

С.А.Бугоркова, А.Ф.Курылина, Т.Н.Щуковская

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ НА ФОНЕ ИММУНОМОДУЛЯЦИИ

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

Цель работы. Определение характера и динамики морфофункциональных изменений в органах периферической иммунной системы мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции. **Материалы и методы.** С помощью комплекса гистологических, гистохимических, иммуногистохимических методов, с применением морфометрического анализа охарактеризована направленность иммунологических процессов в периферических лимфоидных органах мышей линии BALB/c. **Результаты и выводы.** Установлено стимулирующее влияние полиоксидония в схеме сочетанного применения с *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на процессы пролиферации клеток в Т-зонах лимфоидных органов, на активацию в них субпопуляции Т- и В-лимфоцитов по увеличению доли специфически окрашенных маркером CD25 клеток и ядер лимфоцитов с большим содержанием аргирофильных гранул, косвенно характеризующих функциональное состояние ядерного аппарата в них, а также на интенсификацию реакции клеток нейроэндокринного окружения лимфоидных структур. По результатам комплексного морфологического анализа детализированы особенности морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах биомодели, свидетельствующие о перспективности применения полиоксидония с целью повышения эффективности противочумной вакцинации.

Ключевые слова: чумная вакцина, иммуномодулятор, органы иммуногенеза.

Корреспондирующий автор: Светлана Александровна Бугоркова, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

S.A.Bugorkova, A.F.Kurylina, T.N.Shchukovskaya

Morphological-Functional Characteristics of Immune Competent Organs of BALB/c Mice in Case of Vaccination with *Yersinia pestis* NIEG Strain against the Background of Immune Modulation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to specify the character and dynamics of morpho-functional changes in the organs of peripheral immune system of BALB/c mice in case of immunization with vaccine *Yersinia pestis* EV NIEG strain against the background of immune modulation. **Materials and methods.** Applying a combination of histological, histo-chemical, immune histo-chemical methods, and morphometric analysis, defined has been the targeting of immunological processes in peripheral lymphoid organs of BALB/c mice. **Results and conclusions.** Revealed has been stimulating effect of polyoxidonium in concomitant use of *Yersinia pestis* EV NIEG, on the processes of cell proliferation in T-zones of lymphoid organs, on activation of T- and B-lymphocyte sub-population in them by reference to the increment in the amount of specifically stained with CD25 marker cells and nuclei of lymphocytes with high argyrophil granule content, indirectly characterizing the functional state of nuclei apparatus, as well as on response intensification of neuroendocrine environment of lymphoid structures. Based on the results of complex morphological analysis, specified have been the peculiarities of morphofunctional changes in immune competent organs of biomodels, being indicative of polyoxidonium potential to increase the effectiveness of vaccination against plague.

Key words: plague vaccine, immune modulator, organs of immunogenesis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Svetlana A. Bugorkova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Bugorkova S.A., Kurylina A.F., Shchukovskaya T.N. Morphological-Functional Characteristics of Immune Competent Organs of BALB/c Mice in Case of Vaccination with *Yersinia pestis* NIEG Strain against the Background of Immune Modulation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 2:58–62. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-58-62

Применяемая для специфической профилактики чумы в России живая вакцина (ЖЧВ), представляющая собой лиофилизированную живую культуру вакцинного штамма чумного микроба *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, вызывает развитие иммунитета у вакцинированных длительностью до 1 года [2]. Одним из способов воздействия на механизмы про-

лонгации напряженного иммунитета при чуме является использование иммуномодуляторов.

Препарат азоксимера бромид (полиоксидоний), относящийся к высокомолекулярным химически чистым иммуномодуляторам, получаемый с помощью направленного химического синтеза, представляет собой N-оксидированное производное по-

лиэтиленпиперазина с молекулярной массой около 100 кДа [13]. Полиоксидоний характеризуется широким фармакологическим воздействием на организм, но главным образом изучен его иммуномодулирующий эффект [7]. Известно, что в условиях макроорганизма этот препарат не только активирует клеточный и гуморальный иммунитет посредством запуска каскада многогранных реакций клеток моноцитарно-макрофагальной системы, но и оказывает воздействие на нейроэндокринную систему [8].

Возможность применения иммуномодулирующих препаратов в схемах противочумной вакцинации [3, 9, 10] диктует необходимость комплексного морфофункционального контроля состояния органов иммуногенеза при сочетанном использовании ЖЧВ и иммуномодулятора.

