

С.А.Витязева¹, Т.П.Старовойтова¹, В.И.Дубровина¹, С.А.Медведева²,
Л.А.Грищенко², Т.Т.Шкаруба¹

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ ЖИВОТНЫХ В ДИНАМИКЕ ВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОЦЕССА, ВЫЗВАННОГО ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ С ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ

¹ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,
²Институт химии СО РАН, Иркутск

Для выяснения возможности усиления специфического иммунитета против чумы в качестве иммуномодуляторов избраны арабиногалактан, изолированный из лиственницы сибирской *Larix sibirica*, и его нанобиокомпозиаты железа и кобальта. Проведен сравнительный морфометрический анализ состояния органов иммунной системы белых мышей, привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ), и ее сочетание с иммуномодуляторами. Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о том, что арабиногалактан и нанобиокомпозиаты на его основе при сочетанном применении с ЖЧВ усиливают иммуноцитопозитическую функцию органов иммунной системы в большей степени, чем ЖЧВ.

Ключевые слова: живая чумная вакцина, иммунитет, иммуномодуляторы, иммунокомпетентные органы.

Практика многолетнего применения живой вакцины для профилактики чумы позволяет считать этот препарат достаточно эффективным, но не лишенным ряда недостатков, к которым относятся относительная реактогенность, выраженное аллергизирующее действие, снижение защитных свойств при заражении атипичными штаммами возбудителя чумы, а главное непродолжительность вызываемого иммунитета [4].

Создание новых и усовершенствование уже имеющихся вакцин тесно связано с поиском адекватных методических приемов оценки ответной реакции макроорганизма на введение вакцинных препаратов. В этой связи характеристика изменений показателей клеточного состава иммунокомпетентных органов, обусловленных вакцинацией, занимает важное место при оценке препаратов специфической профилактики инфекционных заболеваний [8], а традиционные методы регистрации морфологических изменений, оставаясь базовыми, должны дополняться системным количественным исследованием [1, 3].

Ранее нами [5] показано, что для стимуляции специфического иммунитета при чуме может быть использован препарат природного происхождения – арабиногалактан лиственницы сибирской (*Larix sibirica*, АГ) и синтезированные на его основе наноразмерные металлосодержащие композиции: феррогал (железосодержащее производное арабиногалактана) и кобальтсодержащее производное арабиногалактана (КСПА) [2]. Все три препарата водорастворимы, не токсичны, не пирогенны для экспериментальных животных и не вызывают значительных изменений клеточного состава иммунокомпетентных органов.

Цель настоящего исследования состояла в отслеживании динамики морфологических изменений в селезенке и лимфатических узлах экспериментальных животных при сочетанном введении живой чумной вакцины с АГ, феррогалом или КСПА.

Материалы и методы

В качестве экспериментальной модели в опытах использовали 103 белые мыши весом 18–20 г. Мышей опытной группы подкожно иммунизировали *Yersinia pestis* EV (ЖЧВ) в дозах 10^5 м.к. (ID_{50}), а также вводили в тех же дозах ЖЧВ в сочетании с АГ, феррогалом или КСПА (2 мг/кг). Контролем служили интактные животные. Белых мышей всех групп выводили из эксперимента под наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2003 г.) через 3, 7, 14, 21 сут от момента иммунизации.

Материал (регионарные лимфатические узлы и селезенка) фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезжизивали в этиловом спирте возрастающей концентрации, заливали в парафин.

В работе использовали методы обзорной микроскопии с применением окрасок гематоксилином-эозином, метиловым зеленым-пиронином [7]. Количественную оценку клеточного состава и объемных долей коркового и мозгового вещества лимфатического узла, а также белой и красной пульпы селезенки проводили с использованием морфометрии [1] и компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2) в следующих структурных компонентах: лимфатический узел – герминативный центр (реактивный) и корона лимфатического фолликула [6]; селезенка – периартериальная зона, реактивный центр, мантийная и красная зоны лимфатического фолликула (100 измерений в различных участках на 5 срезах). Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение 1392×1040 пикселей, об. 100 и программы «ВидеоТест-Морфология», версия 4 (Санкт-Петербург). Подсчитывали число следующих видов клеток: бластные формы клеток, малые лимфоциты, лимфоциты (большие и средние), плазма-

тические клетки, макрофаги, а также стромальные элементы. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Статистика», версия 6 (Новосибирск). Достоверными оценивали различия при уровне значимости $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$.

