

Особенности изотипической структуры вирусспецифического системного гуморального иммунного ответа у взрослых волонтеров, привитых инактивированными субъединичными моновакцинами против гриппа A(H1N1)pdm09

А.А. Васильева¹, В.З. Кривицкая¹ (vera.kriv@influenza.spb.ru), Е.М. Войцеховская¹, В.С. Вакин¹, Е.В. Кузнецова¹, Е.Р. Петрова¹, А.А. Го¹, Н.И. Львов², А.А. Соминина¹

¹ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

²ФГБУ ВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург

Резюме

Проведен сравнительный анализ изотипической структуры системного гуморального иммунного ответа на вирус гриппа A(H1N1)pdm09 у взрослых волонтеров, привитых двумя отечественными инактивированными субъединичными моновакцинами против пандемического гриппа. Группу сравнения составили пациенты, перенесшие грипп A(H1N1)pdm09. По сравнению с пациентами, переболевшими пандемическим гриппом, в группе волонтеров, привитых инактивированными моновакцинами, наблюдали более активный ответ на вирус гриппа A(H1N1)pdm09 со стороны антител как с вируснейтрализующим потенциалом (IgG1, IgG2, IgG3), так и ассоциированных с аллергическим воспалением (IgG и IgE). Показана высокая активность вирусспецифических сывороточных IgA как у переболевших пациентов, так и у вакцинированных волонтеров. По данным РТГА, гемагглютинирующая противовирусная активность антител в поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров в отличие от сывороток, полученных от инфицированных пациентов в фазе реконвалесценции, превышала защитный уровень (1:40).

Ключевые слова: инактивированные гриппозные вакцины, пандемический грипп A(H1N1)pdm09, гуморальный иммунитет, изотипы иммуноглобулинов, взрослые волонтеры, переболевшие гриппом пациенты

Features of Isotypic Structure of Virus-Specific Systemic Humoral Immune Response in Adult Volunteers Immunized with Inactivated Monovalent Subunit Vaccines against Pandemic Influenza A(H1N1)pdm09

A.A. Vasileva¹, V.Z. Krivitskaya¹ (vera.kriv@influenza.spb.ru), E.M. Vojcekhovskaya¹, V.S. Vakin¹, E.V. Kuznecova¹, E.R. Petrova¹, A.A. Go¹, N.I. Lvov², A.A. Sominina¹

¹The Federal State Budgetary Institution «Research Influenza Institute» of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg

²Federal State Military Educational Institution of Additional Professional Education «Military Medical Academy named S.M. Kirov» Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg

Abstract

An isotypic structure of system antibody response to influenza A(H1N1)pdm09 was analyzed in adult volunteers vaccinated with two inactivated monovalent subunit vaccines against pandemic influenza. The comparison group consisted of patients infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus. In vaccinated volunteers the more active response of influenza-specific antibodies both with neutralizing properties (IgG1, IgG2, IgG3) and associated with allergic inflammation (IgG and IgE) was observed in comparison with infected patients. The high activity of the virus-specific serum IgA was observed both in infected patients and vaccinated volunteers. Antiviral hemagglutinating activity of antibodies in post-vaccination sera of vaccinated volunteers, unlike sera obtained from infected patients in the phase of recovery, were higher than protective level (1:40) according to HAI data.

Key words: inactivated influenza vaccines, pandemic influenza A(H1N1)pdm09, humoral immunity, immunoglobulin isotypes, adult volunteers, recover from influenza patients

Введение

В настоящее время для профилактики гриппа предлагается широкий спектр гриппозных вакцин, как инактивированных (ИГВ), так и живых аттенуированных (ЖГВ). Каждый тип вакцин имеет свои преимущества и недостатки. ИГВ направлены прежде всего на индукцию противовирусного систем-

ного гуморального иммунитета, в то время как ЖГВ в дополнение к этому стимулируют формирование специфического Т-клеточного и местного секреторного иммунного ответа. Оба типа вакцин обеспечивают 65 – 85% защиту. Однако при появлении в циркуляции антигенно отличного вируса гриппа того же субтипа протективный эффект вакцина-

ции снижается до 20 – 30%. При этом отмечено, что современные ЖГВ индуцируют иммунный ответ, характеризующийся более широким спектром действия против дрейф-вариантов вируса гриппа, чем ИГВ. С другой стороны, наличие в составе ИГВ адъювантов, обладающих иммуномодулирующим действием, а также внутримышечный способ их введения обеспечивают эффективную активацию антиген-презентирующих клеток и быструю пролиферацию В-клеток, секретирующих грипп-специфические антитела (АТ). Общий недостаток всех существующих вакцин – сниженная способность формирования долгосрочного иммунитета широкого спектра действия [1].

В этой связи, в настоящее время получило широкое развитие направление иммунологии, изучающее молекулярные механизмы защитного действия вакцин, а также возможных иммунопатологических осложнений, зависимость иммуногенности препарата от его антигенной структуры, иммунодоминирование в отношении определенных детерминант вакцинных антигенов [1 – 3].

