

ЛОКАЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ МЫШЕЙ ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ

Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б.,
Донина С.А., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г.

ГУ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН,
отдел вирусологии им. акад. А.А. Смородиной, Санкт-Петербург

Резюме. Локальный иммунный ответ слизистых оболочек организма служит первым и наиболее значимым барьером для развития многих вирусных инфекций, в том числе и гриппа. В отношении гриппозной инфекции таким барьером является мукозоассоциированная лимфоидная ткань верхнего отдела дыхательного пути. Считается, что назоассоциированная лимфоидная ткань (НАЛТ) грызунов эквивалентна лимфоидной ткани кольца Пирогова-Вальдеера у людей. Настоящая работа является первой попыткой проанализировать и сопоставить развитие клеточных и гуморальных иммунных реакций в НАЛТ при экспериментальной гриппозной инфекции, вызванной патогенным вирусом гриппа А (H1N1) и вакцинации животных приготовленным из него аттенуированным реассортантным вирусом А (H1N1) с генетической формулой 2/6 (P 2/6) – экспериментальный аналог вакцинного штамма для живой гриппозной вакцины.

Показано, что вакцинный штамм полностью наследует от вирулентного родителя способность к индукции полноценного локального гуморального иммунного ответа. В то же время он проигрывает вирулентному родительскому штамму в активности стимуляции циркулирующих антител. Способность к индукции пролиферативного иммунного ответа общего пула лимфоцитов НАЛТ родительским патогенным вирусом и P 2/6 практически не отличалась. P 2/6 активно стимулировал пролиферацию в НАЛТ Th (CD4⁺), В-клеток (CD 19⁺) и ЦТЛ (CD8⁺). Исследование активности синтеза цитокинов IFN- γ и IL-6 показало, что P 2/6 активировал в НАЛТ как Th1-, так и Th2-лимфоциты.

Полученные данные свидетельствуют, что интраназальный способ противогриппозной иммунизации живыми аттенуированными реассортантными вирусами с генетической формулой 2/6 приводит к стимуляции активного и сбалансированного Th1- и Th2-иммунного ответа во входных воротах инфекции (НАЛТ).

Ключевые слова: локальный иммунитет, гриппозная инфекция, вакцинация.

Petukhova G.D., Naikhin A.N., Barantseva I.B., Donina S.A., Chirkova T.V., Grigorieva E.P., Rudenko L.G.

LOCAL ANTIBODY AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES TO INFLUENZA INFECTION AND VACCINATION

Abstract. Local immune responses of mucous membranes of an organism are the first and most significant barriers preventing many virus infections, including influenza. The barrier against influenza infection is the mucosal-associated lymphoid tissue of the upper airways. It is considered, that nasopharyngeal-associated lymphoid tissue (NALT) in rodents is an equivalent of lymphoid tissue in human Waldeyer's ring. Present work is the first attempt to analyze and compare the development of cellular and antibody immune responses in NALT in a mouse model of experimental influenza infection using a pathogenic influenza A (H1N1) virus and an attenuated reassorted (2/6 genetic formula) live influenza A (H1N1) vaccine.

Адрес для переписки: Петухова Галина Дмитриевна, 197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова д.12, ГУ НИИЭМ РАМН, отдел вирусологии им. акад. А.А. Смородиной. Тел.: 234-68-60, 234-42-92, факс: 234-94-89. E-mail: vaccine@mail.ru

It was shown, that the vaccine strain inherits the ability to induce high-grade local antibody responses like as the virulent parental strain. However, the vaccine strain is inferior to virulent parental strain in capacity to stimulate production of circulating antibodies. Both parental and P 2/6 strains are equally able to induce lymphoproliferative immune response in NALT

lymphocytes. The attenuated reassortant virus is able to stimulate proliferation of Th (CD4⁺), B-cells (CD19⁺) and CTL (CD8⁺) in NALT. As shown by the cytokine activity testing (IFN- γ , IL-6), the attenuated reassortant virus activates both Th1- and Th2-lymphocytes in NALT.

