

О.В. Лебединская ¹, Н.К. Ахматова ², М.Б. Бродовский ¹, Е.А. Ильных ¹, Н.Б. Егорова ²,
Е.А. Курбатова ², С.В. Мелехин ¹

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ МУКОЗАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ВВЕДЕНИЯ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

¹ Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера (Пермь)

² Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (Москва)

Исследованы иммунофенотипические и морфологические особенности формирования иммунных реакций при интраназальном, пероральном и подкожном способах введения поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП-4, содержащей группу антигенов условно патогенных бактерий. Выявлено, что исследуемый препарат вызывает выраженную активацию эффекторов врожденного иммунитета как при парентеральной, так и при мукозальной иммунизации. Это проявляется в экспрессии дифференцировочных, костимулирующих, адгезивных молекул на поверхности мононуклеарных лейкоцитов, в пролиферации ключевых эффекторов мукозального иммунитета ($\gamma\delta$ - и B_1 -лимфоцитов, NK клеток), в изменениях структуры, клеточного состава иммунокомпетентных органов и региональных к месту введения, и удаленных от него. Совокупность имеющихся в настоящее время данных об эффекте и механизме действия мукозальных методов введения вакцин и иммуномодуляторов позволяет считать разработку мукозальных моно- и ассоциированных вакцин приоритетным направлением современной вакцинологии.

Ключевые слова: мукозальный иммунитет, Иммуновак ВП-4, иммунофенотип, морфологические изменения, мукозальная иммунизация, парентеральная иммунизация

MORPHOFUNCTIONAL PECULIARITIES OF MUCOSAL IMMUNITY DEPENDING ON METHODS OF OPPORTUNISTIC MICROBIAL INTRODUCTION

O.V. Lebedinskaya ¹, N.K. Akhmatova ², M.B. Brodovsky ¹, E.A. Ilinykh ¹, N.B. Egorova ²,
E.A. Kurbatova ², S.V. Melekhin ¹

¹ E.A. Wagner Perm State Medical Academy, Perm

² I.I. Mechnikov Institute of Vaccines and Sera RAMS, Moscow

Immunophenotypic and morphological peculiarities of immune reactions under intranasal, peroral and subcutaneous introduction of multicomponent vaccine Immunovac VP-4 containing a group of opportunistic bacterial antigens were investigated. The investigated preparation was found to cause marked activation of congenital immunity effectors both in parenteral and mucosal immunization. It is manifested in the expression of differential, costimulatory, adhesive molecules on the surface of mononuclear leukocytes, in proliferation of key mucosal immunity effectors ($\gamma\delta$ T, B1, NK cells), and changes in structure, cellular composition of immunocompetent organs both regional and distant as to the site of introduction. Currently existing data on effects and mechanisms of vaccine and immunomodulator mucosal introduction allows considering the development of mucosal mono- and associated vaccines as the priority direction in modern vaccinology.

Key words: mucosal immunity, Immunovac VP-4, immunophenotype, morphological changes, mucosal immunization, parenteral immunization

Значительную роль на первичных этапах распознавания микробных антигенов играет метод введения их в макроорганизм, определяющий набор рецепторов, взаимодействующих с лигандами микроорганизмов, и, соответственно, сигнальные пути дальнейшего развития врожденного и адаптивного иммунитета. Активация различных сигнальных путей обуславливает индукцию целого комплекса защитных реакций [9, 10].

Теоретическими и экспериментальными исследованиями последних лет установлено, что важнейшими компонентами, обеспечивающими особенности функциональной активности мукозальной иммунной системы, являются $\gamma\delta$ лимфоциты и B_1 -лимфоциты, заселяющие эпителий слизистых оболочек. Данные клетки обладают способностью усвоения патоген-ассоциированных структур микроорганизмов (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) без костимуляторных

сигналов и предварительного процессинга другими эффекторами иммунитета [5, 6, 8, 11]. В процессе реализации мукозального иммунитета, наряду с его ключевыми эффекторами, большое значение приобретают и другие иммунокомпетентные клетки, взаимодействие которых с $\gamma\delta$ и B_1 -лимфоцитами обеспечивает активацию мукозальной иммунной системы и способность развития при этом не только местного, но и системного иммунитета к антигенам/патогенам [7, 11].

Актуальность таких исследований очевидна, однако молекулярно-клеточные механизмы активации врожденного и адаптивного иммунитета при мукозальных методах введения иммуномодуляторов и вакцин остаются малоизученными.

Цель исследования — сравнительная характеристика морфологических и иммунофенотипических особенностей формирования иммунитета при интраназальном, пероральном и подкожном

методах введения комплекса антигенов условно патогенных микроорганизмов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты

Для изучения особенностей мукозального иммунитета использовалась поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4® (ФГУП «НПО «Микроген»), обладающая широким набором РАМРs. Это обуславливает высокую активность данного препарата в отношении врожденного иммунитета, установленную на молекулярно-клеточном уровне при подкожном введении мышам [1] и на различных инфекционных моделях [2, 3]. Поликомпонентная вакцина Иммуновак-ВП-4 из антигенов условно патогенных микроорганизмов (*Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*) предназначена для иммунотерапии хронических воспалительных и аллергических заболеваний. Она содержит липополисахариды (ЛПС), ассоциированные с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липопотеины, являющиеся лигандами для Толл-подобных рецепторов.