Оценка спектра иммуноглобулинов (Ig) различных изотипов, синтезируемых в ответ на вакцинацию, может быть не только информативным критерием оценки иммуногенности вакцин, но также вкладом в понимание молекулярных механизмов действия новых препаратов на иммунную систему. Так, у мышей синтез IgG2a и IgG1 регулируется факторами, синтезируемыми главным образом Т-хелперами 1 или 2 типа (Th1 или Th2) соответственно. В этой связи в модельных экспериментах показатель соотношения активности антиген-специфических АТ данных изотипов (IgG2a/IgG1) традиционно используется для характеристики протективной (Th1-обусловленной) и потенциально патогенной (Th2-зависимой) составляющих адаптивного иммунного ответа у мышей, в том числе при оценке эффективности вакцин против гриппа [4]. При анализе противовирусного иммунного ответа у людей такой подход практически не используется. Вопрос о механизмах действия Ig различных изотипов у больных гриппом и волонтеров, привитых гриппозными вакцинами, остается нерешенным.

Задача проведенного исследования заключалась в сравнительной оценке изотипической структуры вирусспецифического иммунного ответа у взрослых волонтеров, привитых отечественными ИГВ, прошедшими клинические испытания [5, 6].

Материалы и методы

Группы вакцинированных волонтеров

Проанализированы пре- и поствакцинальные сыворотки взрослых волонтеров, привитых в 2009 – 2011 годы следующими гриппозными вакцинами:

13 взрослых волонтеров были однократно привиты инаktivированной субъединичной моновакциной «А». Состав 1 дозы вакцины:

- 5 мкг поверхностных антигенов (гемагглютина и нейраминидазы) вируса гриппа А/Кали-

форния/07/09, полученного из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов,

- 500 мкг иммуномодулятора полиоксидония,

14 взрослых волонтеров были однократно привиты инаktivированной субъединичной моновакциной «В». Состав 1 дозы вакцины:

- 5 мкг поверхностных антигенов (гемагглютина и нейраминидазы) вируса гриппа А/Калифорния/07/09, накопленного в культуре клеток MDCK,
- 500 мкг иммуномодулятора полиоксидония.

Клинические материалы

Группу сравнения составили 34 взрослых пациента с лабораторно установленным гриппом А(H1N1)pdm09 легкой или средней тяжести, проходившие лечение в отделении респираторных вирусных инфекций у взрослых НИИ гриппа, а также в Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Обследование проводилось с ноября 2009 по февраль 2012 года. Пациенты не были привиты вакциной против гриппа А(H1N1)pdm09. Исследовались парные сыворотки крови, полученные в острой (2 – 4 день) и реконвалесцентной (7 – 15 день) стадиях заболевания. Диагноз гриппа А(H1N1)pdm09 был установлен на основании данных ПЦР при анализе назальных мазков с использованием наборов «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL» (Интерлабсервис, Москва) и/или по выявлению сероконверсий субтипоспецифических IgG (без разделения на изотипы) при использовании ИФА-тест-систем (ООО «Предприятие по производству диагностических препаратов», Санкт-Петербург).

Для характеристики структуры вирусспецифического гуморального иммунного ответа были сконструированы экспериментальные образцы иммуноферментных тест-систем. В качестве антигенов (АГ) для сорбции на твердой фазе использовали фракцию поверхностных гликопротеинов (НА и NA) вируса гриппа А(H1N1)pdm09, штамм А/Калифорния/07/09, полученного из Музея вирусов гриппа и ОРЗ (ФГБУ «НИИ гриппа»).

Выделение фракции поверхностных гликопротеинов (ГП) вирусов гриппа

Фракцию ГП получали из цельновирионных суспензий аллантоисных вирусов, очищенных и концентрированных ультрацентрифугированием через градиент 20 – 46% сахарозы, путем обработки вирусного концентрата 2% раствором детергента n-октил-β-D-глюкопиранозид; (Sigma, США) в течение 15 мин при 37 °С. Солюбилизованные ГП отделяли от вирусных коков центрифугированием при 40000 g в течение 1,5 ч, после чего супернатант центрифугировали в 5 – 40% градиенте сахарозы в течение 3 ч при 120000g. Для дальнейшего изотипического анализа антител в ИФА использовали фракцию поверхностных ГП, лишенную вну-

тренных вирусных белков. Такой материал был идентифицирован в зоне 12 – 17% сахарозы по специфическому взаимодействию в ИФА с МКА к гемагглюнину (НА) вируса гриппа A(H1N1)pdm09 при отсутствии реагирования с МКА, направленными к внутривирионному NP-белку вирусов гриппа типа А. Содержание белка в вирусном материале определяли по методу Бредфорда [7]. Отсутствие консервативных типоспецифичных внутренних белков в антигенном материале позволило проводить в ИФА субтипую дифференцировку АТ, специфически направленных к поверхностным антигенам вируса гриппа A(H1N1) pdm09, без перекрестного взаимодействия с АТ к вирусу гриппа A(H3N2).

Детекция в ИФА противогриппозных иммуноглобулинов различных изоформ

Фракцию очищенных вирусных ГП (2 мкг/мл), разведенных карбонатно-бикарбонатным буфером (рН 9,5), использовали для сенсибилизации твердой фазы (планшеты ОАО «Фирма Медполимер», Санкт-Петербург). Анализируемые сыворотки, разведенные 0,01М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), рН 7,2, с добавлением 5% обезжиренного молока (ФСБ-М) наносили на сенсибилизированные планшеты и инкубировали 18 ч при 4 °С. Сыворотки исследовали в одном разведении, предварительно определенном как оптимальное: 1/200 (IgG1 и IgA), 1/20 (IgG2, IgG4, IgE), 1/40 (IgG3). Связавшиеся с антигеном АТ детектировали с помощью пероксидазных конъюгатов МКА (МКА-Пх), специфичных к соответствующим изоформам Ig человека (НПО «Полигност», Санкт-Петербург), разведенных до рабочей концентрации буфером ФСБ-М. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 0,02% H₂O₂ в ацетат-цитратном буфере, рН 5,0. После остановки реакции с помощью 2N H₂SO₄ измеряли оптическую плотность на фотометре Labsystems Multiskan (Thermo Electron Corp., США) при длине волны 450 нм (OD₄₅₀).

