Противогриппозный иммунитет:

вклад отдела вирусологии имени академика А.А. Смородинцева НИИЭМ СЗО РАМН в изучение проблемы

А.А. Смородинцев – первый исследователь противовирусного (противогриппозного) иммунитета

1. В опытах *in vivo* охарактеризован первичный и вторичный иммунный ответ к вирусам гриппа с точки зрения продукции сывороточных вируснейтрализующих антител (1937 - 1950)
2. Доказано значение локального иммунитета в защите от экспериментальной гриппозной инфекции – вируснейтрализующая активность секретов носовой полости (1938 - 1939)
3. Обоснована роль авидности вируснейтрализующих сывороточных антител в формировании иммунных комплексов (1948 - 1950)
4. Дана полная характеристика развития постинфекционного и поствакцинального системного гуморального иммунитета у людей к вирусам гриппа А и В: сывороточные антигемагглютинирующие антитела (1950 - 1985)
5. Выдвинута концепция о пожизненности противогриппозного иммунитета (1977)
6. Обратил особое внимание на роль коллективного иммунитета в развитии эпидемического процесса при гриппе

А.Н. Дробышевская, О.М. Чалкина, О.И. Шишкина, В.И. Ильенко, Г.И. Александрова, Я.С. Шварцман

Изучение противогриппозного иммунитета – одно из важных направлений в вирусологической иммунологии

1. Огромная социальная значимость гриппа.
2. Вирус гриппа – ***лучший объект для изучения иммунологии острых вирусных инфекций***:

а) самая надёжная и отработанная экспериментальная модель воспроизведения острой вирусной инфекции и вакцинации на разных животных (мыши, хорьки, хлопковые крысы, морские свинки);

б) самый большой набор разных по конструкции гриппозных вакцин;

в) вирус гриппа имеет сегментированный геном, что позволяет изучать тонкие механизмы развития противовирусного иммунитета с помощью различных генетических манипуляций с этим возбудителем.

Данные по иммунологии гриппа вносят огромный вклад в понимание механизмов развития противовирусного иммунитета.

Главные направления в изучении противогриппозного иммунитета в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева

1. Постинфекционная и поствакцинальная индукция:
   а) локального иммунитета;
   б) клеточного иммунитета с акцентом на изучение клеток иммунологической памяти.

2. Оценка влияния гриппозной инфекции и противо-гриппозной иммунизации на аллергический статус людей.

(1997 - 2010)

I. Первое направление – изучение локального иммунитета во входных воротах гриппозной инфекции (верхний отдел дыхательного тракта)

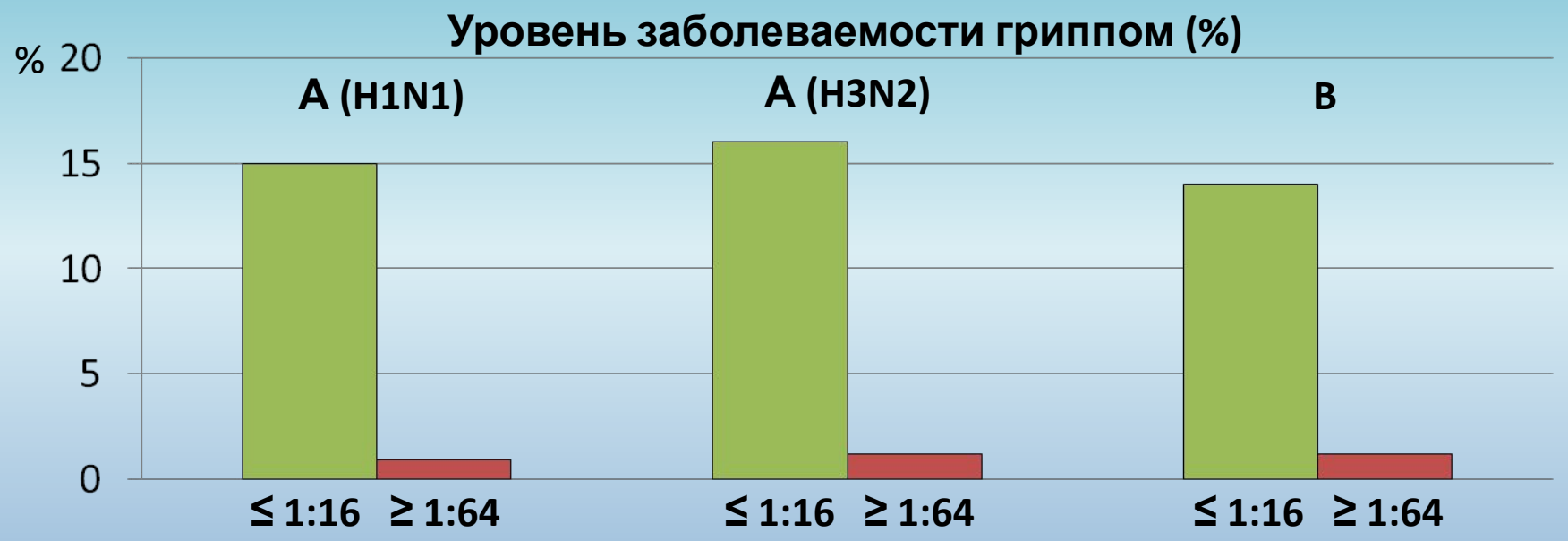
Локальный иммунитет – первый и наиболее значимый барьер на пути проникновения вируса гриппа в организм:

Лабораторно-методическая база:

1. Разработан простой, надежный и высокоспецифичный метод количественного определения у людей в слюне и секретах носа главного фактора локального гуморального иммунитета, то есть секреторных антител класса А (IgA) – иммуноферментная тест-система.
2. Разработаны методики, дающие возможность осуществлять с помощью этой тест-системы анализ авидности локальных антител одновременно по двум качественным параметрам – скорости и прочности соединения иммунных комплексов.

Эти приемы явились методической базой для проведения массовых исследований постинфекционного и поствакцинального иммунитета к вирусам гриппа А и В у людей.

На материале обследования лиц из длительно наблюдаемых коллективов доказана протективная функция локальных IgA-антител при естественной гриппозной инфекции. Определены протективные уровни этих антител у людей



Лица с высокими исходными титрами антител болели гриппом в 6 – 16 раз реже по сравнению с людьми с низкими титрами.
Протективный титр локальных IgA – 1:64 и выше.

Это дало возможность получить четкие количественные критерии оценки защищенности людей, а также критерии оценки иммуногенности вакцин по индукции локального противогриппозного иммунитета

Охарактеризована степень связи между формированием системного и локального противогриппозного иммунитета (соответственно сывороточные и секреторные антитела)

	% несовпадения результатов тестирования конверсий сывороточных и локальных антител
Больные гриппом	25 – 30 %
Привитые живыми гриппозными вакцинами	30 – 40 %

У значительной части людей (25 – 40%) индукция локального иммунитета обладает автономностью по отношению к стимуляции системного иммунного ответа. Это свидетельствует о необходимости отдельного, дополнительного исследования этого вида иммунитета.

