

С.А.Бугоркова, С.Ю.Задумина, В.В.Кутырев

РЕАКЦИЯ КЛЕТОК APUD-СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БИОМОДЕЛЕЙ НА ПОДКОЖНУЮ ИММУНИЗАЦИЮ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ *YERSINIA PESTIS* EB

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

Установлено, что реакция клеток APUD-системы отражает иммунологические и адаптационно-компенсаторные процессы в организме морских свинок, привитых подкожно вакцинным штаммом *Y. pestis* EB. Показана динамика изменения активности и количества апудоцитов в иммунокомпетентных органах в различные периоды иммуногенеза при противочумной вакцинации биомоделей. Применение количественной оценки содержания и функции апудоцитов в лимфондных органах и надпочечниках при вакцинном процессе, позволяя характеризовать адаптационно-компенсаторные реакции в организме биомодели, делает возможным сравнительный анализ реактогенности и безвредности разрабатываемых против этой инфекции вакцин на этапах их доклинического испытания.

Ключевые слова: вакцинный штамм EB, апудоциты, иммунизация, адаптационно-компенсаторные реакции.

Вакцинация является эффективным средством борьбы с чумой, но в силу своей реактогенности живая вакцина вызывает в макроорганизме сложный комплекс нейрогуморальных, метаболических и морфологических сдвигов [4], строгий учет которых позволит охарактеризовать безопасность как имеющихся, так и вновь создаваемых противочумных вакцин.

При вакцинации происходит мобилизация иммунной системы и тесно связанной с ней нейроэндокринной или APUD-системы [8]. Наличие большого числа апудоцитов в различных органах, в том числе и иммунокомпетентных, химическая общность действия основных регуляторных пептидов позволяют считать APUD-систему одной из систем реагирования, контроля и защиты макроорганизма [1, 10, 16]. Новый подход к выяснению роли апудоцитов в иммуногенезе при противочумной вакцинации на основе изучения их реакции в функционально значимых системах макроорганизма, расширяя представления о механизмах нейроиммуноэндокринных взаимоотношений, может быть применен для разработки методов оценки безопасности и эффективности противочумных вакцин и коррекции нарушений иммунного статуса при вакцинации ими.

Цель работы – охарактеризовать в динамике иммунологические и адаптационно-компенсаторные процессы в организме морских свинок, подкожно иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EB, по реакции клеток APUD-системы.

Материалы и методы

Три группы морских свинок массой 400 г (27 особей) иммунизировали подкожно в область правого бедра взвесью двухсуточной агаровой культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EB (линии НИИЭГ) в дозах $1 \cdot 10^7$, $2 \cdot 10^9$ или $1,5 \cdot 10^{10}$ м.к. в 2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Контрольным животным (3 особи) аналогично вводили 2 мл изото-

нического раствора хлорида натрия. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 сут, вскрывая умерщвленных хлороформом морских свинок на 3-и, 7-е и 14-е сутки.

Для гистологического исследования кусочки внутренних органов (печени, почек, сердца, легких, селезенки, тимуса, надпочечников), лимфатических узлов (ЛУ, регионарных, контрлатеральных, отдаленных) и кожи места введения культуры фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, а затем проводили по общепринятой схеме обработки материала для гистологического исследования [7]. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали раствором гематоксилина и эозина [6], импрегнировали раствором нитрата серебра по Гримелиусу [13] для выявления аргирофильных (АГ) апудоцитов и по Массону в модификации Гамперля [9] – для выявления аргентафинных (АТ). Готовые препараты просматривали в микроскопе Olympus CX31 с тринокулярном, выполняя подсчет апудоцитов в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов органов при увеличении 400 (селезенка, тимус, лимфатические узлы, легкие, надпочечники) и при увеличении 200 (двенадцатиперстная кишка), оценивая морфофункциональное состояние клеток по степени заполнения их аргирофильным или аргентафинным веществом. Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и обсуждение

При макроскопическом исследовании на 3-и сутки после иммунизации морских свинок в месте введения обнаруживали небольшие очаги уплотнения тканей, умеренное полнокровие сосудов и очаговый отек подкожной клетчатки только при использовании максимальной дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EB ($1,5 \cdot 10^{10}$ м.к.). К 7-м суткам эти изменения уже не регистрировались. Гистологические изменения у

животных этой группы характеризовали очаговую тканевую реакцию – выраженную воспалительную инфильтрацию полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПМЯЛ) вокруг микробных скоплений. На введение меньших доз к 3-м суткам наблюдали незначительную межтканевую мононуклеарную инфильтрацию. В последующие сроки (7–14-е сутки) видимых изменений не находили, и при гистологическом исследовании ни в одном случае не отмечали рубцовых изменений.