Сероконверсию считали доказанной, если показатель OD₄₅₀ сыворотки, полученной в реконвалесцентный период заболевания, превышал OD₄₅₀ сыворотки, взятой в острой стадии, не менее чем на 0,25. В предварительных экспериментах с титрованием сывороток в ИФА было установлено, что этому показателю соответствуют 4-х-кратные и более приросты титров АТ в РТГА.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Во избежание неспецифических реакций сыворотки крови предварительно подвергали обработке рецептор-разрушающим энзимом (Receptor Destroying Enzyme, RDE), выпускаемым фирмой Denka Seiken Co., LTD, Tokyo, Japan. Постановку РТГА осуществляли в соответствии с методическими указаниями [8] с использованием диагностикомов производства ООО «Предприятие по

производству диагностических препаратов» (Санкт-Петербург). При анализе парных сывороток, полученных до и после вакцинации, а также в острый и реконвалесцентный периоды заболевания, сероконверсией считали 4-х кратное и более увеличение титров антител.

Статистическая обработка полученных данных

Обработка результатов проводилась с помощью компьютерных программ StatDirect и Statistica 10. Графически уровни АТ (OD₄₅₀) представлены в виде квантилей. При множественных попарных сравнениях независимых выборок на одном массиве данных (уровни Ig различных изоформ в сравниваемых группах) использовали критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнения после проведения рангового дисперсионного анализа с применением Н-критерия Крускала-Уоллиса. При сравнении выборочных долей (частоты выявления сероконверсий) применяли точный критерий Фишера. Проверяемые критериями нулевые гипотезы отвергались при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе работ, прежде всего, было проанализировано образование IgG1, IgG2 и IgG3, специфичных к поверхностным ГП вируса гриппа A(H1N1) pdm09, поскольку в модельных экспериментах на мышах, инфицированных вирусом гриппа [9], а также в результате клинических испытаний гриппозных вакцин [10] было убедительно показано, что протективное действие сывороточных АТ, включая нейтрализацию вируса, обуславливается главным образом именно этими изоформами.

В связи с отсутствием статистически значимых отличий по анализируемым нами показателям между группами волонтеров, привитых ИГВ «А» или «В», они были объединены в одну группу.

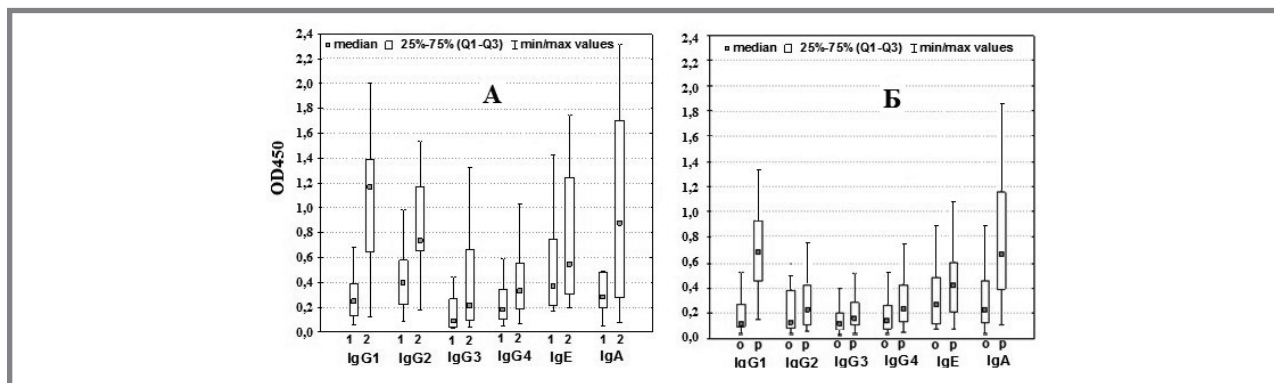
В группе вакцинированных волонтеров и переболевших пациентов частота выявления сероконверсии грипп-специфичных IgG1 была сопоставима, составляя 83 – 89%. Частота сероконверсии IgG3 уступала таковой, показанной для IgG1, при чем в группе привитых она оказалась значимо выше, чем у больных ($p = 0,04$). Сероконверсии вирусспецифичных IgG2 у привитых волонтеров были выявлены с высокой частотой. В то время как в группе переболевших пациентов АТ данного изоформы обнаруживались лишь в единичных случаях ($p < 10^{-6}$) (табл. 1).

В дополнение к высокой частоте конверсий IgG1, IgG2 и IgG3 у волонтеров, привитых моновакцинами, среднегрупповой уровень (OD₄₅₀) вирусспецифичных IgG1 и особенно IgG2 в поствакцинальных пробах значительно превышал OD₄₅₀, наблюдаемый для сывороток, полученных в фазе реконвалесценции в группе пациентов, переболевших гриппом ($p < 0,01$) (рис.1).