Изучена частота локального гуморального иммунного ответа к вирусам гриппа у людей, иммунизированных различными живыми и инактивированными гриппозными вакцинами

% поствакцинальных конверсий локальных IgA-антител

Живые гриппозные вакцины

Сезонная	Пандемическая A (H5N2)	Пандемическая A (H1N1)
40 – 68 %	25 %	48 %

Инактивированные гриппозные вакцины

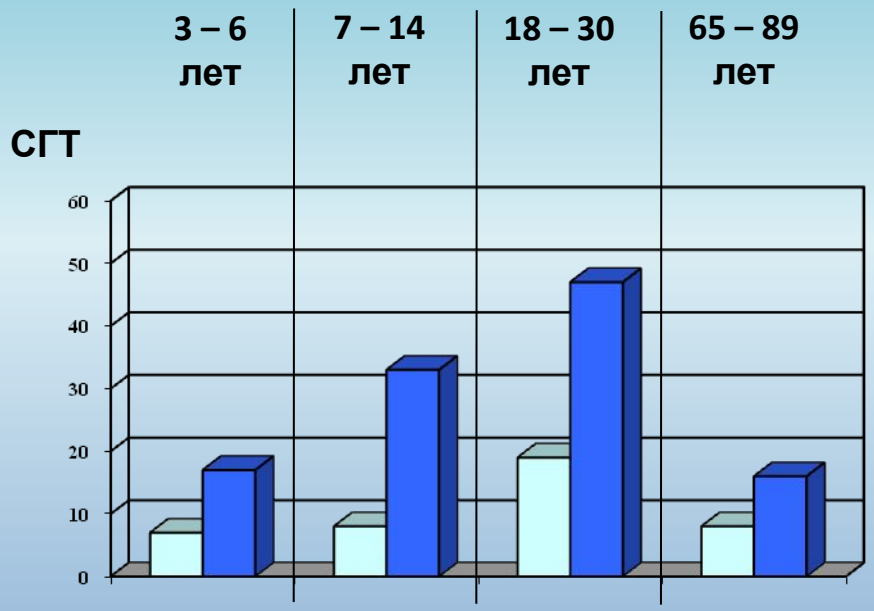
Парентеральная	Пероральная	Интраназальная
2 – 8 %	8 – 22 %	10 – 21 %

В стимуляции локального гуморального иммунитета живая вакцина имеет значительное преимущество перед инактивированной при любом способе аппликации последней. Новые пандемические вакцины способны индуцировать локальный гуморальный иммунный ответ

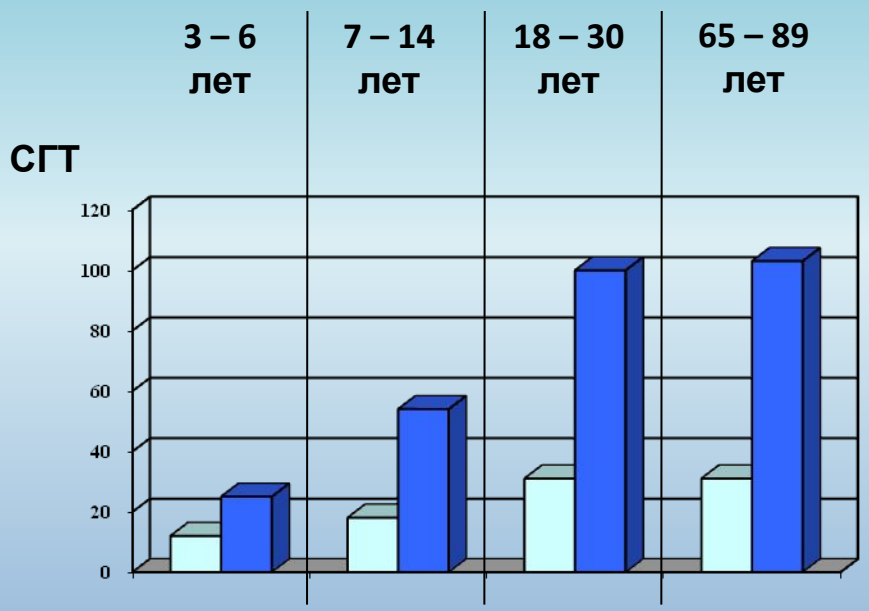
Изучены возрастные особенности формирования локального гуморального иммунитета после вакцинации живой гриппозной вакциной

Возраст является одним из главных признаков, влияющих на развитие иммунного ответа на вакцинацию

Сывороточные антитела



Локальные IgA антитела



Средний геометрический титр антител (СГТ):

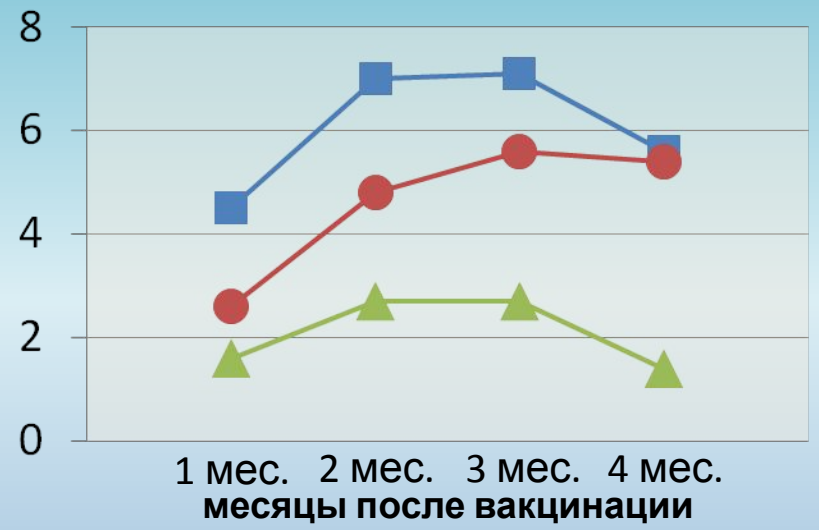
– до вакцинации

– после вакцинации

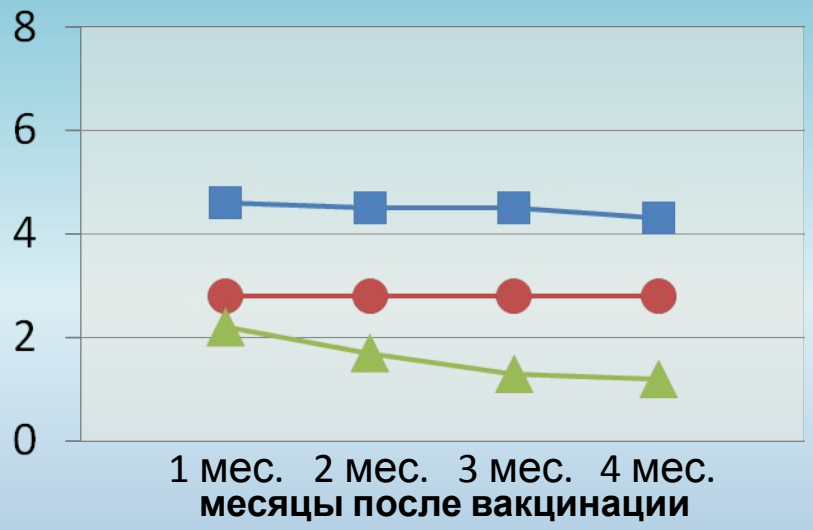
В возрастном аспекте принцип накопления локальных антител тот же, что и сывороточных. Исключение – у пожилых людей продукция локальных антител не снижена в отличие от продукции сывороточных антител.