Использование наименьшей дозы *Y. pestis* EB вызывало в регионарных лимфатических узлах (РЛУ) минимальные воспалительные изменения (в виде незначительного расширения маргинального синуса и явлений катара синусов мозгового вещества) отчетливее всего выраженные на 7-е сутки.

В течение всего периода наблюдения у животных всех групп преобладали признаки, характеризующие активный иммунный ответ. Об этом свидетельствовали: гиперплазия клеток с накоплением бластических элементов в Т-зоне, нарастающая от значительной до резкой степени выраженности; активация светлых центров фолликулов (В-зоны), ко-

торая постепенно стихала к 13-м суткам, сменяясь гиперплазией клеток в мозговых тяжах (В-зоны), где на фоне плазмобластической реакции даже формировались светлые центры в юкстамедуллярной зоне.

Данные по изменению количества клеток APUD-системы в лимфатических узлах и других органах представлены в таблице. После иммунизации дозой $1 \cdot 10^7$ м.к. динамику реакции клеток APUD-системы в РЛУ характеризовало плавное колебание количества АТ клеток вокруг контрольного значения и достоверное снижение числа АГ клеток на 3-и и 14-е сутки с относительным накоплением нейроэндокринных клеток (НЭК) к 7-м суткам. При введении *Y. pestis* EB в дозе $2 \cdot 10^9$ м.к. отмечали достоверное снижение количества АТ клеток на 3-и, а АГ – на 7-е сутки, но на 14-е сутки число и тех, и других НЭК превышало аналогичные показатели у контрольных животных. Максимальная иммунизирующая доза ($1,5 \cdot 10^{10}$ м.к.) вызывала резкое опустошение АТ клеток к 7-м суткам и увеличение их количества к 14-м, в то время как число АГ элементов на протяжении всего срока наблюдения не достигало контрольных значений.

В контрлатеральных и отдаленных ЛУ изме-

Динамика реакции клеток APUD-системы у морских свинок, иммунизированных подкожно вакцинным штаммом *Y. pestis* EB

Орган / окраска	Иммунизирующие дозы вакцинного штамма <i>Y. pestis</i> EB									Интактный контроль
	1·10 ⁷ м.к			2·10 ⁹ м.к			1,5·10 ¹⁰ м.к			
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	
Легкие										
Массон	2,6+0,23	2,0+0,89	2,8+0,69	4,1+0,90	3,1+0,05	3,8+0,75	3,4+0,23	5,5+1,04*	2,6+0,72	3,6+0,50
Гримелиус	1,7+0,65	0,9+0,07*	1,3+1,01	2,6+0,89	1,8+0,64*	1,9+0,55*	2,4+0,32	3,2+0,64	1,6+0,23*	3,9+1,52
Группа регионарных лимфатических узлов										
Массон	3,1+0,35	4,2+1,56	3,1+0,65	2,4+0,61*	2,5+0,28	4,8+2,11	3,8+1,11	0,9+0,61*	4,1+0,07	3,3+0,68
Гримелиус	1,5+0,89*	2,9+0,61	1,2+0,46*	3,3+0,89	2,5+0,29*	4,6+1,58	2,3+0,32	2,7+0,51	2,3+0,51	3,7+0,50
Группа контрлатеральных лимфатических узлов										
Массон	2,7+0,75	2,5+1,04	4,1+1,12*	2,2+0,90	4,5+0,76*	3,6+0,65	5,0+2,31*	2,7+1,82	4,0+1,15	2,7+0,51
Гримелиус	1,1+0,47	0,9+0,02*	1,5+0,5	2,7+1,17	4,8+0,64*	3,7+0,89	2,4+0,30	2,4+1,50	3,7+0,51	2,2+0,53
Группа отдаленных лимфатических узлов										
Массон	4,9+1,09	3,2+1,06	4,4+1,28	3,3+0,90	5,2+0,69*	2,9+1,05	1,5+0,54*	3,4+1,05	5,0+1,02*	3,8+1,51
Гримелиус	3,1+1,07	2,9+0,69	2,4+0,5	2,9+0,61	4,9+0,61*	6,6+2,57*	1,7+0,61	2,0+1,10	2,8+0,52	2,8+0,64
Тимус										
Массон	3,6+1,59	18,1+1,18*	2,1+1,12	6,5+1,2*	2,7+1,01	2,4+0,84	2,9+0,89	2,1+0,06	3,1+0,06	2,1+0,95
Гримелиус	2,7+1,17	15,3+2,47*	1,8+0,53	3,8+0,9	3,2+0,64	1,9+0,06	1,6+0,31	3,5+2,02	2,8+0,12	2,8+1,01
Селезенка										
Массон	3,8+0,53	3,7+0,17	2,7+0,51*	2,2+0,65*	5,5+0,29	4,1+0,87	3,9+0,06	2,2+0,53*	3,8+0,11	5,6+0,35
Гримелиус	2,4+0,89*	2,6+1,09	2,7+0,52	2,1+0,36	2,4+1,05	3,6+0,92	3,8+1,50	3,1+2,06	2,8+0,12	3,7+0,64
Надпочечники										
Массон	5,4+2,44	2,5+0,51*	2,4+0,42*	3,5+0,89*	2,5+1,04*	2,3+1,07*	2,8+0,52*	4,7+2,14*	2,8+0,64*	7,1+1,05
Гримелиус	3,1+1,45	1,9+0,75*	1,9+0,51*	3,6+1,44	2,7+1,02	3,2+1,01	1,8+0,61	1,4+0,52*	2,9+1,53	3,7+0,64