Полученные результаты дополняют данные, представленные в немногочисленных работах, по

Рисунок 1.

Уровни иммуноглобулинов различных изотипов, специфичных к поверхностным гликопротеинам вируса гриппа A(H1N1)pdm09, в сыворотках крови взрослых волонтеров, иммунизированных инактивированными субъединичными моновакцинами, и инфицированных пациентов



Примечание: волонтеры, привитые инактивированными моновакцинами (А); пациенты, переболевшие гриппом A(H1N1)pdm09 (Б). Сыворотки получены в острой (о) и реконвалесцентной (р) фазах заболевания.

священных изотипической структуре противогриппозного иммунного ответа. Так, ранее было показано, что при иммунизации волонтеров различными вариантами гриппозных вакцин, включая вакцину против гриппа A(H1N1)pdm09, ответ был выражен, главным образом, со стороны вирусспецифических IgG1 и в меньшей степени IgG3 [10 – 12]. У взрослых пациентов, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, сероконверсии были выявлены только для субтипоспецифических IgG1 [13].

Согласно данным литературы, при иммунизации взрослых людей гриппозными вакцинами сероконверсию грипп-специфических IgG2 не выявляли или наблюдали с невысокой частотой [10 – 12]. В отличие от этого отечественные инактивированные моновакцины против гриппа A(H1N1)pdm09 характеризуются высокой способностью индуцировать синтез вирусспецифических IgG2 (табл. 1).

Анализ в РТГА титров АТ, взаимодействующих с вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, выявил, что частота сероконверсии и величина средней геометрической титров (СГТ) антител были выше (хотя и недостоверно) в группе вакцинированных, чем у больных. При этом следует отметить, что СГТ АТ поствакцинальных проб в группе вакцинированных превышал титр 1:40, принятый при оценке эффективности вакцин в РТГА в качестве протективного [14]. В то же время у переболевших пациентов СГТ АТ, полученных в фазе реконвалесценции, был

в 1,6 раз ниже этого порогового значения (табл. 2).

Известно, что IgG1, IgG2, IgG3 человека, специфичные к различным вирусам, оказывают выраженное нейтрализующее действие. При этом IgG3 обладает большим потенциалом в отношении нейтрализации вирусов, чем IgG1. IgG1 и IgG3 обычно синтезируются в ответ на белковую составляющую антигенов, IgG2 – большей частью на полисахаридную [15]. Поверхностные белки вируса гриппа представляют собой гликопротеины. При этом тип и степень их гликозилирования сильно влияет на антигенные характеристики патогена и способность АТ взаимодействовать с ним [16]. Способность IgG2 нейтрализовать вирус путем взаимодействия с углеводной составляющей его белков может служить одним из объяснений высокой значимости в иммунной защите от инфекционных заболеваний, показанной для АТ данного изотипа. Так, тяжелое течение пневмонии, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, ассоциировано у пациентов с низким уровнем сывороточных IgG2 [17, 18].

Следует, однако, подчеркнуть, что в отличие от нашего исследования, в вышеупомянутых работах анализировали содержание в крови общего, а не вирусспецифического IgG2 [10 – 12].

Сравнение результатов РТГА и изотипической характеристики, проведенной с помощью ИФА, позволяет предположить, что НА-связывающая активность грипп-специфических АТ, которая, как

Таблица 1.

Изотипическая структура системного гуморального грипп-специфического иммунного ответа у взрослых волонтеров, иммунизированных инактивированными субъединичными моновакцинами, а также у больных гриппом A(H1N1)pdm09

Группа обследованных	Численность группы	Частота сероконверсий к антигенам вируса гриппа А/Калифорния/07/09 (%) (по данным ИФА):					
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgE	IgA
Волонтеры, привитые ИГВ «А» или «В»	27	89	93	56	44	81	70
Непривитые лица, переболевшие пандемическим гриппом A(H1N1)pdm09	34	83	9	29	15	35	68

Таблица 2.

Анти-гемагглютинирующая активность антител у взрослых волонтеров, иммунизированных у взрослых волонтеров, иммунизированных инактивированными субъединичными моновакцинами, и у пациентов, переболевших гриппом A(H1N1)pdm09

Группа обследованных	Численность группы	Активность антител, взаимодействующих с вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (по данным РТГА)	
		Частота сероконверсий (%)	Средние геометрические титры антител в парных сыворотках *
Волонтеры, привитые ИГВ «А» или «В»	27	78	7,2/50,4
Непривитые лица, переболевшие пандемическим гриппом A(H1N1)pdm09	25	56	7,8/25,0

Примечание: *обратные величины СГТ

известно, коррелирует с вируснейтрализующей активностью, обуславливается при введении рассмотренных вакцинных препаратов тремя изотипами – IgG1, IgG2 и IgG3. В отличие от этого у больных гриппом A(H1N1)pdm09 среди АТ, обладающих вируснейтрализующим потенциалом, высокой активностью отличались только IgG1.

Таким образом, полученные нами результаты с учетом данных литературы позволяют предположить, что низкая активность вирусспецифических IgG3 и особенно IgG2 у перенесших грипп пациентов может быть одной из причин сниженной активности АТ по отношению к вирусу гриппа A(H1N1)pdm09, выявленной нами в РТГА. И наоборот, более высокие показатели противовирусной функциональной активности АТ крови у привитых волонтеров могут быть следствием высокой активности не только IgG1, но также IgG3 и особенно IgG2, индуцированной вакцинацией.