Проведен анализ длительности сохранения у людей поствакцинального локального иммунитета в сравнении с системным и клеточным

ЖГВ



Плацебо



- **Локальные IgA-антитела**
- **Сывороточные антитела**

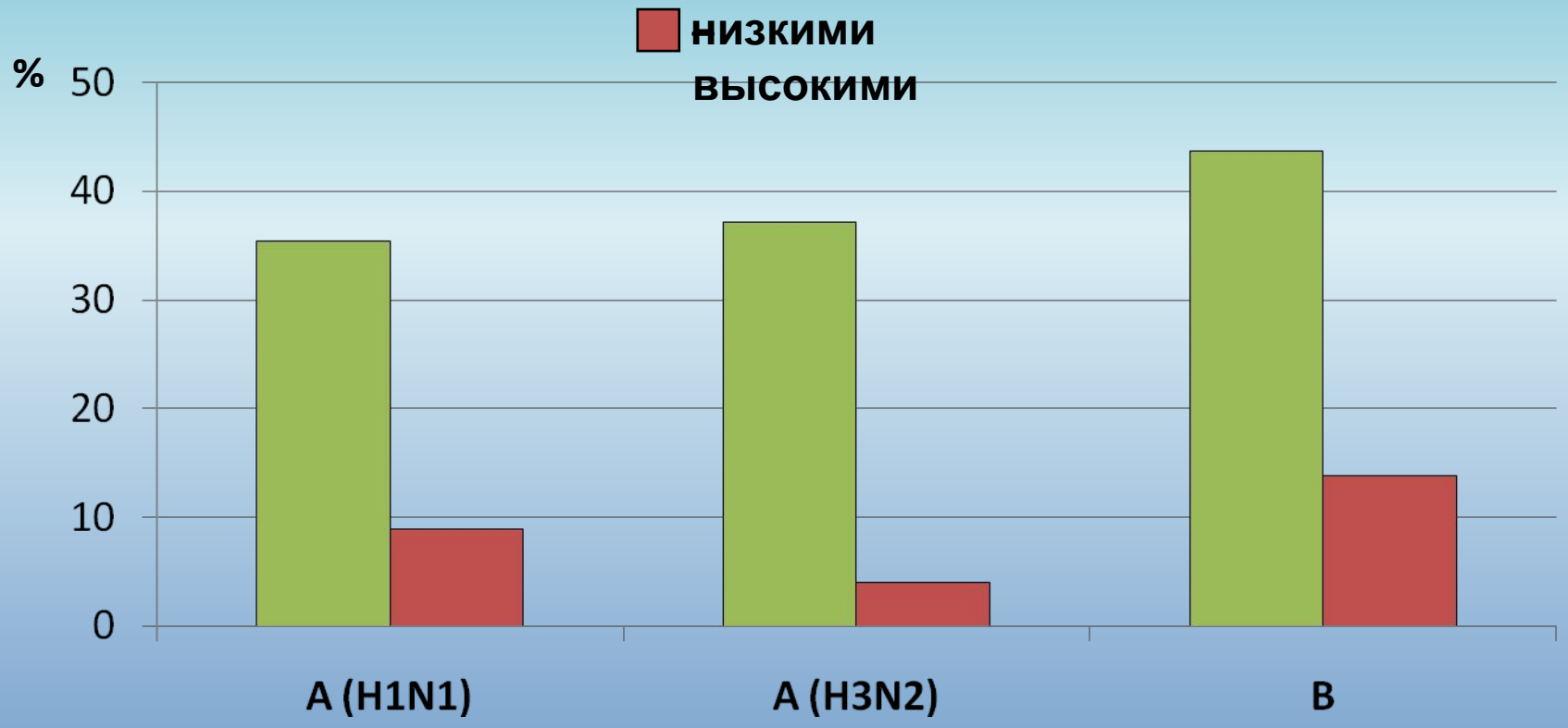
] $\log_2$ средних геометрических титров

- **Клеточный иммунитет** – средние индексы стимуляции лимфоцитов

Концентрации локальных антител снижаются быстрее, чем сывороточных, но сохраняются более длительное время по сравнению с количественными показателями клеточного иммунитета

Проанализирован вопрос о влиянии предвакцинального (исходного) уровня локального иммунитета людей на поствакцинальные изменения этого показателя

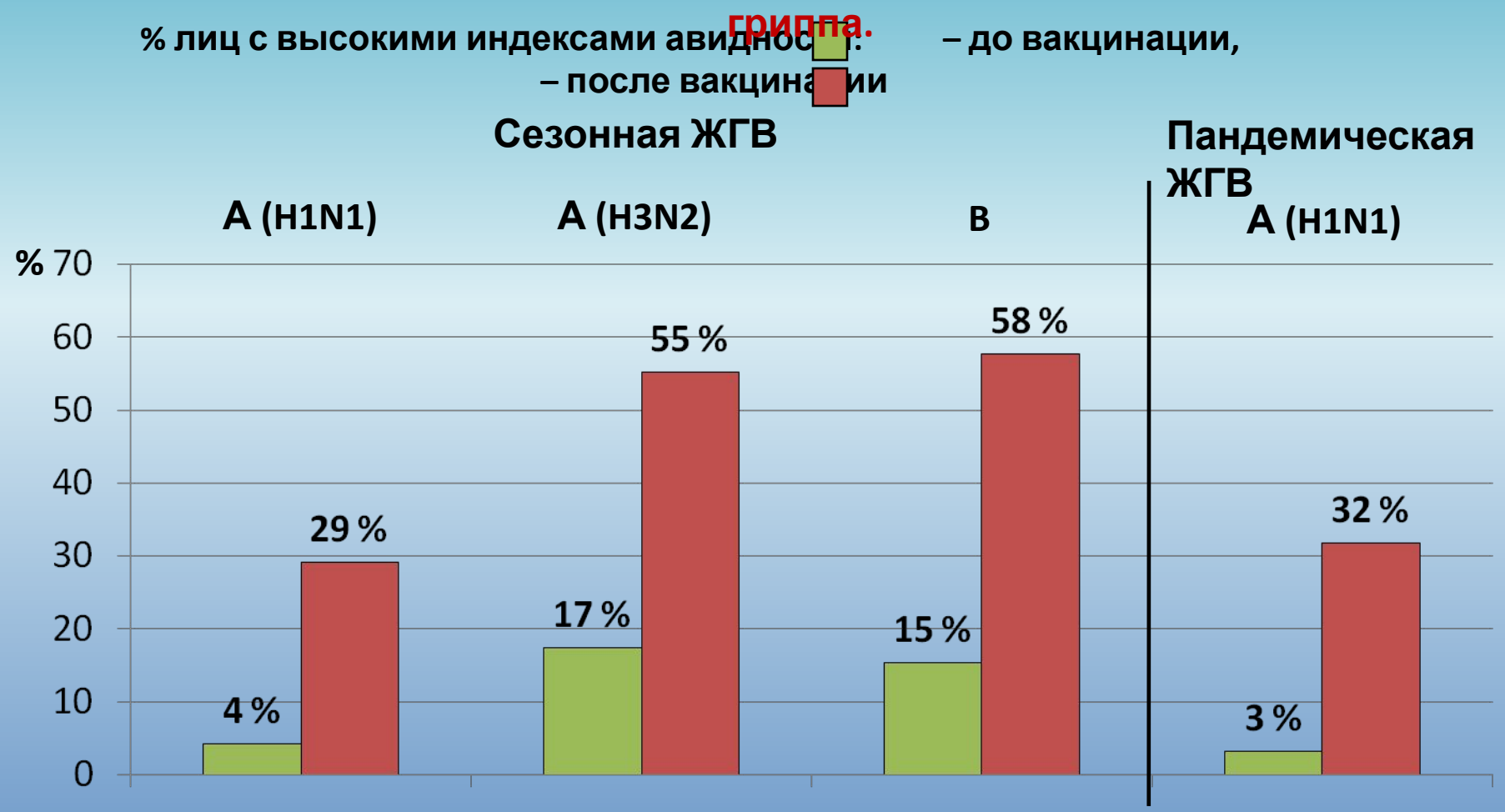
% конверсий локальных IgA-антител после прививки живой вакциной у лиц с исходными титрами антител:



Только лица с низкими исходными титрами локальных IgA-антител активно отвечают на прививку их накоплением. С этой позиции прививка людей с высокими исходными титрами IgA-антител имеет очень низкую эффективность

С помощью специально разработанных методов охарактеризованы изменения авидности локальных IgA-антител после прививки людей живыми вакцинами

Ранее нами доказано, что авидность антител отражает защиту людей от гриппа.



Вакцинация людей не только сезонной, но и новой пандемической вакциной значительно увеличивала долю (%) лиц с высокой авидностью локальных IgA-антител

II. Второе направление – исследование поствакцинальной и постинфекционной стимуляции клеточного иммунитета к вирусам гриппа

Клеточный иммунитет – важнейший компонент противовирусной защиты

Лабораторно-методическая база:

1. Освоен используемый в современной международной практике метод количественного определения вирусспецифических клеток памяти – по определении в проточной цитометрии **внутриклеточных Th1- и Th2-цитокинов**.
2. Разработан **альтернативный метод** количественного определения этих клеток – по их вступлению в трогоцитоз (недавно открытый феномен переноса компонентов плазматической мембраны, происходящий при антигенспецифичном взаимодействии АПК с лимфоцитом).
3. Создана система для экспериментального исследования **локального клеточного иммунитета**, в которой объектом исследования служили Т- и В-клетки назоассоциированной лимфоидной ткани (НАЛТ), а вакцинацию моделировали путем введения мышам реассортантного вируса – экспериментального аналога вакцинного штамма для живой

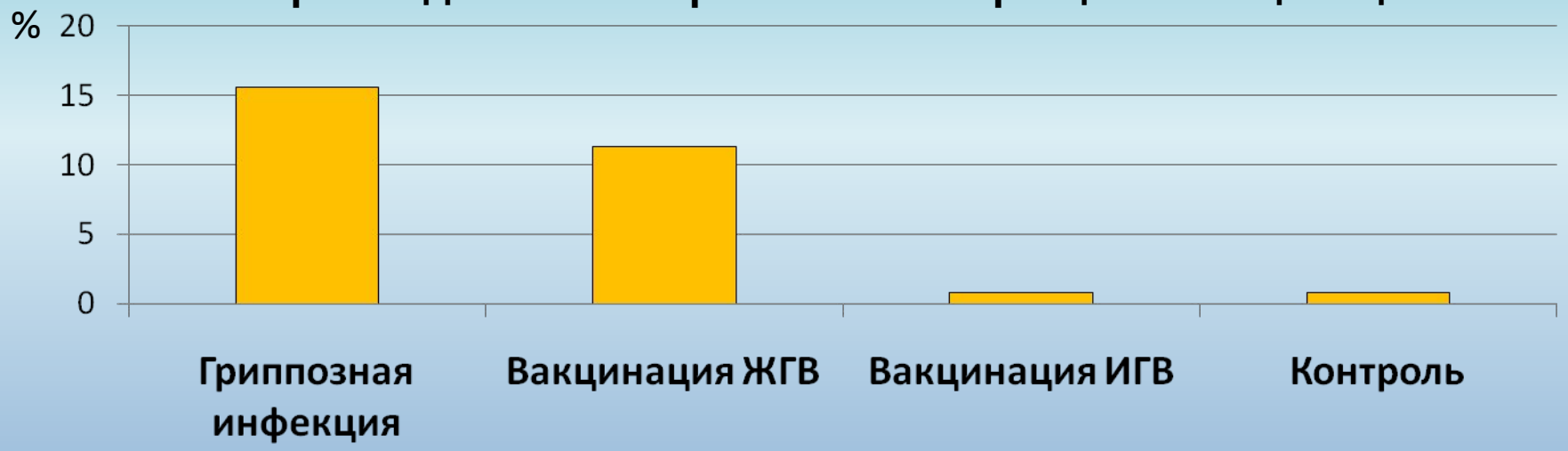
Индукция вирусспецифических клеток иммунологической памяти – ключевой вопрос вакцинальной иммунологии

Т- и В- клетки иммунологической памяти – главный фактор иммунной защиты при повторных острых инфекциях. Стимуляция этих клеток является сутью профилактической вакцинации. Однако только в последние годы уровень развития инфекционной иммунологии позволил приступить к изучению этого вопроса.

Проведен сравнительный анализ индукции в НАЛТ вирусспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов памяти ($CD8^+CD44^{hi}$) при экспериментальной гриппозной инфекции и экспериментальной вакцинации живой и инактивированной гриппозными вакцинами

Инфекция – эталон качества иммунного ответа

% вирусспецифических $CD8^+CD44^{hi}$ Т-лимфоцитов памяти через 60 дней после гриппозной инфекции и вакцинации



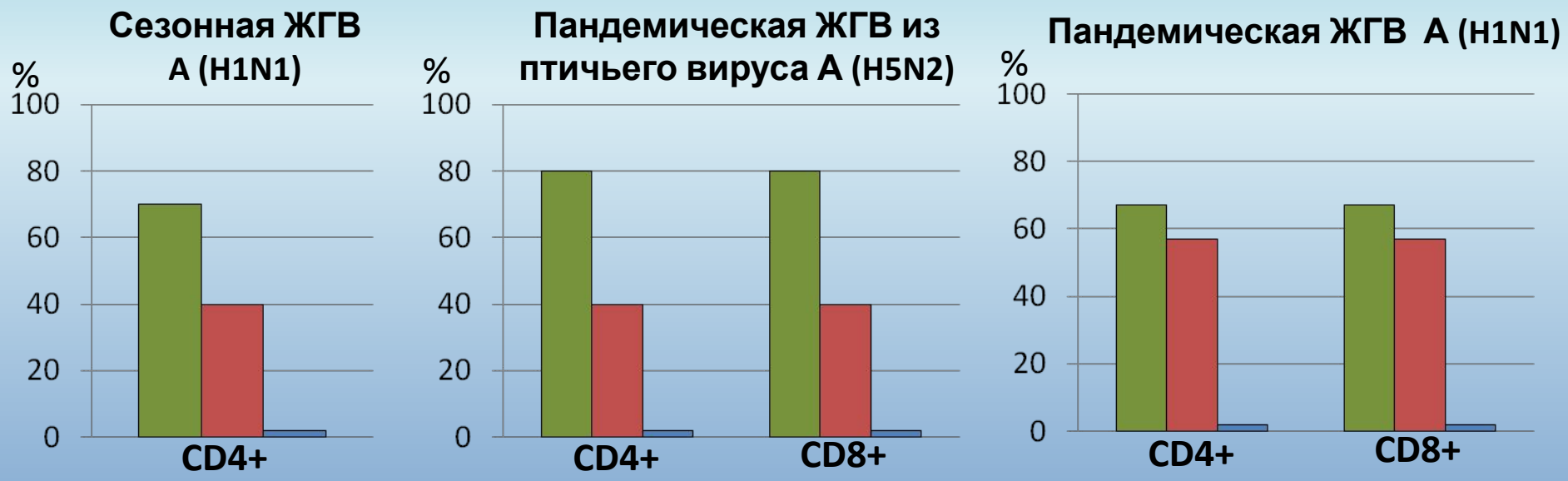
Иммунизация живой вакциной не уступает инфекции в активности стимуляции вирусспецифических ЦТЛ памяти во входных воротах инфекции (НАЛТ). Эти клетки сохраняются после введения живой вакцины не менее двух месяцев (срок наблюдения). Иммунизация инактивированной вакциной практически не индуцирует локальные вирусспецифические ЦТЛ.