This data suggest that intranasal immunization with live attenuated reassortant viruses (genetic formula 2/6) results into active and balanced stimulation of both Th1-and Th2-immune responses at the primary site of infection (NALT). (*Med. Immunol.*, 2006, vol.8, № 4, pp 511-516)

Локальный (местный, мукозальный) иммунный ответ слизистых оболочек организма служит первым и наиболее значимым барьером для развития многих вирусных инфекций, в том числе и гриппа [14]. В отношении гриппозной инфекции таким барьером является мукозоассоциированная лимфоидная ткань (МАЛТ) верхнего отдела дыхательного пути. У людей прямое изучение роли назофарингеальной МАЛТ в формировании локального иммунитета к возбудителям респираторных инфекций сопряжено с большими трудностями, поскольку это возможно только на основе иммунологических исследований эктомированных или биопсинизированных участков слизистой оболочки. Прорыв в исследовании локального противогриппозного иммунитета верхнего отдела дыхательного тракта наметился в конце прошлого века, когда была создана экспериментальная модель на лабораторных животных [6]. Основой такой модели послужили данные об обнаружении у крыс [10, 11], а затем у мышей [5] назоассоциированной лимфоидной ткани (НАЛТ), представляющей собой парные небные лимфоидные образования на границе носовых ходов и гортани. Считается, что НАЛТ грызунов эквивалентна лимфоидной ткани кольца Пирогова-Вальдеера у людей [10]. Разработан оптимальный метод сепарации НАЛТ у мышей [6]. В настоящее время это направление активно развивается с акцентом на изучение поствакцинального противовирусного иммунитета [4]. Данная работа является первой попыткой проанализировать и сопоставить развитие клеточных и гуморальных иммунных реакций в НАЛТ при экспериментальной гриппозной инфекции и вакцинации животных аттенуированным reassortантным вирусом гриппа А – экспериментальным аналогом вакцинного штамма для живой гриппозной вакцины (ЖГВ).

Материалы и методы

Животные. Экспериментальную гриппозную инфекцию и вакцинацию воспроизводили на мышах линии СВА в возрасте 8 – 10 недель.

Вирусы. Мышам вводили интраназально 2 вируса в дозах соответственно 4,0 lg ЭИД₅₀/0,1 мл и 6,0 lg ЭИД₅₀/0,1 мл: **(I)** патогенный для этих животных А/PR/8/34 (H1N1) – экспериментальный аналог дикого вирулентного вируса, используемого для приготовления живой гриппозной вакцины (инфекция); **(II)** аттенуированный reassortант 2/6 – экс-

периментальный аналог вакцинного штамма для ЖГВ, имеющий 2 гена наружных белков вируса гриппа от патогенного А/PR/8/34 (H1N1) и 6 генов внутренних белков от использовавшегося для производства ЖГВ донора аттенуации А/Ленинград/134/47/57 (H2N2). Reassortант обладал всеми характеристиками вакцинного штамма для ЖГВ: холодоадаптированностью, аттенуацией, резко сниженной способностью к репродукции в нижних отделах дыхательного тракта.

В качестве контроля использовались интактные животные. В каждую группу входило по 5 мышей.

Выделение лимфоцитов НАЛТ. Сепарацию НАЛТ осуществляли по методу [6]. Мышам под эфирным наркозом производили цервикальную дислокацию, после чего отрезали верхнюю челюсть по линии глазных яблок. После сепарации небной пластинки, выделяли непосредственно НАЛТ – парные лимфоидные образования по бокам от носовой перегородки со стороны задней части неба. Доли НАЛТ осторожно гомогенизировали с помощью замороженных предметных стекол с матовым краем (Biovitrum, Россия). Лимфоциты НАЛТ отмывали двукратно 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,4) (Sigma Co, США).