Помимо анализа АТ, ответственных за вируснейтрализующую функцию, была проведена оценка активности Ig, ассоциированных с иммунопатологическими проявлениями (IgE и IgG4). Роль Ig данных изотипов в патогенезе вирусных заболеваний, включая грипп, изучена крайне слабо. Основные представления о механизмах их действия получены в результате изучения аллергических заболеваний.

Сенсибилизирующая функция антиген-специфических IgE при аллергическом воспалении четко определена. Взаимодействие аллергена с Fab-фрагментами двух молекул IgE, локализованных на специфических рецепторах (FcεRI) тучной клетки или базофила, приводит к дегрануляции этих клеток и выбросу ряда вазоактивных молекул, таких как гистамин, серотонин, простагландины, лейкотриены. Эти медиаторы увеличивают локальную проницаемость кровеносных сосудов, вызывают сжатие гладкой мускулатуры дыхательных путей, бронхоконстрикцию и создают очаг воспаления. Тучные клетки, активированные IgE-содержащими иммунными комплексами, продуцируют целый ряд хемокинов (RANTES, eotaxin, MIP-1a) и цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, TNF- и GM-CSF), которые обеспечивают приток клеток-эффекторов, ассоциированных

с аллергией (Т-клеток, базофилов, эозинофилов, моноцитов, а также В-клеток, продуцирующих IgE) [19].

В отличие от сенсибилизирующего действия IgE, IgG4 во многих случаях выполняет блокирующую толерогенную функцию: успешная иммунотерапия аллергических заболеваний приводит к интенсификации синтеза аллерген-специфических IgG4 и снижению уровня специфических IgE в крови за счет конкуренции Ig данных двух изотипов за связь с одними и теми же детерминантами аллергена. Следствием является отсутствие IgE-опосредованной активации клеток аллергического воспаления (базофилов и тучных клеток) [20].

Подобно другим лекарственным препаратам вакцины также могут быть причиной аллергических реакций. Тем не менее, при оценке безопасности вакцин в подавляющем числе случаев анализируется аллергизирующее действие только невирусной составляющей препарата (адьюванта, стабилизатора, примесей аллантоисных или клеточных белков) [21].

В немногочисленных статьях, посвященных возможному аллергизирующему действию вируса гриппа или гриппозных вакцин, отмечалось, что иммунизация инактивированной или живой аттенуированной вакциной против пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 индуцировала у детей и взрослых синтез вирусспецифических IgE [22].

Данные об образовании IgG4 противоречивы. По данным одних авторов, введение различных гриппозных вакцин, включая вакцину против гриппа A(H1N1)pdm09 [10 – 12], так же как и инфицирование вирусом пандемического гриппа [13] не приводило к формированию вирусспецифических IgG4. В то же время другие исследователи наблюдали сероконверсию IgG4 у 80% пациентов, переболевших гриппом, [23].

Несмотря на то, что серьезные случаи поствакцинальных осложнений наблюдаются редко, должны быть изучены механизмы их возникновения. При этом следует дифференцировать аллергию, возникшую непосредственно на вирусные антигены, от реакции на другие компоненты, входящие в состав вакцин. Особенно большое значение эти

исследования приобретают, на наш взгляд, в свете интенсивных современных разработок в области создания в качестве вакцин сложных генно-инженерных конструкций, воздействие которых на иммунную систему организма предугадать практически невозможно.

В представленной работе впервые была проведена сравнительная оценка активности вирусспецифических IgE и IgG4 у привитых волонтеров. Для понимания механизмов возможных иммунопатологических проявлений в результате вакцинации логичным представлялось проведение сопоставления активности IgE и IgG4. В этой связи, если принять концепцию о блокирующем антиаллергенном действии IgG4, то сопоставление сероконверсий IgE/IgG4) можно рассматривать как показатель возможного сенсибилизирующего или антисенсибилизирующего воздействия гриппозных антигенов на иммунную систему.

У волонтеров, привитых моновакцинами, была выявлена высокая активность вирусспецифических IgE, значительно превышающая таковую, показанную для инфицированных пациентов. Об этом свидетельствует повышенная по сравнению с больными частота выявления сероконверсии ($p = 0,006$) (см. табл. 1), а также более высокое содержание IgE в поствакцинальных сыворотках по сравнению с сыворотками больных в стадии реконвалесценции ($p = 0,03$). При этом уровень IgE в довакцинальных пробах привитых и сыворотках реконвалесцентов не отличался (см. рис. 1). Последнее свидетельствует о том, что высокую активность сывороточных IgE, наблюдаемую в результате введения волонтерам инаktivированных моновакцин, нельзя объяснить большей их предрасположенностью к атопии по сравнению с больными гриппом.

Частота выявления сероконверсии вирусспецифических IgG4 также была выше в группе вакцинированных по сравнению с больными ($p = 0,02$). Однако по содержанию АТ данного изотипа различий между группами выявлено не было (см. табл. 1, см. рис. 1).

Несмотря на межгрупповые различия в реагировании, показатель соотношения частоты выявления сероконверсий IgE/IgG4 был сопоставим у вакцинированных волонтеров и инфицированных пациентов, составляя соответственно 1,8 и 2,3.