Экспериментальные животные

Использовались мыши (80 животных линии СВА весом 16 – 18 г), полученные из питомника НЦ Биомедицинских технологий РАМН «Андреевка» и содержащиеся в условиях вивария НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Экспериментальным животным вводили Иммуновак-ВП-4 подкожным, интраназальным или пероральным методами. Мукозальную иммунизацию проводили трехкратно с интервалом в 2 – 3 дня. Интраназально препарат вводили в разовой дозе 500 мкг в объеме 30 мкл (1-я группа). Пероральная разовая доза составляла 2 мг в объеме 0,5 мл (2-я группа). Подкожно препарат вводили двукратно с интервалом в 7 суток дозой 200 мкг на каждое введение (3-я группа). Контрольную – 4-ю – группу составляли интактные животные. Через сутки после последнего введения вакцины мышам выводили из опыта эфирным наркозом; извлекали селезенку, лимфатические узлы, ассоциированные с носовой полостью и бронхами (Nasal Associate Lymphoid Tissue – NALT, Broncho Associate Lymphoid Tissue – BALT), а также с тонкой кишкой (Gut Associate Lymphoid Tissue – GALT) и тонкую кишку.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов (МЛ)

Мононуклеарные лейкоциты лимфоидных органов мышам выделяли с помощью одноступенчатого градиента плотности фикола-урографина по методу A. Boyum.

Определение экспрессии поверхностных маркеров проводили при помощи моноклональных антител («Caltag Laboratories», США) против соответствующих антигенов. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur («Beckman Coul-

ter F-500», США). На МЛ селезенки, лимфатических узлов и слизистой оболочки тонкой кишки мышам исследовали уровни экспрессии CD3, NK 1.1, CD3/NK, CD4, CD25, CD4/CD25, CD8, CD19, МНС II класса, CD5.2.

Морфологические исследования

Проведены морфогистохимические исследования центральных (костный мозг и тимус) и периферических (селезенка, лимфатические узлы, лимфоидная ткань кишечника) органов мышам. Для доказательства отсутствия токсического действия применяемого иммуномодулирующего препарата исследовали паренхиматозные органы (печень, легкие, почки). Материал фиксировали в спирт-формол-уксусной кислоте по Теллесницкому [4]. Серийные парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, азуром II и эозином, а также метиловым зеленым и пиронином по Браше с контролем РНК-азой для оценки содержания РНК. Проводили ШИК-реакцию по Шабдашу с контрольной обработкой срезов амилазой для выявления гликогена и нейтральных гликозаминогликанов (ГАГ) и использовали альциановый синий с целью определения кислых ГАГ.

Фотосъемку и анализ изображения с гистологических препаратов органов проводили с помощью цифровой системы регистрации и анализа изображения AxioVision 4.2 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Excel (Microsoft Corporation, США), интегрированным пакетом статистического анализа StatSoft 8.0 с применением параметрических и непараметрических методов сравнения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения иммунофенотипа лимфоцитов мышам в селезенке, NALT/ BALT и GALT при многократной иммунизации экспериментальных животных представлены в таблице и на диаграммах (табл. 1, рис. 1).

При интраназальном введении вакцины существенно увеличивалось содержание поверхностных маркеров на клетках-эффекторах лимфатических узлов NALT/BALT (рис. 1). В NALT/ BALT относительное содержание T_H лимфоцитов повысилось в 32 раза, B₁ – в 8 раз, CD19 и CD4 – в 39 и 3,9 раза соответственно. В селезенке уровень T_H возрастал в 16 раз, B₁ – в 11 раз. В селезенке в большей степени, чем в NALT/BALT, увеличивалось число CD4 (в 28 раз). В GALT все исследованные показатели изменялись в меньшей степени, чем в селезенке и лимфатических узлах NALT/ BALT. Следует учесть, что при интраназальном введении препарата мыши получали небольшую дозу (суммарная доза вакцины 1500 мкг), которая всего в 3,75 раза превышала дозу, вводимую подкожно (суммарная доза 400 мкг).