* $p < 0,05$

нения характеризовали менее интенсивный иммунный ответ: активность Т- и В-зон к 7-м суткам колебались от незначительной (при дозе $1 \cdot 10^7$ м.к.) до выраженной (при дозе $2 \cdot 10^9$ м.к.), а умеренные воспалительные явления (лимфаденит, периаденит, в том числе с продуктивной реакцией) в основном встречались при иммунизации максимальной из использованных доз.

В контрлатеральных ЛУ после введения *Y. pestis* EB в дозе $1 \cdot 10^7$ м.к. при общей тенденции к снижению числа АГ клеток во все сроки по сравнению с контрольным уровнем достоверным оно было на 7-е сутки, а количество АТ элементов, напротив, достоверно возрастало к 14-м. С увеличением дозы иммунизации ($2 \cdot 10^9$ м.к.) максимальные показатели активности как АГ, так и АТ клеток наблюдали к 7-м суткам, с последующим некоторым снижением их числа к 14-м. Максимальная иммунизирующая доза вызывала резкий подъем числа АТ клеток уже к 3-м суткам, а количество АГ элементов в течение всего периода наблюдения превышало контрольный уровень, особенно на 14-е сутки.

При иммунизации *Y. pestis* EB в дозе $1 \cdot 10^7$ м.к. в отдаленных лимфатических узлах наблюдали умеренное колебание числа НЭК, достоверно не отличающееся от контрольных показателей. С увеличением иммунизирующей дозы ($2 \cdot 10^9$ м.к.) регистрировали выраженную активацию обоих видов НЭК к 7-м суткам, и количество АГ клеток росло вплоть до 14-х суток. При максимальной иммунизирующей дозе после начального снижения уровня АТ клеток на 3-и сутки происходило существенное накопление их к 14-м суткам, а число АГ элементов, несколько сниженное в первые два срока, к 14-м суткам так и не превысило контрольный уровень.

В селезенке реакция клеток белой и красной пульпы на введение *Y. pestis* EB в целом характеризовалась высокой интенсивностью. Гиперплазия клеток в органе достигала максимальной степени выраженности в период с 3-х по 7-е сутки. Это проявлялось увеличением размеров мальпигиевых телец, накоплением в их Т- и В-зонах значительного числа бластических форм лимфоцитов, формированием крупных высокоактивных светлых центров. В перитрабекулярных скоплениях (ПТС) красной пульпы, значительно или умеренно выраженных, на пике гиперплазии клеток белой пульпы на 7-е сутки определялись лимфобласты. Помимо лимфобластов в ПТС и в других участках красной пульпы после введения *Y. pestis* EB в дозах $2 \cdot 10^9$ и $1,5 \cdot 10^{10}$ м.к. присутствовали в виде небольшой примеси ПМЯЛ, что указывало на развитие очагового инфекционного спленита. С 3-х суток значительно возрастали число и активность макрофагов и стромальных элементов – ретикулярных клеток, активность которых, хотя и сниженная, сохранялась вплоть до 14-х суток. На этом фоне количество АГ и АТ клеток в селезенке во всех случаях было несколько ниже контрольных показателей.

