

На правах рукописи

**ЛОСЕВ
Игорь Владимирович**

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ АДАПТИВНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА К
ВИРУСАМ ГРИППА А (H5N1), А (H5N2) И А (H2N2)**

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Найхин Анатолий Нойевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Назаров Петр Григорьевич

доктор биологических наук
Ленёва Ирина Анатольевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН"

Защита диссертации состоится «___» _____ 2017 года в ___ часов на заседании диссертационного совета

.....

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБНУ «ИЭМ»

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г

Ученый секретарь Диссертационного совета Амосова И.В.
кандидат биологических наук

I. Общая характеристика работы

Актуальность темы. На протяжении многих десятилетий проблема гриппа А привлекает пристальное внимание ученых и средств массовой информации. Это связано, с одной стороны, с приобретенным опытом тяжелых последствий для человечества прошедших пандемий, вызванных вирусом гриппа А подтипов H1N1, H2N2 и H3N2, с другой, постоянной угрозой появления новых пандемических вариантов этого возбудителя. По мнению экспертов ВОЗ наиболее вероятным этиологическим агентом будущей пандемии может стать вирус гриппа А (H2N2), циркулировавший среди людей в 1957-1968 гг., или один из вирусов гриппа птиц с гемагглютинаинами H5, H6, H7 и H9 [WHO global influenza preparedness plan, 2005]. Данные вирусы вызывали вспышки гриппа среди людей в различных регионах планеты, которые характеризовались тяжелыми клиническими проявлениями с повышенной летальностью. Во время вспышек гриппа А (H5N1) 2003-2005 гг. смертность достигала 60% [WHO guidelines for investigation of human cases of avian influenza A(H5N1). 2007]. В этой связи ВОЗ разработан Глобальный план мероприятий [WHO global influenza preparedness plan, 2005], направленный на борьбу с перечисленными потенциально пандемическими вирусами гриппа А в случае появления угрозы их активного распространения среди людей. Он включает, во-первых, разработку арсенала резервных вакцин против всех этих вирусов, во-вторых, проведение форсированного молекулярно-генетического исследования вирусов гриппа птиц с точки зрения возможности окончательного преодоления ими межвидового барьера, сопровождающегося активной передачей от человека к человеку, в-третьих, накопление знаний по иммунологии потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Настоящая работа посвящена исследованию особенностей развития различных звеньев постинфекционного и поствакцинального адаптивного иммунитета к двум представителям потенциально пандемических вирусов гриппа А: вирусу гриппа птиц H5N1 как наиболее патогенному для людей и вирусу H2N2, имеющему высокую вероятность рециркуляции. Главный акцент в исследовании живой гриппозной вакцины (ЖГВ) H5N2 смещен в сторону стимуляции этой вакциной иммунного ответа к потенциально пандемическому вирусу гриппа А (H5N1).

Для научного обоснования прогноза развития эпидситуации по гриппу А и правильного планирования объема профилактических мероприятий необходим мониторинг состояния коллективного иммунитета – одного из главных составляющих эпидемиологического надзора. В мировой литературе неоднократно декларировалось положение о полном отсутствии у населения иммунитета к потенциально пандемическим зоонозным вирусам гриппа А. В этой связи сформировалось довольно распространенное мнение о катастрофических последствиях для человечества таких пандемий. Однако подобный прогноз не учитывал одно важное обстоятельство – формирование у населения гетеросубтипического иммунитета, то есть кроссреактивного иммунитета, генерируемого вирусом гриппа одного подтипа против других подтипов. Он стимулируется общими для всех подтипов вируса гриппа А антигенными детерминантами и играет важную роль в клиренсе возбудителя из организма и в снижении тяжести гриппозной инфекции [Grebe, *et al.* 2008].

Знания по иммунологии потенциально пандемических вирусов гриппа А необходимы как для прогнозирования с иммунологических позиций эпидситуации при появлении угрозы распространения новых пандемических вариантов, так и для выбора в чрезвычайной ситуации правильной стратегии вакцинопрофилактики с позиции иммуногенности тех или иных существующих вакцинных препаратов в отношении стимуляции иммунного ответа к новому возбудителю. Кроме того, сведения об особенности развития кроссреактивного иммунного ответа у людей полезны для конструирования универсальной вакцины против всех циркулирующих и потенциальных пандемических подтипов вируса гриппа А. В

последние годы это направление активно развивается [Sommerfelt 2011, Quinones-Parra, *et al.* 2014].

Степень разработанности темы. В мировой литературе в связи с особой актуальностью имеется огромное число работ по изучению вируса А(Н5N1). Проведен эпидемиологический и клинический анализ вызванных им вспышек, а также подробный молекулярно-генетический анализ этого возбудителя [de Jong and Hien 2006, Abdel-Ghafar, *et al.* 2008, Mok, *et al.* 2009, Liem, *et al.* 2009, Sikkema, *et al.* 2016, Bui, *et al.* 2016, Saunders-Hastings and Krewski 2016]. В экспериментах на животных изучена его иммуногенность [Chen, *et al.* 2009, Chang, *et al.* 2010, Thueng-in, *et al.* 2010, Ma, *et al.* 2010, Juno, *et al.* 2012]. Показано присутствие в сыворотках крови человека антител к консервативным эпитомам НА вируса А(Н5N1) [Chen, *et al.* 2009, Sakabe, *et al.* 2010]. Установлено наличие у некоторых лиц кроссреактивных CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, специфичных преимущественно к NP того же вируса [Lillie, *et al.* 2012, Antrobus, *et al.* 2012]. Однако работа по комплексному исследованию состояния гетеросубтипического иммунитета людей к данному возбудителю, включающему тестирование циркулирующих антител, локальных антител и различных субпопуляций Т-клеток иммунологической памяти, не проводилась.

Оценена способность ЖГВ Н5N1 индуцировать у добровольцев гуморальный иммунный ответ к вирусам с той же антигенной формулой [Talaat *et al.* 2014]. В клинических испытаниях исследователями из США изучены праймирующие свойства ЖГВ Н5N1 в отношении бустирования гуморального иммунного ответа людей на отдаленную во времени вакцинацию ИГВ Н5N1 [Karron *et al.* 2009]. Все препараты произведены в США.

В современной литературе работы по иммунологии вируса гриппа А (Н2N2) немногочисленны, несмотря на то, что данный вирус представляет не меньшую потенциальную опасность, чем вирусы гриппа птиц. Из сывороток крови людей, родившихся после прекращения циркуляции вируса гриппа А(Н2N2) в 1968 году, были выделены моноклональные антитела к данному вирусу. [Krause, *et al.* 2012]. В модельных опытах мышьях и хорьках показана индукция кроссреактивных сывороточных антител к вирусам гриппа А (Н2N2), циркулировавшим среди людей [Chen, *et al.* 2010, Nabel, *et al.* 2011]. В Японии проведен сероземиологический анализ сывороточных антител к вирусу А (Н2N2) в препаратах иммуноглобулинов, приготовленных в 1993-2010 гг. [Kubota-Koketsu, *et al.* 2012]. У людей, не праймированных вирусом А (Н2N2), выделены CD4+ Т-клеточные эпитопы, реагирующие с гемагглютинином Н2 [Dolfi, *et al.* 2013]. До настоящего времени целенаправленные по возрасту исследования по оценке современного состояния различных звеньев адаптивного популяционного иммунитета к вирусу А (Н2N2) у людей не проводились. Нет сведений об иммуногенных свойствах вакцинных штаммов для ЖГВ Н2N2 с точки зрения их способности стимулировать разные звенья адаптивного иммунного ответа.

В процессе работы основное внимание было сосредоточено на поиске ответов на следующие актуальные, но недостаточно изученные вопросы иммунологии гриппа А:

1. Каковы особенности формирования у людей постинфекционного гетеросубтипического иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А в условиях современного эпидемического процесса, обусловленного циркуляцией вирусов гриппа А (Н1N1) и А (Н3N2)?
2. В чем заключаются особенности развития поствакцинального иммунного ответа к потенциально пандемическим вирусам гриппа А?
3. Способны ли вакцины, приготовленные из поражающих птиц вирусов гриппа А, индуцировать у людей долговременную Т- и В- клеточную память – главный защитный фактор адаптивного иммунитета?

Поиск ответов на эти вопросы базировался на изучении иммунологии трех вирусов: вируса гриппа А (Н2N2), циркулировавшего в человеческой популяции в 1957-1968 гг., и

двух вирусов гриппа А (H5N1) и А (H5N2), поверхностные антигены которых характерны для вирусов, поражающих птиц.

Цель работы: изучить особенности формирования системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2.

Задачи:

4. Оценить состояние гетеротипического иммунитета у людей к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2 в период циркуляции актуальных вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.
5. Охарактеризовать особенности развития у людей поствакцинального системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на отечественную ЖГВ H5N2.
6. Оценить способность этой вакцины индуцировать у людей долговременную Т- и В-клеточную иммунологическую память к вакцинному штамму вируса гриппа А подтипа H5N2 и к вирусу гриппа А подтипа H5N1.
7. В эксперименте на мышах сравнить количественно-качественные показатели гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа на аттенуированные и не аттенуированные штаммы вируса гриппа А подтипа H2N2.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунитета к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2 у людей разного возраста. На основании полученных данных охарактеризованы особенности формирования естественно индуцируемого кроссреактивного иммунитета населения к этим вирусам в условиях эпидемической циркуляции вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.

Впервые осуществлено комплексное исследование иммуногенности отечественной ЖГВ H5N2, включающее оценку индукции у людей поствакцинального гомологичного и гетерологичного иммунного ответа, а также стимуляцию долговременной В-клеточной иммунологической памяти. Полученные данные позволили, во-первых, обосновать возможность использования ЖГВ H5N2 для защиты от потенциально пандемического вируса гриппа А (H5N1), во-вторых, разработать адекватную схему оценки иммуногенных свойств ЖГВ, в состав которых вошли штаммы приготовленные из вирусов гриппа А, циркулирующих среди птиц.