Пероральное трехкратное введение вакцины приводило к выраженным изменениям количественного состава популяций лимфоцитов во всех

Таблица 1

Экспрессия маркёров на клетках-эффекторах иммунитета при разных методах введения бактериальных антигенов

Метод иммунизации	Содержание клеток, %*								
	Селезенка			NALT/BALT			GALT		
	Маркер	Интактные	Иммунизированные	Маркер	Интактные	Иммунизированные	Маркер	Интактные	Иммунизированные
Интраназально 3-х кратно	CD3	6,3 ± 0,61	47,4 ± 4,1 (7)	CD3	1,2 ± 0,6	7,6 ± 0,3 (6,4)	CD3	0,3 ± 0,16	2,7 ± 0,06 (9,0)
	CD3/NK	1,13 ± 0,65	3,63 ± 0,17 (3)	CD3/NK	0,4 ± 0,6	1,19 ± 0,16 (3)	CD4	0,34 ± 0,15	1,9 ± 0,02 (5,6)
	CD4	2,1 ± 1,2	58,6 ± 1,8 (28)	CD4	3,5 ± 0,8	13,7 ± 1,1 (3,9)	CD8	0,24 ± 0,09	3 ± 0,03 (12,5)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,26	4,48 ± 1,1 (5,6)	MHCII	1,6 ± 0,4	72,0 ± 4,5 (45)	B1	0,15 ± 0,06	0,53 ± 0,03 (3,5)
	CD8	4,7 ± 0,74	34,2 ± 4,6 (7,3)	CD19	0,63 ± 0,2	25,2 ± 1,5 (39)			
	Tγδ	0,17 ± 0,02	2,8 ± 1,1 (16)	Tγδ	0,05 ± 0,02	1,6 ± 0,06 (32)			
	B1	0,08 ± 0,03	0,9 ± 0,02 (11,3)	B1	0,21 ± 0,15	1,7 ± 0,06 (8)			
Перорально 3-х кратно	CD3/NK	1,13 ± 0,65	5,8 ± 0,6 (5,2)	CD3	1,2 ± 0,6	34 ± 5,5 (28)	CD3	0,3 ± 0,16	4,3 ± 0,9 (14)
	CD4	2,1 ± 0,2	13,3 ± 1,3 (6)	CD4	3,5 ± 0,8	40,1 ± 3,1 (11)	NK	0,7 ± 0,03	33,3 ± 1,2 (46)
	CD25	1,6 ± 0,65	12,6 ± 0,8 (7,8)	CD8	1,8 ± 0,08	31,9 ± 5,1 (17)	CD4	0,34 ± 0,15	7,3 ± 1,1 (21)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,2	2,44 ± 0,04 (3)	CD19	0,6 ± 0,2	8,2 ± 0,6 (13)	CD25	0,7 ± 0,16	5,4 ± 0,5 (7,6)
	Tγδ	0,17 ± 0,02	1,43 ± 0,1 (3,7)	MHCII	1,6 ± 0,4	4,8 ± 0,8 (3)	CD8	0,24 ± 0,09	2,2 ± 0,15 (10)
	B1	0,08 ± 0,03	0,5 ± 0,06 (6,2)	Tγδ	0,05 ± 0,02	9,3 ± 1,8 (186)	CD19	0,4 ± 0,1	39,9 ± 0,8 (97)
				B1	0,21 ± 0,15	2 ± 0,3 (9,4)	CD3/NK	1,1 ± 0,16	13,7 ± 0,9 (12)
							MHCII	5,0 ± 0,9	51,7 ± 1,0 (10)
							Tγδ	0,2 ± 0,1	9,0 ± 0,8 (45)
							B1	0,15 ± 0,06	11,7 ± 0,9 (117)
Подкожно 2-х кратно				CD3	1,2 ± 0,6	10,4 ± 1,2 (8,8)	CD3	0,3 ± 0,16	2,4 ± 0,2 (8,8)
	CD4	2,1 ± 1,2	14,3 ± 2,26 (7)	CD4	3,5 ± 0,8	12,6 ± 1,0 (3,5)	CD4	0,34 ± 0,15	1,9 ± 0,16 (5,5)
	CD25	1,6 ± 0,15	5,6 ± 0,57 (3,5)	CD8	1,8 ± 0,	12,4 ± 1,9 (7)	CD8	0,24 ± 0,09	1,5 ± 0,2 (6)
	CD4/CD25/Foxp3	0,8 ± 0,26	2,8 ± 0,14 (3)	CD19	0,6 ± 0,02	2,3 ± 0,12 (3,5)	MHCII	5,16 ± 0,9	25,9 ± 0,7 (5)
	Tγδ	0,17 ± 0,02	5,3 ± 0,5 (31,2)	Tγδ	0,05 ± 0,02	12,0 ± 1,6 (240)	CD19	0,4 ± 0,1	1,75 ± 0,2 (4,3)
	B1	0,08 ± 0,03	4,9 ± 1,2 (62)	B1	0,2 ± 0,15	12,2 ± 1,6 (58)			

Примечание: * – представлены только данные, которые после иммунизации увеличивались в 3 и более раз.