В тимусе признаки гиперплазии клеток и телец

Гассалья выявлялись в течение всего периода наблюдения. Клетки APUD-системы отвечали максимальной активацией на 7-е сутки при иммунизации *Y. pestis* EB в дозе $1 \cdot 10^7$ м.к. и на 3-и – при иммунизации в дозе $2 \cdot 10^9$ м.к. А высокая иммунизирующая доза вызывала даже некоторое торможение активации НЭК: АГ на 3-и, а АТ – на 7-е сутки.

Описанные изменения апудоцитов в лимфоидных органах, происходящие в ответ на введение вакцинного штамма *Y. pestis* EB, отражают регуляторные свойства синтезируемых этими клетками биологически активных веществ (БАВ) и пептидов. Активация НЭК тимуса в период с 3-х по 7-е сутки, коррелирующая с процессами активации лимфоидных элементов в органе, согласуется с данными о роли этого органа как координатора молекулярных и клеточных нейроэндокринных взаимодействий [14, 15]. Способность тимусных эпителиальных клеток (ТЭК) секретировать такие БАВ, как серотонин, мелатонин, гистамин и другие [2], и продуцировать сигнальные молекулы – цитокины, играющие важную роль в дифференцировке и пролиферации тимоцитов [5], позволяет предположить участие НЭК не только в иммуномодулирующих процессах, но и в ограничении алергизирующих и общетоксических реакций макроорганизма. В периферических органах иммунной системы первоначально регистрируемое снижение количества апудоцитов, направленное на стимуляцию иммунной реакции, в последующем сменяется увеличением их числа, способствуя ограничению интенсивности процесса [10]. С увеличением дозы *Y. pestis* EB развивающиеся явления острого лимфаденита в РЛУ, по-видимому, сопровождались более ранней (до 3-х суток) активацией апудоцитов, в первую очередь АТ клеток, а к 7-м суткам активность этих элементов резко уменьшалась. К 14-м суткам, когда явления острого воспаления стихают, число НЭК начинает нарастать, что может быть отражением регуляторного влияния продуктов секреции этих клеток на различные компоненты или фазы воспалительного процесса.

В легких у животных до 7-х суток отмечали периваскулярную мононуклеарную инфильтрацию и умеренное полнокровие сосудов и капилляров, к концу периода наблюдения эти проявления заметно ослабевали. При иммунизации большими дозами у отдельных животных обнаруживали мелкие очаги утолщения межалвеолярных перегородок за счет инфильтрации их пролиферирующими гистиоцитами и лимфоидными элементами. Количество АТ элементов было аналогично контрольному уровню при иммунизации в дозе $1 \cdot 10^7$ и $2 \cdot 10^9$ м.к., но достоверно увеличивалось к 7-м суткам после введения *Y. pestis* EB в дозе $1,5 \cdot 10^{10}$ м.к. Ультраструктура эндокринных клеток бронхиального эпителия сходна с ЕС-клетками в кишечнике [12], а физиологический эффект продуктов их секреции предполагает региональный контроль за вентиляцией и перфузией в органе. Поэтому реакция апудоцитов в легких является отражением

нарушенного перфузионно-вентиляционного отношения (ПВО), что наблюдается, например, при использовании больших доз *Y. pestis* EV. ПВО определяли по отношению площади действующих альвеол к площади капилляров на единицу площади среза. Так, при иммунизации животных $1 \cdot 10^7$ и $2 \cdot 10^9$ м.к. ПВО к 7-м суткам составляло – 30,12 и 27,82 соответственно. Этот показатель у животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе $1,5 \cdot 10^{10}$ м.к., составлял 10,01 и был в 3 раза ниже контрольного (30).

В миокарде и почках регистрировались лишь признаки функционального напряжения паренхиматозных элементов и незначительного полнокровия сосудов.