Впервые оценена праймирующая способность ЖГВ усиливать у людей секрецию В-клетками *in vitro* особого пула антител на отдаленную во времени вакцинацию ИГВ. По этим данным описаны особенности поствакцинальной продукции этого пула антител и обоснована возможность использования данного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин.

Впервые проведено сравнительное исследование *in vivo* способности индуцировать разные звенья адаптивного иммунитета не аттенуированными и аттенуированными вирусами гриппа А (H2N2) с разным набором мутаций в генах внутренних белков, привнесенных обратногогенетическим методом от донора аттенуации А/Ленинград/17/134/57 (H2N2). Полученные результаты позволили выделить перспективные штаммы-кандидаты в вакцинные для приготовления ЖГВ (H2N2).

Теоретическая и практическая значимость. Иммунология гриппа А базируется на данных об иммунитете к актуальным вирусам гриппа людей. Теоретические аспекты настоящей работы примыкают к новому направлению – изучению гомологичного и гетерологичного иммунного ответа людей к не циркулирующим потенциально пандемическим вирусам гриппа А зоонозного и антропонозного происхождения. Полученные нами сведения расширяют знания об особенностях формирования гомологичного и гетерологичного иммунного ответа в условиях современного эпидемического процесса и противогриппозной вакцинации. Полученные данные позволили

обосновать ряд практических рекомендаций по применению и оценке иммуногенности резервных вакцин.

Методология и методы исследования. Основной методологической базой являлись иммунологические исследования разных звеньев адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2. С этой целью использован широкий набор иммунологических методов для выявления: (i) циркулирующих сывороточных антител, (ii) секретируемых *in vitro* сывороточных антител, (iii) локальных IgA-антител в СВДП и слюне, (iv) вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти различных фенотипов. Кроме того, применяли вирусологические методы при стандартизации экспериментальных исследований *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У большинства лиц, праймированных вирусами гриппа А подтипа H2N2, то есть родившихся до 1957 г., сохранена в активном состоянии системная и локальная В-клеточная память к данному возбудителю.
2. У людей, не встречавшихся с вирусами гриппа А подтипов H5N1, H5N2 и H2N2, обнаружены кроссреактивные локальные IgA-антитела и Т-клетки памяти, специфичные к этим вирусам.
3. Отечественная ЖГВ H5N2 может быть успешно применена для защиты людей от потенциально пандемического вируса гриппа А (H5N1).
4. Для адекватной оценки иммуногенности ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа А необходимо использовать комплекс иммунологических тестов по детекции системных гуморальных, локальных гуморальных и Т-клеточных иммунных реакций.

Личный вклад автора. Автор лично принимал участие в проведении всех этапов иммунологической части исследований: планирование опытов, отбор материалов, постановка иммунологических тестов, воспроизведение экспериментов на мышах. Автором лично проведена обработка, анализ и обобщение полученных материалов с последующей их публикацией и презентацией на различных конференциях и симпозиумах. Отбор добровольцев, формирование групп, вакцинация, клинические наблюдения и постановка реакции микронеутрализации проведена сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждена адекватным статистическим анализом данных. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на 5 отечественных и международных конференциях: Options for the control of influenza VIII, Cape Town, South Africa, September 5-10, 2013; 2nd Russian young scientists' conference "Problems of biomedical science of 3rd millennium", November 12 – 14 2012; II Всероссийская научная конференция молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» 12 – 14 ноября 2012; Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» 23–25 апреля 2014 г., Санкт-Петербург; European Scientific Working group on Influenza, Рига, сентябрь 2014; XV Всероссийский научный форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 1 - 4 июня 2015 года, а также на заседаниях отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе в 8 российских журналах, входящих в перечень, рекомендованных ВАК, 3 - в иных изданиях, 2 из которых в зарубежном журнале, индексируемом в международных системах цитирования: библиографические базы Web of science, SCOPUS, Pub Med, а также в сборниках материалов 6 конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, перечня материалов и методов, изложения результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, включая 28 таблиц и 5 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 216 источников, из них 25 в отечественных и 191 в иностранных изданиях.

Работа проведена при финансовой и кураторской поддержке международного фонда PATH Vaccine solutions, а также Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-32250).

Внедрение результатов исследования. Все исследования иммуногенности других резервных вакцин (ЖГВ H7N3, H7N9, H2N2) выполняли по схеме, апробированной в настоящей работе, то есть с применением комплексного исследования главных составляющих адаптивного иммунного ответа: системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного. Получено свидетельство о внедрении метода «Технология оценки поствакцинальной секреции антител культурой В-лимфоцитов *in vitro*» (регистрационный номер 557-15008-и, дата регистрации – 16 ноября 2015 года).

II. Основное содержание работы

1. Материалы и методы

Вакцины. Экспериментальные серии ЖГВ были изготовлены предприятием НПО «Микроген» из вакцинных штаммов, разработанных в отделе вирусологии имени А.А. Смородинцева ФГБНУ Института экспериментальной медицины. Штамм был получен методом классической реассортации и включал НА от патогенного вируса А/индюк/Турция/1/2005 (H5N1), а NA и все внутренние белки - от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) – генетическая формула 1:7.

ИГВ ОрниФлю® (Вакцина гриппозная инактивированная субъединичная адсорбированная) предоставлена НПО «Микроген». Суспензия для внутримышечного введения представляет собой поверхностные гликопротеины (гемагглютинин и нейраминидазу), выделенные из очищенных вирионов вируса гриппа А(H5N1), выращенного на куриных эмбрионах. Гликопротеины сорбированы на гидроксиде алюминия. Каждая доза вакцины (0,5мл) содержала 15 мкг гемагглютинина вируса гриппа А(H5N1).

Обследованные контингенты. Для исследования коллективного иммунитета к потенциально пандемическим вирусам гриппа А использованы фоновые образцы СК, СВДП и МПК у людей 18-49 лет, участвовавших в клинических испытаниях различных ЖГВ в 2000-2014 гг., а также лиц 18-85 лет, обследованных в 2011-2012 гг. в различных лабораторных центрах города по поводу диагностики соматических заболеваний.

Испытания ЖГВ H5N2 в 2012 г. и бустирующей ИГВ H5N1 в 2014 г. проводили на добровольцах в возрасте 18-51 лет в полном соответствии с национальным стандартом РФ (ГОСТ Р52379-2005) «Надлежащая клиническая практика». Вакцинацию и отбор биологических материалов осуществляли по схеме: до вакцинации (Д0), первая вакцинация (Д0), через 7 дней после первой вакцинации (Д7), через 28 дней после первой вакцинации (Д28), вторая вакцинация (Д28), отбор проб через 28 дней после второй вакцинации (Д56). Вакцины вводили стандартным методом, то есть интраназально в случае ЖГВ и внутримышечно – в случае ИГВ.

Интенсивность репродукции вирусов в эксперименте на животных. Интенсивность репродукции вирусов в верхних и нижних отделах дыхательного тракта оценивались на мышах линии СВА, инфицированных интраназально под легким эфирным наркозом стандартной дозой вируса 5,5 lgTCID₅₀ в 20 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера. Каждая группа мышей состояла не менее, чем из 5 особей. Инфекционный титр

вируса гриппа определяли путем титрования на культуре клеток MDCK стандартным методом. Изъятие тканей верхнего отдела дыхательных путей и легких производили на 3 сутки после заражения. Наличие репродукции вируса в органах определяли путем титрования гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах, после чего определяли 50% инфекционную дозу по методу Рида и Менча [Matsuoka Y. *et al* 2009].

Штаммы в эксперименте на животных. В иммунологических тестах использовали апатогенные вакцинные штаммы NIBRG–23 (H5N1), A/17/утка/Потсдам/86/92(H5N2), A/17/индюк/Турция/05/133(H5N2), A/17/mallard/Нидерланды/00/95(H7N3), A/Ленинград/134/17/57(H2N2) из музея отдела вирусологии НИИЭМ. Для заражения экспериментальных животных применяли 15 штаммов вируса гриппа А(H2N2), полученных ранее при помощи целенаправленного точечного мутагенеза. Данные штаммы содержали одиночные и комплексные мутации во внутренних генах, присущие донору аттенуации A/Ленинград/134/17/57(H2N2) [Isakova-Sivak, *et al.* 2011]. В качестве контрольных вирусов использовали штамм с полным набором мутаций донора аттенуации во внутренних генах (Len/17 са) и его «дикий» предшественник без мутаций (Len/134 wt). Характеристики вирусов представлены в таблице 9.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА воспроизводили по стандартной методике. СК обрабатывали RDE (Receptor destroy enzyme). Рабочая доза антигенов составляла 4АЕ. Применяли 1% взвесь человеческих эритроцитов 0(I) группы крови. Достоверной конверсией титров антител считали его поствакцинальное увеличение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному.

Реакция микронейтрализации (РМН). РМН выполняли стандартным методом на культуре клеток MDCK в концентрации 200 тыс. клеток/мл. Рабочее разведение вируса составляло 100 TCD₅₀/50 мкл. Достоверным считали увеличение титра сывороточных антител в 4 и более раза в поствакцинальный период по отношению к довакцинальному. РМН была проведена ведущим научным сотрудником лаборатории биотехнологии диагностических препаратов отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, д.б.н. В.З. Кривицкой.

Иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили в непрямом варианте [Найхин А. Н. и др. 1987]. На полистироловые планшеты ПО "Ленмедполимер" сорбировали очищенные штаммы вирусов гриппа А. Доза сорбируемых антигенов составляла 16АЕ/0,1мл. Далее исследуемые пробы (12 проб на планшет) титровали с разведения 1:4 до 1:256 для СВДП или с неразведенного образца до 1:64 для слюны или надосадков культур МПК. Последний ряд планшета служил контролем конъюгата, в который вносили все ингредиенты реакции, кроме проб. Проявление комплексов антиген – антитело осуществляли при помощи конъюгата, состоящего из антитела к данному комплексу, и пероксидазы хрена. Окрашивание полученного комплекса осуществляли при помощи реактива ОФД, приготавливаемого непосредственно перед применением. Оптическую плотность исследуемых материалов измеряли на фотометре с рабочей длиной волны 490нм. Титр антител определяли методом "конечных разведений", то есть за титр антител принимали последнее разведение СВДП или слюны, превышающее не менее чем в 2 раза среднее арифметическое значение оптической плотности лунок с контролем конъюгата. Диагностическим считали прирост титра антител в 4 и более раз во второй парной пробе образца по отношению к первой.

