

*Е.А.Хромова, И.А.Семочкин, Э.А.Ахматова, В.Н.Столникова,  
С.А.Сходова, Е.В.Сорокина, Н.К.Ахматова, М.П.Костинов*

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ВАКЦИН ПРОТИВ ГРИППА: ВЛИЯНИЕ НА СУБПОПУЛЯЦИОННУЮ СТРУКТУРУ ЛИМФОЦИТОВ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

*Цель.* Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов у здоровых лиц под воздействием различных вакцин против гриппа в системе *in vitro*. *Материалы и методы.* Проводили оценку иммунофенотипических особенностей мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, активированных *in vitro* иммуноаdjувантными и безадjувантными вакцинами против гриппа у здоровых лиц с использованием метода проточной цитометрии. *Результаты.* Вакцина Гриппол плюс оказывала более выраженное стимулирующее действие по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами на NK-клетки, клетки с маркером ранней активации CD45/CD25, индуцировала численность естественных регуляторных клеток (CD4/CD25/Foxp3), нарастание количества В-клеток и уменьшала число клеточных типов с маркером апоптоза CD45/CD95. *Заключение.* Иммуноаdjувантная вакцина Гриппол плюс индуцировала формирование эффекторов как врожденного, так и приобретенного иммунитета и обладала наиболее мощным потенциалом в отношении активации различных типов иммунокомпетентных клеток по сравнению с безадjувантными вакцинами.

Журн. микробиол., 2016, № 6, С. 61–65

**Ключевые слова:** иммуноаdjувантные и безадjувантные вакцины против гриппа, субпопуляционная структура лимфоцитов

*E.A.Chromova, I.A.Semochkin, E.A.Akhmatova, V.N.Stolpnikova,  
S.A.Skhodova, E.V.Sorokina, N.K.Akhmatova, M.P.Kostinov*

## **COMPARATIVE ACTIVITY OF INFLUENZA VACCINES: EFFECT ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATION STRUCTURE**

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

*Aim.* Study subpopulation structure of lymphocytes in healthy individuals under the effect of various influenza vaccines in an *in vitro* system. *Materials and methods.* Evaluation of immunophenotype features of PBMCs, activated *in vitro* by immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines against influenza in healthy individuals, was carried out by using flow cytometry method. *Results.* Grippol plus vaccine caused a more pronounced stimulating effect compared with subunit and split-vaccines on NK-cells, cells with markers of early activation CD45/CD25, induced the quantity of natural regulatory cells (CD4/CD25/Foxp3), increase of the number of B-cells and reduced the amount of cell types with apoptosis marker CD45/CD95. *Conclusion.* Immune-adjuvanted vaccine Grippol plus induced formation of effectors of both innate and adaptive immunity and possessed the most powerful potential regarding activation of various types of immune-competent cells compared with unadjuvanted vaccines.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 6, P. 61–65

**Key words:** immune-adjuvanted and unadjuvanted vaccines against influenza, lymphocyte subpopulation structure

## **ВВЕДЕНИЕ**

По своей социальной значимости грипп находится на первом месте среди инфекционных болезней человека. Заболеваемость гриппом и острыми респираторными инфекциями (ОРИ) превышает суммарный показатель по всем

остальным инфекциям. Единственным способом эффективного ограничения распространения гриппа и уменьшения тяжести его последствий является широкий охват вакцинацией групп риска населения — детей раннего возраста, пожилых людей и беременных [9]. На сегодняшний день существует более десятка разновидностей российских и зарубежных вакцин против гриппа как живых, так и инактивированных. Наибольшее применение, в силу своей высокой эффективности и малой реактогенности, получили инактивированные вакцины против гриппа, содержащие фрагменты вируса гриппа, а также иммуномодуляторы. Данные препараты хорошо зарекомендовали себя, т.к. имеют минимальное количество противопоказаний (в основном это аллергические реакции на отдельные их компоненты), и их применение возможно с 6-месячного возраста, в т.ч. и у беременных женщин. В настоящее время отсутствует информация о сравнительной активности адьювантных и безадьювантных вакцин и их влиянии на врожденные и приобретенные эффекторы иммунной системы на молекулярно-клеточном уровне.