Исследован вопрос о способности разных вариантов ЖГВ индуцировать у людей вирусоспецифические Т-клетки памяти в сопоставлении с данными РТГА

РТГА является единственным регламентированным тестом для оценки иммуногенности вакцин

% лиц с приростами уровней вирусспецифических Т-клеток после вакцинации в группах:

- – с конверсиями сывороточных антител – **РТГА (+)**
- – без конверсий сывороточных антител – **РТГА (–)**
- – плацебо



Прививка людей как сезонной, так и новыми пандемическими вакцинами сопровождается увеличением уровня CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти в периферической крови. РТГА далеко не полностью отражает иммунную перестройку организма, т.к. у 40 – 58% лиц, не ответивших на вакцинацию по данным РТГА, обнаружены достоверные приросты уровней этих клеток. Это диктует необходимость дополнительной оценки иммуногенности вакцин по индукции клеток иммунологической памяти.

Индукция гетеротипического иммунитета к разным подтипам вируса гриппа А (перекрестнореагирующие Т- и В-клетки памяти) – наиболее актуальное направление изучения иммунологической памяти

Актуальность:

1. Постоянная антигенная эволюция вируса гриппа А (дизайн вакцин «не успевает» за антигенной изменчивостью возбудителя)
2. Существует потенциальная опасность включения в пандемическую циркуляцию новых подтипов вируса гриппа А зоонозной или антропонозной природы, когда у населения гомотипический иммунитет к этим возбудителям отсутствует
3. Неослабевающая активность вирусологов в деле создания универсальной вакцины против всех подтипов вируса гриппа А.

Зарубежные экспериментальные данные показали прямое участие таких клеток в гетеротипической защите в форме снижения тяжести инфекционного процесса

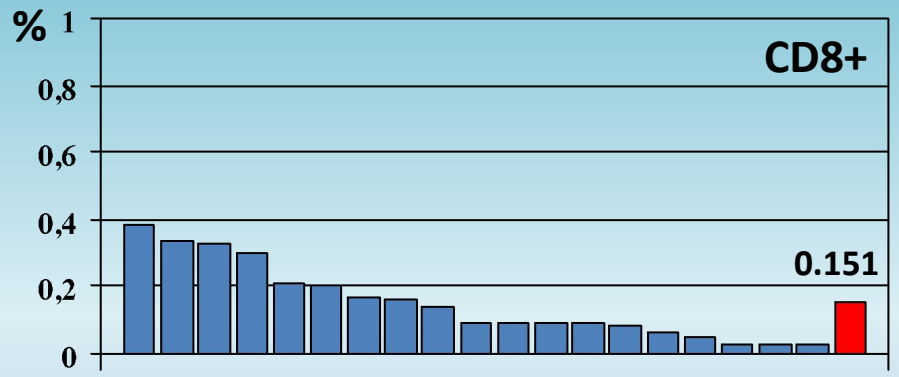
Главные вопросы:

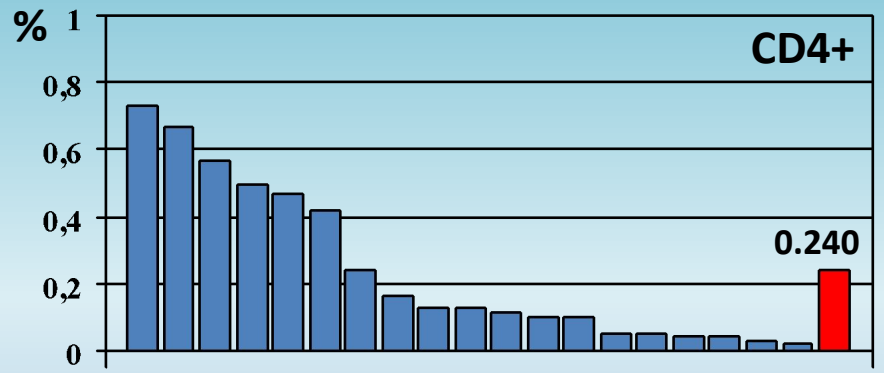
1. Приводит ли естественная гриппозная инфекция, вызванная ныне циркулирующими вирусами А (H1N1) и А (H3N2), к продукции у людей перекрестнореагирующих вируспецифических клеток памяти к другим подтипам вируса гриппа А?
2. Можно ли активно индуцировать у людей эти клетки с помощью вакцинации?

Изучен вопрос о наличии у людей перекрестнореагирующих Т-клеток памяти к подтипам вирусов гриппа А, с которыми эти люди не встречались

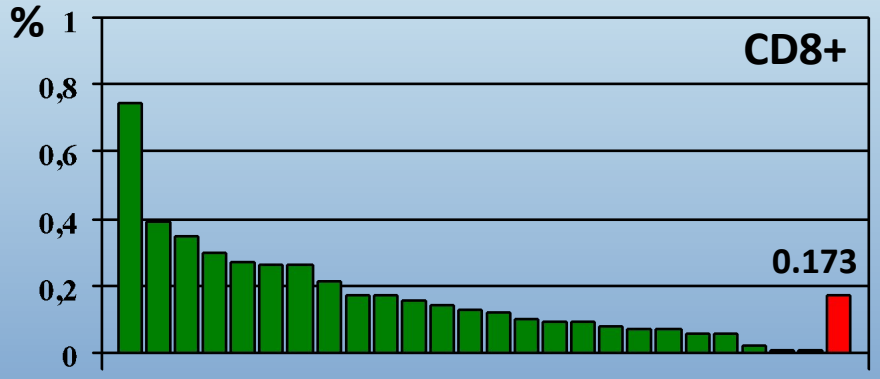
% вирусспецифических клеток в периферической крови лиц 18 – 20 лет

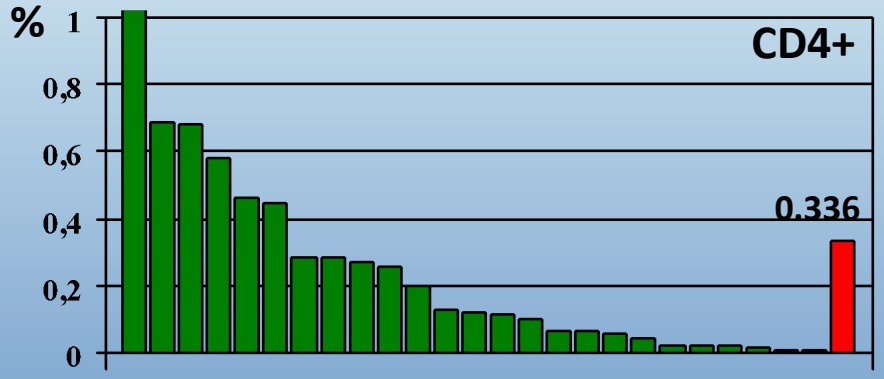
Птичий вирус А(H5N2)