Определение антител, секретируемых *in vitro* культурами МПК проводилось по методике He X.S. с соавторами [He, *et al.* 2011] с незначительной модификацией. Из крови добровольцев выделяли МПК в градиенте плотности с использованием раствора «Histopaque 1077» по стандартной методике. Далее клетки культивировали в течение 4-х дней при 37°C

в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации, собирали надосадки, которые очищали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 оборотах в минуту. Полученные образцы замораживали при температуре – 70°C до исследования в ИФА.

Определение вирусспецифических CD4+ и CD8+Т-клеток иммунологической памяти. Эти клетки тестировали в проточной цитометрии общепринятым методом внутриклеточного окрашивания цитокинов [Петухова Г.Д. и др. 2006] после стимуляции клеток *in vitro* 12 MOI очищенного ультрацентрифугированием штамма. МПК выделяли стандартным способом на градиенте плотности HISTORAUQUE-1077, отмывали и хранили до проведения анализа в жидком азоте. Для определения спонтанной продукции IFN-γ вместо стимуляции вирусом к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640 (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля использовали стимуляцию клеток поликлональным стимулятором – стафилококковым энтеротоксином В. После размораживания порции клеток добровольцев, отобранные во всех временных интервалах, были способны к активации продукции IFN-γ. При анализе данных значения отрицательного контроля вычитали из аналогичных показателей, полученных для вирус-стимулированных клеток. Показатели всех контролей были адекватны. В проточной цитометрии маркерами Т-лимфоцитов центральной (T_{cm}) и эффекторной (T_{em}) иммунологической памяти CD4+ и CD8+ клеток служили меченные флюорохромом моноклеарные антитела к CCR7+CD45RA- и CDR7-CD45RA-(Beckman Coulter, Becton Dickinson). Достоверным увеличением уровня клеток у привитых считали 3 стандартных отклонения от уровня тех же клеток у лиц контрольной группы, получавших препарат плацебо.

Статистическая обработка результатов. Использовали программное обеспечение Statistica, GraphPad Prism5 и «MS Excel» с применением непараметрических методов (U-критерия Манна-Уитни, теста Вилкоксона для парных сравнений и коэффициента корреляции по Спирмену). За уровень статистической значимости была принята $p < 0,05$. Средние величины уровней антител представлены в виде средних геометрических обратных значений титров (СГТ).

2. Результаты исследования и обсуждение

2.1. Обнаружение у людей кроссреактивных факторов адаптивного иммунитета к вирусам гриппа А (H5N2), А (H5N2) и А (H2N2) в условиях современного эпидемиологического процесса, обусловленного вирусами гриппа А (H1N1) и А (H3N2)

Настоящий раздел работы посвящен комплексному изучению различных составляющих адаптивного иммунитета людей к вирусам гриппа А(H5N1) и А(H5N2) и А (H2N2), формируемого при циркуляции вирусов гриппа А (H1N1) и А (H3N2).

Тестирование у 103 лиц 18-45 лет состояния гуморального иммунитета к вирусам гриппа NIBRG-23 (H5N1), А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2) и А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) показало отсутствие у этих лиц сывороточных антител (РТГА, РМН), но наличие у части из них (18-33%) кроссреактивных локальных IgА-антител в титрах $\geq 1:32$ (ИФА).

Проанализирован вопрос о повозрастном распределении титров тех же антител к вирусу гриппа птиц А (H5N2) – таблица 1.

Сывороточные антитела (РТГА) во всех возрастных группах не выявлялись. Ранее было показано существование прямой зависимости между возрастом людей и

напряженностью у них локального иммунитета к актуальным вирусам гриппа А (H1N1) и А (H3N2) [Найхин А.Н. и др. 2004]. Данные таблицы 1 свидетельствуют о наличии такой же зависимости в отношении величин СГТ кроссреактивных локальных IgA-антител к вирусу гриппа А (H5N2).

Таблица 1 Повозрастные данные о состоянии гуморального иммунитета к вирусу гриппа А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у людей 18-84 лет

Годы рождения	Возраст (лет)	Число лиц	АТ к штамму А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2)								
			РТГА (СК)			ИФА- IgA (СВДП)			ИФА- IgA (слюна)		
			СГТ	% с титрами		СГТ	% с титрами		СГТ	% с титрами	
				1:20*	≥1:40**		1:32*	≥1:64**		1:8*	≥1:16**
1989-1995	18-24	26	2,5	0	0	3,0	0	0	3,6	8	8
1979-1988	25-34	18	2,6	0	0	4,2	11	0	4,8	11	7
1969-1978	35-44	24	2,6	0	0	3,2	13	0	2,6	4	8
1947-1956	57-66	26	2,5	0	0	14,2	23	16	11,3	8	46
1937-1946	67-76	24	2,5	0	0	25,7	17	33	17,4	8	67
1927-1936	77-84	21	2,5	0	0	11,3	29	19	13,1	10	62

* значимые титры антител

** защитные титры антител

В таблице 2 отражено распределение сывороточных и локальных антител к вирусу гриппа А(H2N2) у людей двух возрастных групп: праймированных этим вирусом во время его циркуляции в 1957-1968 гг. (родившиеся до 1957г.), и не встречавшихся с ним (родившихся после 1968 г.).

Таблица 2. Состояние гуморального иммунитета к вирусу гриппа А (H2N2) у лиц, праймированных и не праймированных этим возбудителем в 1957-1968 гг.

Годы рождения	АТ к штамму А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)											
	РТГА (СК)				ИФА- IgA (СВДП)				ИФА- IgA (слюна)			
	Число лиц	СГТ	% с титрами		Число лиц	СГТ	% с титрами		Число лиц	СГТ	% с титрами	
			1:20*	≥1:40 **			1:32*	≥1:64 **			1:8*	≥1:16 **
После 1968 (не праймированные)	126	2,5	0	0	125	7,7	14	6	93	3,3	15	11
До 1957 (праймированные)	57	20,7	51	23	50	15,1	21	20	58	8,3	9	48

* значимые титры антител

** защитные титры антител

Сывороточные антитела (РТГА) выявлялись только у праймированных людей, причем, у 23% в защитных титрах. Локальные IgA-антитела присутствовали у тех и других, но у праймированных в более высоких титрах ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Полученные результаты подтверждают сохранение хорошо выраженной не только системной, но и локальной В-клеточной иммунологической памяти к вирусу гриппа А(H2N2) у лиц, встретившихся с ним много лет назад, то есть в 1957-1968 гг. Судя по полученным данным, у не праймированных лиц существует только локальная В-клеточная память в виде продукции кроссреактивных IgA-антител при встрече с актуальными вирусами вируса гриппа А. Однако, ее напряженность менее выражена.

У 71 человека изучено состояние локального иммунитета к пяти подтипам вируса гриппа А (H1N1, H2N2, H3N2, H5N2 и H7N3) до и после эпидемии гриппа А (H1N1) 2012 – 2013 гг. Наибольшая кратность прироста СГТ локальных IgA-антител в постэпидемический период по отношению к доэпидемическому периоду отмечена к этиологическому агенту эпидемии, то есть к вирусу H1N1 ($69,7:12,9 =$ в 5,4 раза). В

то же время наблюдалось повышение СТГ тех же антител к другому актуальному вирусу H3N2 (19,7:9,9 = в 2 раза), к выбывшему из циркуляции вирусу H2N2 (17,8:8,4 = в 2,1 раза), к вирусу гриппа птиц H5N2 (16,2: 9 = в 1,8 раза), а также к другому характерному для птиц вирусу H7N3 (17,2:7,1 = в 2,4 раза). Эти данные подтверждают, что в условиях естественного эпидемического процесса, обусловленного циркуляцией вируса гриппа А актуальных подтипов, поддерживается определенный уровень локального иммунитета к другим подтипам данного возбудителя, в том числе к потенциально пандемическим.

Данные рисунка 1 свидетельствуют о наличии у части лиц специфических к вирусам гриппа А(H5N1) и А(H5N2) CD4+ и CD8+ Т-клеток иммунологической памяти. Такие же А(H2N2) – специфические клетки обнаружены и у людей, родившихся после 1968 г., то есть, не встречавшихся с этим возбудителем.

Таким образом, проведение исследований системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунитета к вирусам гриппа А(H5N1), А(H5N2) и А(H2N2) показали, что у не праймированных ими людей отсутствует системный гуморальный иммунитет, опосредованный сывороточными антигемагглютинирующими (РТГА) и вируснейтрализующими (РМН) антителами. Однако у этих лиц обнаруживаются такие составляющие гетеросубтипического иммунитета, как кроссреактивные локальные IgA-антитела и кроссреактивные хелперные (CD4+) и цитотоксические (CD8+) Т-клетки центральной (T_{cm}) и эффекторной (T_{em}) иммунологической памяти. Продукция этих антител и Т-клеток поддерживается за счет контактов организма с вирусами гриппа А актуальных подтипов. Индукторами данных факторов иммунитета являются консервативные иммунодоминантные последовательности в различных белках вириона, имеющиеся у всех подтипов вируса гриппа А вне зависимости от их хозяина. Вполне вероятно, что обнаруженные кроссреактивные антитела и клетки могут снижать тяжесть эпидемического процесса, если вирусы гриппа с гемагглютинином H5 или вирус А(H2N2) начнут глобальное распространение среди людей. Конечно, это только предположение, поскольку достоверно оценить протекцию можно только при развитии реальных эпидемиологических событий. Проведенные исследования также показали, что у лиц, праймированных в 1957-1968 гг. вирусом гриппа А(H2N2), сохраняется хорошо выраженная не только системная, но и локальная В-клеточная иммунологическая память к этому возбудителю, что, безусловно, явится мощным защитным фактором в случае рециркуляции данного возбудителя.