Цель данной работы – определить характер и динамику морфофункциональных изменений в органах периферической иммунной системы мышей линии BALB/c при иммунизации вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на фоне иммуномодуляции.

Материалы и методы

Противочумный вакцинный процесс моделировали на мышах линии BALB/c массой 18–20 г (60 особей) путем подкожного введения $2,5 \cdot 10^4$ м.к. вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ в соответствии с приложением 7 методических указаний [5]. Содержание и уход за животными выполняли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Мышам 1-й группы за час до иммунизации вакцинным штаммом *Y. pestis* EV подкожно в дозе 0,2 мг/кг вводили полиоксидоний (ПО), животным 2-й группы аналогичным образом была введена только культура вакцинного штамма *Y. pestis* EV. В качестве контрольных были взяты интактные мыши, которым подкожно инокулировали физиологический раствор (К1) или ПО (К2). Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14 и 21-е сутки с помощью хлороформа. Периферические лимфоидные органы (селезенка, регионарные (РЛУ) к месту введения и отдаленные (ОЛУ) лимфатические узлы) фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, дальнейшую обработку гистологического материала проводили по стандартной схеме [4]. Готовые полутонкие парафиновые срезы для обзорной микроскопии окрашивали гематоксилином и эозином.

Уровень пролиферативной активности Т- и В-зон характеризовали полуколичественным методом по 3-балльной шкале (от 0 до 3): 0 баллов – отсутствие активности; 1 балл – слабовыраженная активность; 2 балла – умеренно выраженная активность; 3 балла – резко выраженная активность. Применительно к фолликулам лимфатических узлов, представляющих собой В-зоны, к высокоактивным (3 балла) относили структуры с так называемыми светлыми центрами,

богатыми бластными формами клеток, с наличием митозов, с макрофагами, содержащими осколки ядер. На среднюю степень активности фолликулов (2 балла) указывали: увеличение в светлых центрах числа эпителиоидных клеток, четкий периферический ободок из малых лимфоцитов вокруг центров. В фолликулах со слабой активностью (1 балл) светлые центры содержали мало клеток («запустевшие») и были окружены широкой мантийной зоной из малых лимфоцитов. Фолликулы без светлых центров считали не активными (0 баллов). При оценке активности В-зон мозговых тяжей, а также Т-зон (паракортикальных) учитывали отсутствие (0 баллов) или наличие гиперплазии клеток в них и характер их состава. Преобладание бластных форм – 3 балла; смешанный состав (бласты и неактивированные лимфоциты, либо зрелые плазматические клетки) – 2 балла; преобладание неактивированных клеток с малым числом бластных элементов – 1 балл. Аналогичный подход применяли и для оценки активности Т- и В-зон в селезенке.

Морфометрический анализ структур лимфоидных органов (Т- и В-зон) выполняли с использованием аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц с помощью программы «Денситоморфометрия» (версия 2.1.0.0.).

Клетки нейроэндокринной (APUD-системы) в лимфоидных органах выявляли методом импрегнации срезов серебром по Гримелиусу с помощью готового набора реагентов фирмы BioVitrum и иммуногистохимическим (ИГХ) методом с использованием моноклональных мышинных антител (мкАТ) к хромогранину А (Chromogranin A Ab-2 clone PHE5) – маркеру нейроэндокринных клеток (фирмы Thermo Scientific, США). Подсчет аргирофильных элементов осуществляли в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов лимфоидных органов при увеличении в 400 раз.

Для оценки нуклеолярного аппарата лимфоцитов применяли метод импрегнации азотно-кислым серебром по W.M.Howell, D.A.Black [15] с помощью готового набора реагентов «AgNOR» фирмы BioVitrum. Для оценки функционального состояния ядерного аппарата лимфоцитов в каждом случае применяли световой микроскоп OLYMPUS CX 41 при увеличении в 1000 раз и программу VideoZavr 1.5, подсчитывая содержание гранул серебра в ядрышках 300 ядер клеток, определяя среднее содержание AgNOR-позитивных структур на 1 ядро, процентное содержание AgNOR-позитивных гранул (1, 2, 3 и более) на 1 ядро.

