

С.А.Бугоркова, Т.Н.Щуковская, А.Ф.Курылина**ЯДРЫШКОВЫЙ АППАРАТ ЛИМФОЦИТОВ КАК ИНДИКАТОР ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ВАКЦИН***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Изучено состояние ядрышкового аппарата лимфоцитов периферических лимфоидных органов лабораторных животных, иммунизированных против чумы и туляремии, для оценки прогностических возможностей применения этого параметра на этапах доклинической характеристики разрабатываемых вакцин против особо опасных инфекций. Для выявления активности аффинных к серебру белков в области ядрышкового организатора (AgNOR) полутонкие парафиновые срезы лимфоидных органов иммунизированных мышей линии BALB/c окрашивали по методу W.M.Howell и D.A.Black [10] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum. Установлено увеличение доли клеток с тремя и более AgNOR-позитивными ядрышками в ядрах лимфоцитов периферических органов иммунной системы биомоделей при оценке функционального состояния органов иммуногенеза у иммунизированных против чумы и туляремии животных, что косвенно отражает пролиферативный потенциал в клеточном звене иммунитета. Информативность количественной оценки пролиферативной активности клеток по изменению состояния AgNOR в ядрах лимфоцитов органов иммуногенеза позволяет рассматривать возможность включения этого метода в существующую схему морфологической оценки качества вакцин на доклиническом этапе.

Ключевые слова: периферические лимфоидные органы, лимфоциты, вакцинные штаммы, AgNOR, особо опасные инфекции.

S.A.Bugorkova, T.N.Shchukovskaya, A.F.Kurylina**Nucleolar Apparatus of Lymphocytes as an Indicator of Lymphoid Organs' Functional Activity in the Context of Pre-Clinical Vaccine Evaluation***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Studied has been the state of the nucleolar apparatus in lymphocytes of periphery lymphoid organs in laboratory animals vaccinated against plague and tularemia in order to evaluate predictive capability of the parameter in the context of pre-clinical evaluation of the vaccines under development, against particularly dangerous infections. For the detection of silver adjoining proteins, contained in the nucleolar organizer region (AgNOR), W.M.Howell and D.A.Black staining of semi-thin paraffin sections of lymphoid organs of the immunized BALB/c mice has been performed. For this purpose, ready-assembled panel, manufactured at BioVirtum, has been deployed. Under assessment of the functional state of immunogenesis organs in vaccinated against plague and tularemia animals revealed has been the increase in numbers of cells with three and more AgNOR-positive nucleoli in the nucleus of the lymphocytes of periphery organs of the biomodels' immune system. It indirectly manifests proliferative capacity of immune system cellular component. Informativity of the quantitative evaluation of the cell proliferative activity by the reference to the status changes of AgNOR in the nuclei of immunogenesis organs' lymphocytes makes it possible to entertain the possibility of introducing this method into the existing morphological vaccine quality assessment scheme at the stage of the pre-clinical trials.

Key words: periphery lymphoid organs, lymphocytes, vaccine strains, AgNOR, particularly dangerous infections.

Совершенствование и разработка современных, эффективных, безопасных, конкурентоспособных вакцин для профилактики особо опасных инфекционных болезней диктует необходимость оптимизации процесса оценки качества препаратов за счет применения современных информативных методов. В этой связи поиск новых и совершенствование существующих способов быстрой и эффективной оценки состояния клеточного звена иммунной системы организма не теряет своей актуальности.

В последние годы в морфологии и цитологии широкое применение получил метод определения функционального состояния клеток с помощью оценки активности области ядрышкового организатора (AgNOR) [6, 11, 12].

Иммунная система как одна из систем реагирования и контроля участвует во всех адаптационных реакциях макроорганизма [7]. Представительством этой системы в организме являются лимфоидные органы, неодинаковые по своему назначению и клеточному составу. В то же время любая форма иммунного ответа (гуморального или клеточного) является результатом сложных процессов кооперации между различными популяциями лимфоцитов, макрофагами, дендритными клетками, конечный полезный результат которых зависит от функциональной активности компонентов системы.

