

УДК 616-018.25-022:612.017.1]-07

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУННОГО ОТВЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДАХ ВВЕДЕНИЯ АНТИГЕНОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

*Н. П. Уткина<sup>1</sup>, Е. А. Ильиных<sup>1</sup>, О. В. Лебединская<sup>1\*</sup>, Н. К. Ахматова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Пермская государственная медицинская академия им. ак. Е. А. Вагнера, г. Пермь,

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова РАМН, г. Москва, Россия

## MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF IMMUNE RESPONSE IN DIFFERENT METHODS OF ADMINISTRATION OF OPPORTUNISTIC BACTERIA ANTIGENS

*N. P. Utkina<sup>1</sup>, E. A. Ilinykh<sup>1</sup>, O. V. Lebedinskaya<sup>1\*</sup>, N. K. Akhmatova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Perm State Academy of Medicine named after Academician E. A. Wagner, Perm,

<sup>2</sup>Research Institute of Vaccines and Sera named after I. I. Mechnikov, RAMS, Moscow, Russian Federation

---

**Цель.** Исследование морфологических, иммунофенотипических и функциональных особенностей формирования иммунного ответа при мукозальных и парантеральных методах введения комплекса антигенов условно-патогенных микроорганизмов.

**Материалы и методы.** Исследованы функциональные, иммунофенотипические и морфологические характеристики иммунокомпетентных клеток и органов (80 мышей, линия СВА) у интактных животных (контроль), а также при интраназальном (3-кратно в дозе 500 мкг/мышь), пероральном (3-кратно в дозе 2 мг/мышь) и подкожном (2-кратно в дозе 200 мкг/мышь) способах введения поликомпонентной вакцины «Иммуновак-ВП-4», содержащей комплекс антигенов условно-патогенных микроорганизмов. На мононуклеарных лейкоцитах селезёнок, лимфатических узлов и лимфоидной ткани тонкой кишки оценивали уровень экспрессии маркёров (CD3, NK 1.1, CD3/NK, CD4, CD25, CD4/CD25, CD8, CD19, MHC II, CD5.2 (B<sub>h</sub>), TCR (Тγδ)) при помощи моноклональных антител (CaltagLaboratories, США) на проточном цитометре FACS Calibur (BeckmanCoulterF-500, США). Выявляли цитотоксическую активность натуральных киллеров по отношению к опухолевой линии K562 в МТТ-тесте. Морфологические исследования проводили на серийных парафиновых срезах, окрашенных гистологическими и гистохимическими методами. При статистической обработке данных использовали пакет статистического анализа StatSoft 8.0.

**Результаты.** Выявлено, что исследуемый комплекс антигенов условно-патогенных бактерий вызывает заметную активацию эффекторов врождённого иммунитета как при парантеральной, так и при мукозальной иммунизации. Это проявляется в увеличении уровня экспрессии дифференцировочных, костимулирующих, адгезивных молекул на поверхности мононуклеарных лейкоцитов, в пролифера-

---

© Уткина Н. П., Ильиных Е. А., Лебединская О. В., Ахматова Н. К., 2013

e-mail: lebedinska@mail.ru

тел. 8 902 799 56 07

[Лебединская О. В. (\*контактное лицо) – доктор медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Уткина Н. П. – соискатель кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Ильиных Е. А. – аспирант кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии; Ахматова Н. К. – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета].

ции ключевых эффекторов мукозального иммунитета ( $T\gamma\delta$ - и  $B_1$ -лимфоцитов, NK-клеток), повышении их функциональной активности, в изменениях структуры, клеточного состава иммунокомпетентных органов и лимфоидной ткани, региональных к месту введения и удалённых от него, что свидетельствует о формировании не только местного, но и системного иммунитета.

**Выводы.** Полученные данные позволяют расширить стратегию использования вакцин и иммуномодулирующих препаратов бактериального происхождения с применением непарентеральных методов иммунизации для создания защиты от широкого спектра патогенов.

**Ключевые слова.** Иммунный ответ, антигены условно-патогенных микроорганизмов, Иммуновак ВП-4, мукозальная иммунизация, парентеральная иммунизация, иммунофенотип, цитотоксическая активность, морфологические изменения.

**Aim.** To investigate morphological, functional and immunophenotypic features of the immune response using mucosal and parenteral methods of administration of the complex of opportunistic microorganism antigens.