исследованных органах (табл. 1, рис. 1). В GALT относительное число Tγδ лимфоцитов увеличилось в 45 раз. Количество B₁ лимфоцитов возросло в 117 раз. Только при этом методе вакцинации отмечена положительная динамика популяции NK, которая возросла в 47,5 раза. Значительно увеличилось также содержание клеток с маркерами CD3, CD4, CD8, CD19. В NALT/BALT резко возросло содержание Tγδ-лимфоцитов, B₁ лимфоцитов (в 9,5 раза), что сопоставимо с результатами при интраназальном методе введения вакцины. Уровни дифференцировочных антигенов CD4, CD8, CD19 были увеличены в 11,5; 17,0 и 12,9 раза соответственно. При пероральном методе введения, в отличие от

интраназального, менее выражены изменения в селезенке иммунизированных мышей: процентное содержание CD4⁺, CD25⁺, Tγδ, B₁-клеток увеличилось всего в 6 – 8 раз.

При подкожном методе введения бактериальных антигенов происходила заметная активация клеток эффекторов врожденного иммунитета в селезенке и лимфатических узлах NALT/BALT (табл. 1, рис. 1). При данном методе вакцинации наблюдалось повышение числа Tγδ лимфоцитов в NALT/BALT в 240 раз, в селезенке – в 31,2 раза. Также выявлен высокий уровень количества B₁ лимфоцитов в этих органах при низкой степени увеличения других показателей. Значительно

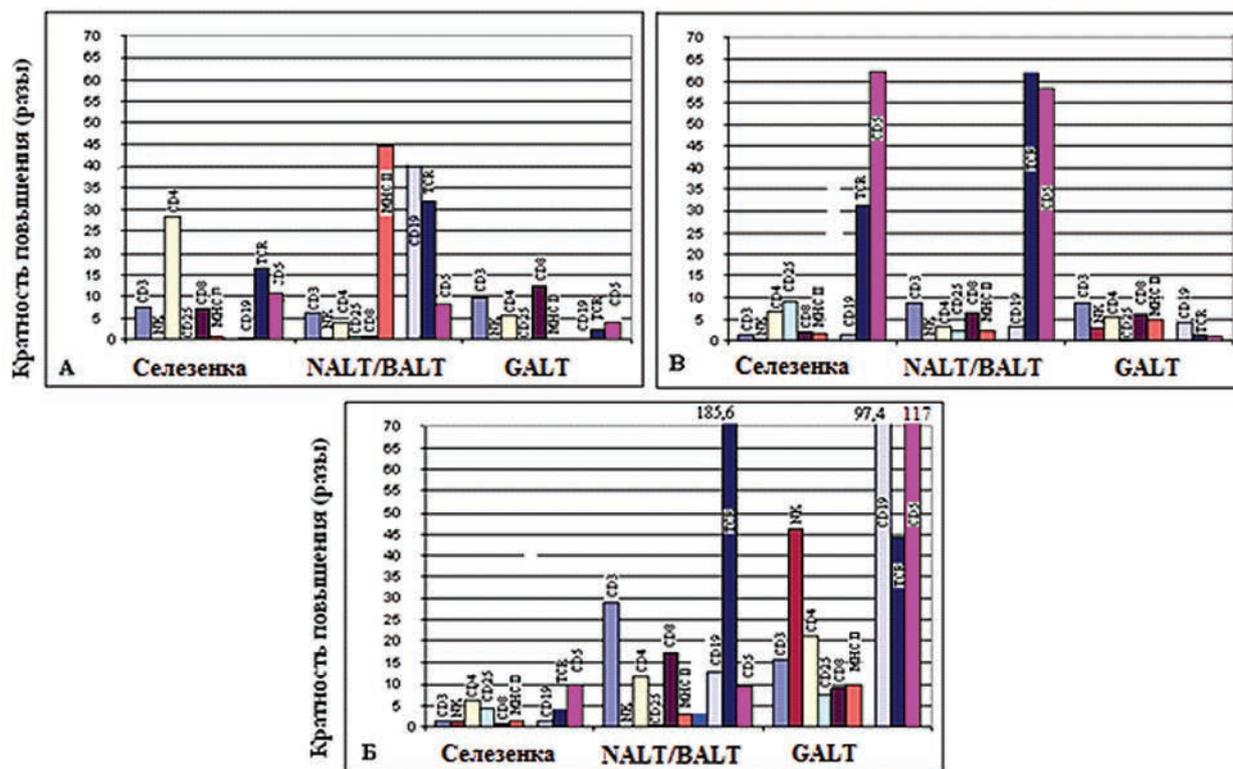


Рис. 1. Увеличение количества клеток-эффекторов в лимфоидных органах мышей, иммунизированных вакциной Иммуовак ВР-4. **А** – интраназальный метод иммунизации; **Б** – пероральный метод иммунизации; **В** – подкожный метод иммунизации. По оси абсцисс – исследуемые лимфоидные органы мышей, по оси ординат – кратность повышения (разы) процентного содержания клеток, экспрессирующих маркеры дифференциации и антигенного представления, в лимфоидных органах иммунизированных мышей по сравнению с интактными.

меньшее изменение этих показателей, как и при интраназальном методе введения, выявлялось в лимфоидной ткани тонкой кишки.