Цель статьи — исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов у здоровых лиц под воздействием иммуноадьювантных и безадьювантных вакцин против гриппа в системе *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 16 здоровых женщин репродуктивного возраста (18 — 50 лет), у которых исследовали образцы венозной крови. Проводили оценку иммунофенотипических особенностей мононуклеарных лейкоцитов периферической крови (МЛПК), активированных *in vitro* иммуноадьювантными и безадьювантными вакцинами против гриппа. МЛПК выделяли с помощью одноступенчатого градиента плотности фиколл-урографина по методу [5] путем центрифугирования. Лейкомассу разводили средой 199 в 2 раза (ПанЭко, Россия), содержащей 25 ЕД/мл гепарина (Sigma), затем наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина плотностью 1,077 г/см<sup>3</sup> (Pharmacia) с последующим центрифугированием при 400 г 40 мин. МЛПК, образовавшие интерфазное кольцо, собирали и трехкратно отмывали в среде 199. После каждой отмывки в 10-кратном объеме среды клетки осаждали центрифугированием при 250 г.

Клетки (10<sup>6</sup> кл/мл) инкубировали в СО<sub>2</sub> инкубаторе в течение 96 часов в присутствии различных вакцин (10 мкл/мл) против гриппа. Исследовали активность следующих вакцин; Инфлювак (субъединичная), Ваксигрип и Ультрикс (сплит-вакцины), Гриппол плюс (иммуноадьювантная).

Исследование субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии на приборе FC-500 (Beckman Coulter, США) с использованием FITC- и PE-меченных МАТ к CD45/CD3, CD3/CD4, CD3/CD8, CD16/56, CD3/CD16/56, CD45/CD20, CD45/HLA-DR, CD45/CD25, CD4/CD25/Фохр3, CD45/CD95. Изменение данных показателей после инкубации с различными вакцинами соотносили с контролем после инкубации без присутствия вакцины.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение изменения субпопуляций МЛПК у здоровых женщин детородного возраста показало отсутствие каких-либо статистически значимых различий между образцами, культивируемыми с различными видами вакцин, и

**Влияние адьювантной и безадьювантных вакцин на субпопуляционную структуру лимфоцитов в культуре МЛПК у здоровых женщин**

| Показатель     | Содержание лимфоцитов, % (M±σ) |             |              |             |             | Различия между группами                                |
|----------------|--------------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--|
|                | Контроль                       | Инфлювак    | Гриппол плюс | Ваксигрип   | Ультрикс    |  |
| CD45/CD3       | 73,55±4,08                     | 68,99±2,05  | 64,07±6,06   | 72,49±2,66  | 68,23±2,67  | P <sub>1и2-5</sub> >0,05                               |
| CD3/CD4        | 45,54±2,15                     | 43,88±3,52  | 42,57±3,84   | 46,44±4,03  | 41,10±2,85  | P <sub>1и2-5</sub> >0,05                               |
| CD3/CD8        | 19,18±1,69                     | 18,16±1,58  | 18,99±1,62   | 20,92±1,33  | 18,09±2,02  | P <sub>1и2-5</sub> >0,05                               |
| CD16/56        | 4,34±0,61                      | 12,38±0,69* | 14,54±0,62*  | 13,36±0,81* | 10,70±0,68* | P <sub>3и1,2,4,5</sub> <0,05                           |
| CD3/CD16/56    | 2,05±0,76                      | 4,00±0,58*  | 4,34±0,17*   | 4,64±0,66*  | 4,05±0,34*  | P <sub>2,3,4,5 и 1</sub> <0,05                         |
| CD45/CD20      | 6,77±0,56                      | 16,69±1,93* | 10,49±1,79*  | 8,48±1,31   | 9,14±1,35   | P <sub>2и1,3-5</sub> <0,05; P <sub>3и1,4,5</sub> <0,05 |
| CD45/HLA-DR    | 14,86±0,27                     | 20,03±1,63* | 31,26±1,14*  | 27,90±2,58* | 30,05±2,80* | P <sub>2и3-5</sub> <0,05                               |
| CD45/CD25      | 3,23±0,42                      | 6,88±0,49*  | 9,19±0,59*   | 6,63±0,46*  | 6,64±0,63*  | P <sub>2и1,5</sub> <0,05; P <sub>3и1,2,4,5</sub> <0,05 |
| CD4/CD25/Foxp3 | 1,48±0,54                      | 1,69±0,53   | 2,53±0,73*   | 1,99±0,59   | 1,86±0,57   | P <sub>3и1</sub> <0,05                                 |
| CD4/CD8        | 2,71±0,33                      | 2,33±0,29   | 2,26±0,28    | 2,7±0,35    | 1,92±0,37   | P <sub>1и2-5</sub> >0,05                               |
| CD45/CD95      | 6,17±0,64                      | 7,13±0,63   | 5,12±0,28*   | 6,24±0,42   | 5,98±0,67   | P <sub>3и1,2,5</sub> <0,05;                            |

Примечание. \* p<0,05 — достоверность различий с контрольной группой (Mann-Whitney U test).