Известно, что основным компонентом всех лимфоидных органов выступает лимфоцит. Лимфоцит, принимая сигналы о любых изменениях внутренней

среды организма, модулирует свои функции с учетом восстановления общего гомеостаза. Этот принцип лежит в основе реакции иммунокомпетентных клеток, что делает их универсальными индикаторами нормы и патологии. Своеобразным показателем пролиферативной активности лимфоидных органов на молекулярном уровне может быть оценка процессов репликации в ядрах лимфоцитов и их изменение под влиянием вакцинации. При различных патологических состояниях или на фоне изменения функциональной активности в процессе формирования адаптивных реакций происходят изменения в ядрышковом аппарате клетки [2, 3, 5, 8, 12].

Целью работы было изучение состояния ядрышкового аппарата лимфоцитов периферических лимфоидных органов лабораторных животных, иммунизированных против чумы и туляремии, для оценки прогностических возможностей применения этого параметра на этапах доклинической характеристики вакцин против особо опасных инфекций.

Материалы и методы

Лабораторных мышей линии BALB/c массой (19±1) г подкожно в область правого бедра иммунизировали вакцинными штаммами в дозе 10⁴ м.к.: 1-я группа – *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; 2-я – *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ; 3-я – *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ в сочетании с иммуномодулятором синтетического происхождения азоксимера бромидом, который инокулировали подкожно перед иммунизацией в дозе 0,2 мг/кг массы животного; 4-я – контрольная (интактные животные, которым аналогичным образом вводили 0,2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида); 5-я – мыши, которым подкожно вводили только азоксимера бромид в дозе 0,2 мг/кг. Всего было использовано 35 животных по 7 в группе. На 7-е сутки после иммунизации животных умерщвляли хлороформом и для гистологического исследования брали кусочки селезенки и регионарных лимфатических узлов (РЛУ). Гистологический материал фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина. Дальнейшую обработку гистологического материала (проводку, заливку) проводили по стандартной схеме [4]. Готовые полутонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления активности аффинных к серебру белков в области ядрышкового организатора (AgNOR) полутонкие срезы лимфоидных органов окрашивали по методу W.M.Howell и D.A.Black [10] с использованием готового набора реактивов фирмы BioVitrum. Для оценки функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов в каждом случае с помощью светового микроскопа OLYMPUS CX 41 при увеличении ×1000 и программы VideoZavr 1.5 определяли диаметр лимфоцитов в зоне фолликулов селезенки и паракортикальной зоне регионарных лимфатических узлов, площадь ядер в них. Готовность лимфоцитов к пролиферации оценивали по методу J.Crocker и P.Nag

[9], основанному на выявлении зон активных ядрышковых организаторов, учитывая относительное содержание NOR-активированных клеток. Для этого анализировали состояние 300 ядер лимфоцитов и определяли среднее содержание AgNOR на 1 ядро, процентное содержание AgNOR-позитивных гранул (1, 2, 3 и более) на 1 ядро. Статистическую обработку результатов проводили с помощью стандартного пакета компьютерных программ «Excel» и «Statistica» 7.0.

Результаты и обсуждение

Аргирофильные кислые негистоновые белки ядрышка (C23, B23, UBF и РНК-полимераза I), ответственные за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, выявлялись при окраске в виде черных точек (гранул) – это места, где серебро связалось в клетке с кислыми протеинами, имеющими непосредственное отношение к транскрипции и преобразованию рРНК, а ядрышки приобретали коричневый цвет (рисунок). При этом содержание гранул серебра в ядрышках, как правило, соответствует количеству активно работающей в них РНК-полимеразы I [13].