Для всех методов оказалось характерным наибольшее увеличение экспрессии маркеров V_1 и $T\gamma\delta$ лимфоцитов. Это связано, видимо, не только с методом введения, но и с характером используемых антигенов, которые в этих клетках подвергаются процессингу без предварительного участия в данном процессе МНС класса II и CD4 лимфоцитов. Интересно, что экспрессия NK маркеров происходила в значительной степени только при пероральном введении антигенов. Важно также отметить, что при непарентеральных методах, наряду с активацией лимфоцитов в NALT/BALT и GALT, наблюдалось значительное увеличение экспрессии поверхностных маркеров на клетках селезенки, что свидетельствует о развитии при этих методах не только мукозального, но и системного иммунитета.

Данные морфологических исследований служат подтверждением иммунофенотипического анализа количественного состава популяций лимфоидных клеток в органах региональных к месту введения антигенов и отдаленных от него. При интраназальном введении Иммуовак ВР-4 наиболее ярко выраженная реакция наблюдается в органах, региональных к месту введения препарата (рис. 2).

В легких выявляются многочисленные перибронхиальные, периваскулярные и перенхима-

тозные лейкоцитарные инфильтраты, содержащие большое количество клеток лимфоцитарного ряда и макрофагов (рис. 2а). Корковое вещество в перибронхиальных лимфатических узлах расширено, содержит крупные, иногда сливающиеся лимфоидные узелки (В-зависимые зоны). В некоторых узелках выявляются реактивные центры (рис. 2б). Межузелковые участки плотно заполнены лимфоцитами и макрофагами. Паракортикальная зона практически отсутствует. Мозговые тяжи расширены, в них выявляются многочисленные бластные формы и плазмциты (рис. 2в). За счет расширения мозговых тяжей сужаются лимфатические синусы, в которых в большом количестве определяются макрофаги, лимфоциты, гранулоциты, делящиеся и стромальные клетки (рис. 2г).

При пероральном введении вакцины Иммуовак наблюдается выраженная активизация лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (рис. 2д, 2е). Агрегированные лимфоидные узелки (пейеровы бляшки) в подвздошной кишке многочисленны и занимают большую площадь, чем у интактных животных, сливаясь в конгломераты. Количество узелков с куполами (В-зоны) в составе бляшки увеличивается до 4 – 5. Межузелковые (Т-зависимые) зоны плотно заполнены лимфоцитами (рис. 2д). Между криптами тощей кишки можно обнаружить диффузную лимфоцитарную инфильтрацию. Строма ворсинок тонкого кишечника

