

ФОРМИРОВАНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА ПРИ ИММУНИЗАЦИИ ИНАКТИВИРОВАННЫМИ ГРИППОЗНЫМИ ВАКЦИНАМИ «ГРИППОЛ ПЛЮС», «СОВИГРИПП» И «УЛЬТРИКС»

**Шурыгина А.-П.С., Васильев К.А., Варюшина Е.А., Ладыгина М.Д.,
Зубкова Т.Г., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А., Лиознов Д.А.**

*ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Во всем мире циркулирующие вирусы гриппа ежегодно приводят к серьезным медицинским и социально-экономическим последствиям. Вакцинация является наиболее эффективной и безопасной стратегией предотвращения гриппа и его осложнений. В целях снижения побочных эффектов при использовании живых вирусов широкое применение находят расщепленные и субъединичные гриппозные вакцины. Особенности формирования В-клеточного ответа на фоне иммунизации гриппозными вакцинами до настоящего времени остаются недостаточно изученными. В связи с этим, целью нашего исследования является изучение динамики субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови при иммунизации различными типами вакцин «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс». Исследование проведено на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в эпидемический по гриппу сезон 2018-2019 гг. Образцы венозной крови были получены у 39 добровольцев до вакцинации, на 7-е и 21-е сутки после вакцинации. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов оценивали методом проточной цитометрии с применением панели флюоресцентно-меченных антител к CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA (BioLegend, США). Для анализа использовали образцы криоконсервированных мононуклеаров с концентрацией 1×10^6 клеток/образец. Обработку результатов проводили с помощью штатного программного обеспечения (H., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., США) и дополнительного ПО Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter, Inc., США). При статистическом анализе различия с данными до вакцинации оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни и считали достоверными при $p < 0,05$.

В результате проведенных исследований были выявлены следующие популяции В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺): наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти

Адрес для переписки:

*Варюшина Елена Анатольевна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа
имени А.А. Смородинцева» Министерства
здравоохранения РФ
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора
Попова, 15/17.
Тел.: 8 (906) 244-95-19.
E-mail: elenavaryush@gmail.com,
elena.varyushina@influenza.spb.ru*

Address for correspondence:

*Elena A. Varyushina
A. Smorodintsev Research Institute of Influenza
15/17 Prof. Popov St
St. Petersburg
197376 Russian Federation
Phone: +7 (906) 244-95-19.
E-mail: elenavaryush@gmail.com,
elena.varyushina@influenza.spb.ru*

Образец цитирования:

*А.-П.С. Шурыгина, К.А. Васильев, Е.А. Варюшина,
М.Д. Ладыгина, Т.Г. Зубкова, Ж.В. Бузицкая,
М.А. Стукова, Д.А. Лиознов «Формирование
В-клеточного ответа при иммунизации
инактивированными гриппозными вакцинами “Гриппол
плюс”, “Совигрипп” и “Ультрикс” // Медицинская
иммунология, 2024. Т. 26, № 1. С. 191-202.
doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

*© Шурыгина А.-П.С. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0*

For citation:

*A.-P.S. Shurygina, K.A. Vasiliev, E.A. Varyushina,
M.D. Ladygina, T.G. Zubkova, Zh.V. Buzitskaya,
M.A. Stukova, D.A. Lioznov “Development of B cell response
during immunization with inactivated influenza vaccines
‘Grippol Plus’, ‘Sovigripp’ and ‘Ultrix’”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 1,
pp. 191-202. doi: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

*© Shurygina A.-P.S. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-DOB-2609*

(CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁻), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), плазмобласты (CD20⁻CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-клеток, относящихся к популяциям наивных, эффекторных В-лимфоцитов, переключенных и непереключенных В-клеток памяти. При анализе В-клеточного ответа после иммунизации исследуемыми вакцинами было выявлено увеличение как общего числа В-лимфоцитов, так и отдельных популяций, в том числе плазмобластов и активированных переключенных В-клеток памяти. Для адьювантных вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп» по сравнению с расщепленной вакциной «Ультрикс» было показано раннее увеличение относительного количества плазмобластов на 7-й день исследования. При этом все три вакцины в одинаковой мере способствовали повышению числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител. Таким образом, оценка В-клеточного ответа выявила значительные изменения в субпопуляционном составе В-лимфоцитов периферической крови в ответ на вакцинацию «Гриппол плюс», «Совигрипп» или «Ультрикс».

Ключевые слова: противогриппозные вакцины, В-лимфоциты, проточная цитометрия, плазмобласты, В-клетки памяти, вирус гриппа

DEVELOPMENT OF B CELL RESPONSE DURING IMMUNIZATION WITH INACTIVATED INFLUENZA VACCINES “GRIPPOL PLUS”, “SOVIGRIPP” AND “ULTRIX”

Shurygina A.-P.S., Vasiliev K.A., Varyushina E.A., Ladygina M.D., Zubkova T.G., Buzitskaya Zh.V., Stukova M.A., Lioznov D.A.