Пандемический вирус А(H1N1) 2009 года – до его распространения в России



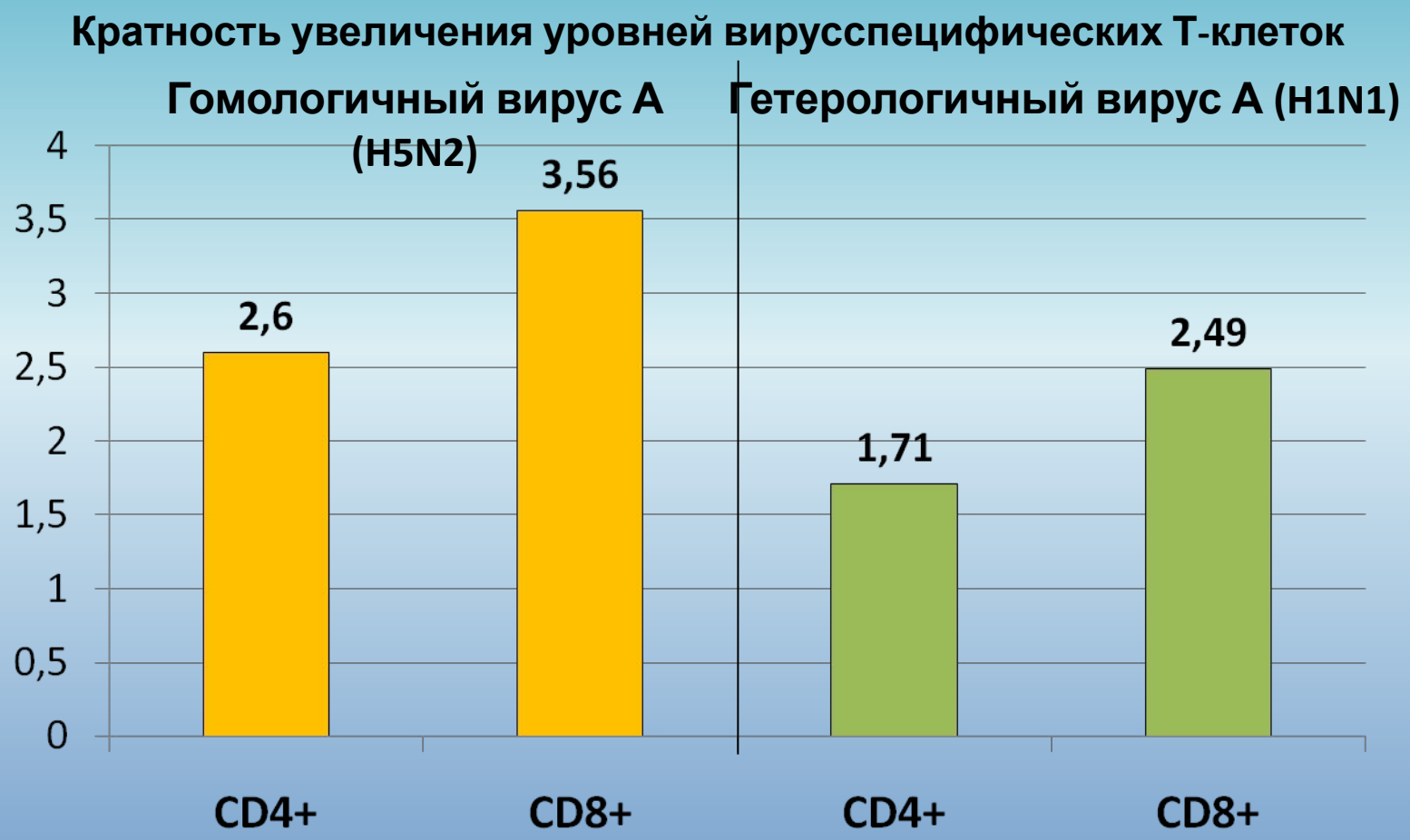


- индивидуальные данные;

- средние значения

У значительной части людей (47 – 61 %) обнаружены перекрестнореагирующие CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти, специфичные к вирусам, с которыми люди не контактировали.

Получены данные об индукции у людей перекрестнореагирующих Т-клеток памяти после вакцинации пандемической живой вакциной, приготовленной из птичьего вируса А (H5N2)



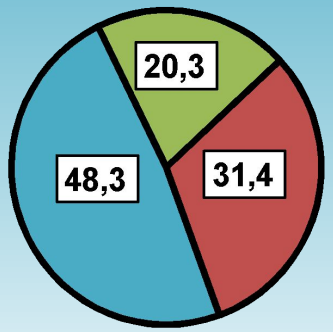
Вакцина А (H5N2) стимулировала продукцию перекрестнореагирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток памяти, специфичных не только к гомологичному вирусу А (H5N2), но и к гетерологичному вирусу А (H1N1)

III. Третье направление – оценка влияния гриппозной инфекции и противогриппозной вакцинации на аллергический статус людей

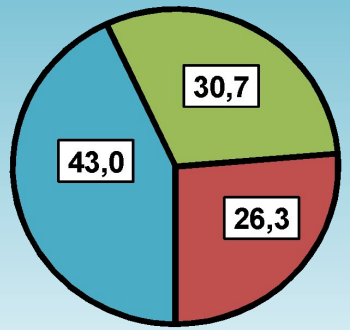
В современной аллергологии одним из актуальных направлений является исследование роли респираторных вирусов в возникновении и проявлении IgE-опосредованных аллергических заболеваний дыхательного тракта. Это относится как к инфекции, так и к вакцинации.

Изучен уровень аллергизации населения Санкт-Петербурга различных возрастов по уровню общих IgE

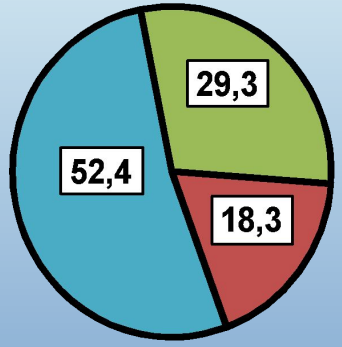
3 – 6 лет



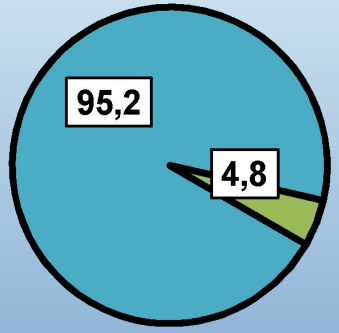
8 – 15 лет



18 – 22 лет



65 – 87 лет



Все обследованные не имели в анамнезе клинически выраженных аллергических заболеваний.