2.2. Гомологичный и гетерологичный иммунный ответ людей на ЖГВ H5N2

Создание резервных вакцин, включающих потенциально пандемические вирусы гриппа птиц с гемагглютинидами H5, H6, H7 и H9, является глобальным приоритетом для органов здравоохранения [WHO global influenza preparedness plan, 2005]. Такие вакцины разрабатываются в России и США. Ключевым моментом в их оценке служит иммуногенность данных препаратов. Настоящий раздел работы был посвящен изучению особенностей формирования гуморального и Т-клеточного иммунного ответа людей на ЖГВ H5N2, созданную в отделе вирусологии НИИЭМ. Клинические испытания проведены в НИИ гриппа Минздрава России по утвержденному протоколу (разрешение №212 от 28.08.2012) при финансовой и кураторской поддержке международного фонда Path Vaccine solution. Иммунологический раздел выполнен в НИИЭМ в лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии.

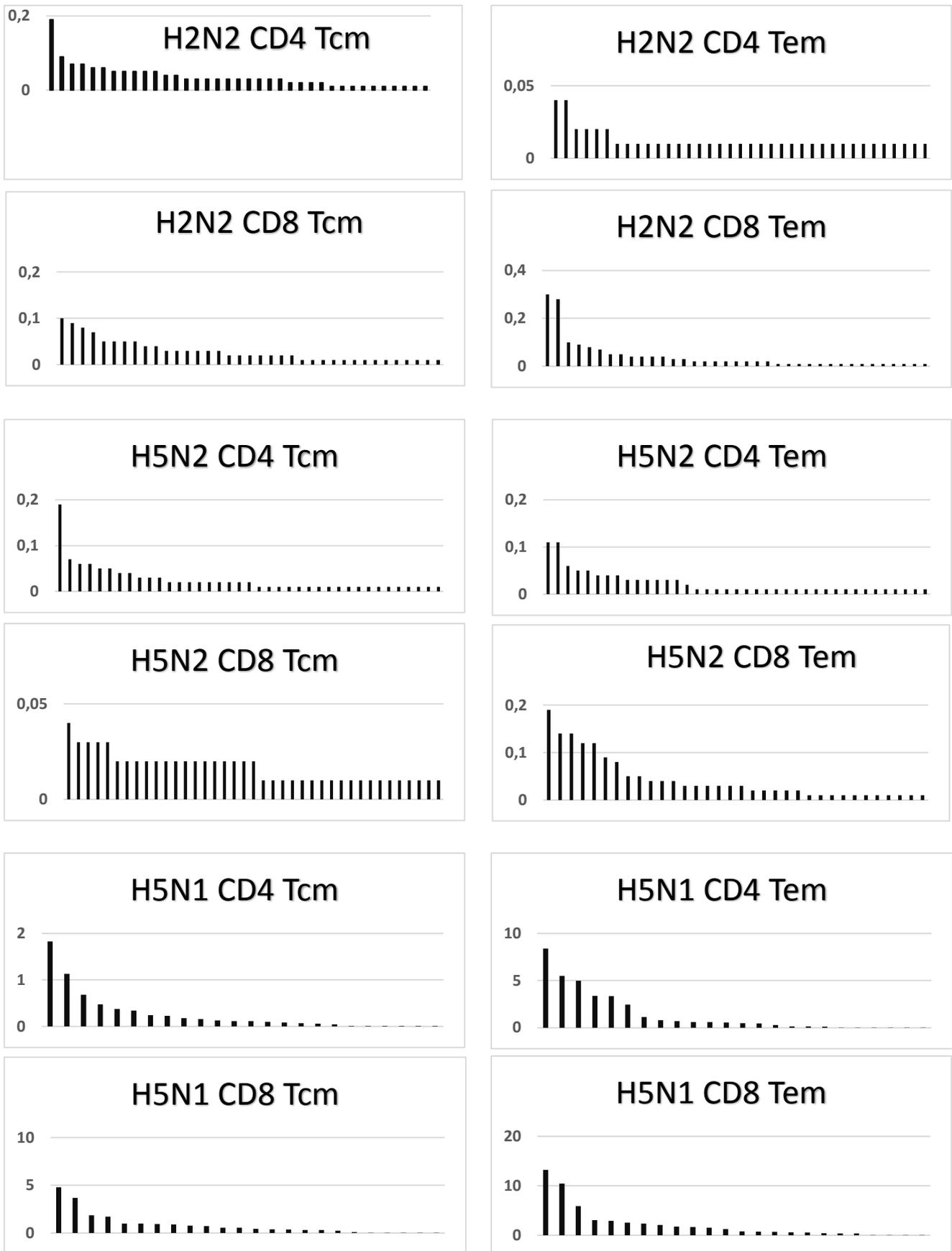


Рисунок 1. Обнаружение у людей 18-45 лет вирусспецифических кроссреактивных T-клеток иммунологической памяти к вирусам гриппа А/Ленинград/134/17/57(H2N2), N1BRG-23(H5N1) и А/17/индюк/Турция/05/133(H5N2). Вертикально - % клеток по данным ПЦ, горизонтально – индивидуальные данные по конкретным лицам. Данные по А (H2N2) – лица, родившиеся после 1968 г.)

Данные таблицы 3 дают представление о числе (%) конверсий сывороточных и локальных антител у добровольцев после вакцинации ЖГВ H5N2. Определяли антитела к гомологичному вакцинному штамму A(H5N2), к штамму того же подтипа, но выделенному от другого вида птиц, и к гетерологичным штаммам A(H5N1) и A(H7N3).

Таблица 3. Частота гомологичных и гетерологичных гуморальных иммунных ответов у 29 добровольцев 18 – 49 лет на двухкратную вакцинацию ЖГВ A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)

Антитела	Лабораторные тесты	% конверсий АТ у 29 добровольцев			
		A/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)	A/17/утка/Потсдам /86/92 (H5N2)	NIBRG – 23 (H5N1)	A/17/mallard/ Нидерланды/00 /95 (H7N3)
Сывороточные	РТГА	14/38*	10/48	0/10	0/0
	РМН	10/48	НИ**	10/28	0/0
	ИФА-IgA	0/7	3/7	3/7	7/10
	ИФА-IgG	0/0	0/3	НИ	0/0
Локальные	ИФА-IgA (СВДП)	7/21	7/35	14/28	3/17
	ИФА-IgG (слюна)	10/35	10/31	7/17	0/0
Всего по совокупным данным всех тестов		28/79	24/72	17/65	10/24

* Числитель – конверсии антител после 1-вакцинации, знаменатель – после 2-й вакцинации

** НИ – не исследовали. Число лиц, получивших препарат плацебо, = 10; у этих лиц конверсии антител во всех тестах отсутствовали.

По результатам отдельных тестов число конверсий антител после первой вакцинации колебалось от 3 до 14%, после второй – от 7 до 48%. По суммарным данным, учитывающим конверсии антител во всех лабораторных тестах в совокупности, наличие иммунной реакции к вирусам с гемагглютинином H5 зафиксировано на первую вакцинацию у 17 – 28% добровольцев, а на вторую – у 65 – 79% ($p < 0,05$ и $p < 0,01$). Значительно меньшие показатели отмечены в отношении иммунных ответов к гетерологичному вирусу с полностью отличающимися HA и NA, то есть к A(H7N3): соответственно 10 и 24% конверсий антител, зафиксированных только в ИФА ($p < 0,05$ и $p < 0,01$). Число суммарных иммунных ответов ко всем вирусам превосходило в 1,5 – 6,5 раза аналогичные данные РТГА ($p < 0,05$ и $p < 0,01$), то есть единственного официально регламентированного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин.

Если в отношении частоты (%) поствакцинальных гуморальных иммунных ответов у добровольцев на ЖГВ H5N2 к вирусам А (H5N2) и А (H5N1) результаты были вполне удовлетворительными, то данные об интенсивности продукции антител оказались более скромными. Так, после двухкратной вакцинации (Д56) СТГ всех антител к этим вирусам хоть и увеличились в 1,6-2,2 раза ($p < 0,05$), но их уровень оказался весьма низкими: от 1:4 до 1:15.

Материалы таблицы 4 отражают частоту (%) поствакцинальных конверсий разных вирусспецифических фенотипов Т-клеток иммунологической памяти к вакцинному вирусу А (H5N2). По совокупным данным о конверсиях всех изученных клеточных субпопуляций, на первую вакцинацию ответили приростом уровня Т-клеток 38% добровольцев, на первую и/или вторую – 69%.

Таблица 4. Частота Т-клеточных иммунных ответов на вакцинный штамм А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) у 29 добровольцев 18-49 лет, привитых ЖГВ (H5N2)

Фенотипы Т-клеток		% достоверных* конверсий уровня вирусспецифических Т-клеток у привитых добровольцев	
		После 1-й вакцинации (Д28)	После 1-й и/или 2-й вакцинации (Д28, Д56)
CD4+IFN+	CD4+	10	21**
	CD4+Tcm	17	28**
	CD4+Tem	17	38**
	CD4+Tcm + CD4+Tem	27	55**
CD8+IFN+	CD8+	3	7**
	CD8+Tcm	7	10
	CD8+Tem	21	28
	CD8+Tcm + CD8+Tem	28	35
Всего по совокупным данным по всем Т-клеткам		38	69**

* Достоверной конверсией считали 3 стандартных отклонения от средних данных по контрольной группе добровольцев, получивших препарат плацебо (N=10)

** разница показателей между 1-й и 2-й вакцинациями достоверна при $p < 0,05$ или $p < 0,01$.

Объединенные данные по частоте гуморальных и Т-клеточных иммунных ответов (табл. 5) показали, что у абсолютного большинства добровольцев (28 из 29 – 97%) двойная вакцинация ЖГВ H5N2 вызывала тот или иной тип В- и/или Т- клеточной иммунной реакции организма.