Антитела секретов дыхательных путей и сыворотки крови. Количественное определение общего пула IgG-, IgM- и IgA-антител осуществляли в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) по ранее разработанной методике [2] при помощи поликонъюгата - кроличьих антител к IgG+IgM+IgA мыши, меченных пероксидазой хрена (ICN Pharmaceutical Inc., США). В качестве субстрата использовался ортофенилендиамин (Sigma Co, США). Оптическую плотность (ОП) оценивали на спектрофотометре (Bio-Tec Instruments, Финляндия) при длине световой волны 420 нм. За титр антител принимали последнее разведение исследуемого материала, превышавшее в 2 и более раза данные контроля (все ингредиенты реакции без исследуемого образца). Антитела сывороток крови выявляли путем определения в ИФА титров IgA-, IgG- и IgM-антител по той же методике, используя коммерческие конъюгаты (ICN Pharmaceutical Inc., США).

Титры обоих видов антител определяли на 21-й день после заражения животных.

Пролиферативную активность лимфоцитов (ПАЛ) в НАЛТ оценивали по методу [13]. Клетки ресуспендировали в полной среде RPMI-1640 (ООО «Биолот», Россия), содержащей 10% сыворотки эм-

брионов коров. Взвесь лимфоцитов в концентрации $1 \cdot 10^6$ кл/мл вносили по 50 мкл в 96-луночные планшеты (Sarstedt Co, США). В качестве специфического стимулятора культур лимфоцитов использовали инактивированный вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Этот вирус вносили в концентрации 20 АЕ/лунку в объеме 50 мкл. Для достижения равного объема в контрольные лунки вносили по 50 мкл среды. Планшеты инкубировали при 37°C во влажной среде, содержащей 5% CO_2 . Через 72 ч в культуры клеток вносили 10 мкл МТТ (Sigma, США) в финальной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 4 ч при 37°C . По окончании времени инкубации во все лунки планшета добавляли по 100 мкл экстрагирующего раствора (0,04 N HCl в изопропанол). ОП учитывали на многоканальном спектрофотометре (Bio-Tec Instruments Inc., Финляндия) при длине световой волны 570 нм. Индекс стимуляции (ИС) лимфоцитов определяли как соотношение ОП лунок, стимулированных вирусом лимфоцитов к ОП контрольных лунок.

Распределение лимфоцитов НАЛТ по мембранным маркерам. Количество (%) CD4^+ Т-хелперов (Th), CD8^+ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) и CD 19^+ В-лимфоцитов оценивали с помощью набора меченых FITC моноклональных антител (BD Biosciences Pharmingen, США). Учет результатов проводили по данным проточной цитофлуориметрии (Becton. Dickson. FACS-calibur, США).

Уровень интерферона- γ (IFN γ) и интерлейкина-6 (IL-6) определяли в супернатантах трехдневных культур лимфоцитов, стимулированных инактивированным вирусом гриппа А/PR/8/34 (H1N1), используя стандартные коммерческие наборы для тестирования в иммуноферментном анализе мышинных цитокинов (BD Biosciences Pharmingen, США).

Статистические методы. Статистическую достоверность результатов, полученных в экспериментальных и контрольных группах животных, оценивали по критерию Стьюдента. Достоверным считали показатель $p < 0,05$.

Результаты

В таблице 1 представлены показатели локального гуморального иммунного ответа на патогенный и

аттенуированный вирусы гриппа А. Патогенный вирус А/PR/8/34 активно стимулировал продукцию локальных антител как в верхнем (назофарингеальные смывы), так и в нижнем (бронхоальвеолярные смывы) отделах дыхательного тракта. Атенуированный реассортант 2/6 вызывал выраженную продукцию этих антител в верхнем участке респираторного пути. Однако после введения этого вируса титры локальных антител в нижних дыхательных путях и титры циркулирующих IgG- и IgM-антител в сыворотке крови оказались ниже по сравнению с аналогичными показателями при гриппозной инфекции.