Количество людей (%) с концентрациями IgE:

– в пределах нормы;

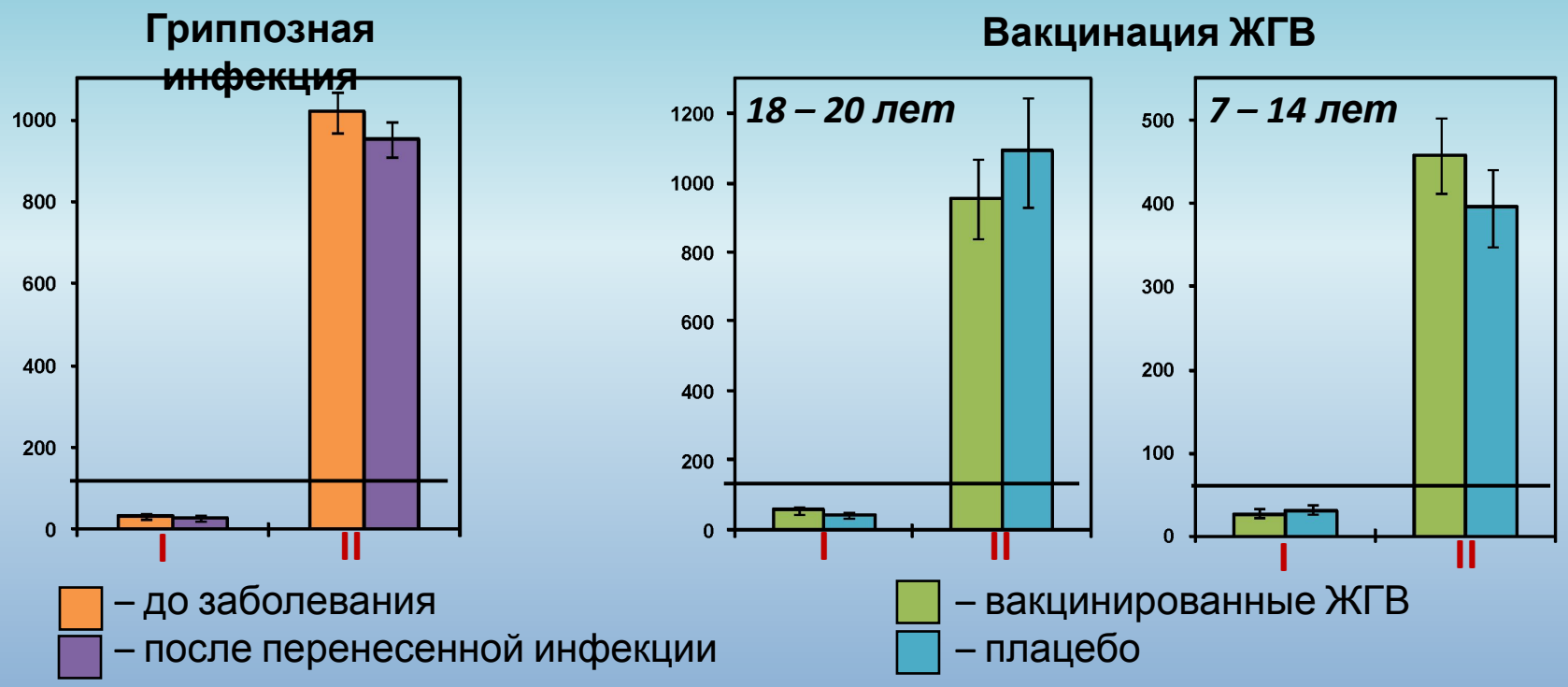
– в 1,5 – 4,9 раза выше нормы;

– ***лица с латентной сенсибилизацией, то есть со значительным (в 5 – 17 раз) превышением нормального уровня IgE при отсутствии клинических симптомов аллергии.***

Лица с латентной сенсибилизацией относятся к группе повышенного риска в отношении возможного перехода у них латентной формы аллергии в манифестную. Среди молодых людей и детей выявлено значительное число лиц с латентной сенсибилизацией (до 30%).

Проведен анализ продукции общих IgE у людей с латентной сенсибилизацией после перенесенной гриппозной инфекции и иммунизации живой вакциной

Общие сывороточные IgE (КЕ/л) у лиц с нормальными (I) и очень высокими (II) уровнями общих сывороточных IgE перед вакцинацией

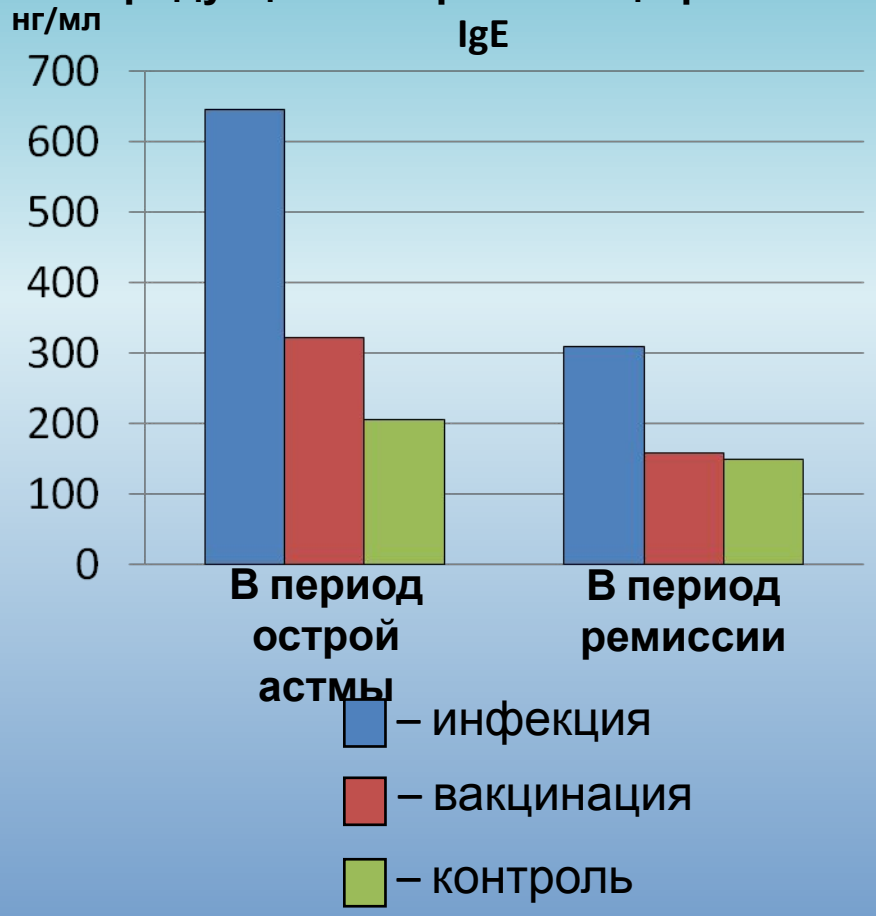


-------- – верхняя граница нормы общих IgE (100 КЕ/л).

Неосложненная гриппозная инфекция и иммунизация живой вакциной не приводят к усилению продукции общих IgE, а также к появлению аллергических реакций, не только у лиц с нормальными уровнями этих антител, но и у людей с латентной сенсибилизацией.