Таблица 5. Итоговые данные о частоте достоверного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у добровольцев, привитых живой гриппозной вакциной А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)

Число лиц	Частота гуморального ответа (конверсии антител) после первой и/или второй вакцинации							Частота клеточного ответа ($\geq 3SD$ от среднего по плацебо) после первой и/или второй вакцинации							Всего по данным всех тестов
	РТГА	PMH	Сывор. IgG ИФА	Сывор. IgA ИФА	СВДП. IgA ИФА	Слюна. IgA ИФА	Всего	CD4+	CD8+	CD4 Tcm	CD4 Tem	CD8 Tcm	CD8 Tem	Всего	
29	11 38%	14 48%	1 3%	2 7%	6 21%	10 34%	23 79%	6 21%	2 7%	8 28%	11 38%	3 10%	8 28%	20 69%	28 97%

Таким образом, данные этого раздела работы свидетельствуют, что практически у всех добровольцев (97%) двухкратная вакцинация ЖГВ H5N2 индуцировала тот или иной тип адаптивного иммунного ответа к вакцинному штамму. При этом отдельно в регламентированном тесте (РТГА) зафиксировано лишь 38% конверсий. ЖГВ H5N2 стимулировала не только гомологичный, но и гетерологичный иммунный ответ в виде конверсий сывороточных и/или локальных антител к потенциально пандемическому вирусу А (H5N1) – 65% конверсий, а также локальных IgA-антител к другому потенциально пандемическому вирусу А (H7N2) с полностью отличавшейся антигенной формулой – 24% конверсий. В то же время интенсивность гомологичных и гетерологичных иммунных ответов на ЖГВ H5N2 оказалась довольно слабой в сравнении с аналогичными показателями для сезонных гриппозных вакцин.

Полученные результаты позволяют сделать ряд практических выводов:

РТГА как официально регламентированный тест для оценки иммуногенности гриппозных вакцин далеко не полностью отражает данный процесс. В частности, для полноценного определения числа поствакцинальных гомологичных иммунных реакций на вакцинацию резервными ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа птиц необходимо использовать комплекс иммунологических реакций, определяющих системный гуморальный, локальный гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы.

Выраженность гетерологичного гуморального иммунного ответа людей на ЖГВ, приготовленную из вирусов гриппа птиц, зависит от антигенной формулы вакцинного и гетерологичного вируса, а именно: от наличия и отсутствия в них общего гемагглютинина, то есть наиболее антигенного вирусного белка. Сходство по этому белку значительно повышает гетерологичный иммунный ответ. Данное обстоятельство расширяет тактику применения различных резервных ЖГВ в случае появления угрозы распространения среди людей тех или иных зоонозных вирусов гриппа А.

2.3. Индукция у людей ЖГВ H5N2 гомологичной (H5N2) и гетерологичной (H5N1) долговременной иммунологической памяти.

Целью любой вакцинации является стимуляция у вакцинируемых долговременной иммунологической памяти к вакцинному штамму. В предыдущем разделе работы показано, что ЖГВ H5N2 стимулирует у людей иммунные ответы к потенциально пандемическому вирусу гриппа А(H5N1) с высокой частотой, но низкой интенсивностью. В этой связи необходимо было ответить на главный вопрос: формируется ли у людей в этих условиях поствакцинальная долговременная иммунологическая память к вирусам А (H5N1)? Для поиска ответа на данный вопрос нами проведен анализ иммунного ответа у привитых ЖГВ H5N2 добровольцев на отдаленную во времени (через 1,5 года) вакцинацию ИГВ H5N1. Иными словами, был применен метод сочетанной вакцинации (prime-boost vaccination), предусматривающий усиление иммунного ответа (бустирование) к одной вакцине с помощью отдаленной во времени предварительной вакцинации (праймирование) другой вакциной [Luke and Subbarao 2014]. Подразумевается, что праймирование может формировать долговременную Т- и В- клеточную иммунологическую память, которая усилит, ускорит и расширит иммунный ответ на буст – вакцину. Эффективность схемы «праймирование-бустирование» показано на вакцинах против ВИЧ [Xin, *et al.* 2005], туберкулеза [Li, *et al.* 2015], малярии [Li, *et al.* 2015] и гриппа А (H5N1) в режиме праймирования произведенной в США ЖГВ H5N1 и бустирования ИГВ H5N1 через 5 лет после праймирования [Luke et al 2014].

Представленные ниже данные получены в рамках совместных клинических испытаний отечественной ИГВ H5N1 в НИИ Гриппа и ФГБНУ «ИЭМ» по программе, утвержденной МЗ РФ (№212 от 28.08.2012) при финансовой и кураторской поддержке международного фонда Path Vaccine Solution. Вся иммунологическая часть работы проведена в НИИЭМ в лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии.

Анализ предвакцинального иммунного статуса добровольцев (D0) показал, что уровень ряда показателей у лиц, праймированных 1,5 года назад ЖГВ H5N2 (N=19), оказался достоверно выше, чем у не праймированных. Это касалось СТГ сывороточных IgG- антител (соответственно 1:335 и 1:170 $p<0,01$) и сывороточных вируснейтрализующих антител (соответственно 1:8 и 1:4 $p<0,05$) к вакцинному вирусу NIBRG – 23 (H5N1), а также уровня Т-клеток иммунологической памяти фенотипов CD8+, CD8+Tcm, CD8+Tem, специфических к тому же вирусу (соответственно 2,49 и 1,30%; 1,44 и 0,86%; 3,05 и 2,23%). Данный факт может служить косвенным свидетельством лучшего сохранения долговременной кроссреактивной иммунологической памяти к вирусу А (H5N1) у праймированных ЖГВ H5N2 лиц по сравнению с не праймированными.

Доказательством воздействия праймирования ЖГВ H5N2 на формирование долговременной иммунологической памяти являются данные, представленные в таблицах 6 и 7. Так, у праймированных лиц даже однократная вакцинация ИГВ H5N1 оказывала хорошо выраженный бустировующий эффект в виде ускорения (D7) и усиления (D28) гуморального иммунного ответа к вакцинному вирусу А (H5N1).

Главным в применении комбинационных схем вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А является вопрос о методе оценки способности праймирующей вакцины успешно индуцировать долговременную иммунологическую память к данным возбудителям. Считается, что доказательством успешной «закладки» у людей поствакцинальной В-клеточной памяти является интенсивная продукция у них антигемагглютинирующих антител (РТГА) после введения препарата. В этой связи обращает на себя внимание резкий диссонанс между слабым по интенсивности иммунным ответом добровольцев на праймирование ЖГВ H5N2 и очень сильным бустирующим эффектом у них же на вакцинацию ИГВ H5N1 (табл. 6, 7). Дополнительный анализ показал полное отсутствие у данных лиц связи между наличием конверсий антител (РТГА, РМН) к праймирующему А (H5N2) и бустирующему А (H5N1) вирусам. Это свидетельствует, что сведения об иммуногенности ЖГВ H5N2, полученные в отдельности в РТГА или РМН, не отражают истинного уровня формирования В-клеточной памяти на вакцинацию. Реально этот процесс соотносится только с совокупными данными всех иммунологических тестов, включающих конверсии сывороточных и локальных антител (табл. 3) и вирусспецифических хелперных и цитотоксических Т-клеток (табл. 4). Такие конверсии на вакцинацию ЖГВ H5N2 отмечены у почти всех добровольцев – 97% (Табл. 5).

Таблица 6. Интенсивность гуморального иммунного ответа (РТГА, РМН) к вирусам гриппа А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) и NIBRG-23 (H5N1) после иммунизации добровольцев праймирующей ЖГВ H5N2 и бустирующей ИГВ H5N1.

Группа привитых	Число лиц	Обратные величины СГТ АТ								% лиц с защитными титрами в РТГА АТ \geq 1:40
		РТГА				РМН				
		Д0*	Д7*	Д28*	Д56*	Д0	Д7	Д28	Д56	Д56
Праймированные ЖГВ H5N2	19	$\leq 3/3^{**}$	НИ	3/4	3/5	НИ/5	НИ	НИ/6	НИ/11	0
Те же лица, привитые через 1,5 года ИГВ H5N1	19	$\leq 3/3$	81/6	32/43	45/62	8/14	67/138	166/398	239/398	73
Контрольная группа – привитые только ИГВ H5N1	24	$\leq 3/3$	31/3	6/6	9/8	4/6	16/25	32/57	73/147	38

* Д0 – до вакцинации; Д7 – через 7 дней после 1-й вакцинации; Д28 – через 28 дней после 1-й вакцинации; Д56 – через 28 дней после 2-й вакцинации.

** Числитель – антитела к вирусу гриппа А NIBRG -23 (H5N1), знаменатель – антитела к вирусу гриппа А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2)

НИ – не исследовали

В Д7, Д28 и Д56 во всех случаях СГТ антител в опытной и контрольных группах добровольцев достоверно отличались при $p < 0,05$ или $p < 0,01$ или $p < 0,001$

Для более полного представления о В-клеточном иммунном ответе на ИГВ H5N1 проведено исследование в ИФА эндогенной секреции этими клетками антител *in vitro* в надосадках культур МПК (табл. 7). Наши данные показали, что праймирование людей ЖГВ H5N2 оказывало бустирующий эффект в виде ускоренной (Д7) и усиленной (Д28, Д56) продукции не только сывороточных, но и секретируемых IgG-антител к вакцинному штамму ИГВ H5N1. Секреция IgA-антител оказалась более слабой и, в отличие от IgG-антител, ее пик наблюдался на раннем сроке после первичной вакцинации (Д7). В сравнении с традиционной методикой определения антител в сыворотках крови, используемый прием обладал рядом преимуществ: во-первых, в виде наличия дополнительной информации о числе конверсий

IgG-антител (25-33%); во-вторых, выявлении максимального числа конверсий IgA-антител (74%) уже на раннем сроке после первой прививки ИГВ H5N1.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования испытанной методики определения в ИФА секрети in vitro в качестве дополнительного теста оценки иммуногенности гриппозных вакцин. На эту методику получено свидетельство о внедрении метода «Технология оценки поствакцинальной секрети антител культурой В-лимфоцитов in vitro» (регистрационный номер 557-15008-и, дата регистрации – 16 ноября 2015 года).