**Materials and methods.** Functional, morphological and immunophenotypic characteristics of immunocompetent cells and organs of mice (80, SWA line) in intact animals (control), as well as the above characteristics in intranasal (3-fold in the dose of 500  $\mu\text{g}$  / mouse), peroral (3-fold in the dose of 2 mg / mouse) and subcutaneous (2-fold in the dose of 200 mg / mouse), methods of administration of multicomponent vaccine Immunovac VP-4 containing the complex of opportunistic microorganism antigens were investigated. Mononuclear leukocytes of spleen, lymph nodes and lymphoid tissue of the small intestine were used to evaluate the expression level of markers (CD3, NK 1.1, CD3/NK, CD4, CD25, CD4/CD25, CD8, CD19, MHC II, CD5.2 (B1), TCR ( $T\gamma\delta$ ) with the help of monoclonal antibodies («Caltag Laboratories», USA) by means of a flow cytometer FacsCalibur («Beckman Coulter F-500», USA). Cytotoxic activity of natural killers against neoplastic K562 line in MTT assay was revealed. Morphological studies were performed on serial paraffin sections stained with histological and histochemical methods. Statistical processing of the data was performed using statistical package StatSoft 8.0.

**Results.** It was revealed that the investigated complex of opportunistic bacteria antigens causes significant activation of effectors of innate immunity both in parenteral and mucosal immunization. It is displayed in increased levels of expression of differentiation, co-stimulating, adhesive molecules on the surface of mononuclear leukocytes, in proliferation of key effectors of mucosal immunity ( $T\gamma\delta$ - $B_1$  and  $B_1$ -lymphocytes, NK cells), increase in their functional activity, changes in the pattern, cellular composition of immunocompetent organs and lymphoid tissue, regional to the site of administration and distant from it that indicates formation of not only local, but systemic immunity as well.

**Conclusion.** The obtained data allow us to extend the strategy for using vaccines and immunomodulators of bacterial origin by means of non-parenteral immunization methods to create protection from a broad spectrum of pathogens.

**Key words.** Immune response, opportunistic microorganism antigens, Immunovac VP-4, mucosal immunization, parenteral immunization, immunophenotype, cytotoxic activity, morphological changes.

## ВВЕДЕНИЕ

Активация сигнальных путей в процессе формирования врождённого и адаптивного иммунного ответа на первых этапах распознавания микробных антигенов зависит от методов введения их в макроорганизм, определяющих набор рецепторов, которые взаимодействуют с лигандами микроорганизмов и обуславливают индукцию ком-

плекса защитных реакций [9, 10]. В настоящее время возникла необходимость в обобщении данных по молекулярно-клеточным механизмам, задействованным в формировании мукозального иммунитета, так как до 90% патогенов проникают в организм через слизистые оболочки. Важное преимущество мукозальная иммунизация приобретает в условиях расширяющегося Национального календаря прививок, при котором ребёнок получает до 20–30 прививок в год. Теорети-

ческими и экспериментальными исследованиями последних лет установлено, что важнейшими компонентами, обеспечивающими особенности функциональной активности мукозальной иммунной системы, являются T $\gamma$  $\delta$ - и V $\beta$ <sub>1</sub>-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 T $\gamma$  $\delta$ - и V $\beta$ <sub>1</sub>-лимфоцитами обеспечивает активацию 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 врождённого и адаптивного иммунитета при мукозальных методах введения иммуномодуляторов и вакцин остаются малоизученными.

*Цель исследования* – характеристика морфологических, иммунофенотипических и функциональных особенностей формирования иммунного ответа при мукозальных (интраназальном, пероральном) и параназальном (подкожном) методах введения комплекса антигенов условно-патогенных микроорганизмов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения особенностей мукозального иммунитета использовалась поликомпонентная вакцина «Иммуновак-ВП-4<sup>®</sup>» (ФГУП «НПО "Микроген"»), обладающая широким набором PAMPs. Это обуславливает

высокую активность данного препарата в отношении врождённого 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, ассоциированные с белком наружной мембраны грамотрицательных микроорганизмов, пептидогликан, тейхоевые кислоты, липопротеины, являющиеся лигандами для Толл-подобных рецепторов.

