.1.0.0.

Количество межэпителиальных лимфоцитов тонкого кишечника и лимфоцитов покровного эпителия толстого кишечника определяли на 1000 ядер энтероцитов при увеличении  $\times 200$ . Общее количество секреторных клеток сосчитывали на 100 ядер эпителиоцитов в 10 повторах при увеличении  $\times 200$ . Секреторный профиль бокаловидных клеток определяли по количеству клеток, дающих голубую (кислые мукополисахариды – КМПС), красную (нейтральные мукополисахариды – НМПС) или фиолетовую (смешанные формы) окраски, ориентируясь на 100 секреторных клеток в 10 повторах тонкого и толстого кишечника. Количество апудоцитов определяли в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов кишечника при увеличении  $\times 200$ . Морфофункциональное состояние клеток характеризовали по изменению интенсивности окрашивания и зоне распределения продукта секреции в клетке, выявляемых в гистохимических реакциях.

Для взаимосвязанной оценки отдельных звеньев гомеостаза, конкретные морфометрические параметры необходимо было представить в виде ассоциаций показателей в форме различных индексов и коэффициентов, облегчающих процесс сопоставления результатов и выбора оптимального вакцинирующего препарата.

### Результаты и обсуждение

Характеристика противохолерного препарата,

проводимая в соответствии с разрабатываемым алгоритмом, направлена на учет отдельных параметров состояния барьерных структур ЖКТ – процессов экссудации, пролиферации и секретообразования, состояния апудоцитов и клеток эффекторной зоны иммунной системы кишечника.

В качестве формализованных признаков были изучены и отобраны следующие показатели: плотность и характер клеточного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, соотношение в нем различных клеточных популяций, изменение которого характеризует вредное действие исследуемого агента; количество одноклеточных секреторных желез – бокаловидных клеток, состав их секрета, содержащего углеводно-белковые комплексы, играющие защитную роль; количество МЭЛ, клеток, способных активно покидать эпителий и возвращаться назад в собственную пластинку слизистой оболочки кишечника, косвенно влияя на механизмы регенерации и дифференцировки эпителиальных клеток, стимуляцию слизееобразования бокаловидными клетками, снижая возможность адгезии микроорганизмов и их токсинов к поверхности энтероцитов; количество и морфофункциональное состояние апудоцитов как неспецифических регуляторов иммунологических процессов в ЖКТ.

По результатам экспериментальных данных наиболее информативными для оценки качества противохолерных вакцин были признаны изменения состояния 3 групп клеточных элементов: МЭЛ, апудоцитов, бокаловидных клеток. Поэтому для характеристики степени выраженности антигенного воздействия на кишечник подопытных животных нами предложен расчет индекса регенеративной активности эпителия (ИР):

$$ИР = \frac{\text{среднее количество МЭЛ на 1000 ядер эпителиоцитов (опыт, контроль)}}{\text{среднее количество МЭЛ на 1000 ядер эпителиоцитов}}$$

Факт обнаружения апудоцитов с различной степенью интенсивности окраски клеток при постановке гистохимических реакций серебрения (состояния гистохимической активности или опустошения) указывает на то, что в этих клетках постоянно идет синтез биологически активных веществ и их выделение. При срыве компенсаторных возможностей функциональных систем макроорганизма процессы синтеза биологически активных веществ и их выделение в апудоцитах идут несинхронно, что приводит либо к усиленному опустошению клеток, либо к повышенному накоплению продуктов секреции в них. Морфофункциональное состояние апудоцитов у подопытных животных наглядно характеризовал введенный нами показатель – индекс активности апудоцитов (Иап), вычисляемый по формуле:

$$Иап = \frac{\% \text{ опустошен. апудоцитов} + \% \text{ гистохимически активных апудоцитов}}{\% \text{ клеток в состоянии функционального покоя}}$$

В то же время предложенный коэффициент активности апудоцитов (КА) позволял сравнивать со-

стояние этих клеток в опытной группе по отношению к контролю.

$$KA = \frac{I_{оп}}{I_{конт}} \text{ (опыт, контроль)}.$$

Активность бокаловидных клеток оценивали по изменению вида секрета в них. В норме основной пул бокаловидных клеток ЖКТ подопытных животных представлен зрелыми формами, содержащими смешанный продукт секреции, клетки с КМПС («стареющие») и с НМПС («юные») встречаются в небольшом количестве [4].