Активацию клеток субпопуляции Т- и В-лимфоцитов оценивали с применением поверхностных антигенных маркеров (дифференцировочных антигенов, CD), используя мкАТ к CD25 (Thermo Scientific, США), выполняли двухшаговый протокол с тепловой демаскировкой антигена по стандартной схеме проведения ИГХ реакции [6] с применением готового набора реагентов (EnVision Flex, Dako), ядра докра-

шивали раствором гематоксилина. Определяли долю окрашенных клеток среди 300 посчитанных элементов при увеличении в 400 раз и проводили полуколичественный учет окрашенных клеток, ориентируясь на интенсивность окраски: 0 – нет окрашивания; 1 – слабое окрашивание; 2 – умеренное окрашивание; 3 – сильное окрашивание.

Статистическую обработку результатов производили с помощью стандартного пакета компьютерных программ «Excel» и «Statistica» 7.0.

Результаты и обсуждение

До 3 сут в лимфоидных органах иммунизированных животных опытных групп регистрировали незначительные признаки острого серозного аденита и спленита, начиная с 7-х суток, отмечали развитие, в различной степени выраженности, гиперпластических процессов. Так, в РЛУ на 14-е сутки у мышей 1-й группы активность Т-зон достигала 1–2, а В-зон – 3 баллов, а во 2-й группе средняя активность Т- и В-зон находилась в пределах 2 баллов, преимущественно за счет активации Т-зон. В этот срок в селезенке при нарастании активности в среднем до 2–3 баллов у мышей из опытных групп в большей степени отмечали активацию Т-зон у животных 2-й группы. К 21-м суткам картина несколько менялась, и на фоне относительной активации в опытных группах Т- и В-зон до 3 баллов регистрировали в большей степени активацию Т-зон у мышей из 1-й группы (рис. 1). Менялось и соотношение площадей, занимаемых Т- и В-зонами в различные сроки. Если в селезенке мышей 1-й группы на 3-и сутки соотношение Т- и В-зоны составляло 3:1, а во 2-й группе – 8:1, то на 21-е сутки в 1-й группе сохранялась тенденция увеличения соотношения зон в пользу тимусзависимых областей (4:1), а во 2-й группе этот показатель резко менялся в пользу В-зоны и составлял 1:22.

В РЛУ, где явления аденита в ранние сроки после иммунизации были более выражены, наблюдали относительное увеличение площади фолликулов во 2-й группе по сравнению с 1-й до 14 сут, а к 21-м суткам этот показатель был выше у мышей из 1-й группы и

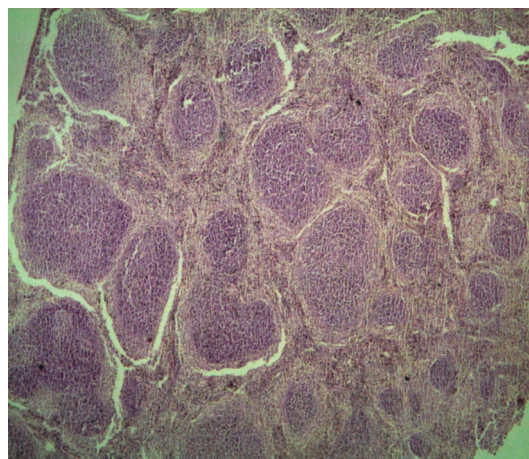
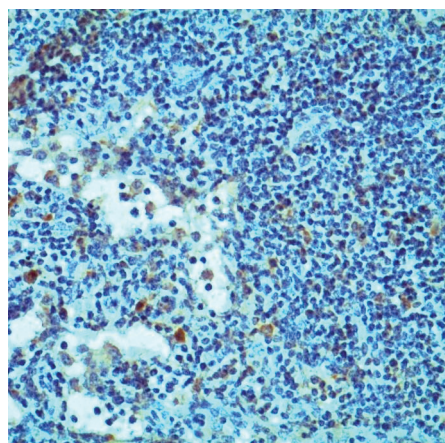


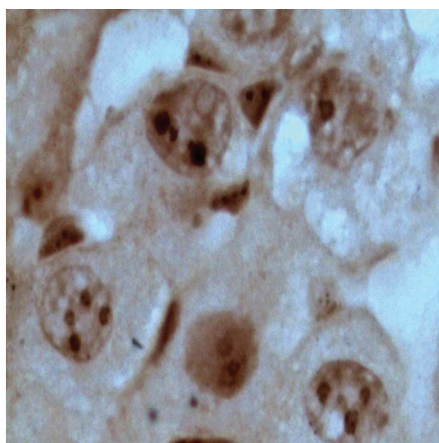
Рис. 1. Селезенка. Иммунизация *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием, 7-е сутки наблюдения. Проплиферативные процессы. Окр. гематоксин-эозином. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 4. Ок. 10