В исследовании использовались мыши (80 животных линии СВА весом 16–18 г), полученные из питомника научного центра 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 3-кратно с интервалом в 2–3 дня. Интраназально препарат вводили в разовой дозе 500 мкг в объёме 30 мкл (1-я группа). Пероральная разовая доза составляла 2 мг в объёме 0,5 мл (2-я группа). Подкожно препарат вводили 2-кратно 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 мышей выводили из опыта эфирным наркозом; извлекали селезёнку, лимфатические узлы и лимфоидную ткань, ассоциированные с носовой полостью и бронхами (Nasal Associate Lymphoid Tissue – NALT, Broncho

Associate Lymphoid Tissue – BALT), а также лимфоидную ткань тонкой кишки (Gut Associate Lymphoid Tissue – GALT).

**Выделение мононуклеарных лейкоцитов.** Мононуклеарные лейкоциты лимфоидных органов мышей выделяли с помощью одноступенчатого градиента плотности фиколл-урографина по методу А. Воупм.

**Определение экспрессии поверхностных маркёров** проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов. Результаты учитывали на проточном цитометре FacsCalibur (Beckman Coulter F-500, США). На мононуклеарных лейкоцитах селезёнок, лимфатических узлов и лимфоидной ткани тонкой кишки мышей исследовали уровни экспрессии CD3, NK 1.1, CD3/NK, CD4, CD25, CD4/CD25, CD8, CD19, MHC II, CD5.2 (B<sub>1</sub>), TCR (T $\gamma$  $\delta$ ).

**Цитотоксическую активность мононуклеарных лейкоцитов лимфоидных органов и тканей** мышей определяли на НК чувствительной линии опухолевых клеток K-562 в МТТ-тесте. Опухолевые клетки ( $3 \cdot 10^4$ /мл) инкубировали в течение 18 часов в плоскостонных 96-луночных планшетах (Costar, Франция) в культуральной среде RPMI 1640 (Sigma, США) с мононуклеарными лейкоцитами органов и тканей после вакцинации в соотношении 1:5 в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37° С и 4 %-ном CO<sub>2</sub>. В лунки добавляли витальный краситель МТТ (Fluka, Германия) и по оптической плотности ( $\lambda$  – 540 нм), измеряемой на мультискане MS (Labsystem, Финляндия), рассчитывали процент лизиса опухолевых клеток (процент цитотоксичности).

Проведены морфогистохимические исследования центральных (костный мозг и тимус) и периферических (селезёнка, лимфатические узлы, лимфоидная ткань кишечника) органов мышей. Для доказательства отсутствия токсического действия применяемого иммуномодулирующего препарата исследовали паренхиматозные органы (печень, лёгкие, 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 зелёным и пиронином по Браше с контролем РНК-азой для оценки содержания РНК. Проводили ШИК-реакцию по Шабашу с контрольной обработкой срезов амилазой для выявления гликогена и нейтральных гликозаминогликанов и использовали альциановый синий с целью определения кислых гликозаминогликанов.

Фотосъёмку и анализ изображения с гистологических препаратов органов проводили с помощью цифровой системы регистрации и анализа изображения AxioVision4.2 (Carl Zeiss, Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли 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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа иммунофенотипических особенностей лимфоцитов мышей в селезёнке, NALT/ BALT и GALT при многократной иммунизации экспериментальных животных представлены в табл. 1.

При интраназальном введении вакцины существенно увеличивалось содержание поверхностных маркёров на клетках-эффекторах лимфатических узлов NALT/BALT (рис. 1). В NALT/BALT относительное содержание T $\gamma$  $\delta$ -лимфоцитов повысилось в 32 раза, B<sub>1</sub> – в 8 раз, CD19 и CD4 – в 39 и 3,9 раза соответственно. В селезёнке уровень T $\gamma$  $\delta$  возростал в 16 раз, B<sub>1</sub> – в 11 раз. В селезёнке в большей степени, чем в NALT/BALT, увеличивалось число CD4 (в 28 раз). В GALT все исследованные показатели изменялись в меньшей степени, чем в селезёнке и лимфатических узлах NALT/BALT. Следует учесть, что при интраназальном введении препарата мыши получали