Изменение соотношения количества бокаловидных клеток с различным секретом отражает процессы обновления слизи в них [5]. Морфофункциональное состояние бокаловидных клеток у подопытных животных, определяемое нами по отношению клеток, содержащих КМПС к сумме клеток, содержащих НМПС и смешанный продукт реакции, характеризовал индекс секреторной активности (*Ica*):

$$Ica = \frac{\% \text{ КМПС}}{\% \text{ НМПС} + \% \text{ смешанных форм}}.$$

Применение которого позволило оценить процессы обновления слизи в секреторных клетках ЖКТ и сравнить характер изменения этого показателя в опытных и контрольных группах за счет введения коэффициента секреторной активности (*KC*), вычисляемого по формуле:

$$KC = \frac{I_{са}}{I_{са}} \text{ (опыт, контроль)}.$$

Для получения сопоставимых результатов состояние клеточных элементов оценивали в трех отделах ЖКТ, выбор которых был обусловлен знаниями о неравнозначной роли различных участков кишечника и связан с анатомо-физиологическими особенностями его у биомоделей. Так, двенадцатиперстная кишка является основным звеном для выполнения секреторной, моторной и пищеварительной функции ЖКТ, в ней сосредоточено максимальное количество желез (бруннеровы железы), секретирующих НМПС и нейроэндокринных клеток с различной направленностью продукции БАВ. Здесь же активно идет процесс всасывания не только белков, углеводов и жиров, но и токсических субстанций. В этом отделе кишечника наиболее выраженная и адекватная реакция МЭЛ [4].

В подвздошном отделе кишечника сосредоточено максимальное количество лимфоидных скоплений и специальных образований – пейеровых бляшек, являющихся индуктивной зоной иммунной системы ЖКТ, в тесной связи с которой находится эффекторная зона, представленная МЭЛ. В этом отделе кишечника активно идет процесс резорбции поступивших веществ, в том числе токсических субстанций, и развивается основной патологический симптомокомплекс любой экспериментальной кишечной инфекции.

Восходящий отдел ободочной кишки отличается особой реакцией клеток APUD-системы, дегрануляция апудоцитов здесь начинается уже через 6 ч после поступления антигенного материала и продолжается до суток, в то время как реакция апудоцитов в дистальных отделах задерживается во времени и у конвенциональных животных в большей степени зависит от изменения состава мукозального микробного окружения.

Вторым сложным вопросом является выбор адекватного контроля. Был проанализирован значительный объем морфологического материала от интактных взрослых кроликов и крольчат-сосунков. Это позволило получить сведения о морфометрических характеристиках, отражающих функциональное состояние различных клеточных элементов в состоянии относительного функционального покоя организма экспериментального животного. Таким образом, были охарактеризованы интактные контроли. Затем был проведен отбор ряда штаммов вирулентных культур холерных вибрионов обоих сероваров, выбрана оптимальная заражающая доза, необходимая для воспроизведения полного симптомокомплекса экспериментальной холерной инфекции методом RITARD. Собранный морфологический материал подвергли тщательному морфометрическому анализу. Так были охарактеризованы контроли заражения.

Оценку качества противохолерных вакцин проводили на основании сравнения учитываемых морфометрических параметров у биомоделей опытных и контрольных групп по разработанным индексам и коэффициентам.

О безвредности препарата судили по изменению величин индексов и коэффициентов, определяемых по отношению данных, полученных при морфометрическом анализе опытных образцов к интактному контролю. Препарат считали безвредным при отклонении показателя от единицы не более чем на 0,5.

Эффективность местной защиты при иммунизации противохолерными вакцинами оценивали по изменению величин индексов и коэффициентов, определяемых по отношению данных, полученных при морфометрическом анализе образцов контроля заражения к опытным. Считая коэффициенты *KA* и *KC* больше 1,5 и индекса *IP* меньше или равным 1 достаточной степенью защиты от патогена (таблица). Из представленных данных следует, что коммерческие вакцины производства РосНИПЧИ «Микроб» и Cholera Impstoff по оцениваемым критериям показали высокую эффективность защиты подопытных животных, в то время как представленные экспериментальные серии препаратов отличались друг от друга и от коммерческих вакцин по учитываемым показателям, что свидетельствует о необходимости их дальнейшего совершенствования.

Таким образом, проведенное исследование показало, что если определяемые показатели не выходят за указанные пределы у соответствующих контролей, то состояние адаптации организма и изменения, опи-

Результаты оценки качества коммерческих и экспериментальных препаратов для специфической профилактики холеры по разработанным показателям

Название препарата	Схема иммунизации	Доза препарата	Заражение на 14-е сутки после окончания иммунизации	Показатели								
				Двенадцатиперстная кишка			Подвздошный отдел тонкого кишечника			Восходящий отдел ободочной кишки		
				КА	КС	ИР	КА	КС	ИР	КА	КС	ИР
Коммерческая вакцина РосНИПЧИ «Микроб»	<i>Per os</i> однократно	1 ч/д	<i>V. cholera</i> O1	5,36	8,67	0,94	2,98	4,79	0,73	5,80	12,74	0,75
Коммерческая вакцина Cholera-Impstoff	«	«	«	4,69	13,88	0,84	3,59	5,10	0,83	4,50	6,56	0,71
<i>V. cholera</i> KM 184	«	5·10 <sup>9</sup> м.к.	«	1,78	46	0,70	3,24	16,63	0,73	7,04	44,3	0,75
<i>V. cholera</i> KM 184	«	«	–	0,96	0,92	1,37	0,85	1,12	1,04	1,27	0,63	0,57
VCG/O1+TCP	<i>Per os</i> двукратно	20 мг	<i>V. cholera</i> O1	4,69	19,69	1,21	3,11	4,96	0,83	3,0	7,64	0,52
VCG/O1-TCP	«	«	«	3,07	8,56	1,16	3,37	3,69	1,25	3,78	3,12	0,81
VCG/O139+TCP	«	«	<i>V. cholera</i> O139	4,28	75,67	1,27	4,95	57,7	1,68	3,74	62,8	0,90
VCG/O139-TCP	«	«	«	6,27	23,88	1,27	2,47	23,02	1,62	6,44	16,24	0,89
<i>V. cholera</i> KM 182	«	5·10 <sup>9</sup> м.к.	«	3,75	136	1,41	1,85	28,2	1,19	1,44	42,7	1,07
<i>V. cholera</i> KM 182	«	«	–	0,92	0,42	0,95	1,57	0,97	0,99	1,49	0,42	0,92