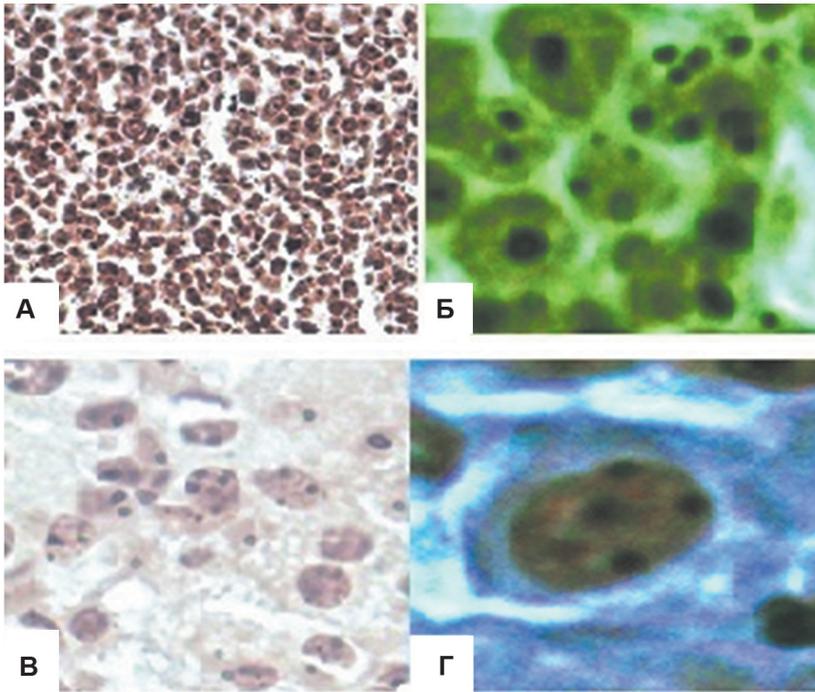
Проведение количественного учета ряда параметров аргентофилии ядрышка позволяет оценивать активность рибосомных генов [1], а следовательно, функциональное состояние клетки в целом.

При иммунизации мышей отмечали относительное увеличение среднего диаметра лимфоцитов фолликулов в периферических лимфоидных органах, но достоверных отличий в изменении среднего диаметра клеток не выявлено.

При разделении клеток по величине их диаметра на малые (М) – менее 6,5, средние (С) – 6,5–8,5 и большие (Б) – более 8 мкм, опирались на известные данные, что малые и средние лимфоциты включают 95 % Т-хелперов и около 50 % цитотоксических Т-лимфоцитов, большие – это большие гранулярные лимфоциты (НК-клетки), реже делящиеся лимфоциты [7].

Характеризуя клеточный состав лимфоцитов в лимфоидных органах иммунизированных животных по изменению величины их диаметра, наблюдали увеличение доли больших лимфоцитов. В селезенке максимальное увеличение количества больших лимфоцитов до 19,4 % (в интактном контроле – 1 %) выявляли у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ. В остальных группах этот показатель превышал контрольные значения не более чем в 4–6 раз. В РЛУ доля больших лимфоцитов была максимальной у мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с иммуномодулятором и составляла 16,1 % (в интактном контроле – 2 %), но во всех случаях увеличивалось количество средних лимфоцитов, за счет чего несколько снижался пул малых лимфоцитов.

Известно, что аргентофилия характерна для



Мышь линии BALB/c, 2-я группа. AgNOR-положительные области в лимфоцитах

A, B – селезенки. C, D – ЛЛУ. Импрегнация серебром по методу W.M.Howell и D.A.Black. Иммерсия $\times 1000$

белков, обогащенных сульфгидрильными, дисульфидными связями. Как уже указывалось, четкой аргентофилией обладают интерфазные ядрышки и зоны ядрышковых организаторов на митотических хромосомах.

Типичный фенотип лимфоцита при окраске азотно-кислым серебром представлен клеткой в среднем с 1–2 ядрышками преимущественно компактного или нуклеолонемно-компактного типа и, как правило, одной экстрануклеолярной гранулой. Ядра равномерно окрашены, интенсивность аргентофилии одинакова для большинства клеток изучаемой популяции.