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

Метод иммунизации	Содержание клеток, %*								
	Селезёнка			NALT/BALT			GALT		
	Маркёр	Интактные	Иммунизир.	Маркёр	Интактные	Иммунизир.	Маркёр	Интактные	Иммунизир.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Интраназально 3-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)	B <sub>1</sub>	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 B <sub>1</sub>	0,17±0,02 0,08±0,03	2,8±1,1 (16) 0,9±0,02 (11,3)	Tγδ B <sub>1</sub>	0,05±0,02 0,21±0,15	1,6±0,06 (32) 1,7±0,06 (8)			
Перорально 3-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)
	B <sub>1</sub>	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)
				B <sub>1</sub>	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)
						B <sub>1</sub>	0,15±0,06	11,7±0,9 (117)	
Подкожно 2-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 B <sub>1</sub>	0,17 ±0,02 0,08±0,03	5,3±0,5 (31,2) 4,9±1,2 (62)	Tγδ B <sub>1</sub>	0,05±0,02 0,2±0,15	12,0±1,6 (240) 12,2±1,6 (58)	CD19	0,4±0,1	1,75±0,2 (4,3)

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

небольшую дозу (суммарная доза вакцины 1500 мкг), которая всего в 3,75 раза превышала дозу, вводимую подкожно (суммарная доза 400 мкг).

Пероральное трёхкратное введение вакцины приводило к выраженным изменениям количественного состава популяций лимфоцитов во всех исследованных органах (см. табл. 1, рис. 1). В GALT относительное число Т $\gamma$ δ-лимфоцитов увеличилось в 45 раз. Количество В $_1$ -лимфоцитов возросло в 117 раз. Только при этом методе вакцинации отмечена положительная динамика популяции NK, которая возросла в 47,5 раза. Значительно увеличивалось также содержание клеток с маркерами CD3, CD4, CD8, CD19. В NALT/BALT резко возросло содержание Т $\gamma$ δ-, В $_1$ -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 селезёнке иммунизированных мышей: процентное содержание CD4 $^+$ , CD25 $^+$ , Т $\gamma$ δ, В $_1$ -клеток увеличилось всего в 6–8 раз.

При подкожном методе введения бактериальных антигенов происходила заметная активация клеток эффекторов врождённого иммунитета в селезёнке и лимфатических узлах NALT/BALT. При данном методе вакцинации наблюдалось повышение числа Т $\gamma$ δ-лимфоцитов в NALT/BALT в 240 раз, в селезёнке – в 31,2 раза. Также выявлен высокий уровень количества В $_1$ -лимфоцитов в этих органах при низкой степени увеличения других показателей. Значительно меньшее изменение этих показателей, как и при интраназальном методе введения, выявлялось в лимфоидной ткани тонкой кишки.

Для всех методов оказалось характерным наибольшее увеличение экспрессии маркёров В $_1$ - и Т $\gamma$ δ-лимфоцитов. Интересно,

что экспрессия NK-маркёров 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 маркёров на клетках селезёнки, что свидетельствует о развитии при этих методах не только мукозального, но и системного иммунитета.

Изучение цитотоксической активности натуральных киллеров лимфоидных органов и тканей экспериментальных мышей при разных способах введения вакцины показало следующее (табл. 2). При интраназальном введении «Иммуновак-ВП-4» усиливалась цитотоксическая активность NK-клеток в NALT/BALT и GALT (в 2,1 и 4,2 раза соответственно). При подкожной и пероральной иммунизации отмечалось повышение цитотоксичности NK в селезёнке в 1,8 раза, в NALT/BALT в 3,5 и 2,6 раза. Наиболее существенное нарастание цитотоксической активности NK отмечено в GALT – в 9,6 и 37,7 раза по сравнению с контролем. Самой высокой цитотоксичностью характеризовались клетки, полученные из лимфоидной ткани кишечника после пероральной иммунизации (75,4 $\pm$ 1,83%). Это является существенной особенностью перорального метода иммунизации и согласуется с тем, что только в этом случае наблюдалось существенное нарастание популяции NK-клеток после иммунизации.

Данные морфологических исследований служат подтверждением иммунофенотипического анализа количественного состава популяций лимфоидных клеток в органах, региональных к месту введения антигенов и отдалённых от него. При интраназальном введении «Иммуновак-ВП-4» наиболее ярко выраженная реакция наблюдается в органах, региональных к месту введения препарата (см. рис. 1).