контрольным образцом (без вакцины), в отношении общего пула Т-лимфоцитов с фенотипом CD45/CD3, Т-хелперов (CD3/CD4) и цитотоксических (CD3/CD8) лимфоцитов (табл.).

Однако было выявлено нарастание уровня количества естественных киллерных клеток (NK-клетки) с маркерами CD16/56 под воздействием вакцин Инфлювак (в 2,8 раза), Гриппол плюс (в 3,3 раза), Ваксигрип (в 3 раза) и Ультрикс (в 2,4 раза). Следует отметить, что в нашем исследовании более выраженное иммуностимулирующее действие на МЛПК оказывала иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс. NK-клетки относятся к ключевым эффекторам врожденного иммунитета, функцией которых является лизис опухолевых и инфицированных вирусами клеток [7] и регуляция врожденного и адаптивного иммунных ответов [4].

Также наблюдалось нарастание численности естественных киллерных Т-лимфоцитов (NKT), экспрессирующих молекулы CD3/CD16/56, примерно в 2 раза в образцах со всеми вакцинами: Инфлювак (в 2 раза), Гриппол плюс (в 2,1 раза), Ваксигрип (в 2,26 раза), Ультрикс (в 2 раза).

Что же касается клеток-антителопродуцентов В-лимфоцитов с фенотипом CD45/CD20, статистически значимое увеличение было выявлено под воздействием вакцины Инфлювак (увеличение в 2,5 раза), Гриппол плюс (увеличение в 1,5 раза).

Также было отмечено увеличение содержания клеток, экспрессирующих маркеры ранней (CD25) и поздней (HLA-DR) активации, под влиянием всех исследуемых вакцин. При этом наиболее существенные изменения наблюдались в образце с иммуноадьювантной вакциной Гриппол плюс. Она повышала количество клеток с экспрессией маркера CD45/CD25 в 2,8 раза по сравнению с контролем, активность безадьювантных вакцин была ниже — Инфлювак увеличивал число клеток с данным маркером в 2,1 раза, Ваксигрип и Ультрикс — в 2 раза.

В отношении маркера CD45/HLA-DR наблюдалась следующая картина: Гриппол плюс повышал численность клеток в 2,1 раза, Инфлювак — в 1,3 раза, Ваксигрип — в 1,9 раза, Ультрикс — в 2 раза.

Одной из наиболее изученных популяций являются так называемые естественные регуляторные клетки тимусного происхождения (nTreg) с поверхностным фенотипом CD4+CD25+ и конститутивной экспрессией транскрипционного фактора Foxp3 (forkheadboxp3), ответственного за их регуляторную активность. Примечательно, что в нашем исследовании мы выявили увеличение клеток, экспрессирующих данный маркер, только в одном образце с иммуноадьювантной вакциной Гриппол плюс (увеличение в 1,7 раза).

Относительно маркера апоптоза CD45/CD95 мы выявили увеличение клеток в образце с вакциной Инфлювак (в 1,1 раза), в образцах с вакцинами Ваксигрип, Ультрикс показатели были идентичны с данными контроля, а в образце с вакциной Гриппол плюс мы обнаружили снижение количества клеток в 1,2 раза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение влияния различных вакцин против гриппа на субпопуляционную структуру лимфоцитов выявила следующее. Вакцина Гриппол плюс имела более выраженное стимулирующее действие по сравнению с субъединичной и сплит-вакцинами на НК-клетки, клетки с маркером ранней активации CD45/CD25, индуцировала численность естественных регуляторных клеток (CD4/CD25/Foxp3), нарастание количества В-клеток и уменьшала число клеточных типов с маркером апоптоза CD45/CD95. То есть иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс индуцировала формирование эффекторов как врожденного, так и приобретенного иммунитета. При взаимодействии с моноклеарами периферической крови человека полиоксидоний существенно повышает цитотоксичность НК-клеток по отношению к клеткам-мишеням. Этот эффект наблюдался практически у всех исследованных доноров, причем повышающий эффект особенно выражен у индивидуумов, у которых активность НК-клеток находилась на нижней границе нормы или была понижена [2].

