

С.А.Бугоркова¹, И.С.Барулина², Т.Н.Щуковская¹, Л.В.Саяпина²**НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ БИОМОДЕЛИ НА ВВЕДЕНИЕ ЖИВОЙ ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ**¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;²ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича», Москва

Проведена оценка изменений в тимусе, регионарных и отдаленных лимфатических узлах, селезенке биомоделей и реакции нейроэндокринных клеток в этих органах при моделировании противотуляремийного вакцинального процесса. Получены количественные характеристики состояния нейроэндокринного окружения лимфоидных органов биомоделей на 5-е сутки после введения противотуляремийной вакцины в различных дозах. Выявлены определенные закономерности в реакции клеток APUD-системы лимфоидных органов и легких биомоделей, тесно связанные с характером изменений в них. Определены перспективы применения количественной характеристики клеток APUD-системы в целях совершенствования и оптимизации методов оценки безопасности и эффективности живых вакцин.

Ключевые слова: туляремийная вакцина, нейроэндокринные клетки.

В Российской Федерации природные очаги туляремии обнаружены на территории практически всех краев, областей и автономных республик [8]. Массовая иммунизация населения живой туляремийной вакциной (ЖТВ) из штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ обеспечила снижение заболеваемости туляремией и способствовала успеху борьбы с этой инфекцией [4, 7]. ЖТВ является эффективным профилактическим препаратом, создающим стойкий специфический иммунитет в течение пяти лет, но может вызывать ряд нежелательных последствий – аллергизацию и интоксикацию организма вакцинированного [5]. Этим обусловлен интерес исследователей к поиску новых объективных критериев, характеризующих эффективность и максимальную безопасность живых вакцин.

Верификация клеток нейроэндокринной (APUD) системы в составе иммунокомпетентных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы, костный мозг) позволяет по-новому оценить механизмы развития иммунологических реакций. Несмотря на данные, свидетельствующие об участии биогенных аминов и пептидных гормонов, продуцируемых апудоцитами, в регуляции иммунных реакций, протекающих в эффекторном звене иммунной системы [11], многие стороны структурно-функциональных взаимосвязей APUD-системы и иммунокомпетентных органов, в том числе и при противотуляремийной вакцинации, остаются невыясненными.

Целью исследования было выявление закономерностей в характере изменений лимфоидных органов биомоделей и реакции апудоцитов в них при моделировании противотуляремийного вакцинального процесса.

Материалы и методы

Морских свинок подкожно в область правого бедра иммунизировали культурой вакцинного штамма

F. tularensis 15 НИИЭГ в дозах $5 \cdot 10^7$ м.к. (1-я группа) и $5 \cdot 10^9$ м.к. (2-я группа). Животных умерщвляли хлороформом на 5-е сутки после иммунизации. Контролем служили интактные морские свинки (интактный контроль), для сравнения брали животных, зараженных вирулентной культурой штамма *F. tularensis* 503/840 в дозе 5 м.к. (контроль заражения).

Кусочки внутренних органов – легкие, печень, почки, надпочечники, селезенка, лимфатические узлы (регионарные и отдаленные) – фиксировали в 10 % нейтральном водном растворе формалина с последующим использованием стандартной схемы обработки материала для гистологического исследования [6]. Полутонкие парафиновые срезы для характеристики состояния органов и тканей биомоделей окрашивали гематоксилином и эозином, часть материала, применяемого для оценки реакции клеток APUD-системы, импрегнировали серебром по Массону в модификации Гамперля [9] и по Гримелиусу [12]. Подсчет апудоцитов проводили в 10 полях зрения 10 правильно ориентированных срезов лимфоидных органов и легких при $\times 400$. Морфометрическую характеристику состояния лимфоидных органов осуществляли с помощью денситоморфометрической программы МЕКОС-Ц – ДММ-2.1.0.0 при $\times 40$ и $\times 100$. Проводили статистическую обработку полученных данных [2].

Результаты и обсуждение

Моделирование ранней фазы процесса иммуногенеза в организме морских свинок с использованием различных иммунизирующих доз ЖТВ позволило выявить в реакции клеток APUD-системы лимфоидных органов и легких биомоделей определенные закономерности, тесно связанные с характером изменений в них.

В месте введения культур вакцинного штамма на 5-е сутки отмечали умеренное полнокровие сосудов, наличие участков уплотнения, небольшой отек

области правого паха. При гистологическом исследовании этой зоны регистрировали очаговое серозное с примесью полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) воспаление дермы и подкожной клетчатки.