Рисунок 1 содержит сведения о способности тех же вирусов стимулировать локальный клеточный иммунный ответ, опосредованный ПАЛ. Показатели ПАЛ фиксировали в динамике. Введение как патогенного, так и аттенуированного вируса повышало пролиферативную активность лимфоцитов НАЛТ. Достоверное возрастание индексов стимуляции отмечено уже на третий день после зараже-

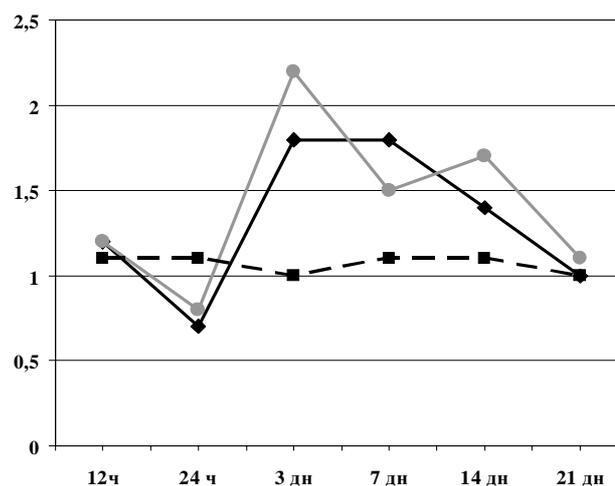


Рис. 1. Динамика пролиферативной активности лимфоцитов НАЛТ мышей, при гриппозной инфекции и вакцинации аттенуированным реассортантным вирусом гриппа. По оси ординат – индексы стимуляции (ИС) лимфоцитов вирусом А/PR/8/34 (H1N1), по оси абсцисс – время после заражения.

—◆— патогенный вирус А/PR/8/34 (H1N1);
—●— аттенуированный реассортант 2/6;
- - ■ - - контроль.

Табл. 1. ЛОКАЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВАКЦИНАЦИИ АТТЕНУИРОВАННЫМ ВИРУСОМ ГРИППА

Вирусы	Обратные величины титров антител				
	Назофарингеальные смывы*	Бронхоальвеолярные смывы*	Сыворотки крови		
			IgG	IgM	IgA
Патогенный А/PR/8/34 (H1N1)	64	64	128	64	16
Аттенуированный реассортант 2/6	64	16	64	32	16
Контроль	<2	<2	<2	<2	<2

* - Титры общего пула IgG-, IgM- и IgA-антител (см. «Материалы и методы»)

Табл. 2. ПРОДУКЦИЯ IFN- γ И IL-6 (пг/мл) В СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУР ЛИМФОЦИТОВ НАЛТ, СТИМУЛИРОВАННЫХ *IN VITRO* ИНАКТИВИРОВАННЫМ ВИРУСОМ A/PR/8/34 (H1N1)

Вирусы	IFN- γ		IL-6	
	3 дн.	7 дн.	3 дн.	7 дн.
Патогенный A/PR/8/34 (H1N1)	270	687	228	287
Аттенуированный реассортант 2/6	274	739	381	419
Контроль	163	250	156	99

ния ($p < 0,05-0,01$). Оба вируса вызывали кратковременную и незначительную супрессию клеточного иммунитета через 24 часа после введения ($p < 0,05$). Величины индексов стимуляции лимфоцитов НАЛТ у мышей, зараженных реассортантом 2/6 и патогенным родительским вирусом A/PR/8/34, оказались вполне сопоставимы ($p > 0,05$).

Данные рисунка 2 характеризуют способность патогенного и аттенуированного реассортантного вирусов стимулировать различные субпопуляции лимфоцитов. На пике ПАЛ (третий день после заражения) оба вируса одинаково активно стимулировали CD4⁺ Th и CD19⁺ В-клетки. Однако их способность индуцировать CD8⁺ ЦТЛ значительно отставала ($p < 0,001$). В целом, интенсивность индукции в НАЛТ всех изученных субпопуляций лимфоцитов при инфекции и вакцинации практически не различалась.