составлял $(70057,77 \pm 32651,44)$ мкм², во 2-й группе – $(63500,12 \pm 23574,120)$ мкм². В селезенке наблюдали обратную реакцию, так средняя площадь фолликулярной ткани в органе животных 2-й группы на 3-и и 14-е сутки была соответственно в 1,4 и 4,7 раза больше, чем в группе интактного контроля (К1), но к 21-м суткам площадь фолликулов в большей степени превалировала у мышей из 1-й группы и составляла $(83816,12 \pm 4966,30)$ мкм² и $(73967 \pm 18911,68)$ мкм² соответственно.

Интенсивность активации клеток субпопуляции Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах по результатам ИГХ исследования с маркером CD25 характеризовало планомерное увеличение доли положительно окрашенных клеток в период 14-х по 21-е сутки (рис. 2, а). В РЛУ мышей 1-й группы отмечали увеличение количества положительно окрашенных клеток от 18 до 42 % на фоне средней интенсивности реакции в 2–3 балла, во 2-й группе этот показатель достигал 18 и 32 % соответственно. На 14-е сутки положительно окрашенные клетки наблюдали преимущественно в воротном синусе лимфатического узла, но встречались и единичные элементы в области фолликулов. К 21-м суткам накопление по-



А



Б

Рис. 2. РЛУ. Иммунизация *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием, 3-и сутки наблюдения:
А – CD25-позитивные клетки в синусе узла. ИГХ. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 40. Ок. 10. Б – аргирофильные гранулы в лимфоцитах. Импрегнация срезов серебром по методу Howell W.M., Black D.A. Микроскоп OLYMPUS CX 41. Об. 90. Ок. 10

Реакция нейроэндокринных клеток в лимфоидных органах мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ в сочетании с полиоксидонием

Группа	Орган	Срок наблюдения, сут			
		3	7	14	21
1-я	РЛУ	4,1±0,94	5,9±0,82*	9,2±1,4*	10,8±0,62*
	ОЛУ	5,1±1,45*	3,1±1,14	7,4±1,74*	8,1±1,16*
	Селезенка	4,5±1,36	6,8±1,25*	14,1±2,26*	15,8±2,44*
2-я	РЛУ	2,9±0,84	4,75±0,54	7,9±0,63*	8,2±1,2*
	ОЛУ	2,8±0,96	6,5±0,98*	6,9±1,1*	7,2±1,4*
	Селезенка	8,4±2,26*	9,7±1,14*	6,3±1,56	10,5±2,93*
K1	РЛУ	2,9±1,85	2,78±0,62	2,91±0,84	2,8±0,18
	ОЛУ	2,3±0,64	2,4±0,72	2,2±0,32	2,4±0,84
	Селезенка	2,8±0,65	2,9±0,64	2,8±0,96	2,7±0,32
K2	РЛУ	3,9±0,94	1,5±0,81	3,2±0,96	2,7±0,64
	ОЛУ	4,6±0,92*	1,3±0,64	2,8±0,81	2,8±0,81
	Селезенка	4,9±0,94	5,2±1,4*	3,1±0,67	2,4±0,32

*Достоверное отличие от показателя в группе K1 ($p < 0,05$).

ложительно окрашенных клеток регистрировали в паракортикальной зоне (ПКЗ) узла. В селезенке сохранялась отмеченная тенденция накопления CD25-положительных клеток чаще в Т-зонах. При общей интенсивности реакции в органе в 2 балла на 14-е сутки регистрировали до 24 % положительно окрашенных клеток в 1-й группе и до 18 % – во 2-й. На 21-е сутки этот показатель соответственно составлял 54 и 48 % клеток.