Регионарные лимфатические узлы (РЛУ) были незначительно увеличены в размере (0,5–0,6 см), полнокровны, окружающая их клетчатка умеренно отека. При микроскопии под капсулой РЛУ встречались единичные микроскопические преимущественно эпителиоидноклеточные гранулемы, чаще при использовании ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. На фоне явлений серозного лимфаденита (рис. 1) отмечали начальные признаки гиперпластических процессов в паракортикальной зоне (ПКЗ) и фолликулах. В подтверждение этого регистрировали умеренное увеличение площади фолликулов в РЛУ биомodelей 1-й ($44426,07 \pm 18350,37$ мкм²) и 2-й ($46247,52 \pm 19942,65$ мкм²) групп по отношению к группе intactных животных ($43217,15 \pm 1224,56$ мкм²). Наблюдали относительную активацию пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов РЛУ биомodelей: до 24 % фолликулов со светлыми центрами у животных в 1-й группе, 22 % – во 2-й, что в 1,5 раза превышало аналогичный показатель у морских свинок из группы intactного контроля (16,5 %). Начальные гиперпластические процессы в РЛУ сопровождалась некоторой активацией аргентаффинных (АТ) клеток, особенно на введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к., в то время как реакция аргирофильных (АГ) элементов практически не отличалась от аналогичных показателей у животных из группы intactного контроля (таблица). Прослеживалась обратная зависимость между выраженностью воспалительного компонента в РЛУ и степенью активности нейроэндокринных элементов в них.

В отдаленных лимфатических узлах (ОЛУ) на фоне явлений незначительного очагового серозного лимфаденита регистрировали умеренную гиперпла-

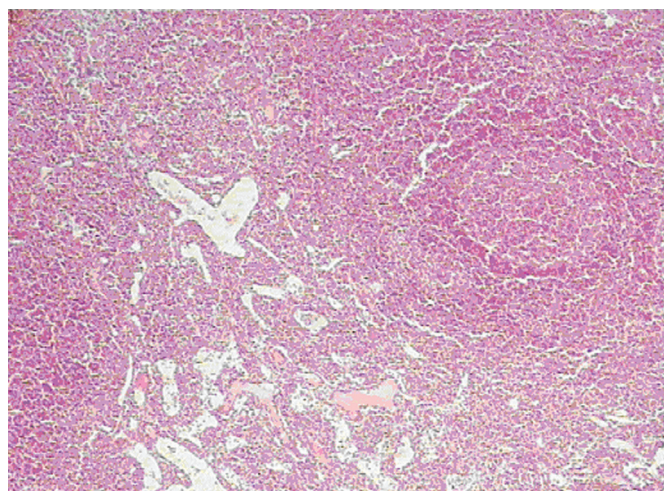


Рис. 1. Морская свинка. Подкожное введение *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к, 5-е сутки. Серозный лимфаденит. Начальные признаки гиперпластических процессов в ПКЗ и фолликулах. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 40$

зию фолликулов (от $41256,44 \pm 21120,17$ мкм² в 1-й группе и до $42264,13 \pm 11207,24$ мкм² во 2-й группе) по сравнению с животными из группы intactного контроля ($32154,35 \pm 1245,68$ мкм²), но без изменения количества фолликулов с выраженными пролиферативными процессами в их центрах. Нейроэндокринные клетки (НЭК) в ОЛУ биомodelей реагировали резкой активацией как АТ, так и АГ клеток на введение культуры вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. и умеренной активацией АГ элементов на иммунизацию $5 \cdot 10^7$ м.к. (таблица).

Селезенка у биомodelей опытных групп была увеличена в размере [$(2,7 \pm 0,96) \times (1,5 \pm 0,64) \times (0,9 \pm 0,17)$ см], умеренно полнокровна, с единичными беловато-серыми узелками (не более 3 на орган). При гистологическом исследовании наблюдали умеренную гиперплазию клеток белой пульпы (фолликулов и периартериальных муфт), незначительную плазмноклеточную реакцию, очаги серозного спленита (рис. 2), мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме органа и единичные без очагов некроза в центре эпителиоидноклеточные гранулемы. По результатам морфометрического исследования площадь фолликулов у животных опытных групп была увеличена ($70659,25 \pm 27669,88$ мкм² и $83878,63 \pm 25443,32$ мкм² соответственно) в 1,6–1,9 раза по отношению к аналогичному показателю у морских свинок из группы intactного контроля ($43121,12 \pm 13564,21$ мкм²). Количество НЭК в органе повышалось на введение культуры вакцинного штамма, но в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к. показатели активности как АТ, так и АГ элементов были значительно выше (таблица).