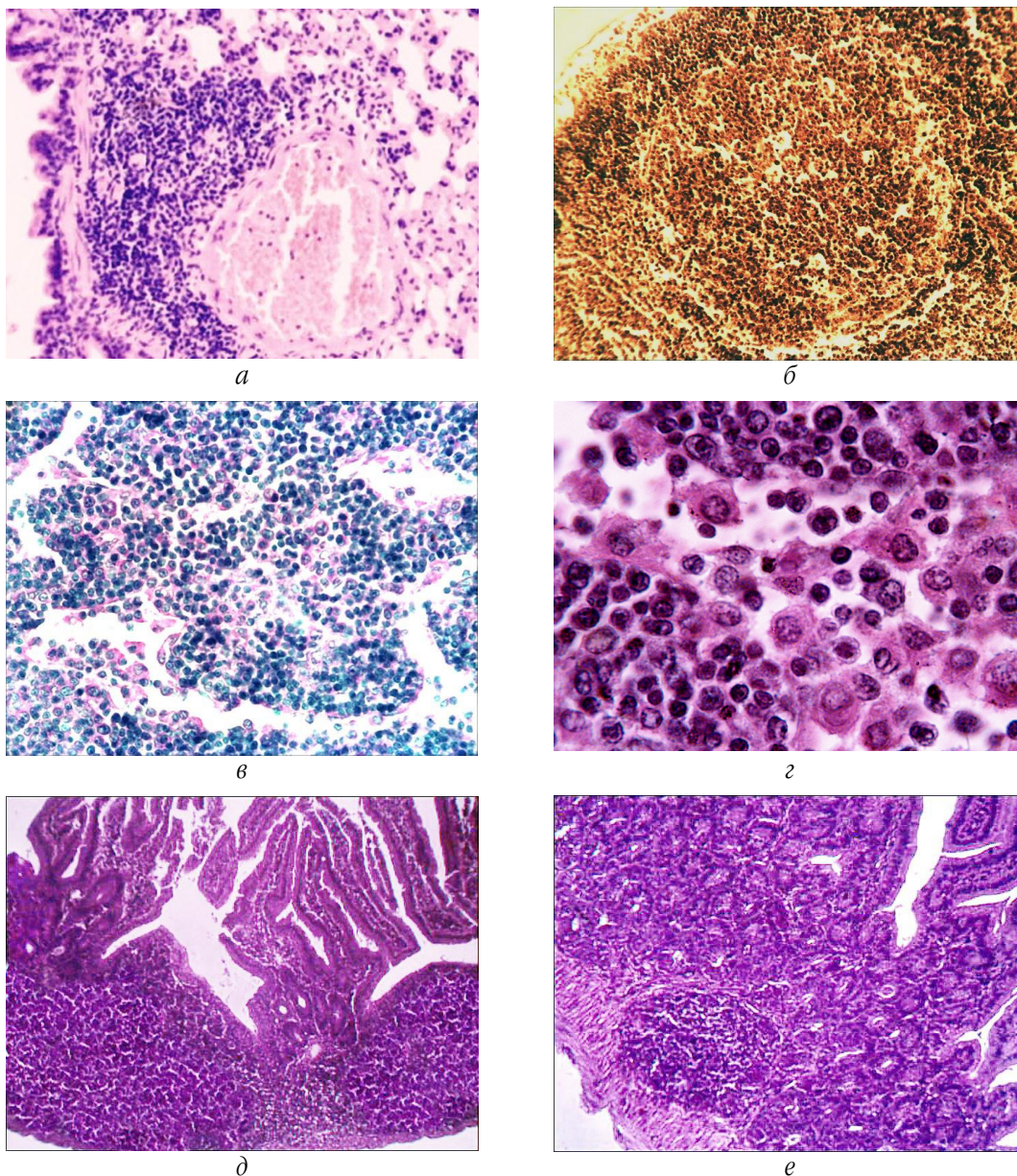


Рис. 1. Лимфоидные органы и ткани, регионарные к месту введения антигена у мышей, иммунизированных «Иммуновак-ВП-4»: а, б, в, з – интраназальная иммунизация; д, е – пероральная иммунизация; а – лёгкое, окрашенное гематоксилином и эозином; × 200; б – лимфатический узел, окрашенный по Ван Гизону; × 200; в – мозговой синус лимфатического узла, окрашенного метиловым зелёным и тиронином по Браше; × 400; з – мозговой синус лимфатического узла, окрашенный шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабдашу с контрольной обработкой амилазой; × 1000; д – групповые лимфоидные узелки в подвздошной кишке, окрашенные гематоксилином и эозином; × 100; е – солитарный лимфоидный узелок в месте перехода тонкой кишки в толстую; окраска гематоксилином и эозином; × 200