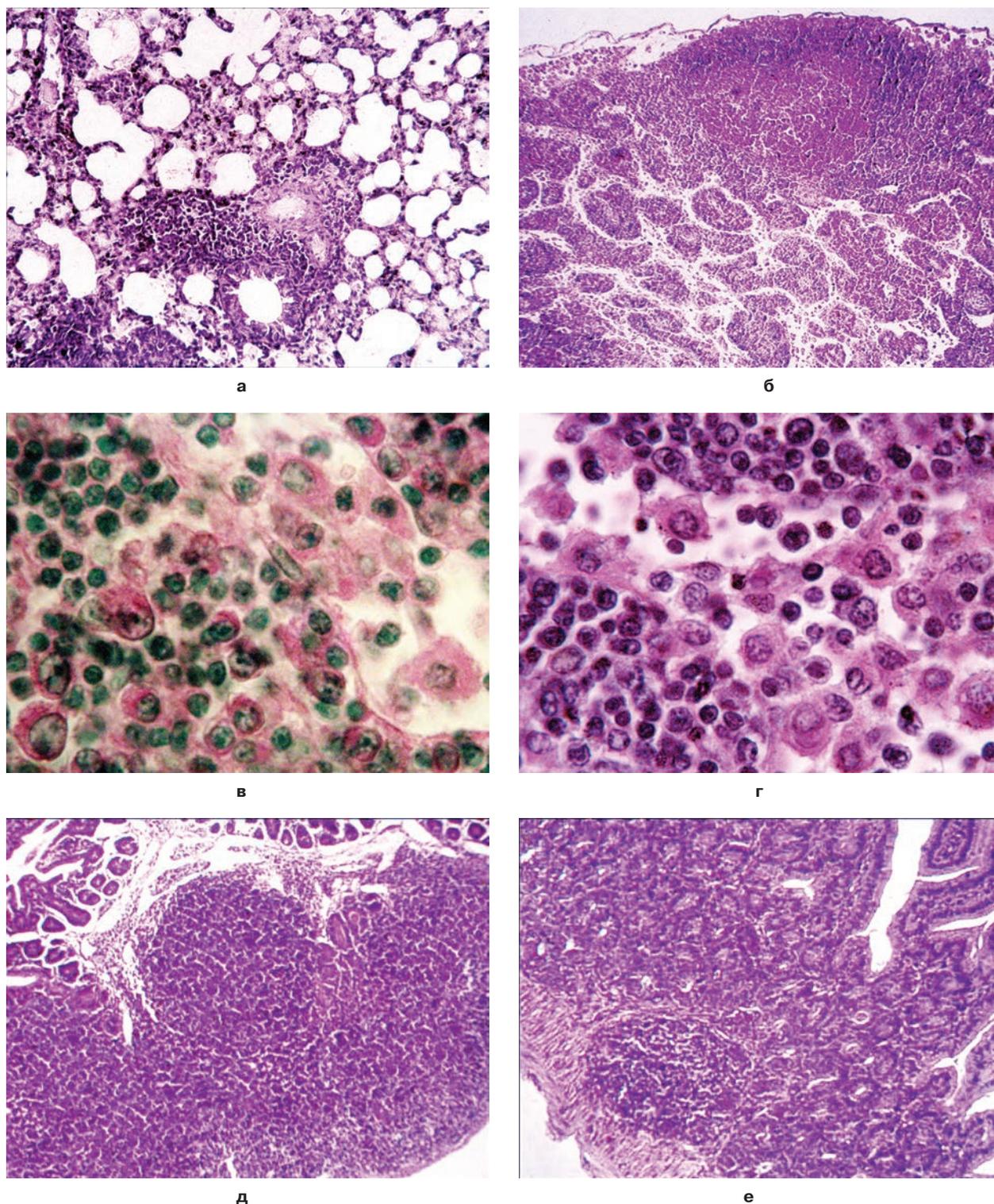


Рис. 2. Лимфоидная ткань региональная к месту введения антигена у мышей, иммунизированных Иммуновак ВП-4: **а, б, в, г** – интраназальная иммунизация; **д, е** – пероральная иммунизация; **а** – легкое; ув. 200; **б** – лимфатический узел; ув. 100; **в** – мозговой синус лимфатического узла; ув. 1000; **г** – мозговой синус лимфатического узла; ув. 1000; **д** – групповые лимфоидные узелки в подвздошной кишке; ув. 100; **е** – солитарный лимфоидный узелок в месте перехода тонкой кишки в толстую; ув. 200; **а, д, е** – окр. гематоксилином и эозином; **б, в** – окр. метиловым зелёным и пиронином по Браше; **г** – окр. шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабадашу с контрольной обработкой амилазой.

заполнена лейкоцитами, но интраэпителиальные лимфоциты встречаются редко. В месте перехода тонкой кишки в толстую видны солитарные лимфоидные узелки (рис. 2е).

Особое внимание следует обратить на лимфоидную ткань селезенки при различных методах аппликации бактериальных антигенов (рис. 3).