В тимусе животных опытных групп наблюдали

Реакции клеток APUD-системы морских свинок, иммунизированных культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Окраска по	1-я группа	2-я группа	Intactный контроль
Легкие			
Массону	2,3 \pm 0,4	4,2 \pm 0,14	3,6 \pm 0,50
Гримелиусу	2,9 \pm 1,17	3,5 \pm 1,06	3,9 \pm 1,52
Регионарные лимфатические узлы (РЛУ)			
Массону	6,7 \pm 1,08*	4,4 \pm 0,28	3,3 \pm 0,68
Гримелиусу	4,1 \pm 0,89	3,6 \pm 0,17	3,7 \pm 0,50
Отдаленные лимфатические узлы (ОЛУ)			
Массону	2,6 \pm 1,06	7,1 \pm 1,48*	3,8 \pm 1,51
Гримелиусу	4,2 \pm 0,72*	7,4 \pm 0,99*	2,8 \pm 0,64
Тимус			
Массону	5,4 \pm 1,22	6,7 \pm 0,92*	2,1 \pm 0,95
Гримелиусу	3,9 \pm 0,64	6,9 \pm 1,34*	2,8 \pm 1,01
Селезенка			
Массону	11,5 \pm 2,14*	5,7 \pm 1,91	5,6 \pm 0,35
Гримелиусу	9,8 \pm 1,45*	5,8 \pm 3,68	3,7 \pm 0,64
Надпочечники			
Массону	6,5 \pm 1,24	3,9 \pm 0,07*	7,1 \pm 1,05
Гримелиусу	4,2 \pm 0,98	5,5 \pm 0,35	3,8 \pm 1,22

* Достоверное различие ($p < 0,05$).

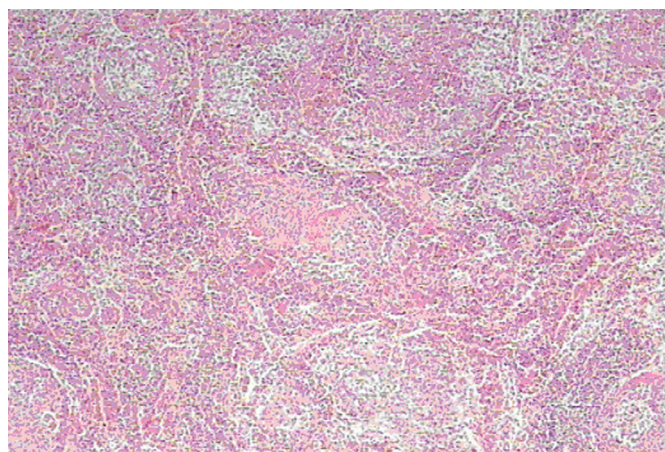


Рис. 2. Морская свинка. Подкожное введение *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к, 5-е сутки. Серозный спленит, умеренная гиперплазия клеток белой пульпы. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 40$

более выраженную активацию НЭК при иммунизации ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к.

Подтверждением регуляторной функции апудоцитов, находящим свое отражение в адаптационных реакциях организма, является изменение количества и функционального состояния клеток APUD-системы. Расположенные практически во всех органах и продуцирующие биологически активные вещества клетки APUD-системы играют роль местных регуляторов гомеостаза макроорганизма [13]. Отмеченная реакция апудоцитов в лимфоидных органах явилась косвенным свидетельством тесного молекулярного и клеточного взаимодействия иммунокомпетентных клеток с их нейроэндокринным окружением. Проведенное исследование подтвердило, что, по-видимому, апудоциты в периферических (РЛУ, ОЛУ, селезенка) и центральных (тимус) органах иммунитета активно участвуют в ауторегуляторных процессах при противотуберкулезной вакцинации, влияют на интенсивность иммунологических и ограничивают воспалительных реакций в этих структурах.

В легких наблюдали умеренную очаговую инфильтрацию межальвеолярных перегородок лимфогистиоцитарными элементами, участки дистелектазов. Если у животных из группы контрольного заражения имело место снижение перфузионно-вентиляционного отношения (ПВО) в 13 раз по отношению к аналогичному показателю у морских свинок из группы интактного контроля, то у иммунизированных биомоделей этот показатель отличался лишь в 1,5–1,6 раза. Аргирофильные клетки, встречающиеся среди бронхиального эпителия, по своему строению сходны с ЕС-клетками в кишечнике [3]. Локализация апудоцитов в органах дыхания и известный физиологический эффект продуктов их секреции предполагают региональный контроль за вентиляцией и перфузией в легких [10]. На фоне незначительного изменения ПВО у иммунизированных животных отмечали некоторое снижение как АТ,

так и АГ клеток на введение ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к. и умеренное увеличение АТ элементов при иммунизации в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. вакцинного штамма (таблица). Отсутствие достоверного отличия в количестве апудоцитов в легких животных из опытных и контрольной групп свидетельствовало о сохранении адаптационного потенциала у иммунизированных животных. Это подтверждало наличие определенной зависимости между морфофункциональной активностью апудоцитов в легких и показателя перфузии в периферических отделах органа, приспособляемого к иным условиям вентиляции [10].