Результаты и обсуждение

Лимфоузлы и селезенка первыми из органов иммунитета встречаются с антигенным раздражителем. Первичная иммунная реакция в этих органах после введения вакцинного штамма чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ к 3-м суткам проявляется активацией центров размножения за счет увеличения содержания бластных форм клеток (в 1,5–3,5 раза по сравнению с контролем), достигая к 7-м суткам (в 3,0–4,0 раза больше, чем в контроле) максимальных показателей. В связи с тем, что к 7–14-м суткам происходит выход лимфоцитов из центра размножения, наблюдается повышение количества малых лимфоцитов в короне лимфатического узелка (в 1,2–1,5 раза, $p \leq 0,05$) и мантийной зоне фолликула селезенки (в 2,0–2,5 раза, $p \leq 0,05$). Наблюдается увеличение к 7-м суткам количества плазматических клеток (от 0,2 до 9,0 абсолютного содержания клеток).

Клеточный состав иммунокомпетентных органов в процессе формирования иммунитета характеризуется значительным увеличением количества плазматических (в 10 раз по сравнению с контролем) и ретикулярных клеток (в 1,5–2,0 раза).

Таблица 1

Клеточный состав селезенки белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ (М±m)

Зоны	Клетки	Контроль	Срок наблюдения, сут			
			3	7	14	21
ПА	Л	47,6±0,2	55,4±1,2*	58,1±1,8*	58,4±0,9*	58,2±1,0*
	БК	5,8±0,4	9,4±0,4*	12,7±0,5*	9,6±0,4*	6,5±0,6
	РК	3,2±0,1	3,6±0,2	3,8±0,2	4,0±0,2	4,3±0,4
РЦ	МЛ	6,0±0,4	14,0±0,1**	14,6±0,7**	15,0±0,3**	15,6±1,0**
	Л	36,8±1,3	36,7±1,2	39,9±1,6	42,3±0,4*	41,6±1,7*
	БК	8,0±0,4	13,7±1,0**	24,3±1,3**	18,7±0,8**	10,9±0,9*
	РК	2,4±0,2	2,6±0,4	3,0±0,1	3,6±1,0	3,5±0,3
	МФ	2,2±0,2	2,2±0,4	2,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,2
МЗ	МЛ	10,6±1,4	19,2±0,9**	25,2±1,5**	23,8±0,8**	23,4±1,3**
	Л	59,7±1,2	65,6±1,6*	67,9±1,4*	68,3±0,3*	68,6±2,1*
	ПК	0,3±0,1	0,5±0,2	9,7±0,9**	6,9±0,6	3,6±0,2**
	РК	3,0±0,2	3,3±0,3	3,6±0,2	3,4±0,4	3,2±0,2
	МФ	1,4±0,1	1,8±0,2	1,7±0,1	1,6±0,3	1,3±0,2
КЗ	Л	52,6±0,9	54,6±1,3	56,7±1,4	58,4±0,7*	60,4±1,3*
	МФ	2,8±0,3	3,4±0,4	3,4±0,2	3,3±0,1	3,3±0,3

Примечания: МЗ – мантийная зона; РЦ – реактивный центр; КЗ – краевая зона; ПА – периартериальная зона; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; БК – бластные формы клеток; * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контролем); ** $p \leq 0,01$.

Количественные показатели клеток иммунокомпетентных органов у лабораторных животных после введения живой чумной вакцины по результатам серий экспериментов представлены в табл. 1, 2.

На основании результатов морфометрического исследования удалось установить, что сочетанное применение ЖЧВ и иммуномодуляторов вызывают изменения в микроанатомии структурных компонентов лимфатических узлов. У белых мышей, привитых как ЖЧВ, так и ЖЧВ в сочетании с АГ и феррогалом, имела место гиперплазия ткани фолликулов, но в большей степени выраженная при введении ЖЧВ с КСПА. Количество фолликулов со светлыми центрами у опытных животных возрастало уже к 3-м суткам после иммунизации, достигая максимума к 7-м суткам, что указывает на бласттрансформацию и пролиферацию лимфоцитов, и постепенно снижалось к 21-м суткам.