В печени встречали очаги баллонной дистрофии гепатоцитов от резкой в ранний срок до значительной и умеренной в поздние сроки, наблюдали умеренную пролиферацию звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и мелкие мононуклеарные инфильтраты (до 10 клеток) как вокруг сосудов, так и внутри печеночных долек.

В надпочечниках отмечали очаговое, умеренное или значительное, сужение клубочковой зоны коркового вещества, а также обеднение липоидами сетчатой и/или пучковой зон на 3-й и 7-е сутки. Наблюдалось снижение феохромии мозгового вещества от умеренной до значительной степени на 7–13-е сутки в зависимости от дозы вводимого штамма *Y. pestis* EV. Реакция клеток APUD-системы была однотипной независимо от иммунизирующей дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EV и заключалась в резком угнетении в первую очередь АТ элементов в интервале с 3-х по 7-е сутки. Эта реакция апудоцитов укладывается в характеристику стрессорных реакций макроорганизма и подтверждается колебанием концентрации БАВ в крови в ранние сроки после введения препаратов [3, 11].

Таким образом, учет количества апудоцитов в иммунокомпетентных органах, легких и надпочечниках при противочумной вакцинации позволяет судить не только о направленности процессов иммуногенеза, но и о стрессорной реакции макроорганизма на введение различных использованных доз вакцинного штамма *Y. pestis* EV и может быть рекомендован к применению для сравнительной оценки реактогенности и безвредности вновь разрабатываемых противочумных вакцин на этапах их доклинического испытания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействии регулирующих систем: нервной, эндокринной и иммунной. Усп. физиол. наук. 1996; 27(1): 3-19.
2. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология: факты и гипотезы. Пробл. эндокринологии. 1997; 1(43):3-9.
3. Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., Саяпина Л.В. Электрофоретическая подвижность и энергетический заряд адениловой системы лимфоцитов крови морских свинок, привитых против чумы субкультурами штамма *Yersinia pestis* EV с различной иммуногенностью. Биопрепараты. 2005, сентябрь. С. 17-20.
4. Бунин К.В., Гапченко К.Г. Прививочные реакции при иммунизации живыми вакцинами. М.: Медицина; 1970. 296 с.
5. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О. Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб; 2005. 102 с.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
7. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. – М.: Медицина; 1969. 423 с.
8. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М.; 2003.
9. Пирс Э. Гистохимия. Португалов В.В., редактор. М.: Изд-во Иностранная литература; 1962. 962 с.
10. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. APUD-система (обобщающие патологические и онкологические аспекты). Обнинск; 1993. Ч. 1-2. 172 с.
11. Щуковская Т.Н. Регуляция нейромедиаторами формирования специфической резистентности к особо опасным инфекциям. Аллергология и иммунология. 2000; 1(2):110-1.
12. Feyrter G.L. Über die peripheren endokrinen (parakrinen) Drüsen des Menschen. Wien-Dusseldorf. W.Maudrich, 1953. 231 s.
13. Grimelius L. A silver nitrate stain for 12 cells in human pancreatic islets. Acta Soc. Med. upsaliensis. 1968. 73:243-70.
14. Manley N.R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. Semin. Immunol. 2000; 12(5):421-8.
15. Maroder M., Bellavista D., Vacca A. et al. The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000; 217:741-7.
16. Toni D.R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. J. Endocrinol. Invest. 2004; 27 Suppl. 6:35-47.

S.A.Bugorkova, S.Yu.Zadumina, V.V.Kutyrev

Reaction of APUD-System Cells of Experimental Biomodels to Subcutaneous Immunization by *Yersinia pestis* EV Vaccine Strain

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe"

It was stated that the reaction of APUD-system cells reflects immunologic and adaptive-compensatory processes in the organisms of guinea-pigs subcutaneously inoculated by *Y. pestis* EV vaccine strain. Shown was the dynamics of changing of activity and quantity of apudocytes in immunocompetent organs in different periods of immunogenesis after anti-plague vaccination of biomodels. Implementation of quantitative assessment of content and function of apudocytes in lymphoid organs and adrenals during vaccination process allows characterizing the adaptive-compensatory reactions in biomodel organism and makes it possible to comparatively analyze reactogenicity and safety of vaccines developed against this infection on the stages of their preclinical trials.

Key words: EV vaccine strain, apudocytes, immunization, adaptive-compensatory reactions.

Поступила 20.02.08.