Установлено, что в большинстве групп иммунизированных мышей готовность к пролиферации лимфоцитов селезенки и ЛЛУ превышает таковую у контрольных животных, о чем свидетельствует увеличение среднего показателя количества AgNOR-положительных ядрышек в ядрах клеток (таблица). Этот показатель в ЛЛУ всех иммунизированных животных превышал в той или иной степени аналогич-

ный в группе интактных животных. Что касалось селезенки, то достоверно относительное содержание AgNOR-положительных ядрышек увеличивалось в 1,6 раза по сравнению с интактным контролем только у мышей 1-й группы.

Менялось соотношение лимфоцитов селезенки с различным количеством AgNOR-положительных ядрышек по отношению к интактному животному (таблица). Если у мышей 1-й группы увеличивалось количество клеток с одним AgNOR-положительным ядрышком и умеренно нарастало число клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками, то у животных в 2-й и 3-й группах наблюдали перераспределение клеток за счет уменьшения доли ядер с одним ядрышком и увеличения количества клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками. Азоксимера бромид, введенный интактным животным, достоверно не изменял функциональное состояние лимфоцитов. В ЛЛУ у всех иммунизированных мышей (таблица) увеличивалось количество клеток с тремя и более AgNOR-положительными ядрышками.

Характеристика состояния области ядрышкового организатора (AgNOR) в лимфоцитах периферических лимфоидных органов иммунизированных мышей линии BALB/c (M \pm m)

Группа	Селезенка				Регионарные лимфатические узлы			
	Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцита	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %			Количество AgNOR на 1 ядро лимфоцита	Ядра с различным количеством гранул AgNOR, %		
		1	2	более		1	2	более
1-я	2,5 \pm 0,97*	67,7	22,6	9,7	2,06 \pm 0,64*	22,6	54,8	22,6
2-я	1,81 \pm 0,17	32,3	51,6	16,1	2,32 \pm 0,93*	22,6	51,6	25,8
3-я	1,94 \pm 0,62	32,3	38,7	29,0	2,13 \pm 1,12	25,8	51,6	22,6
4-я	1,53 \pm 0,32	41,9	51,6	6,5	1,59 \pm 0,17	61,3	29	9,7
5-я	1,33 \pm 0,13	41,9	58,1	0	1,96 \pm 0,19	41,9	56,1	2

*P<0,05 – различия достоверны по сравнению с интактным контролем.

Таким образом, оценка функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов органов иммуногенеза при вакцинном процессе позволяет косвенно характеризовать пролиферативный потенциал в клеточном звене иммунитета у иммунизированных биомоделей. Применение метода выявления AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах лимфоцитов лимфоидных органов иммунизированных биомоделей связано с возможностью быстрой и информативной количественной оценки пролиферативной активности клеток, основанной на характеристике функциональных изменений их генома, что позволяет рассматривать перспективность включения этого метода в существующую схему морфологического исследования на доклиническом этапе изучения разрабатываемых вакцин.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобров И.П., Авдальян А.М., Лазарев А.Ф., Климачев В.В., Климачева Т.Б., Мищенко Е.В. Морфофункциональная характеристика белков областей ядрышковых организаторов при гладкомышечных опухолях матки. *Арх. патол.* 2008; 70(3):18–23.
2. Брюхин Г.В., Пашнина Е.Н. Готовность к пролиферации лимфоцитов селезенки потомства крыс при хронической патологии печени матери. *Морфология.* 2005; 2:56–61.
3. Брюхин Г.В., Федосов А.А. Характеристика пролиферативной активности тимоцитов и лимфоцитов периферической крови потомства самок с хроническим экспериментальным поражением печени различной этиологии. *Морфология.* 2006; 129(1):57–9.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: ООО «Издательство СпецЛит»; 2010. 96 с.
5. Попков П.Н., Чапайкина А.М., Рябинин В.Е. Состояние активности ядрышковых организаторов в гепатоцитах крыс после индукции цирроза печени четыреххлористым углеродом и в динамике его лечения. *Мед. наука и образование Урала.* 2008; 2:66–8.
6. Райхлин Н.Т., Букаева И.А., Пробатова Н.А., Смирнова Е.А. Аргирофильные белки областей ядрышковых организаторов – маркеры скорости клеточной пролиферации. *Арх. патол.* 2006; 68(3):47–51.
7. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медицина; 2006. 311 с.
8. Чучкова Н.Н., Кормилина Н.В. Активность AgNOR's лимфоцитов лимфатических узлов при формировании атеросклероза у крыс. *Морфологические ведомости.* 2010; 4:74–8.
9. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8.
10. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.
11. Karki S., Jha A., Sayami G. The Role of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Study in Cytological Evaluation of Fluids, Especially for Detection of Malignancy. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2012; 10(37):44–7.