Так, на 3–7-е сутки в лимфатических узлах животных, получивших ЖЧВ совместно с иммуномодуляторами (2, 3, 4-я группы), по сравнению с животными, вакцинированными только ЖЧВ (1-я группа), наблюдалось увеличение объемных долей коркового вещества и паракортикальной зоны на 10,0–23,0 и 1,0–4,0 % ($p \leq 0,05$) соответственно. Причем, показатели тимусзависимой зоны (паракортикальной) оставались более высокими во 2, 3 и 4-й опытных группах. Начиная с 14-х суток, объемные доли мозгового вещества увеличивались на 3,6–5,4 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с 1-й группой, что связано с миграцией и накоплением антителообразующих клеток. Таким образом, в течение всего эксперимента у животных 2, 3 и 4-й опытных групп отмечалось плавное увеличение объема коркового вещества, что указывало на пролонгированное стимулирующее действие АГ, КСПА и феррогала на пролиферацию и миграцию лимфоцитов.

В лимфатических узлах животных, вакцинированных ЖЧВ в сочетании с иммуномодуляторами, к 3-м суткам наблюдается активация центров размно-

Таблица 2

Клеточный состав лимфоузлов белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ (М±m)

Зоны	Клетки	Контроль	Срок наблюдения, сут			
			3	7	14	21
РЦ	БК	4,4±0,3	15,5±1,7**	15,7±0,5**	9,0±0,3**	7,8±0,5**
	Л	47,5±1,3	42,4±1,7*	41,8±0,7**	43,7±0,6**	45,3±0,7
	МЛ	13,4±1,0	13,0±0,9	11,5±0,5	11,8±0,4	11,6±0,4
	РК	3,2±0,3	3,1±0,1	3,3±0,2	3,5±0,2	3,3±0,2
	МФ	1,0±0,1	1,8±0,1*	1,9±0,2*	2,6±0,1*	2,6±0,2*
КУ	МЛ	78,8±0,5	86,2±1,8*	89,2±2,0*	88,8±0,5*	84,0±1,6*
	РК	3,3±0,2	3,4±0,2	3,6±0,3	3,5±0,2	3,4±0,1
	ПК	0,2±0,1	2,2±0,2**	8,0±0,3**	6,4±0,4**	5,9±0,7**

Примечания: РЦ – реактивный центр; КУ – корона узелка; БК – бластные формы клеток; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контролем); ** $p \leq 0,01$.

жения за счет увеличения содержания бластных форм клеток (в 1,3–1,5 раза по сравнению с 1-й группой), достигая к 7-м суткам (в 1,2–1,5 раза больше чем в 1-й группе) максимальных показателей. В связи с тем, что к 7–14-м суткам происходит выход лимфоцитов из центра размножения, наблюдается повышение количества малых лимфоцитов в короне лимфатического фолликула (от 1,2 до 13,0 %). Увеличение содержания плазмочитов в этой зоне наблюдается к 7-м суткам (в 1,3–1,4 раза по сравнению с 1-й группой экспериментальных животных).

Количественные показатели клеток лимфатических узлов у лабораторных животных после введения ЖЧВ в сочетании с КСПА по результатам серий экспериментов представлены в табл. 3.

При исследовании гистологических срезов нами установлено, что в селезенке мышей, привитых ЖЧВ в сочетании с АГ, феррогалом или КСПА, имела место гиперплазия лимфатических фолликулов, приводящая к увеличению доли белой пульпы (от общего объема органа) на 2,0–6,0 % ($p \leq 0,05$) по сравнению с показателями 1-й группы животных. Показано, что к 3-м суткам в селезенке белых мышей 2, 3 и 4-й групп, по сравнению с 1-й, наблюдалась пролиферация лимфоцитов, приводящая к увеличению объемных долей периартериальных зон (от общего объема фолликула селезенки) в 2,2–3,1 раза. К 7–14-м суткам объемные доли реактивного центра и мантийной зоны селезенки опытных животных (2, 3, 4-й групп) на 1,2–1,7 и 1,3–1,8 % соответственно, превышали таковые показатели у мышей 1-й группы, а к 21-м суткам наблюдалось их снижение.