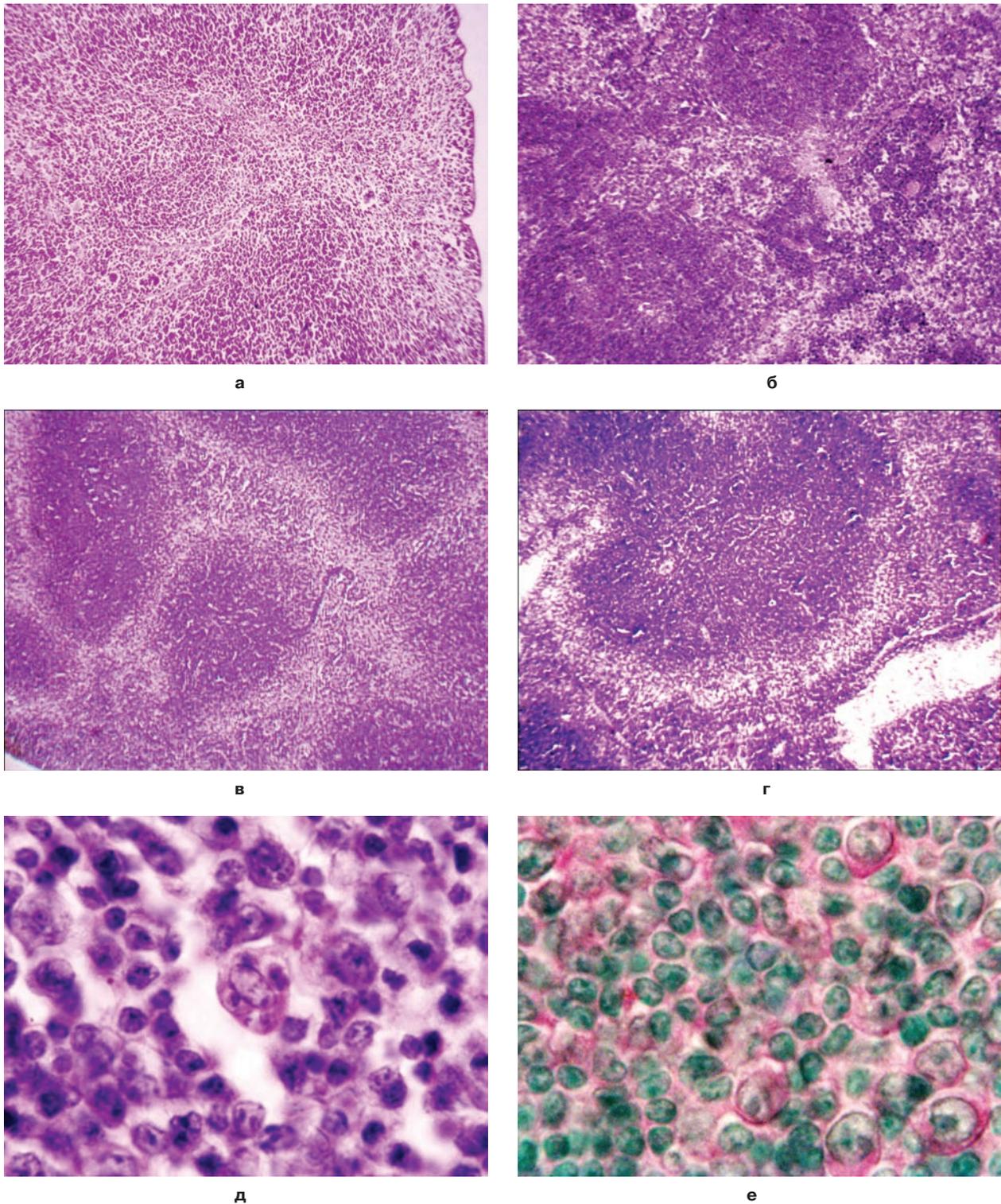


Рис. 3. Селезенка intactных и иммунизированных Иммуновок ВП-4 мышей: **а** – intactная мышь; **б** – интраназальная иммунизация; **в** – пероральная иммунизация; **г, д, е** – подкожная иммунизация; **а, в, г** – окр. гематоксилином и эозином; **б, д** – окр. шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабдашу; **е** – окр. метиловым зелёным и пиронином по Браше; **а, б, в, г** – ув. 100; **д, е** – ув. 1000.

У intactных животных белая пульпа в селезенке занимает меньшую площадь, чем красная. Лимфатические узелки малых и средних размеров, не разделены на типичные зоны (рис. 3а). Интраназальное введение вакцины приводит к расширению площади белой пульпы, лимфоидные узелки при-

обретают тенденцию к слиянию, увеличиваются в размерах, в них появляются реактивные центры и маргинальные зоны (рис. 3б). При пероральной иммунизации размеры лимфоидных узелков белой пульпы также увеличены, и некоторые приобретают тенденцию к слиянию, т.е. структура селезенки

напоминает картину, выявляемую в предыдущей группе (рис. 3в). И, наконец, при подкожной инъекции антигенов бактериальной природы наблюдается слияние лимфоидных узелков белой пульпы, они приобретают самую разнообразную конфигурацию (рис. 3г). Во многих из них отчетливо различаются все хорошо развитые отделы (периартериальная муфта, центр размножения, мантийная и маргинальные зоны). В реактивных центрах выявляются макрофаги, фагоцитирующие клеточный детрит и апоптотные тела (рис. 3д) и многочисленные бластные формы (рис. 3е).

Таким образом, установлено, что антигены условно патогенных бактерий независимо от пути введения являются активными стимуляторами эффекторной системы врожденного иммунитета. В реализации функции слизистых оболочек, как первой линии защиты от патогенов, наиболее значительную роль играют $T\gamma\delta$ и B_1 -лимфоциты, являющиеся важнейшими компонентами мукозальной иммунной системы. В данном исследовании выявлено, что после многократного введения Иммуновак ВП-4 происходит значительное увеличение количества $T\gamma\delta$ - и B_1 -лимфоцитов при всех методах введения. Маркеры $T\gamma\delta$ и B_1 -лимфоцитов наиболее активно экспрессируются на поверхности лимфоцитов: при интраназальном введении — в NALT/BALT и в селезенке; при пероральном — в GALT и NALT/BALT; при подкожном введении — в селезенке и NALT/BALT. Как известно, данные клетки обладают свойством усвоения PAMPs микроорганизмов без предварительного их процессинга и представления в комплексе с МНС II T-лимфоцитам. Это обстоятельство обеспечивает быструю защиту от различных патогенов и вносит свой вклад в расшифровку механизма меньшей сенсибилизирующей активности антигенов при мукозальном введении, поскольку при взаимодействии этих клеток вырабатываются антитела классов IgM и IgA, но не IgE.