12. Vercosa B.L.A., Borges A.C.J., Mendes F.J.M., Costa M.L.S., Pereira N.B., Melo M.N., Mendonca I.L., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C. Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2011; 17(3):308–17.
13. Voit R., Schnapp A., Kuhn A., Rosenbauer H., Hirschmann P., Stunnenberg H.G., Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 1992; 11:2211–18.

References

1. Bobrov I.P., Avdalyan A.M., Lazarev A.F., Klimachev V.V., Klimacheva T.B., Mishchenko E.V. [Morphological-functional characteristics of nucleolar organizer region proteins in case of smooth muscle tumors of uterus]. *Arkh. Patol.* 2008; 70(3):18–23.
2. Bryukhin G.V., Pashnina E.N. [Preparedness to splenic lymphocytes proliferation in the brood of female rat with chronic liver pathology]. *Morfologiya.* 2005; 2:56–61.
3. Bryukhin G.V., Fedosov A.A. [Characteristics of proliferative activity of thymocytes and lymphocytes contained in periphery blood of brood from females with chronic experimental liver disorder of various etiology]. *Morfologiya.* 2006; 129(1):57–9.
4. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamentals Principles of Histological Technique]. St. Petersburg: "SpetsLit Publishing House" Ltd.; 2010. 96 p.
5. Popkov P.N., Chepaikina A.M., Ryabinin V.E. [The state of nucleolar organizers' activity in hepatocytes of rats after liver cirrhosis induction using carbon tetrachloride and with the treatment progression]. *Med. Nauka i Obrazovanie Urala.* 2008; 2:66–8.
6. Raikhlin N.T., Bukaeva I.A., Probatova N.A., Smirnova E.A. [Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions – markers of cell proliferation rate]. *Arkh. Patol.* 2006; 68(3):47–51.
7. Khaitov R.M. [Immunology]. M.: GZOTAR-Meditsina; 2006. 311 p.
8. Chuchkova N.N., Kormilina N.V. [Activity of AgNOR's lymphocytes of lymphatic glands in case of atherosclerosis development in rats]. *Morfologich. Vedomosti.* 2010; 4:74–8.
9. Crocker J., Nar P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.* 1987; 151:111–8.
10. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.
11. Karki S., Jha A., Sayami G. The Role of Argyrophilic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Study in Cytological Evaluation of Fluids, Especially for Detection of Malignancy. *Kathmandu Univ. Med. J.* 2012; 10(37):44–7.
12. Vercosa B.L.A., Borges A.C.J., Mendes F.J.M., Costa M.L.S., Pereira N.B., Melo M.N., Mendonca I.L., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C. Inflammatory response, parasite load and AgNOR expression in ear skin of symptomatic and asymptomatic *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dogs. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2011; 17(3):308–17.
13. Voit R., Schnapp A., Kuhn A., Rosenbauer H., Hirschmann P., Stunnenberg H.G., Grummt I. The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J.* 1992; 11:2211–18.

Authors:

Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Kurylina A.F. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Курылина А.Ф. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 01.12.14.