Нарастание численности T-regs, возможно, можно объяснить иммунорегулирующим влиянием вакцины, содержащей адьювант полиоксидоний. Иммунорегуляторная функция nTreg реализуется как посредством секреции цитокинов, таких как TGF-β и ИЛ-10, так и контактного взаимодействия с эффекторными T-лимфоцитами и антигенпрезентирующими клетками [3].

Стимуляция субъединичной вакциной Инфлювак увеличивала количество клеток с маркером апоптоза CD45/CD95 и лучше всего стимулировала рост В-клеток. Экспрессия молекулы CD95 указывает на готовность к апоптозу и появляется чаще на клетках бластного ряда. Именно с этим явлением и связывают низкий уровень порога чувствительности пролиферирующих клеток к апоптозу под воздействием различных агентов у здоровых лиц [1]. А в отношении других популяций клеток Инфлювак в меньшей степени стимулировал нарастание числа иммунокомпетентных клеток. Известно, что в отсутствие адьюванта иногда может сформироваться слабый иммунный ответ, а при низкой концентрации антигена наивные T-лимфоциты могут стать толерогенными [8].

В отношении естественных киллерных T-лимфоцитов (НКТ) с маркером CD3/CD16/56 все вакцины имели одинаковое стимулирующее действие, увеличивая численность клеток примерно в 2 раза. НКТ, являясь фенотипически неоднородной популяцией клеток, дублируют функции НК и являются свя-

зующим звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом, однако их роль в настоящее время полностью не изучена [6].

Что же касается клеток с экспрессией маркера поздней активации CD45/HLA-DR, действие иммуноадьювантной вакцины и сплит-вакцин имело схожие результаты, увеличивая численность клеток примерно в 2 раза. Несколько хуже был результат с субъединичной вакциной Инфлювак (увеличение 1,3 раза). Данный маркер является также ключевой молекулой антигенной презентации, экспрессия его может свидетельствовать об активации клеточного звена и возможности представления антигенов (АГ), входящих в состав вакцины, антиген-представляющими клетками. Известно, с сохранением нативной структуры АГ и антигенной специфичности полиоксидоний осуществляет прочное связывание с АГ различной природы, обеспечивая физическую презентацию АГ антигенпредставляющими клетками [5]. Таким образом, резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что наиболее мощным потенциалом в отношении активации различных типов иммунокомпетентных клеток обладает иммуноадьювантная вакцина Гриппол плюс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К. Роль апоптоза лимфоцитов периферической крови в механизмах развития геморрагической лихорадки с почечным синдромом. Дисс. к.м.н., Уфа, 2003.
2. Иванова А.С., Пучкова Н.Г., Некрасов А.В. и др. Механизмы адьювантных эффектов полиоксидония. Иммунология гемопоза. 2015, 13 (2): 30-92.
3. Казимирко Н.К., Акимова Е.Е., Завацкий В.Ю., Поляков А.С., Татаренко Д.П. Иммунология физиологической беременности. Молодой ученый. 2014, 3 (6): 132-137.
4. Biron C.A., Nguyen K. B., Pien G. C. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu. Rev. Immunol. 1999, 17: 189-220.
5. Boyum A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968, 267: 95-99.
6. De Martino M., Rossi M.E., Azzari C. et al. Viral load and cd69 molecule expression on freshly isolated and cultured mitogen-stimulated lymphocytes of children with perinatal hiv-1 infection. Clin. Exp. Immunol. 1999, 117 (3): 513-516.
7. French A. R., Yokoyama W. M. Natural killer cells and viral infections. Curr. Opin. Immunol. 2003, 15: 45-51.
8. Schettini J., Mukherjee P. Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. Clin Dev. Immunol. 2008; 2008:106321. doi: 10.1155/2008/106321.
9. Siston A.M. et al. Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. JAMA. 2010, 303 (15): 1517-1525.

*Поступила 27.04.16*

Контактная информация: Хромова Екатерина Александровна,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)917-49-00