Таблица 7. Интенсивность гуморального иммунного ответа (ИФА) к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) у добровольцев на вакцинацию ИГВ H5N1

Антитела	Группа привитых	Число лиц	Обратные величины СТГ АТ							
			АТ в сыворотках крови				АТ в надосадках культур МПК			
			Д0*	Д7*	Д28*	Д56*	Д0	Д7	Д28	Д56
IgA	ИГВ H5N1**	24	7	21 ¹	21 ²	25 ³	1	2 ⁸	2	1
	ЖГВ H5N2** + ИГВ H5N1	19	6	55 ¹	69 ²	60 ³	1	6 ⁸	3	3
IgG	ИГВ H5N1	24	170 ⁴	290 ⁵	490 ⁶	633 ⁷	2	5 ⁹	8 ¹⁰	10 ¹¹
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1	19	335 ⁴	745 ⁵	1485 ⁶	1285 ⁷	5	23 ⁹	34 ¹⁰	37 ¹¹

Цифры 1-11 означают достоверность отличий СТГ АТ при $p < 0,05$ или $p < 0,01$

* - как в таблице 5

** - ИГВ H5N1 – привитые только ИГВ H5N1; ЖГВ H5N2+ИГВ H5N1 – праймированные ЖГВ H5N2 с последующей (через 1,5 года) вакцинацией ИГВ H5N1.

Авидность антител отражает созревание В-клеточной иммунологической памяти [Ярилин А.Р. 2010]. Ранее исследователями из США показано, что праймирование людей ЖГВ H5N1 приводит к усилению продукции высокоавидных сывороточных IgG-антител к вакцинному штамму бустирующей ИГВ H5N1 [Luke et al. 2014]. Представленные в таблице 8 результаты свидетельствуют, что праймирование добровольцев ЖГВ H5N2 приводило к повышению индексов авидности сывороточных IgA- и IgG- антител к вакцинному штамму А(H5N1). У не праймированных лиц этого не наблюдалось.

Таблица 8. Авидность сывороточных антител к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) у привитых ИГВ H5N1 добровольцев, праймированных и не праймированных ЖГВ H5N2

Лабораторный тест и антитела	Группа привитых	Число лиц с конверсиями антител к вакцинному вирусу	Из них с достоверным увеличением индекса авидности антител (ИААТ*)	Средние значения ИААТ		
				Д0**	Д7**	Д28**
ИФА IgA	ИГВ H5N1**	16	0	77,4	83,3	77,9
	ЖГВ H5N2** + ИГВ H5N1	17	7 (41,2%)	72,7	86,4	84,9
ИФА IgG	ИГВ H5N1	17	3 (17,6%) ¹	78,3	78,3	77,9 ³
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1	11	6 (54,5%) ¹	76,2 ²	86,2	90,6 ^{2,3}

Цифры 1-3 означают наличие статистически значимых отличий: 1 – $p < 0,05$; 2 – $p < 0,05$; 3 – $p < 0,05$

* ИИАТ вычисляется как отношение оптической плотности в пробе до добавления мочевины к оптической плотности в той же пробе после добавления мочевины, переведенное в проценты. Достоверным считается увеличение ИИАТ на 15 и более процентов.

** как в таблице 7.

На конечном этапе был проведен анализ Т-клеточного иммунного ответа у тех же добровольцев. Определяли цитотоксические клетки фенотипов CD8+, CD8+Tcm и CD8+Tem, специфичные к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1). По аналогии с гуморальным иммунным ответом ожидалось, что поствакцинальная продукция данных клеток иммунологической памяти у праймированных ЖГВ H5N2 (N=19) будет значительно выше, чем у не праймированных (N=24). Однако этого не наблюдалось. Так, после вакцинации ИГВ H5N1 у первых доля CD8+, CD8+Tcm и CD8+Tem клеток составляла соответственно 2,22%, 1,79% и 3,82%, а у вторых соответственно 2,05%, 1,48% и 3,83%. Можно предположить, что торможение Т-клеточного иммунного ответа у праймированных добровольцев носило компенсаторный характер вследствие резкого усиления В-клеточного ответа. Не исключено также, что оно связано с более высоким исходным уровнем (D0) этих клеток у праймированных лиц по сравнению с не праймированными: соответственно 2,49%, 1,44% и 3,05% у первых и 1,30%, 0,86% и 2,23% у вторых. Статистический анализ полученных результатов показал существование четкой обратной зависимости между исходными уровнями данных клеток и их поствакцинальными конверсиями (коэффициента Спирмана от 0,71 до 0,84)

Обобщая результаты этого раздела работы, можно отметить следующее.

Двукратная вакцинация ИГВ H5N1 не праймированных лиц слабо стимулировала гуморальный иммунный ответ к вакцинному штамму. Отдаленное во времени (1,5 года назад) праймирование добровольцев ЖГВ H5N2 резко бустировало антительный иммунный ответ на однократное введение ИГВ H5N1 по всем перечисленным выше характеристикам антителогенеза. Это касалось продукции сывороточных и секретируемых *in vitro* антител к гомологичному вакцинному и гетерологичным вирусам с тем же гемагглютинином H5. У праймированных лиц антитела обладали более высокой авидностью. Перечисленные факты свидетельствуют о способности отечественной праймирующей ЖГВ H5N2 формировать долговременную (не менее 1,5 года) В-клеточную иммунологическую память, реализующуюся в ускорении, усилении и расширении гуморального иммунного ответа на бустирующую ИГВ H5N1. Данные РТГА и РМН об иммуногенности ЖГВ H5N2 (число конверсий антител) по отдельности не характеризовали ее истинную способность формировать долговременную В-клеточную память к вирусам А (H5N1) и А (H5N2). Адекватно отражали этот процесс совокупные сведения о частоте иммунных реакций на ЖГВ H5N2, полученные во всех использовавшихся иммунологических тестах: РТГА+РМН+ИФА+Т-клетки. В целом, полученные результаты обосновывают новое направление в применении ЖГВ для защиты от потенциально пандемических вирусов гриппа А.

2.4 Экспериментальное исследование иммунного ответа к вирусам гриппа А(H2N2)

В главе 2.1. представлены сведения о формировании у людей гетеросубтипического иммунитета к вирусу А(H2N2) в условиях современного эпидемического процесса. Изучение поствакцинального иммунного ответа к этому возбудителю связано со строгими ограничениями на введение людям данного вируса, особенно в живом состоянии. Поэтому настоящий раздел работы выполнен в рамках эксперимента *in vivo*. Исследование поддержано грантом РФФИ № 14-04-32250. Работа в 2015 г. заняла первое место среди стендовых докладов на Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге».

При выполнении исследования основное внимание было сконцентрировано на получении экспериментальных данных, полезных для конструирования резервной ЖГВ (H2N2). Такое конструирование основано на создании аттенуированного вакцинного штамма со сниженной способностью размножаться в нижних отделах дыхательного тракта. Данное

свойство связано с приобретением вакцинным штаммом (реассортация, обратная генетика) набора мутаций во внутренних генах от донора аттенуации (в России – А/Ленинград/134/17/57 (H2N2)). Эти мутации возникли в доноре аттенуации в процессе длительного пассирования исходного «дикого» вируса А/Ленинград/134/57 (H2N2). Полный набор мутаций приведен в таблице 9. Вакцинный штамм для ЖГВ H2N2 должен быть не только аттенуированным, но и достаточно иммуногенным. Однако вопрос о влиянии приобретенных мутаций на формирование разных звеньев адаптивного иммунного ответа оставался открытым. Для выяснения этого вопроса были проведены специальные исследования.

Для заражения самок мышей СВА использовали 15 штаммов вируса А(H2N2) – таблица 9. 14 из них приготовлены И.Н. Исаковой-Сивак методом обратногогенетического переноса отдельных и комплексных мутаций в гены PB1, PB2, PA, NP, M1 и NS2, характерных для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) –Len/17ca. Эталонном служил исходный «дикий» вирус А/Ленинград/134/57 (H2N2) – Len/17wt, из которого получен донор аттенуации. Тестировали сывороточные антитела, локальные антитела и вирусспецифические CD4+IFN+ и CD8+IFN+ Т-клетки.

Таблица 9. Характеристики штаммов вируса гриппа H2N2, использовавшихся для заражения мышей

N п/п	Наличие мутаций, характерных для донора аттенуации Len/17 Ca (N2)									Репродукция в легких вирусов (lg EID50/мл±co)	
	PB2		PB1		PA		NP	M1			NS2
	V478L	K265N	V591 I	L28P	V341L	N492S	I15V	F144L	M100I		
Референс вирусы*											
1											4,4 ± 1,4
2											1,9 ± 0,9
Вирусы с одиночными мутациями											
3											3,4 ± 2,0
4											4,7 ± 0,4
5											5,1 ± 1,2
6											5,0 ± 0,3
7											5,4 ± 0,2
8											4,6 ± 1,2
9											2,5 ± 1,1 **
10											4,8 ± 0,5
11											4,6 ± 0,4
Вирусы с комбинированными мутациями											
12											1,2 ± 0,0 **
13											5,7 ± 0,5
14											4,6 ± 0,6
15											1,2 ± 0,0 **

Черным цветом обозначено наличие мутаций, характерных для вируса А/Ленинград/134/17/57(H2N2)

* N1 – Len/134 wt – «дикий» вирус гриппа А (H2N2); N2 – Len/17 ca – полностью аттенуированный обратногогенетический аналог донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2)

** - аттенуированные мутантные штаммы с низкой репродуктивной активностью в легких по сравнению с «диким» вирусом

Из 13 изученных мутантных штаммов только три (N9, N12 и N15) обладали пониженной способностью размножаться в легких (табл. 9). Рисунок 2 дает представление о развитии гуморального иммунного ответа мышей на эти штаммы вируса гриппа А(H2N2).