Таким образом, при условии принятия постулата об антисенсибилизирующей роли IgG4, можно предположить, что несмотря на различия в активности вирусспецифических IgE и IgG4 у привитых и больных, в обеих группах приблизительно в 50% случаях высокая алергизирующая активность IgE блокируется в результате синтеза IgG4.

Тем не менее, вопрос о биологической значимости вирусспецифических IgE и IgG4 при гриппозной инфекции и введении гриппозных вакцин остается

открытым и требует дальнейшего изучения.

В отличие от секреторного IgA, защитная противовирусная роль которого хорошо изучена, функции сывороточных АТ этого класса во многом не ясны. В тоже время установлено, что сывороточный IgA играет важную противовоспалительную роль в регуляции иммунного ответа: ингибирует фагоцитоз моноцитов/макрофагов, хемотаксис макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов в очаге поражения, снижает секрецию провоспалительных цитокинов. С другой стороны отмечена прямая связь между высоким содержанием алергенспецифических IgA в крови и развитием у пациентов алергического воспаления, а также обострением атопической бронхиальной астмы [24].

По данным литературы, иммунизация различными вариантами гриппозных вакцин приводила к значительному повышению содержания в крови волонтеров не только вирусспецифических IgG, но и IgA [11]. Анализ сывороток крови взрослых пациентов, инфицированных вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, позволил авторам выявить в ИФА в 67% случаев сероконверсию специфических IgA [25].

Полученные нами результаты согласуются с представленными литературными данными. Частота выявления сероконверсии сывороточных IgA, взаимодействующих с поверхностными ГП вируса гриппа A(H1N1)pdm09, оказалась высоко информативным показателем реакции организма как на ИГВ, так и на инфекцию, варьируя в пределах 68 – 70% (табл. 1). При этом по уровню IgA статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было (см. рис.1).

Вопрос о том, обладают ли системные вирусспецифические IgA про- или анти-воспалительным действием при инфицировании или вакцинации может быть решен в ходе дальнейших исследований.

Выводы

1. По сравнению с пациентами, переболевшими пандемическим гриппом, в группе волонтеров, привитых инаktivированными моновакцинами против пандемического гриппа A(H1N1)pdm09, наблюдали более активный иммунный ответ на вирус гриппа со стороны антител как с вируснейтрализующим потенциалом (IgG1, IgG2, IgG3), так и ассоциированных с алергическим воспалением (IgG и IgE).
2. Показана высокая активность вирусспецифических сывороточных IgA как у переболевших пациентов, так и у вакцинированных волонтеров.
3. Гемагглютинирующая противовирусная активность антител в поствакцинальных сыворотках привитых волонтеров, в отличие от сывороток, полученных от инфицированных пациентов в фазе реконвалесценции, превышала защитный уровень (1:40).

Литература

- Chiu C., Ellebedy A.H., Wrammert J., Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 386: 381–398.
- Gomez Lorenzo M.M., Fenton M. J. Immunobiology of influenza vaccines. *Chest.* 2013; 143 (2): 502 – 510.
- Chung E.H. Vaccine allergies. *Clin. Exp. Vaccine. Res.* 2014; 3 (1): 50 – 57.
- Lv J., Wang D., Hua Y.H., Pei S.J., Wang J., Hu W.W. et al. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 197.
- Ельшина Г.А., Лонская Н.И., Мефед К.М., Пучкова Н.Г., Чирун Н.В., Горбунов М.А. и др. Результаты клинических исследований пандемических субъединичных гриппозных моновакцин. Биопрепараты. 2010; 4 (40): 31 – 36.
- Ельшина Г.А., Харит С.М., Романенко В.В., Комлева С.В., Пучкова Н.Г., Чирун Н.В. и др. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественных субъединичных адьювантных пандемических моновакцин группы Гриппол® у детей от 6 месяцев до 17 лет. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2011; 2 (57): 41 – 46.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 1 (72): 248 – 254.
- Соминина А.А., Кривицкая В.З., Войцеховская Е.М., Медведева Н.А., Липина Н.В., Потапенко Л.Б. Практические рекомендации по диагностике вирусных инфекций. Санкт-Петербург: 2005: 21.
- Palladino G., Mozdzanowska K., Washko G., Gerhard W. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. *J. Virol.* 1995; 69(4): 2075 – 2081.
- Pedersen G.K., Hschler K., ie Solbak S.M., Bredholt G., Pathirana R.D., Afsar A. et al. Serum IgG titres, but not avidity, correlates with neutralizing antibody response after H5N1 vaccination. *Vaccine.* 2014; 32 (35): 4550 – 4557.
- El-Madhun A.S., Cox R.J., Haaheim L.R. The effect of age and natural priming on the IgG and IgA subclass responses after parenteral influenza vaccination. *J Infect Dis.* 1999; 180 (4): 1356 – 1360.
- Frasca D., Diaz A., Romero M., Mendez N., Landin A.M., Blomberg B. Effects of age on H1N1-specific serum IgG1 and IgG3 levels evaluated during the 2011 – 2012 influenza vaccine season. *Immunity and Ageing.* 2013; 10:14.
- Arankalle V.A., Lole K.S., Arya R.P., Tripathy A.S., Ramdasi A.Y., Chadha M.S. et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13099.
- Concept paper on the revision of the CPMP/BWP note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines. London; 2001, CPMP/ EWP/1045/01.
- Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 2014; 5: 520.
- Reichert T., Chowell G., Nishiura H., Christensen R.A., McCullers J.A. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? *BioMed. Central. Infect. Dis.* 2010; 10: 5 – 9.
- Gordon C.L., Johnson P.D., Permezel M., Holmes N.E., Gutteridge G., McDonald C.F. et al. Association between severe pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection and immunoglobulin G(2) subclass deficiency. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50 (5): 672 – 678.
- Yamamoto T., Mizoguchi Y., Kaneno H., Yamamoto K., Inoue Y., Kawashima H. et al. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A(H1N1)pdm2009 infection. *J. Infect. Chemother.* 2013; 19: 833 – 842.
- Burton O.T., Oettgen H.C. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol. Rev.* 2011; 242 (1): 128 – 143.
- Hofmaier S., Comberiati P., Matricardi P.M. Immunoglobulin G in IgE-mediated allergy and allergen-specific immunotherapy. *Eur. Ann. Allergy. Clin. Immunol.* 2014; 46 (1): 6 – 11.
- Chung E.H. Vaccine allergies. *Clin. Exp. Vaccine. Res.* 2014; 3 (1): 50 – 57.
- Smith-Norowitz T.A., Kusunruksa M., Wong D., Norowitz M.M., Joks R., Durkin H.G. et al. Long-term persistence of IgE anti-influenza A H1N1 virus antibodies in serum of children and adults following influenza A vaccination with subsequent H1N1 infection: a case study. *J. Inflamm Res.* 2012; 5: 111 – 116.
- Julkunen I., Hovi T., Seppä I., Mäkelä O. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 1985; 60 (1): 130 – 138.
- Monteiro R.C. Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation. *J. Clin. Immunol.* 2010; 30 (1): 1 – 9.
- Li Z.N., Lin S.C., Carney P.J., Li J., Liu F., Lu X. et al. IgM, IgG, and IgA antibody responses to influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin in infected persons during the first wave of the 2009 pandemic in the United States. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2014; 21 (8): 1054 – 1060.