В таблице 2 приведены результаты, отражающие свойства патогенного и аттенуированного реассортантного вирусов повышать продукцию Th1 (IFN- γ) и Th2 (IL-6)-маркерных цитокинов. Количественные показатели продукции этих цитокинов определяли на 3 и 7 день после заражения животных. Выбор вырабатываемого Th2-клетками IL-6 обусловлен его участием в стимуляции IgA путем направления дифференцировки В-лимфоцитов в IgA-антителосекретирующие В-клетки [8]. Показатели концентрации IFN- γ и IL-6 у мышей, зараженных патогенным вирусом и аттенуированным реассортантом, превышали аналогичные данные в контрольной группе животных соответственно в 1,7-3,0 и 1,5-2,4 раза ($p < 0,01$; $< 0,001$). При этом реассортант не уступал патогенному родительскому вирусу в активности индукции этих цитокинов.

Обсуждение

Главным фактором локального гуморального противогриппозного иммунитета являются антитела секретов дыхательного тракта [7].

Нами показано, что в отличие от гриппозной инфекции, вызываемой патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1), вакцинация аттенуированным реассортантом 2/6 активно стимулировала продукцию локальных антител только в верхнем, но не в нижнем участке респираторного тракта (табл. 1). Фактически,

эти иммунологические данные отражают одно из основных биологических свойств вакцинных штаммов для ЖГВ – резкое снижение способности репродуцироваться в нижних отделах дыхательных путей [1]. Важно отметить, что величина титра секреторных антител в назофарингеальных смывах после гриппозной инфекции и иммунизации аттенуированным реассортантом 2/6 оказались одинаковыми.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии негативных последствий аттенуации вирусов гриппа А методом генетической реассортации по формуле 2/6 на способность стимулировать гуморальный локальный иммунитет во входных воротах инфекции. По-видимому, вакцинный штамм 2/6 полностью наследует от вирулентного родителя способность к индукции полноценного локального гуморального иммунного ответа. В то же время он проигрывает вирулентному родительскому штамму в активности стимуляции циркулирующих антител (табл. 1).

В последние годы основное внимание исследователей направлено на изучение клеточного локального противовирусного иммунитета [14], поскольку противогриппозная вакцинация должна быть эффективной в индукции не только Th2-гуморального, но и Th1-клеточного иммунного ответа в месте репликации возбудителя, т.е. в назофарингеальном участке дыхательного тракта [9].

Нами установлено, что способность к индукции пролиферативного иммунного ответа лимфоцитов НАЛТ патогенным вирусом A/PR/8/34 (гриппозная инфекция) и аттенуированным реассортантом (аналогом вакцинного штамма для ЖГВ) существенно не отличалась (рис. 1). При этом динамические изменения показателей ПАЛ у мышей, иммунизированных реассортантом 2/6 и его родительским патогенным вирусом, носили сходный характер. Эти данные свидетельствуют, что аттенуация вирусов гриппа А методом генетической реассортации не приводит к снижению их способности стимулировать локальную пролиферативную иммунную реакцию лимфоцитов в регионе первичного контакта вируса с организмом. Обращает на себя внимание наличие иммуносупрессии ПАЛ через 24 ч после заражения обоими вирусами. Скорее всего, это связано с ранее обнаруженным нами фено-

меном транзиторного апоптоза лимфоцитов, запускаемого на ранних сроках репликации этих штаммов [3].

При анализе иммунных реакций в НАЛТ важно знать, какие конкретные клетки пролиферируют после антигенного стимула. Нами отмечено, что реассортант 2/6 активно стимулировал пролиферацию в этом участке слизистой оболочки таких важных в противовирусном иммунитете популяций лимфоцитов, как Th ($CD4^+$) и В-клетки ($CD19^+$) (рис. 2). В то же время, стимуляция ЦТЛ ($CD8^+$) оказалась на более низком уровне. Полученные данные совпадают с результатами, приведенными японскими исследователями в отношении тех же субпопуляций лимфоцитов НАЛТ мышей, зараженных ослабленным пассажным методом вирусом гриппа А/PR/8/34 (H1N1) [6, 12].