Из представленных данных видно, что при контакте с комплексом антигенов условно патогенных бактерий происходит экспрессия маркеров почти всех популяций лимфоцитов. Однако выявлены некоторые иммунофенотипические отличия в зависимости от методов введения группы антигенов условно патогенных микроорганизмов. При интраназальной аппликации наблюдалась активация (в 10 и более раз) иммунокомпетентных клеток ($T\gamma\delta$, B_1 , CD3, CD4, CD8, CD19) в NALT/BALT и в селезенке. Пероральное введение приводило к увеличению количества иммуноцитов ($T\gamma\delta$, B_1 , CD3, CD4, CD19, NK) в GALT и NALT/BALT. Подкожная иммунизация препаратом Иммуновак вызывала активацию $T\gamma\delta$, B_1 в селезенке и в NALT/BALT. Обращает на себя внимание, что только пероральный метод характеризовался значительным повышением NK-клеток, являющихся важнейшим компонентом врожденного и адаптивного иммунитета.

В данном исследовании подтверждено также положение о том, что происходит интенсивный обмен лимфоцитами не только между лимфо-

идными образованиями, ассоциированными со слизистыми оболочками респираторного и желудочно-кишечного трактов, но и с селезенкой, что обеспечивает при мукозальных методах иммунизации развитие, наряду с местным, и системного иммунитета. Это показано также с помощью морфологических методов исследования, которые выявляют активацию лимфоидной и макрофагальной систем, бласттрансформацию и пролиферацию клеток лимфоидной ткани и плазмоцитогенез как в иммунокомпетентных органах, региональных к месту введения вакцины, так и в селезенке при всех методах аппликации антигенов условно патогенных микроорганизмов. Следовательно, проведенные исследования подтверждают представление о единстве системы слизистых оболочек [6, 7], в соответствии с которым активированные клетки-эффекторы иммунитета циркулируют, проникая даже в отделы, отдаленные от места введения антигенов. Это подтверждает положение о том, что мукозоассоциированная лимфоидная ткань (mucosal-associated lymphoid tissue — MALT) является важнейшим органом иммунитета, имеющим функциональную связь с системным иммунитетом [6, 7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о высокой степени активации эффекторов врожденного иммунитета как при парентеральной, так и при мукозальной иммунизации комплексом антигенов условно патогенных микроорганизмов. Это подтверждается появлением значительного числа клеток с экспрессированными дифференцировочными, костимулирующими, адгезивными маркерами, пролиферацией ключевых эффекторов мукозального иммунитета ($T\gamma\delta$ и B_1 , NK клеток), морфологическими изменениями в иммунокомпетентных органах и региональных к месту введения, и удаленных от него. Совокупность имеющихся в настоящее время данных об эффекте и механизме действия мукозальных методов введения вакцин и иммуномодуляторов позволяет считать разработку мукозальных моно- и ассоциированных вакцин приоритетным направлением современной вакцинологии.

Работа поддержана грантом РФФИ 11-04-96037p_урал_a и Администрацией Пермского края.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противомикробный. — М.: Практ. медицина, 2008. — 256 с.
2. Егорова Н.Б., Курбатова Е.А. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно-патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак-ВП-4 // Мед. иммунология. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 13 — 20.
3. Курбатова Е.А. Разработка поликомпонентной вакцины из антигенов условно-патогенных

микроорганизмов (Экспериментальное и клинико-иммунологическое исследование): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1997. — 50 с.

4. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. — М., 1969. — С. 128—131.

5. Сидорова Е.В. Королевство В-лимфоцитов // Мед. иммунология. — 2004. — Т. 6, № 3—5. — С. 176—185.

6. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и при патологии // Иммунология. — 1997. — № 5. — С. 4—7.

7. Asanuma H., Thompson A.H., Jwasaki T., Sato Y. et al. Isolation and characterization of mouse

nasal-associated lymphoid tissue // J. Immunol. Met. — 1997. — Vol. 202. — P. 123—131.

8. Biossmenu R. Function of intestinal gammadelta T-cells // Immunol. Res. — 2000 — N 2—3. — P. 123—127.

9. Harris G., KuoLee R., Chen W. Role of Toll-like receptors in health and disease of gastrointestinal tract // World J. Gastroenterol. — 2006. — N 12. — P. 2149—2160.

10. Porrett P.M., Yuan X., La Rosa D.F., Walsh P.T. et al. Yang J. Mechanisms underlying blockade of allograft acceptance by TLR ligands // J. Immunol. — 2008. — Vol. 181, N 3. — P. 1692—1699.

11. Xiong N., Raulet D.H. Development and selection of gammadelta T cells // Immunol. Res. — 2007. — Vol. 215. — P. 15—31.

Сведения об авторах

Лебединская Ольга Витальевна — доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития, доктор медицинских наук (614039, г. Пермь, ул. П. Осипенко, д. 61, кв. 74; e-mail: lebedinska@mail.ru)

Ахматова Нелли Кимовна — заведующая лабораторией регуляции иммунитета ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук

Бродовский Максим Борисович — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Ильиных Елизавета Анатольевна — заочный аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная медицинская академия им. академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения и социального развития

Егорова Надежда Борисовна — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН

Курбатова Екатерина Алексеевна — заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» РАМН, доктор медицинских наук, профессор