References

- Chiu C., Ellebedy A.H., Wrammert J., Ahmed R. B cell responses to influenza infection and vaccination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 386: 381–398.
- Gomez Lorenzo M.M., Fenton M. J. Immunobiology of influenza vaccines. *Chest.* 2013; 143 (2): 502 – 510.
- Chung E.H. Vaccine allergies. *Clin. Exp. Vaccine. Res.* 2014; 3 (1): 50 – 57.
- Lv J., Wang D., Hua Y.H., Pei S.J., Wang J., Hu W.W. Wang X.L., Jia N., Jiang Q.S. Pulmonary immune responses to 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in mice. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:197.
- Elshina G.A., Lonskaya N.I., Mefed K.M., Puchkova N.G., Chirun N.V., Gorbunov M.A. et al. Results of clinical research of pandemic monovalent influenza vaccine. *Biopreparaty.* 2010; 4 (40): 31 – 36 (in Russian).
- Elshina G.A., Harith S.M., Romanenko V.V., Komleva S.V., Puchkova N.G., Chyrun N.V. et al. The results of the study of the safety and immunogenicity of adjuvanted subunit of domestic pandemic monovalent group Grippol® in children from 6 months to 17 years. *Epidemiology & Vacinal Prevention.* 2011; 2 (57): 41 – 46 (in Russian).
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 1 (72): 248 – 254.
- Sominina A.A., Krivitskaya V.Z., Voytsekhovskaya E.M., Medvedeva N.A., Lipina N.V., Potapenko L.B. Practical Guidelines for the diagnosis of viral infections. St. Petersburg: 2005; 21 (in Russian).
- Palladino G., Mozdzanowska K., Washko G., Gerhard W. Virus-neutralizing antibodies of immunoglobulin G (IgG) but not of IgM or IgA isotypes can cure influenza virus pneumonia in SCID mice. *J. Virol.* 1995; 69 (4): 2075 – 2081.
- Pedersen G.K., Hschler K., ie Solbak S.M., Bredholt G., Pathirana R.D., Afsar A. et al. Serum IgG titres, but not avidity, correlates with neutralizing antibody response after H5N1 vaccination. *Vaccine.* 2014; 32 (35): 4550 – 4557.
- El-Madhun A.S., Cox R.J., Haaheim L.R. The effect of age and natural priming on the IgG and IgA subclass responses after parenteral influenza vaccination. *J Infect Dis.* 1999; 180 (4): 1356 – 1360.
- Frasca D., Diaz A., Romero M., Mendez N., Landin A.M., Blomberg B. Effects of age on H1N1-specific serum IgG1 and IgG3 levels evaluated during the 2011 – 2012 influenza vaccine season. *Immunity and Ageing.* 2013; 10:14.
- Arankalle V.A., Lole K.S., Arya R.P., Tripathy A.S., Ramdasi A.Y., Chadha M.S. et al. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in Indian patients. *PLoS One.* 2010; 5(10): e13099.
- Concept paper on the revision of the CPMP/BWP note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines. London; 2001, CPMP/ EWP/1045/01.
- Vidarsson G., Dekkers G., Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 2014; 5: 520.
- Reichert T., Chowell G., Nishiura H., Christensen R.A., McCullers J.A. Does Glycosylation as a modifier of Original Antigenic Sin explain the case age distribution and unusual toxicity in pandemic novel H1N1 influenza? *BioMed. Central. Infect. Dis.* 2010; 10: 5 – 9.
- Gordon C.L., Johnson P.D., Permezel M., Holmes N.E., Gutteridge G., McDonald C.F. et al. Association between severe pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection and immunoglobulin G(2) subclass deficiency. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50 (5): 672 – 678.
- Yamamoto T., Mizoguchi Y., Kaneno H., Yamamoto K., Inoue Y., Kawashima H. et al. Serum immunoglobulin G subclass levels and estimated clinical severity caused by possible influenza A(H1N1)pdm2009 infection. *J. Infect. Chemother.* 2013; 19: 833 – 842.
- Burton O.T., Oettgen H.C. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol. Rev.* 2011; 242(1): 128 – 143.
- Hofmaier S., Comberiati P., Matricardi P.M. Immunoglobulin G in IgE-mediated allergy and allergen-specific immunotherapy. *Eur. Ann. Allergy. Clin. Immunol.* 2014; 46 (1): 6 – 11.
- Chung E.H. Vaccine allergies. *Clin. Exp. Vaccine. Res.* 2014; 3(1): 50-57.
- Smith-Norowitz T.A., Kusunruksa M., Wong D., Norowitz M.M., Joks R., Durkin H.G. et al. Long-term persistence of IgE anti-influenza A H1N1 virus antibodies in serum of children and adults following influenza A vaccination with subsequent H1N1 infection: a case study. *J. Inflamm Res.* 2012; 5: 111 – 116.