Таблица 2

**Цитотоксическая активность мононуклеарных лейкоцитов лимфоидных органов и тканей мышц, иммунизированных «Иммуновак-ВП-4», по отношению к НК-зависимой линии опухолевых клеток K562\*\***

Метод введения вакцины, дозы, кратность	Цитотоксичность МЛ (%), полученных из		
	селезёнки	лимфатических узлов NALT/BALT	лимфоидной ткани GALT
Контроль (физ. р-р)	18,3±1,2	7,7±1,45	2,0±1,15
Интраназальный (0,5 мг 3-кратно)	12,0±1,0	16,4±0,72*	8,4±0,8*
Пероральный (2 мг 3-кратно)	33,7±1,01*	20,1±0,8*	75,4±1,83*
Подкожный (0,2 мг 2-кратно)	33,7±0,93*	27,0±1,01*	19,3±2,2*

Примечание: \* – достоверность различий по отношению к контролю  $p < 0,05$ ; \*\* – соотношение «клетки эффекторы/клетки мишени» – 1:5.

В лёгких выявляются многочисленные перибронхиальные, периваскулярные и паренхиматозные лейкоцитарные инфильтраты, содержащие большое количество клеток лимфоцитарного ряда и макрофагов (см. рис. 1, *а*). Корковое вещество в перибронхиальных лимфатических узлах расширено, содержит крупные, иногда сливающиеся лимфоидные узелки (В-зависимые зоны). В некоторых узелках выявляются реактивные центры (см. рис. 1, *б*). Межузелковые участки плотно заполнены лимфоцитами и макрофагами. Паракортикальная зона практически отсутствует. Мозговые тяжи расширены, в них выявляются многочисленные бластные формы и плазмциты (см. рис. 1, *в*). За счёт расширения мозговых тяжей сужаются лимфатические синусы, в которых в большом количестве определяются макрофаги, лимфоциты, гранулоциты, делящиеся и стромальные клетки (см. рис. 1, *г*).

При пероральном введении вакцины наблюдается выраженная активизация лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (см. рис. 1, *д*, *е*). Агрегированные лимфоидные узелки (пейеровы бляшки) в подвздошной кишке многочисленны и занимают большую площадь, чем у интактных животных, сливаясь в конгломераты. Коли-

чество узелков с куполами (В-зоны) в составе бляшки увеличивается до 4–5. Межузелковые (Т-зависимые) зоны плотно заполнены лимфоцитами (см. рис. 1, *д*). Между криптами тощей кишки можно обнаружить диффузную лимфоцитарную инфильтрацию. Строма ворсинок тонкого кишечника заполнена лейкоцитами, но интраэпителиальные лимфоциты встречаются редко. В месте перехода тонкой кишки в толстую видны солитарные лимфоидные узелки (рис. 1, *е*).

Особое внимание следует обратить на лимфоидную ткань селезёнки при различных методах аппликации бактериальных антигенов. У интактных животных белая пульпа в селезёнке занимает меньшую площадь, чем красная. Лимфатические узелки малых и средних размеров, не разделены на типичные зоны (рис. 2, *а*). Интраназальное введение вакцины приводит к расширению площади белой пульпы, лимфоидные узелки приобретают тенденцию к слиянию, увеличиваются в размерах, в них появляются реактивные центры и маргинальные зоны (рис. 2, *б*). При пероральной иммунизации размеры лимфоидных узелков белой пульпы также увеличены, и некоторые приобретают тенденцию к слиянию, т.е. структура селезёнки напоминает картину, выявляемую в предыдущей группе