В реактивном центре и периартериальной зоне селезенки у мышей, иммунизированных комплексом ЖЧВ и иммуномодуляторами (АГ, КСПА или феррогал), в ранние сроки наблюдения имеет место увеличение количества малодифференцированных бластов от 8 до 27 % на 3-и сутки и от 16 до 35 % на 7-е (при $p \leq 0,05$) по сравнению с первой группой (жи-

вотные иммунизированные ЖЧВ). Таким образом, количество зрелых лимфоцитов как в мантийной, так и в краевой зонах увеличивается к 14–21-м суткам на 2–6 и 4–9 % (при $p \leq 0,05$) по сравнению с 1-й группой.

Во всех зонах лимфатического фолликула у животных экспериментальных групп к 7-м суткам наблюдения отмечено незначительное возрастание количества ретикулярных клеток и макрофагов, которые в реактивном центре селезенки участвуют в селекции лимфоцитов, а также фагоцитируют дефектные и погибшие клетки; в периартериальной зоне стимуляцию бласттрансформации Т- и В-лимфоцитов выполняют ретикулярные клетки. Причем, показатели ретикулярных клеток в этих двух зонах на 9–26 и 15–33 % (при $p \leq 0,05$) больше у животных 2, 3, и 4-й опытных групп, чем в 1-й. Количество макрофагов в реактивном центре, мантийной и краевой зонах селезенки мышей, иммунизированных ЖЧВ в сочетании с иммуномодуляторами, во все сроки наблюдения на 3–15; 27–38; 9–23 % соответственно больше, чем у животных 1-й группы. Это указывает на активацию фагоцитирующих клеток, которые обладают киллерной активностью, а также выполняют функцию как антигенпредставляющих, так и продуцирующих регуляторы иммунного ответа (цитокины), что в свою очередь имеет значение при чуме.

Установлено, что содержание плазматических клеток в мантийной зоне лимфатического фолликула селезенки во все сроки наблюдения у мышей 2, 3 и 4-й групп было выше, чем в 1-й группе, и достигало максимума на 7-е сутки с последующим снижением, причем характер снижения показателей неоднозначен.

Таким образом, изменения клеточного состава (увеличение бластоцитарной и плазмочитарной активности, гиперплазия ретикулярной ткани, лимфоидная гиперплазия) лимфатических фолликулов селезенки и лимфоузлов свидетельствует об усилении иммуноцитопоэтических функций органов иммунной системы, что является важным показателем перестройки организма в условиях антигенной стимуляции (иммунизации ЖЧВ). Полученные в ходе экспериментальной работы данные могут быть использованы как для прогнозирования развития патологических процессов, так и для степени заинтересованности иммунокомпетентных органов в адаптивном процессе к препаратам.

Арабиногалактан и нанобиокомпозиты на его основе (феррогал и КСПА) при сочетанном применении с ЖЧВ усиливают иммуноцитопоэтическую функцию органов иммунной системы в большей степени, чем ЖЧВ. Это обстоятельство открывает перспективы для изучения механизмов иммунокорректирующего действия препаратов растительного происхождения и синтезированных на их основе металло-содержащих нанокompозитов, а также возможность их использования в медицинской практике.

Таблица 3

Клеточный состав лимфоузлов белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ в сочетании с КСПА (М±m)

Зоны	Клетки	Срок наблюдения, сут			
		3	7	14	21
РЦ	БК	12,6±0,5*	18,0±0,4*	14,0±0,4*	10,6±0,2*
	Л	38,6±0,6	35,2±0,7*	36,8±0,4*	36,9±0,4
	МЛ	14,5±0,5*	11,1±0,3	12,8±0,3	11,9±0,4
	РК	2,2±0,2*	3,1±0,1	3,5±0,2	3,3±0,1
	МФ	2,1±0,1	2,5±0,1*	2,6±0,1*	2,2±0,2
КУ	МЛ	88,6±0,6	89,7±0,2*	92,1±0,2**	99,3±0,3**
	РК	3,1±0,2	3,6±0,1	4,2±0,1*	4,0±0,2*
	ПК	1,6±0,2	8,9±0,2	7,7±0,2*	6,8±0,3*