23. Julkunen I., Hovi T., Seppä I., Mäkelä O. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. Clin. Exp. Immunol. 1985; 60 (1): 130 – 138.
24. Monteiro R.C. Role of IgA and IgA fc receptors in inflammation. J. Clin. Immunol. 2010; 30 (1): 1 – 9.
25. Li Z.N., Lin S.C., Carney P.J., Li J., Liu F., Lu X. et al. IgM, IgG, and IgA antibody responses to influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin in infected persons during the first wave of the 2009 pandemic in the United States. Clin. Vaccine Immunol. 2014; 21 (8): 1054 – 1060.

Экспериментальное изучение влияния иммуномодуляторов на эффективность применения вакцины бруцеллезной живой сухой

Н.В. Богачева (bogacheva70@mail.ru), В.Ю. Охупкина, Н.В. Пяткова, А.К. Федотов, А.С. Кучеренко

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров

Резюме

Вакцина бруцеллезная живая сухая, применяемая для иммунопрофилактики бруцеллеза, имеет целый ряд недостатков. В связи с этим в статье рассмотрена возможность использования иммуномодуляторов для повышения эффективности иммунизации и уменьшения риска развития побочных реакций и осложнений. В качестве иммуномодуляторов использовали липид, полиоксидоний и тимоген. По результатам оценки у различных лабораторных животных показателей клеточного и гуморального иммунитета, а также защитной эффективности живой бруцеллезной вакцины, установлено наличие комплексного стимулирующего влияния на эффективность иммуногенеза у иммуномодулятора липида.

Ключевые слова: иммунопрофилактика, вакцина бруцеллезная живая сухая, эффективность иммунизации, иммуномодуляторы, липид, тимоген, полиоксидоний, проточная цитофлуориметрия

Experimental Research of the Influence of Immunomodulators on Efficiency Using of Brucellosis Living Dry Vaccine

N.V. Bogacheva (bogacheva70@mail.ru), V.Y. Okhapkina, N.V. Pyatkova, A.K. Fedotov, A.S. Kucherenko

Branch of the Federal state establishment «48 Central Research and Development Institute»

Russian Federation Ministry of Defense, Kirov

Abstract

Brucellosis living dry vaccine, used for immunization of brucellosis, has a number of drawbacks. In this regard, the article discusses the using of immunomodulators for enhance of the effectiveness of immunization and reduce of the risk of side effects and complications. Lipid, polioksidony and timogen were used as immunomodulators. As a result of valuation cellular and humoral immunity of different laboratory animals and valuation of protective efficacy of brucellosis living vaccine, the presence of a complex stimulating effect on the efficiency of immunogenesis licopid was established.

Key words: immunoprophylaxis, brucellosis living dry vaccine, the effectiveness of immunization, immunomodulators, lipoid, timogen, polioksidony, flow cytometry

Введение

Применяемая в настоящее время в Российской Федерации для иммунопрофилактики бруцеллеза людей вакцина бруцеллезная живая сухая характеризуется целым рядом недостатков. Многочисленные данные литературы указывают на относительно невысокую эффективность препарата и на множественные серьезные побочные эффекты и осложнения, сопровождающее его применение [1 – 3]. Бруцеллезная вакцина создает лишь относительный иммунитет, который сохраняется в течение 6 – 8 месяцев только у 80% привитых, а к 12 месяцам резистентными к заражению оказываются от 14 до 60% привитых и даже однократное

инфицирование способно привести к развитию болезни [4]. По данным литературы [1 – 3], вакцинация позволяет снизить уровень заболеваемости при поражении вирулентными штаммами в 5 – 15 раз, период эффективной защиты в условиях аэрогенного инфицирования не превышает 3 месяцев. Это минимальные сроки защиты среди средств иммунопрофилактики других особо опасных инфекционных заболеваний.

Высокая чувствительность вакцинного штамма к антибактериальным препаратам исключает возможность сочетанного проведения специфической и экстренной профилактики заболевания при возникновении экстренных эпидемических показаний.