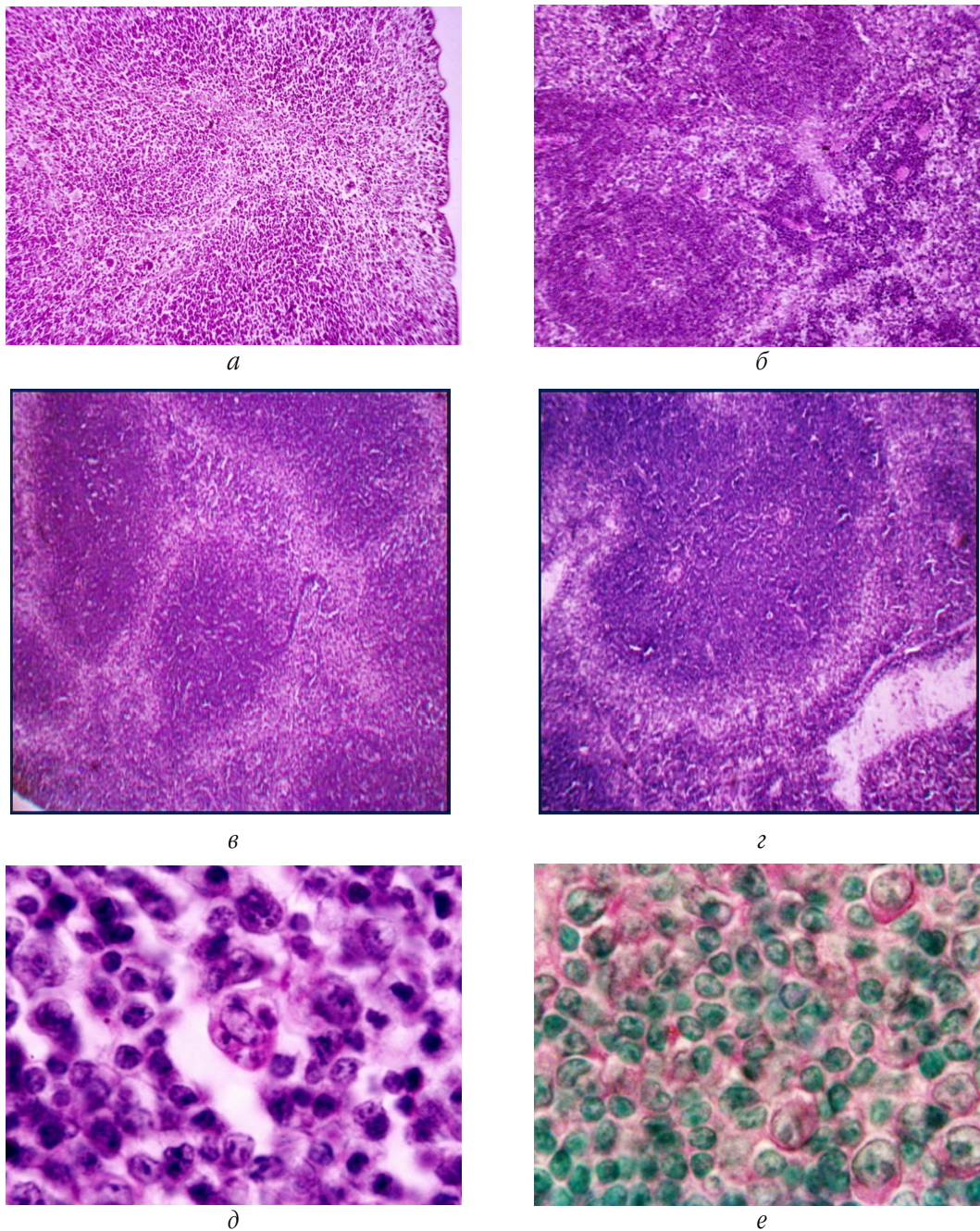


Рис. 2. Селезёнка intactных и иммунизированных «Иммуновак-ВП-4» мышей: а – intactная мышь; б – интраназальная иммунизация; в – пероральная иммунизация; з, д, е – подкожная иммунизация; а, в, з – окраска гематоксилином и эозином; б, д – окраска шифф-йодной кислотой и гематоксилином по Шабдашу; е – окраска метиловым зелёным и пиронином по Браше; а, б, в, з –  $\times 100$ ; д, е –  $\times 1000$

(рис. 2, в). И, наконец, при подкожной инъекции антигенов бактериальной природы наблюдается слияние лимфоидных узелков белой пульпы, они приобретают самую разнообразную конфигурацию (рис. 2, з). Во многих из них отчётливо различаются все хорошо развитые отделы (периартериальная муфта, центр размножения, мантийная и маргинальные зоны). В реактивных центрах выявляются макрофаги, фагоцитирующие клеточный детрит и апоптозные тела (рис. 2, д), и многочисленные бластные формы (рис. 2, е).