Примечания: РЦ – реактивный центр; КУ – корона узелка; БК – бластные формы клеток; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; * $p \leq 0,05$ (по сравнению с контролем); ** $p \leq 0,01$.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990. 384 с.
2. Александрова Г.П., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Дубровина В.И., изобретатели. Металлопроизводные арабиногалактана, способ получения металлопроизводных арабиногалактана. Патент РФ № 2194715 РФ, МПК А61 К 47/48. № 2000 121112; Заявл. 04.08.00; Отпубл. 20.12.02, Бюл. № 35.
3. Бугоркова С.А., Белобородов Р.А., Дальвадяц С.М. Морфологическая характеристика иммунокомпетентных органов морских свинок при ревакцинации живой и химической чумными вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):69–73.
4. Домарадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
5. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности к чуме, псевдотуберкулезу и туляремии [автореф. дис. д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 42 с.
6. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: МИА; 2002. 373 с.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
8. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В. Морфология. 2005; 4:20–4.

S.A.Vityazeva, T.P.Starovoitova, V.I.Dubrovina, S.A.Medvedeva,
L.A.Grischenko, T.T.Shkaruba

Morphological Alterations in Immunocompetent Organs of Animals in Dynamics of Vaccinal Process Caused by Live Plague Vaccine with Immunomodulators

Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk; Institute of Chemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Irkutsk

Arabinogalactane isolated from Siberian larch (*Larix sibirica*) and its iron and cobalt nanobiocomposites were selected as immunomodulators to elucidate the possibility of intensification of specific immunity against plague.

Comparative morphometric analysis of immune system organs of white mice inoculated with live plague vaccine (LPV) and its combination with immunomodulators was performed. Experimental data indicate that arabinogalactane and its nanobiocomposites used in combination with LPV increase immunocytopoietic function of immune system organs to larger extent than LPV.

Key words: live plague vaccine, immunity, immunomodulators, immunocompetent organs.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.988.21:576.8.097.3

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, Е.М.Храмкова, И.А.Шепелёв, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Т.А.Михеева, Н.Н.Кочкалова, М.Н.Киреев

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА F(ab')₂-ФРАГМЕНТОВ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПЕПСИНА

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

Разработана биотехнологическая схема получения F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина с помощью иммобилизованного пепсина. Определены оптимальные способы получения иммобилизованного пепсина, подобраны условия ферментативного гидролиза антирабического иммуноглобулина. Проведена оценка протективных свойств препарата F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина, полученного настоящим способом.

Ключевые слова: бешенство, антирабический иммуноглобулин, F(ab')₂-фрагменты, иммобилизованный пепсин.

Среди мер, применяемых для профилактики и лечения ряда инфекционных болезней, большое значение придается иммуноглобулиновым препаратам. Для постэкспозиционной профилактики гидрофобии в медицинской практике широко используется гетерологичный антирабический иммуноглобулин. Согласно данным ВОЗ, в настоящее время препараты гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются высокоочищенными и безопасными, однако у 1–2 % пациентов при его введении могут возникнуть побочные реакции [13].

Одним из направлений совершенствования антирабического иммуноглобулина представляется разработка способов дополнительной очистки с помощью ферментативного гидролиза иммуноглобулина с последующим хроматографическим фракционированием [8, 9]. В литературе описано применение различных ферментов для протеолиза иммуноглобулина. Таковыми являются пепсин, папаин, плазмин, химопапаин, фицин, бромелаин, ферменты микроорганизмов – *S. aureus* V8, грибов рода *Aspergillus* [1].

При воздействии пепсина на молекулу иммуноглобулина образуются один F(ab')₂-фрагмент и один Fc'-фрагмент. Способность связывать антиген сохраняется в F(ab')₂-фрагментах, а связывание компонента и связывание ткани сохраняется во фрагменте Fc. Таким образом, удаление Fc-части иммуноглобулина, приводит к ликвидации нежелательных взаимодействий с Fc-рецепторами тканей и уменьшает частоту побочных реакций.

Для ферментативной обработки иммуноглобулина весьма приемлемо использование иммобилизованных протеаз. Работа с иммобилизованными ферментами обеспечивает возможность их многократного применения и быстрого извлечения из реакционной среды, а также позволяет исключить стадию удаления остаточного фермента.

Материалы и методы

В работе использовали коммерческий препарат иммуноглобулина антирабического лошадиного производства РосНИПЧИ «Микроб». Для проведе-