При иммунологической перестройке у вакцинированных животных в лимфоидных органах наблюдали не только специфические изменения, характерные для иммунного ответа, но регистрировали признаки активации клеток нейроэндокринной системы (APUD-системы). В период с 3-х по 21-е сутки отмечали планомерное увеличение количества аргирофильных клеток в опытных группах по отношению к K1 (таблица). В группе K2 регистрировали относительное повышение количества аргирофильных клеток до 3 сут, затем их число приближалось к контрольным значениям, а в некоторых случаях было даже ниже. Отмечали более выраженное увеличение количества аргирофильных клеток в лимфоидных органах у мышей 1-й группы. На 21-е сутки количество аргирофильных элементов в РЛУ мышей 1-й группы было в 1,3 выше, чем во 2-й. В ОЛУ эта тенденция сохранялась. В селезенке количество аргирофильных клеток в 1-й группе было в 1,5 раза выше аналогичного показателя во 2-й. Во всех группах по результатам ИГХ исследований отмечали увеличение количества хромогранин А-позитивных клеток до 7 сут, но к 21-м суткам число хромогранин А-позитивных элементов значительно снижалось в опытных группах.

Наблюдали в РЛУ относительное увеличение среднего показателя количества AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах лимфоцитов животных (рис. 2, б) опытных групп до $2,27 \pm 1,1$ (1-я группа) и $2,14 \pm 0,92$

(2-я группа), что в среднем в 1,4 раза было выше, чем у интактных животных (K1). Менялось и соотношение лимфоцитов с различным количеством AgNOR-позитивных ядрышек в пользу увеличения доли клеток с тремя и более гранулами до 26 % клеток в 1-й группе и 23 % во 2-й (в K1 – 9 %).

В селезенке на 21-е сутки количество AgNOR-позитивных ядрышек в ядрах в среднем увеличивалось в 1,3 раза ($1,97 \pm 0,32$ в 1-й группе и $1,81 \pm 0,64$ во 2-й) по сравнению с K1 ($1,53 \pm 0,13$). Доля лимфоцитов с тремя и более гранулами составляла 29 % в 1-й группе и 16 % во 2-й (в K1 – 6 %).

Ранее полиоксидоний успешно применяли для повышения иммуногенности и протективной активности ЖЧВ в экспериментальных условиях [3, 9, 10], но в этих работах не затрагивали вопросы морфофункциональной трансформации в лимфоидных органах биомоделей в процессе иммуногенеза. Установленные особенности морфофункциональных изменений в периферических органах иммунитета мышей, иммунизированных против чумы в сочетании с полиоксидонием, позволяют сделать вывод о направленной активации Т-клеточного звена иммунитета.

Иммунная система в силу уникальности своих функций, реагируя на иммунизацию формированием реакций специфического иммунного ответа, еще и вовлекает в этот процесс, посредством нейроиммунноэндокринной взаимосвязи, другие системы организма [12]. Особое место в реализации способности полиоксидония влиять на иммунный ответ, помимо основных мишеней – клеток макрофагально-моноцитарной системы, воздействующих на иммунную систему через ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО, интерферон- α , отведено биогенным аминам [11]. Как следует из наших исследований, отмеченная реакция нейроэндокринных клеток в лимфоидных органах животных, иммунизированных на фоне иммуномодуляции, в

виде увеличения количества клеток APUD-системы и повышения экспрессии в них хромогранина А происходила в соответствии с эффекторной ролью регуляторных свойств, синтезируемых этими клетками биологически активных веществ [1, 14].

Результаты нашего исследования согласуются с данными авторов [3, 9], доказавших, что полиоксидоний усиливает эффекторную фазу иммунного ответа.

Своеобразным маркером пролиферативной активности лимфоидных органов на молекулярном уровне может быть оценка процессов репликации в ядре. Выявляемые методом серебрения в виде черных точек (гранул) аргирофильные кислые негистоновые белки ядрышка (C23, B23, UBF и РНК-полимераза I), ответственные за активизацию и контроль транскрипции рибосомных генов, характеризующие состояние активно работающих в них РНК-полимераз-1, позволили косвенно охарактеризовать процесс активации клеток в лимфоидных органах животных, иммунизированных на фоне иммуномодуляции.

Примененный комплекс морфологических методов для оценки состояния органов иммуногенеза при моделировании противочумного вакцинного процесса на фоне иммуномодуляции, безусловно, позволил детализировать направленность иммуноморфологических изменений у биомоделей.