Обращают на себя внимание следующие моменты: (i) во всех случаях по силе локальный гуморальный иммунный ответ уступал системному гуморальному иммунному ответу; (ii) повторная иммунизация всеми штаммами, за исключением N15, увеличивала

показатели продукции антител; (iii) штаммы N2, N9 и N12 не уступали или уступали незначительно эталонному «дикому» вирусу (N1) по интенсивности стимуляции обоих типов антител

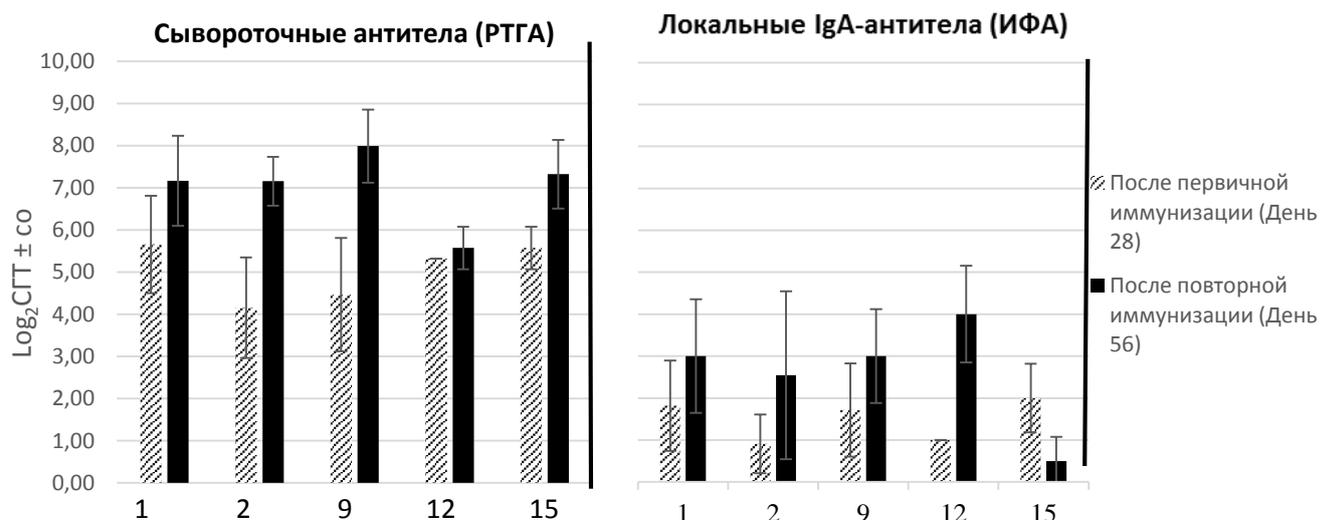


Рисунок 2. Гуморальный иммунный ответ мышей после иммунизации «диким» (N1) и аттенуированными мутантными штаммами вируса гриппа А(H2N2) с низкими показателями репродукции в легких (N2, 9, 12, 15).

1 – «дикий» штамм А/Ленинград/134/57(H2N2) без мутаций Len/134 wt

2 – полный набор мутаций от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2) Len/17 ca;

9 – одиночная мутация M1 – I15V

12 – комплексные мутации PB2-V478L; PB1-K265N, V591I

15 – комплексные мутации PB2-V478L; PB1-K265N,V591I; NS2-M100I

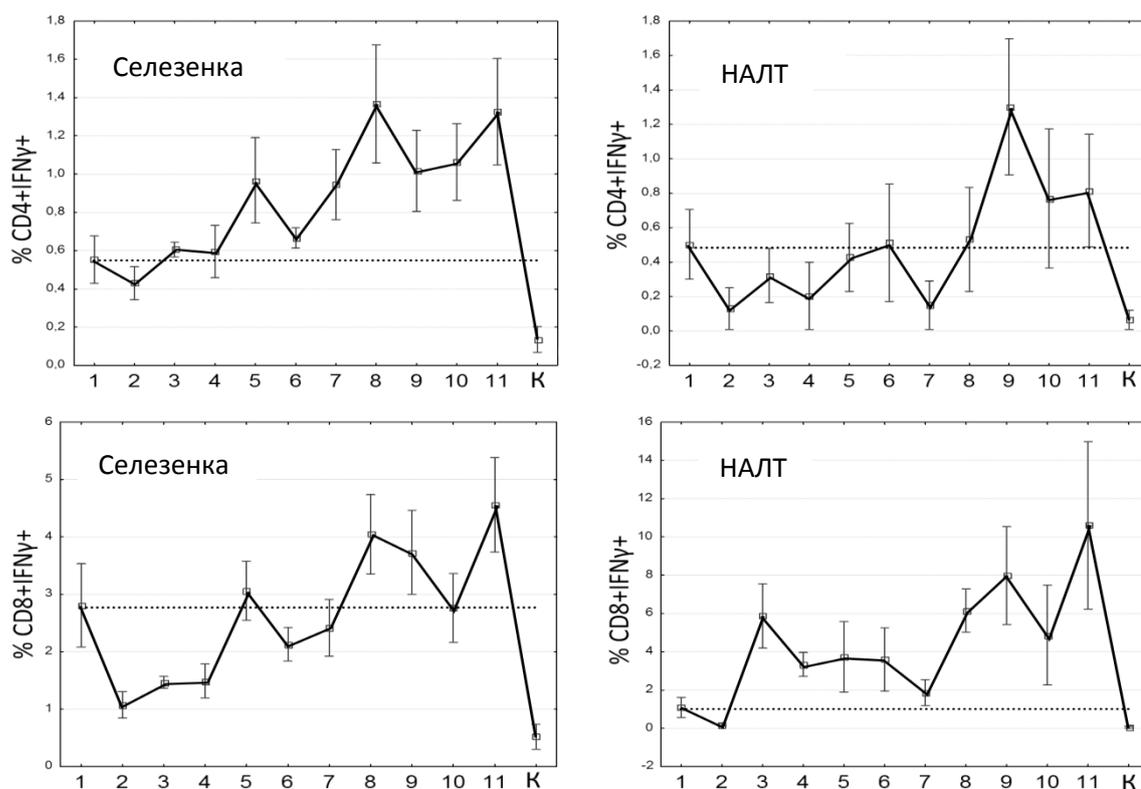


Рисунок 3. Т-клеточный иммунный ответ мышей в селезенке и назоассоциированной

лимфоидной ткани (НАЛТ) после двукратной иммунизации штаммами вируса гриппа А

(H2N2). Данные представлены в виде % вирусспецифических CD4+IFN γ + и CD8+IFN γ + Т-клеток \pm стандартное

отклонение: 1 – LEN/wt; 2 – LEN/ca; 3 – PB2-V478L; 4 – PB1-K265N; 5 – PB1-V591I; 6 – PA-L28P; 7 – PA-V341L; 8 – NP-N492S; 9 – M1-I15V; 10 – M1-F144L; 11 – NS2-M100I; K – интактные мыши.

Рисунок 3 содержит данные о системных (селезенка) и локальных (НАЛТ) вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеточных иммунных ответах мышей на двукратное заражение эталонным «диким» вирусом (N1), аналогом донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2) и штаммами с одиночными мутациями (N3-N11) вируса гриппа А (H2N2)

Наблюдались значительные отличия в стимуляции вирусспецифических клеток разными мутантными штаммами. Вирусы с мутациями в генах M1, NP, NS2 (N8-N11) индуцировали продукцию CD4+ Т-лимфоцитов (селезенка) и/или локальных CD8+ Т-лимфоцитов (НАЛТ) в 2-3 раза интенсивнее, чем «дикий» вирус N1. Донор аттенуации (N2) с полным набором мутаций уступал «дикому» вирусу в силе индукции изученных пулов Т-клеток.

Таким образом, все изученные штаммы вируса гриппа А(H2N2), в том числе и мутантные, индуцировали синтез сывороточных антител, локальных IgА-антител и вирусспецифических CD4+ и CD8+ Т-клеток в селезенке и НАЛТ, но с разной интенсивностью. Наличие таких колебаний свидетельствует о влиянии изученных мутаций в генах внутренних белков вируса А (H2N2) на формирование адаптивного иммунного ответа.

С позиции выбора вакцинного штамма для ЖГВ H2N2 представляют интерес только те мутантные штаммы, которые обладают достаточной аттенуацией в сочетании с удовлетворительной иммуногенностью. В этом смысле прежде всего привлекает внимание штамм N9 с одиночной мутацией в гене белка M1, который активно стимулировал все изученные факторы адаптивного иммунитета при уровне аттенуации, приближающемся к донору аттенуации. С тех же позиций представляет интерес и штамм N 12 с комплексными мутациями в генах PB1 и PB2.

3. Заключение

Проведенные исследования выявили ряд особенностей развития поствакцинального и естественно формируемого гетеросубтипического иммунного ответа к вирусам гриппа А (H5N1), А (H5N2) и А (H2N2) у не праймированных людей. К ним относятся: (i) индукция циркулирующими вирусами гриппа А (H1N1) и А (H3N2) кроссреактивных локальных антител и Т-клеток иммунологической памяти, но не сывороточных антител, выявляемых в РТГА и РМН. (ii) необходимость двукратной вакцинации резервной вакциной; (iii) высокий по частоте, но слабый по интенсивности поствакцинальный иммунный ответ; (iv) достаточность такого ответа для полноценного формирования долговременной В-клеточной иммунологической памяти; (v) высокая частота поствакцинальных антительных иммунных ответов к различным штаммам с единым гемагглютинином H5; Эти данные, с одной стороны, способствуют раскрытию механизмов иммуногенеза при первичном контакте взрослых людей с разными подтипами вируса гриппа А, с другой, важны для прогноза эпидситуации, оценки иммуногенности резервных вакцин и адекватному их применению в случае угрозы пандемии, вызванной новым подтипом вируса гриппа А. Эксперименты на мышах показали, что мутации в генах внутренних белков донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2), переносимые реассортацией или обратной генетикой в вакцинный штамм для ЖГВ, могут существенно влиять на интенсивность адаптивного Т- и В-клеточного иммунного ответа. Эти исследования позволили выделить перспективные для приготовления ЖГВ H2N2 мутационные штаммы с достаточной аттенуацией и высокой иммуногенностью.