Нами установлено, что и патогенный вирус, и аттенуированный реассортант 2/6 активно стимулировали продукцию как Th1- ($IFN\gamma$), так и Th2 ($IL-6$)- цитокинов лимфоцитами НАЛТ (табл. 2). При этом выработка $IFN\gamma$ была практически одинаковой в ответ на введение обоих вирусов, а продукция $IL-6$ была даже несколько выше после иммунизации аттенуированным реассортантом по сравнению с патогенным вирусом.

Таким образом, по нашим данным, вирус, аттенуированный методом генетической реассортации по формуле 2/6, активировал во входных воротах

инфекции (НАЛТ) как Th1-, так и Th2-лимфоциты. Это свидетельствует о сбалансированности клеточного и гуморального иммунного ответа на этот штамм.

Обобщая представленные данные, можно отметить следующее:

Впервые проведено сравнительное исследование функции НАЛТ в формировании гуморального и клеточного локального иммунного ответа мышей при гриппозной инфекции и вакцинации аттенуированными вирусами гриппа.

Показано, что вирус гриппа А (H1N1), аттенуированный методом генетической реассортации по формуле 2/6 (экспериментальный аналог вакцинного штамма для ЖГВ), не уступает патогенному родительскому вирусу А/PR/8/34 (H1N1) в активности стимуляции локального гуморального и клеточного иммунитета во входных воротах гриппозной инфекции (локальные IgA, IgG и IgM-антитела, пролиферативная активность общего пула лимфоцитов, индукция Th ($CD4^+$)-, ЦТЛ ($CD8^+$)- и В ($CD19^+$)-лимфоцитов, продукция Th1- и Th2-маркерных цитокинов). Это свидетельствует, что интраназальный способ противогриппозной иммунизации живыми аттенуированными реассортантными вирусами приводит к стимуляции активного и сбалансированного Th1- и Th2-иммунного ответа в НАЛТ.

С практической точки зрения полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что при-

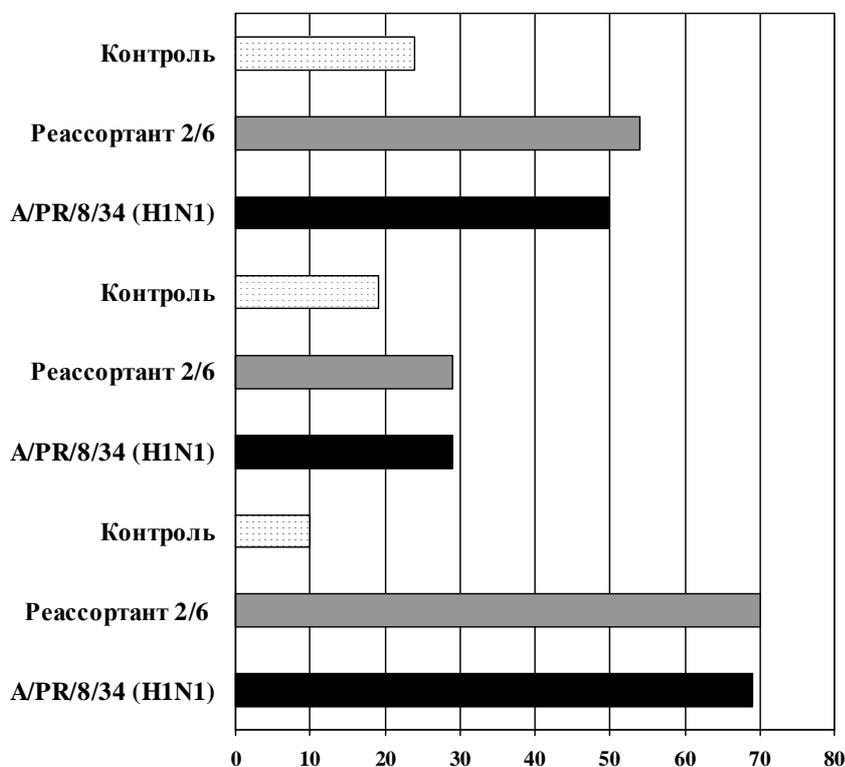


Рис.2. Количество $CD4^+$ - (Th), $CD8^+$ - (ЦТЛ) и $CD19^+$ - (В-лимфоцитов) при гриппозной инфекции и вакцинации аттенуированным реассортантным вирусом гриппа. По оси абсцисс – % от числа сортированных клеток (10 тыс.).