Таким образом, применение полиоксидония при моделировании противочумного иммунного ответа свидетельствует о перспективности его использования с целью повышения эффективности вакцинации, а комплексный подход, включающий различные морфологические методы, повышает информативность этой оценки.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугоркова С.А., Кутырев В.В. Морфофункциональная оценка состояния клеток APUD-системы биомодели при характеристике противочумного вакцинного процесса. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2013; 4:49–55.
2. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хаитов Р.М., редакторы. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 880 с.
3. Каральник Б.В., Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Денисова Т.Г., Мельникова Н.Н., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Закарян С.Б. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2014; 6:108–12.
4. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб: СпецЛит; 2010. 95 с.
5. Основные требования к вакцинным штаммам чумного микроба. МУ 3.3.1.1113-02. М.; 2002. 63 с.
6. Петров С.В., Райхлин Н.Т. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Казань: Титул; 2004. С. 18–37.
7. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М.; 2011. 608 с.
8. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения. *Цитокины и воспаление.*

2004; 3: 1–7.

9. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Денисова Т.Г., Закарян С.Б., Мельникова Н.Н. Влияние полиоксидония на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины. *Иммунология.* 2014; 5:286–90.

10. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Тугамбаев Т.И., Мельникова Н.Н., Адамбеков Д.А. Иммуномодуляция как способ повышения иммуногенности живой чумной вакцины. *Вестник КГМА им. И.К.Ахунбаева.* 2015; 3:95–8.

11. Стручко Г.Ю., Меркулова Л.М., Москвичев Е.В., Кострова О.Ю., Михайлова М.Н., Мухаммад Захид, Бессонова К.В. Морфологические изменения тимуса после применения полиоксидония. *Фундаментальные исследования.* 2012; 5:197–202.

12. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы гистофизиологии иммунной системы. *Иммунология.* 2002; 1:4–8.

13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Механизм действия. М.: Фармарус принт; 2005. 27 с.

14. Шуковская Т.Н. Регуляция нейромедиаторами формирования специфической резистентности к особо опасным инфекциям. *Аллергология и иммунология.* 2000; 1:110–11.

15. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.

References

1. Bugorkova S.A., Kutyrev V.V. [Morphofunctional assessment of APUD-system cells in bio-model when characterizing anti-plague vaccine process]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2013; 4:49–55.
2. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M., editors. [Vaccines and Vaccination: National Guidelines]. M.: "GEOTAR-Media"; 2011. 880 p.
3. Karal'nik B.V., Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Denisova T.G., Mel'nikova N.N., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Zakaryan S.B. [Impact of immune modulation on immunogenic and protective activity of live plague vaccine]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 6: 108–12.
4. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. [Fundamentals of Histological Technique]. St. Petersburg: "SpetsLit"; 2010. 95 p.
5. [Basic requirements to vaccine strains of plague microbe]. Methodological Regulations 3.3.1.1113-02. M.; 2002. 63 p.
6. Petrov S.V., Raikhlin N.T. [Guidelines on Immune Histochemical Diagnostics of Human Tumors]. Kazan: "Titul"; 2004. P. 18–37.
7. Petrov R.V., Khaitov R.M. [Next Generation Immunogens and Vaccines]. M.; 2011. 608 p.
8. Pinegin B.V., Nekrasov A.V., Khaitov R.M. [Immune modulator, polyoxidonium: mechanisms of action and aspects of clinical use]. *Itiotikiny i Vospalenie.* 2004; 3:1–7.
9. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Denisova T.G., Zakaryan S.B., Mel'nikova N.N. [Effect of polyoxidonium on immunogenic and protective activity of live plague vaccine]. *Immunologiya.* 2014; 5:286–90.
10. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Tugambaev T.I., Mel'nikova N.N., Adambekov D.A. [Immune modulation as a means of immunogenicity enhancement of live plague vaccine]. *Bulletin of I.K.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy.* 2015; 3:95–8.
11. Struchko G.Yu., Merkulova L.M., Moskvichev E.V., Kostrova O.Yu., Mikhailova M.N., Mukhammad Zakhid, Bessonova K.V. [Morphological changes of thymus after administration of polyoxidonium]. *Fundamental. Issledovan.* 2012; 5:197–202.
12. Trufakin V.A., Shurlygina A.V. [Problems of histophysiology of immune system]. *Immunologiya.* 2002; 1:4–8.
13. Khaitov R.M., Pinegin B.V. [Advanced Immune Modulators. Classification. Mechanism of Action]. M.: "Farmus print"; 2005. 27 p.
14. Shchukovskaya T.N. [Neurotransmitter regulation of the development of specific resistance to particularly dangerous infections]. *Allergol. Immunol.* 2000; 1:110–11.
15. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia.* 1980; 36:1014–5.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 11.02.16.