В надпочечниках на фоне умеренного обеднения липоидами клеток коркового и незначительного снижения феохромии мозгового вещества в ранние сроки иммуногенеза, вследствие введения ЖТВ, реакция НЭК сводилась к дегрануляции клеток и снижению количества АТ элементов, достоверному во 2-й опытной группе. При этом количество АГ клеток в обеих группах несколько увеличивалось (таблица). Реакция энтерохромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников была ответом на умеренное стрессорное действие вакцины, отмечаемое исследователями при использовании живых препаратов для специфической профилактики особо опасных инфекций [1].

Со стороны внутренних органов иммунизированных биомоделей отмечали умеренное неравномерное полнокровие сосудов лишь на введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к., а у одного животного в печени наблюдали 3 мелких узелка беловато-серого цвета. При гистологическом исследовании в печени регистрировали на фоне относительного функционального напряжения гепатоцитов очаговые зоны вакуольной и жировой дистрофии клеток, мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме вокруг сосудов. На введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. дополнительно отмечали появление единичных эпителиоидноклеточных гранул и небольших очагов некроза и некробиоза клеток. В почках грубых дистрофических изменений или признаков воспалительной реакции не регистрировали.

Таким образом, были получены количественные параметры состояния нейроэндокринного окружения лимфоидных органов биомоделей, отражающие характер адаптационно-компенсаторных процессов и иммуногенеза в макроорганизме при моделировании вакцинального процесса, обусловленного введением различных доз культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Анализ реакции клеток APUD-системы ряда функционально значимых органов биомоделей при введении *F. tularensis* вакцинного штамма, расширяя представления о механизмах нейроиммуноэндокринных взаимоотношений в макроорганизме, позволил определить перспективу применения количественного учета апудоцитов в целях совершенствования и оптимизации методов оценки безопасности и эффективности живых вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., Саяпина Л.В. Стрессорное действие вакцинного и аттенуированного штаммов чумного микроба в зависимости от степени их остаточной вирулентности. Биопрепараты. 2005; 3:17–20.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М.: Медицина; 1967. 303 с.
3. Блинова С.А. Возрастные особенности морфологии и распределения эндокринных клеток APUD-системы в легких человека. Мед. журн. Узбекистана. 1986; 9:54–7.
4. 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.
5. Медунцын Н.В. Вакцинология. 2-е изд. М.: «Триада-X»; 2004. 448 с.
6. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969. 423 с.
7. Мещерякова И.С. Туляремия: современное состояние заболеваемости и профилактики туляремии в Российской Федерации. В кн: Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Науч. Тр. ВУНМЦ МЗ РФ. 1999. С. 290–312.
8. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 360 с.
9. Пирс Э. Гистохимия. Португалова В.В., редактор; пер. с англ. М.: Изд-во Иностранная литература; 1962. 962 с.
10. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск; 1993. Ч. 1–2. С. 217.
11. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы центральной регуляции биоритмов иммунной системы. Роль мелатонина. Вестник Российской АМН. 2006; 9–10:121–7.
12. Grimelius L. A silver nitrate stain for 12 cells in human pancreatic islets. Acta Soc. Med. Upsaliensis. 1968; 73:243–70.
13. Feldman S.A., Eiden L.E. The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. Endocr. Pathol. 2003; 14(1):3–23.

Об авторах:

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

Барулина И.С., Саяпина Л.В. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича.

S.A.Bugorkova, I.S.Barulina, T.N.Schukovskaya, L.V.Sayapina

Neuroendocrinal Aspects of Analysis of Biomodel Lymphoid Organs Response to Administration of Live Tularemia Vaccine

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;
L.A.Tarasevich State Institute of Standartization and Control, Moscow

Evaluated were alterations in thymus, regional and remote lymphatic glands, and spleen of biomodels as well as neuroendocrinal cells reaction in these organs in simulating anti-tularemia vaccinal process. Received are quantitative characteristics of neuroendocrinal environment state of biomodels' lymphoid organs on the 5th day after administration of anti-tularemia vaccine in different doses. Elucidated were certain principles in cells' reaction of APUD-system of biomodel's lymphoid organs and lungs, associated with nature of their alterations. Identified were the prospects of application of the APUD-system cells quantitative characteristics in view of improving and optimizing the evaluation methods as regards safety and efficiency of live vaccines.

Key words: tularemia vaccine, neuroendocrinal cells.

Authors:

Bugorkova S.A., Barulina I.S., Schukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Sayapina L.V. L.A.Tarasevich State Institute of Standartization and Control. Moscow.

Поступила 22.01.09