сываемые при обзорном гистологическом исследовании, рассматриваются как доброкачественные, характеризующие безвредность или эффективность испытуемых противохолерных вакцин. Предложенный способ характеристики качества противохолерных вакцин в значительной мере повышает информативность, обеспечивает объективность доклинических исследований новых препаратов и может служить основой для дальнейшего совершенствования принципов оценки их безопасности и эффективности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугоркова С.А., Кутырев В.В., Бугоркова Т.В., Куличенко А.Н. Способ оценки качества вакцинных препаратов против холеры: Патент РФ 2301075. Опубл. 20.06.07 Бюл. № 17.
2. Бугоркова С.А., Задумина С.Ю., Бугоркова Т.В., Лоцманова Е.Ю., Кравиц А.Л., Шуковская Т.Н., Кутырев В.В. Комплексный морфологический подход к оценке протективных свойств препаратов для специфической профилактики холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:31–4.
3. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Шкаруба Т.Т. Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах животных в динамике вакцинального процесса, вызванного живой чумной вакциной с иммуномодуляторами. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):50–3.
4. Голофеевский В.Ю. Введение в клиническую морфологию желудка и двенадцатиперстной кишки. СПб: ФОЛИАНТ; 2005. 109 с.
5. Ипатов Ю.П., Комарова Л.Г., Переслегина И.А., Шабунина Е.И. Ключи к проблеме гастроэнтерологических заболеваний у детей. Н.Новгород; 1997. 217 с.
6. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.
7. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 2004. 448 с.
8. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969. 423 с.
9. Першин Б.Б., Гелиев А.Б., Толстов Д.В., Ковальчук Л.В. Система лимфоцитов ткани пищеварительного тракта животных и перорально индуцированная иммунная толерантность. Иммунология. 2001; 6:10–19.
10. Полевщиков А.В. Методологические аспекты современной иммунологии. Рос. биомед. журн. 2004; 3:17–20.
11. Санитарные правила «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов» СП 3.3.2.561-96. М.: Информ. издат. центр Минздрава

- России; 1996. 127 с.
12. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 478 с.
13. Kabir S. Cholera vaccines: the current status and problems. Rev. Med. Microbiol. 2005; 16: 101–16.
14. Wright N.A. Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998; 353(1370):925–33.

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

1. Bugorkova S.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V., Kulichenko A.N. [Method of assessment of quality of vaccine preparations against cholera]. RF Patent 2301075. 2007 June 20.
2. Bugorkova S.A., Zadumina S.Yu., Bugorkova T.V., Lotsmanova E.Yu., Kravitsov A.L., Shchukovskaya T.N., Kutyrev V.V. [Complex morphological approach to assessment of protective properties of preparations for cholera specific prophylaxis]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 1:31–4.
3. Vityazeva S.A., Starovoiitova T.P., Dubrovina V.I., Medvedeva S.A., Grischenko L.A., Shkaruba T.T. [Morphological alterations in immunocompetent organs of animals in dynamics of vaccinal process caused by live plague vaccine with immunomodulators]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 3(97):50–3.
4. Golofeevskii V.Yu. [Introduction in Clinical Morphology of Stomach and Duodenum]. SPb.: FOLIANT; 2005. 109 p.
5. Ipatov Yu.P., Komarova L.G., Pereslegina I.A., Shabunina E.I. [The Keys to the Problem of Gastrointestinal Diseases in Children]. N.Novgorod; 1997. 217 p.
6. 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; 2(92):18–24.
7. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. M.: Triada-X; 2004. 448 p.
8. Merkulov G.A. [Course of Pathologistologic Techniques]. M.: Meditsina; 1969. 423 p.
9. Pershin B.B., Geliev A.B., Tolstov D.B., Kovalchuk L.V. [Lymphocyte system of the animal digestive tract tissue and immune tolerance induced per os]. Immunologia. 2001; 6:10–19.
10. Polevshchikov A.V. [Methodological aspects of modern immunology]. Ros. Biomed. Zh. 2004; 3:17–20.
11. [Sanitary Regulations “State Trials and Registration of New Medical Immunobiological Preparations” SR 3.3.2.561-96]. M.: Minzrav RF; 1996. 127 p.
12. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. [Microscopy Technique: Manual]. M.: Meditsina; 1996. 478 p.

Authors:

Bugorkova S.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Бугоркова С.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 10.03.10.