Изучено влияние гриппозной инфекции и иммунизации живой вакциной на течение разных патогенетических стадий экспериментальной *овальбумин (ОВА)-индуцированной* бронхиальной астмы у мышей

Продукция аллерген-специфических IgE



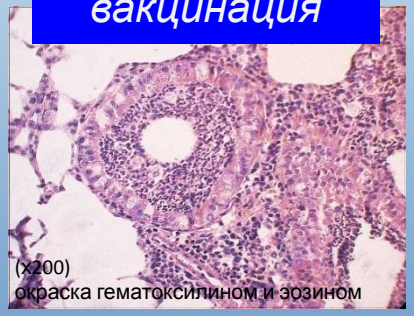
Патоморфологические изменения в легких

Стадия острого воспаления | Стадия ремиссии

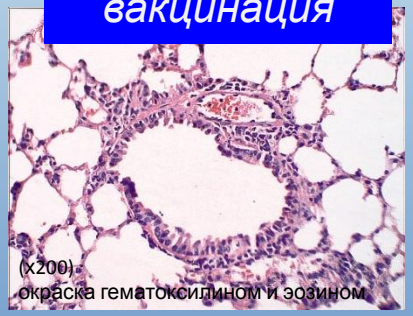
инфекция

инфекция

вакцинация



вакцинация

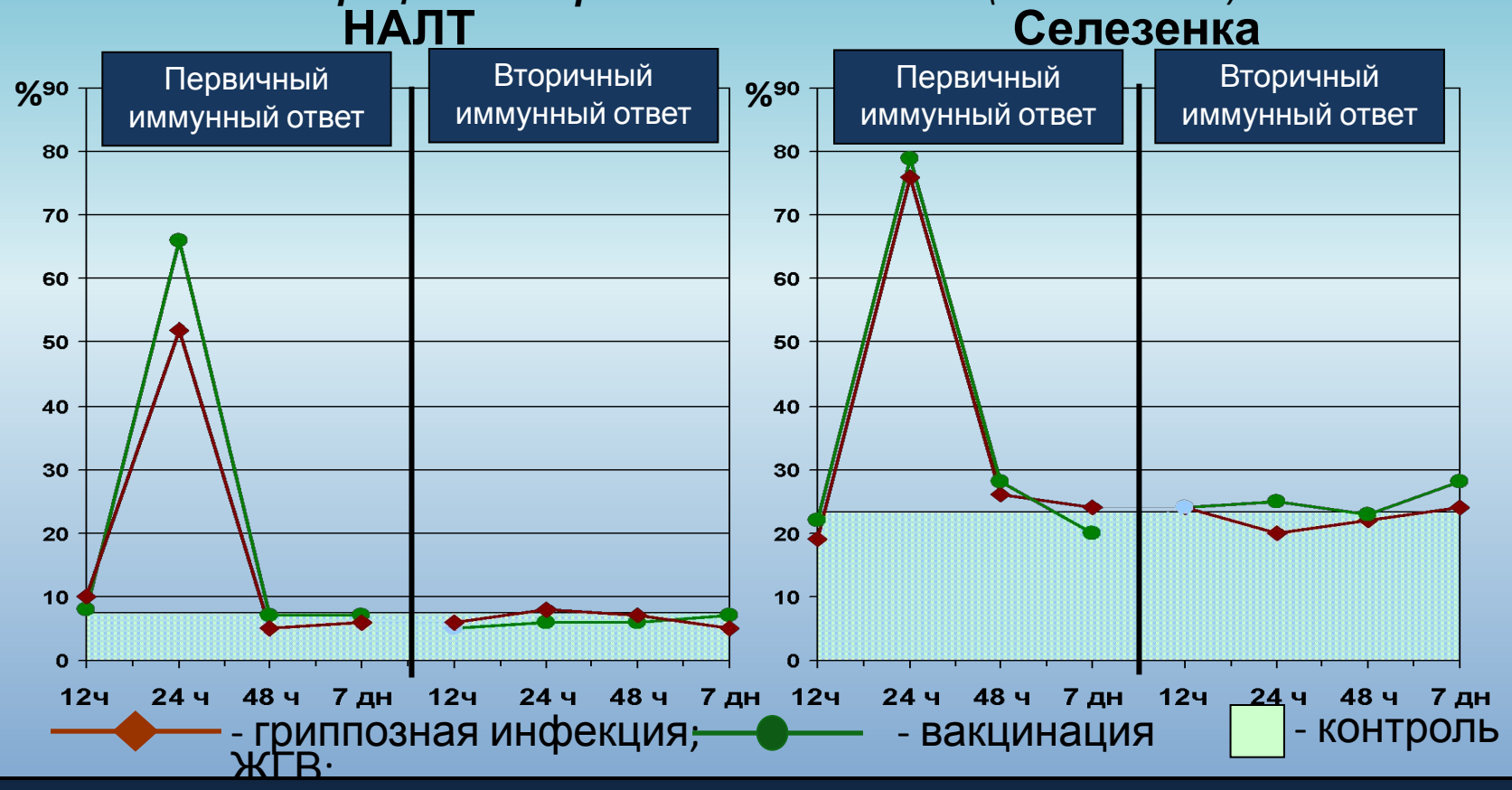


В отличие от инфекции вакцинация ЖГВ в период ремиссии БА (но не в острой стадии) не представляет угрозы с точки зрения провокации обострения этой аллергопатологи

Исследован апоптоз лимфоцитов НАЛТ и селезенки мышей при гриппозной инфекции и вакцинации

Ранее показана способность вируса гриппа запускать апоптоз человеческих лимфоцитов *in vitro [Nichols J.E. et al., 2001]*

***% лимфоцитов с признаками апоптоза** (Аннексин V +)*



Неосложненная гриппозная инфекция и вакцинация не представляли угрозы с точки зрения усиления вирусиндуцированного апоптоза локальных и системных лимфоцитов, поскольку подъем уровня апоптоза этих клеток наблюдался только при первичном иммунном ответе и в очень короткий промежуток времени (не более суток).

Главные итоги проведенных исследований

С фундаментальных позиций:

1. Описаны особенности развития локального иммунного ответа у людей при гриппозной инфекции и иммунизации различными гриппозными вакцинами.
2. Охарактеризован на локальном и системном уровнях поствакцинальный клеточный иммунный ответ, опосредованный вирусспецифическими Т-клетками иммунологической памяти.
3. Дана оценка влияния гриппозной инфекции и вакцинации живой вакциной на возникновение и течение IgE-опосредованных аллергических реакций организма.

С прикладной точки зрения:

1. Определены количественные параметры защищенности людей от гриппа по уровню локальных антител.
2. Создана современная лабораторно-методическая база для многофакторного исследования локального и клеточного иммунитета к вирусам гриппа.
3. Это дало возможность создать и внедрить новые критерии оценки иммуногенности гриппозных вакцин по индукции важнейших факторов противовирусного иммунитета, а именно:
    - локальных антител в количественном (титры) и качественном (авидность) измерении в слюне и секретах верхних дыхательных путей;
    - вирусспецифических Т-клеток иммунологической памяти.
4. Разработаны приемы, дающие возможность оценивать вакцины на предмет их аллергенности.

Сотрудники лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИЭМ РАМН:

Светлана Александровна Донина
Ирина Борисовна Баранцева
Галина Дмитриевна Петухова
Татьяна Викторовна Чиркова
Даниил Анатольевич Котриковский

По материалам опубликованы 39 статей (28 в отечественных и 11 в зарубежных журналах).

Результаты доложены на многочисленных международных симпозиумах и конференциях, дважды – на совещаниях экспертов ВОЗ.

Полученные данные по вакцинальной иммунологии явились одним из разделов темы, удостоенной в 2009 г. премии им. А.П. Ольденбургского.