нятый при производстве вакцинных штаммов для ЖГВ способ их аттенуации путем генетической reassortации по формуле 2/6 не приводит к снижению иммуногенности этих штаммов в отношении индукции локального противогриппозного иммунитета в месте первичного контакта возбудителя с организмом.

Список литературы

1. Александрова Г.И., Климов А.И. Живая вакцина против гриппа. - Санкт-Петербург: Наука. - 1994. - 151 с.
2. Найхин А.Н., Доница С.А., Кустикова Ю.Г., Каторгина Л.Г., Руденко Л.Г. Моноклональная иммуоферментная тест-система для оценки секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В // Вопросы вирусологии. - 1997. - №5. - С. 212-216.
3. Найхин А.Н., Рекстин А.Р., Баранцева И.Б., Доница С.А., Дешева Ю.А., Григорьева Е.П., Киселева И.В., Руденко Л.Г. Иммуный ответ на живую гриппозную вакцину // Вестн. РАМН. - 2002. - № 12. - С.24-28.
4. Найхин А.Н., Баранцева И.Б. Локальный иммунный ответ к вирусам гриппа в назоассоциированной лимфоидной ткани // Мед. Иммунология. - 2004. - Т.6 - С. 487-492.
5. Asanuma H., Inaba Y., Aizawa Ch., Kurata T., Tamura S. Characterization of mouse nasal lymphocytes isolated by enzymatic extraction with collagenase // J. Immunol. Meth. - 1995. - Vol. 187. - P.41-51.
6. Asanuma H., Thompson A.H., Iwasaki T., Sato Y., Inaba Y., Aizawa C., Kurata T., Tamura S. Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue // J. Immunol. Meth. - 1997. - Vol. 202. - P.123-131.
7. Asanuma H., Aizawa Ch., Kurata T., Tamura S. IgA antibody-forming cell responses in the nasal-associated lymphoid tissue of mice vaccinated by intranasal, intravenous and/or subcutaneous administration // Vaccine. - 1998. - Vol.16. - P.1257-1262.
8. Beagley K.W., Eldridge J.H., Lee F., Kiyono H., Everson M.P., Koopman W.J., Hirano T., Kishimoto T., McGhee J.R. Interleukins and IgA synthesis: human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B-cells // J. Exp. Med. - 1989. - Vol. 169. - p. 2133-2148.
9. Hiroi T., Iwatani K., Iijima H., Kodama S., Yanagita M., Kiyono H. Nasal immune system: distinctive Th0 and Th1/Th2 type environment in murine nasal-associated lymphoid tissue and nasal passage, respectively // Europ. J. Immunol. - 1998. - Vol.28. - P. 3346-3353.
10. Koornstra P.J., De Jong F.I., Vlek L.F., Marres E.H., van Breda Vriesman P.J. The Valdeyer ring equivalent in the rat // Acta Otolaryng. - 1991. - Vol. 111. - P. 591-599.
11. Koper C.F., Koornstra P.J., Hameleers D.M., Biewenga J., Spit B.J., Duijvestijn A.M., van Breda Vriesman P.J., Sminia T. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue // Immunology Today. - 1992. - Vol.13. - P.129-224.
12. Matsuo K., Jwasaki T., Asanuma H. Cytokine mRNA in the nasal-associated lymphoid tissue during influenza infection and vaccination // Vaccine. - 2000. - Vol.18. - P.1344-1350.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular-growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. - 1983. - Vol.65. - P.55-63.
14. Tamura S., Kurata T. Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa // Jpn. J. Infect. Dis. - 2004. - Vol.57 - p.236-247.

*поступила в редакцию 12.12.2005
отправлена на доработку 10.01.2006
принята к печати 17.01.2006*