Таким образом, установлено, что антигены условно-патогенных бактерий независимо от пути введения являются активными стимуляторами эффекторной системы врождённого 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 использования «Иммуновак-ВП-4» происходит значительное увеличение количества  $T\gamma\delta$ - и  $B_1$ -лимфоцитов при всех методах введения. Маркёры  $T\gamma\delta$ - и  $B_1$ -лимфоцитов наиболее активно экспрессируются на поверхности лимфоцитов: при интраназальном введении – в NALT/BALT и в селезёнке; при пероральном – в GALT и NALT/BALT; при подкожном введении – в селезёнке и NALT/BALT. Как известно, данные клетки обладают свойством усвоения PAMPs микроорганизмов без предварительного их процессинга и представления в комплексе с MHC II T-лимфоцитам. Это обстоятельство обеспечивает быструю защиту от различных патогенов и влияет на расшифровку механизма меньшей сенсibiliзирующей 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 маркёров 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 раз и более) иммунокомпетентных клеток ( $T\gamma\delta$ ,  $B_1$ , CD3, CD4, CD8, CD19) в NALT/BALT и в селезёнке. 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 селезёнке и в NALT/BALT.

Обращает на себя внимание, что непарентеральное введение антигенов условно-патогенных бактерий индуцирует увеличение численности и цитотоксической активности NK, причём наибольшей цитотоксичностью характеризуются клетки, полученные после пероральной иммунизации из лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником.

В данном исследовании подтверждено также положение о том, что происходит интенсивный обмен лимфоцитами не только между лимфоидными образованиями, ассоциированными со слизистыми оболочками респираторного и желудочно-кишечного трактов, но и с селезёнкой, 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 селезёнке при всех методах аппликации антигенов условно-патогенных микроорганизмов. Следовательно, проведённые исследования подтверждают представление о единстве системы слизистых оболочек [6, 7], в соответствии с которым активированные клетки-эффекторы иммунитета циркулируют, проникая даже в отделы, отдалённые от места введения антигенов. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что мукозоас-

социированная лимфоидная ткань (mucosal-associated lymphoid tissue – MALT) является важнейшим органом иммунитета, имеющим функциональную связь с системным иммунитетом [6, 7].

### Выводы

Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о высокой степени активации эффекторов врождённого иммунитета как при парантеральной, 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 (Т<sub>γδ</sub>- и В<sub>1</sub>-, НК-кле-ток), морфологическими изменениями в иммунокомпетентных органах, и региональных к месту введения, и удалённых от него. Результаты нашего исследования дают теоретические предпосылки для расширения стратегии использования вакцин и иммуномодулирующих препаратов бактериального происхождения с применением непарантеральных методов иммунизации с целью создания защиты от широкого спектра патогенов. 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 11-04-96037р\_урал\_a и Администрацией Пермского края.

### Библиографический список

1. *Ахматова Н. К., Киселевский М. В.* Врождённый иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практическая медицина 2008; 256.
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). Медицинская иммунология 2008; 10 (1): 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.
4. *Лилли Р.* Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969; 128–131.
5. *Сидорова Е. В.* Королевство В-лимфоцитов. Медицинская иммунология 2004; 6 (3–5): 176–185.
6. *Хаитов Р. М., Пинегин Б. В.* Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и при патологии. Иммунология 1997; 5: 4–7.
7. *Asanuma H., Thompson A. H., Juwaki T., Sato Y.* Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. J. Immunol. Met. 1997; 202: 123–131.
8. *Biossmenu R.* Function of intestinal gammadelta T cells. Immunol. Res. 2000; 2–3: 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; 12 (14): 2149–2160.
10. *Porrett P. M., Yuan X., La Rosa D. F.* Mechanisms underlying blockade of allograft acceptance by TLR ligands. J. Immunol. 2008; 181 (3): 1692–1699.
11. *Xiong N., Raulet D. H.* Development and selection of gammadelta T cells. Immunol. Res. 2007; 215: 15–31.

Материал поступил в редакцию 03.06.2013