ВЫВОДЫ:

1. У лиц, контактировавших с вирусом А (H2N2) в 1957-1968 гг., сохранена в активном состоянии системная и локальная В-клеточная иммунологическая память к нему. Это подтверждается обнаружением у таких лиц высоких титров сывороточных антигемагглютинирующих и локальных IgА-антител к данному подтипу.

2. У людей, не контактировавших с потенциально пандемическими вирусами гриппа А (H5N1) и А (H2N2), обнаруживаются специфические к ним кроссреактивные локальные IgA-антитела, а также кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки иммунологической памяти фенотипов T_{cm} и T_{em}. У этих людей не выявляются сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела к данным возбудителям.
3. Отечественная ЖГВ H5N2 обладает высокой иммуногенностью, выражающейся в стимуляции у большинства людей конверсий различных факторов адаптивного иммунитета как к вакцинному штамму, так и к вирусу А(H5N1).
4. Однократная вакцинация отечественной ЖГВH5N2 формирует у людей долговременную В-клеточную иммунологическую память не только к вакцинному вирусу А (H5N2), но и к вирусу А (H5N1). Это иллюстрируется ускоренной и усиленной продукцией сывороточных антител к этим вирусам, а также повышением показателей их авидности у лиц, привитых ИГВ H5N1 после отдаленного во времени (1,5 года назад) праймирования ЖГВ H5N2.
5. По экспериментальным данным *in vivo* изученные аттенуированные штаммы вируса гриппа А (H2N2) с разным набором мутаций в генах внутренних белков, полученных от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), способны стимулировать продукцию сывороточных антигемагглютинирующих антител, локальных IgA-антител, а также вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток на системном (селезенки) и локальном (НАЛТ) уровнях. По совокупным показателям самой низкой стимуляционной активностью обладает аттенуированный штамм с полным набором мутаций от донора аттенуации, а самой высокой – достаточно аттенуированный штамм с одиночной мутацией M1-I15V
6. Для оценки иммуногенности резервных ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа А необходимо использовать комплекс иммунологических тестов, отражающих системный гуморальный, локальный гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы. Такой подход дает адекватное представление как о частоте поствакцинальных иммунных реакций, так и о реальном формировании долговременной В-клеточной памяти на эту вакцину.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Донина С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный гуморальный иммунный ответ у больных гриппом людей и лиц, привитых против сезонных, пандемических и потенциально пандемических вирусов гриппа. // Вопросы вирусологии – 2013 – №3 – с. 37 – 42.
2. Кореньков Д.А. Исакова-Сивак И.Н. Кузнецова В.А. Лосев И.В. Руденко Л.Г. Найхин А.Н. Сравнительный иммуноэпитопный анализ нуклеопротеинов современных циркулирующих вирусов гриппа А и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) для живой гриппозной вакцины. //Фундаментальные исследования, 2014 – №10 – с.908-912.
3. Найхин А.Н., Донина С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Гомологичный и гетерологичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые реассортантные гриппозные вакцины А(H5N2) и А(H7N3). //Медицинская иммунология, 2015 – Т. 17, № 1. – с. 59-70.
4. Лосев И.В., Донина С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Обнаружение у людей кроссреактивных антител и Т-клеток иммунологической памяти к антропонозным и зоонозным подтипам вируса гриппа А. // Медицинская иммунология, 2015. – Т. 17, № 4. – с. 351-362.

5. Найхин А.Н. Лосев И.В. Роль консервативных и гипервариабельных иммунодоминантных эпитопов внутренних белков вирусов гриппа А в формировании цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа. // Вопросы Вирусологии, 2015. – Т. 60, № 1. – с. 11-16.
6. Кузнецова С.А. Исакова-Сивак И.Н. Кузнецова В.А. Петухова Г.Д. Лосев И.В. Дони́на С.А. Руденко Л.Г. Найхин А.Н. Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей. // Вопросы Вирусологии, 2015, – Т. 60, №2, – с. 25-30
7. Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Ерофеева М.К., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Использование метода оценки поствакцинальной секреции антител В-лимфоцитами in vitro для характеристики иммуногенности в клинических испытаниях резервных гриппозных вакцин А (H5N1) и А (H5N2). // Медицинская иммунология 2016, – Т. 18, № 2, – с. 129-138
8. Найхин А.Н., Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Ерофеева М.К., Стукова М.А., Руденко Л.Г. Индукция долговременной Т- и В-клеточной иммунологической памяти к вирусу гриппа А (H5N1) у людей, привитых живой гриппозной вакциной А(H5N2). // Медицинская иммунология 2017. – Т 19, №4. – с.375-386.

Статьи в других изданиях:

1. Petukhova G.D., Kuznetsova S.A., Kuznetsova V.A., Korenkov D.A., Losev I.V., Isakova-Sivak I.N. Effect of ts-mutations on influenza A virulence // Medical Academic Journal. Supplement. - Proceedings of the 2nd Russian young scientists' conference "Problems of biomedical science of 3rd millenium", November 12 – 14 2012. - P. 333 – 335
2. Лосев И.В. Дони́на С.А. Стукова М.А. Найхин А.Н. Поствакцинальный гуморальный иммунный ответ людей на живую и инактивированную гриппозные вакцины, приготовленные из птичьих вирусов гриппа А с гемагглютинином H5. // "Inter-Medical" 2015. – №4(10), с. 107-110.
3. Rudenko L.G., Naykhin A.N., Donina S.A., Korenkov D.A., Petukhova G.D., Isakova-Sivak I.N., Losev I.V., Stukova M.A., Erofeeva M.K., Nikiforova A.N., Power M. and Flores J. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. // Human vaccines & immunotherapeutics. 2015. – 11(12). – p. 2839-48

Тезисы

1. Petukhova G.D., Donina S.A., Kuznetsova S.N., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local antibody immune response to seasonal, pandemic and potentially pandemic (avian) live attenuated influenza vaccines in human nasal swab and saliva samples. // Options for the control of influenza VIII, Cape Town, South Africa, September 5-10, 2013, – Abstract Book, – p. 285
2. Kuznetsova S.A., Isakova-Sivak I.N., Kuznetsova V.A., Petukhova G.D., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Effect of ts mutations in polymerase genes of influenza A virus on its virulence, immunogenicity, and protective efficacy in a mouse model. // Proceedings of “Options for the Control of Influenza VIII. Cape Town, South Africa, 5-10 September 2013. – Abstracts- 2013. – p1-338. - P. 288
3. Лосев И.В., Петухова Г.Д., Дони́на С.А., Кузнецова С.А., Найхин А.Н. Локальный гуморальный иммунный ответ к сезонным, пандемическим и потенциально пандемическим живым гриппозным вакцинам. // Инфекция и иммунитет. Приложение. –Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» 23–25 апреля 2014 г., – Санкт-Петербург. – с. 78 – 79.
4. Петухова Г.Д., Лосев И.В., Дони́на С.А., Найхин А.Н. Формирование CD4+ и CD8+ Т-клеток иммунологической памяти у волонтеров после вакцинации живыми аттенуированными гриппозными вакцинами А (H5N2) и А (H1N1)pdm2009. // Инфекция и иммунитет. Приложение. –Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» 23–25 апреля 2014 г., – Санкт-Петербург. – с. 84 – 85.

5. Petukhova G.D., Kuznetsova S.A., , Losev I.V., Isakova-Sivak I.N., Kuznetsova V.A., Korenkov D.A., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Contribution of single mutations specific for A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) master donor virus in influenza A virulence and immunogenicity in a mouse model. // ESWI, Рига, сентябрь 2014

6. Лосев И.В., Петухова Г.Д., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова С.А. Влияние отдельных мутаций в генах, кодирующих внутренние белки вируса гриппа А, на гуморальный и клеточный иммунный ответ. // Материалы конференции «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» 2015

Список сокращений

АТ – антитела;

ВОЦ – внутриклеточное окрашивание цитокинов;

ЖГВ – живая гриппозная вакцина;

ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина;

ИФА – иммуноферментный анализ;

МПК – мононуклеары периферической крови;

НАЛТ – назоассоциированная лимфоидная ткань;

ПЦ – проточная цитометрия;

РМН – реакция микронеutralизации;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации;

СВДП – секреты верхних дыхательных путей;

СГТ – Средние геометрические титры антител

СК – сыворотка крови;

СО – стандартное отклонение

ЕID50 – эмбриональная инфекционная доза 50

НА – Гемагглютинин

IFN γ – интерферон γ

MOI – multiplicity of infection

NA – Нейраминидаза

T_{cm} – вирусспецифические Т-клетки центральной памяти

T_{em} – вирусспецифические Т-клетки эффекторной памяти

БЛАГОДАРНОСТИ:

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю, доктору медицинских наук, профессору Анатолию Нойевичу Найхину за помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор глубоко признателен кандидату медицинских наук Светлане Александровне Дониной за неоценимую помощь, оказанную в ходе выполнения данной работы. Автор искренне признателен доктору биологических наук Вере Зорьевне Кривицкой за проведение реакции микронеutralизации. Автор особо благодарен доктору медицинских наук, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, профессору Ларисе Георгиевне Руденко, за всестороннюю поддержку и помощь при выполнении исследования.