A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The worldwide circulating influenza viruses annually lead to serious medical and socio-economic consequences. It is generally recognized that vaccination is the most effective and safe strategy for preventing influenza and its complications. In order to reduce side effects when using live viruses, split and subunit influenza vaccines are widely used. To date, the characteristics of B cell response after immunization with influenza vaccines remain insufficiently studied. The aim of our study was to compare the effects of immunization with different influenza vaccines, i.e., “Sovigripp”, “Grippol plus” and “Ultrix”, on the B cell response. The study was conducted on the base of Clinical Department at the A.Smorodintsev Influenza Research Institute during the epidemic flu season of 2018-2019. For clinical studies, venous blood samples were obtained from 39 volunteers before vaccination, on the 7th and 21st days after vaccination. The subpopulations of B cells were analyzed by flow cytometry using fluorescently labeled antibodies to CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA surface antigens (BioLegend, USA). Cryopreserved mononuclear cells (1 × 10⁶ cells/sample) were used for analysis. The processing of flow cytometry data was carried out with special software (H., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., USA) and Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, Inc., USA). The differences with pre-vaccination data were evaluated using the Mann–Whitney U-test and being considered significant at p < 0.05.

As a result of the studies, the following subpopulations of B lymphocytes (CD3⁻CD19⁺) were specified: naive B cells (CD20⁺CD27⁻IgD⁺), non-switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁻), effector memory B cells (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), plasmablasts (CD20⁻CD38^{hi}CD27^{hi}). Activation of the B cell immune response was assessed by measuring the relative content of CD38⁺B cells belonging to subpopulations of naive, effector B lymphocytes, switched and non-switched memory B cells. The analysis of B cell response showed an increase in both the total number of B lymphocytes and their subpopulations including plasmablasts and activated switched memory B cells after immunization. With adjuvant vaccines “Grippol plus” and “Sovigripp”, as compared with the split “Ultrix” vaccine, an early increase in relative counts of plasmablasts was shown on the 7th day of the study. At the same time, all three vaccines equally contributed to an increase in the number of activated memory B cells with a switched antibody isotype. Thus, the assessment of B cell response revealed significant changes in contents of peripheral blood B cell subpopulations in response to vaccination with “Grippol plus”, “Sovigripp”, or “Ultrix”.

Keywords: influenza vaccines, B lymphocytes, flow cytometry, plasmablasts, memory B cells, influenza virus

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме «Оценка напряженности коллективного иммунитета и эпидемиологической эффективности гриппозных вакцин в Российской Федерации» 2019-2021 гг.

Список использованных сокращений: АТ – антитела, ГА – гемагглютинин, ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина, РТГА – реакция торможения гемагглютинации, МПК – мононуклеары периферической крови, BCR – В-клеточный рецептор, DN – double-negative B cells, эффекторные В-клетки, IgA – иммуноглобулин А, IgD – иммуноглобулин D, IgG – иммуноглобулин G, IgM – иммуноглобулин M, RSV – респираторно-синцитиальный вирус, TNF – фактор некроза опухоли.

Введение

Во всем мире циркулирующие вирусы гриппа ежегодно приводят к серьезным медицинским и социально-экономическим последствиям [6]. Общеизвестно, что вакцинация является наиболее эффективной и безопасной стратегией предотвращения гриппа и его осложнений. В целях снижения побочных эффектов при использовании живых вирусов, широкое применение находят расщепленные и субъединичные гриппозные вакцины. В нашем исследовании было проведено изучение иммунного ответа после иммунизации тремя отечественными сезонными трехвалентными инактивированными гриппозными вакцинами (ИГВ). Две из них – субъединичные вакцины «Гриппол плюс» и «Совигрипп», содержат в своем составе адьюванты («Полиоксидоний» в вакцине «Гриппол плюс» и «Совидон» – в «Совигрипп»), а количество антигенов снижено по отношению к сплит-вакцинам. Введение адьюванта в состав вакцин позволяет снижать количество антигена, увеличивать продолжительность специфического иммунного ответа, а также усиливать ответ клеточных звеньев специфического иммунитета. Третья вакцина – «Ультрикс» – относится к расщепленным вакцинам последнего поколения, активирующим гуморальный и клеточный иммунный ответ. Результаты клинических исследований свидетельствуют о хорошей переносимости, безопасности данных вакцин и их иммуногенности [1, 2, 3].

В последнее время при изучении поствакцинального иммунитета все больше внимания уделяется характеристикам не только гуморального, но и Т- и В-клеточного ответа. В-лимфоциты играют важную роль в обеспечении гуморального иммунитета при многих вирусных и бактериальных инфекциях. Проточная цитометрия с использованием антител к специфическим

поверхностным маркерам В-клеток является информативным и высокочувствительным методом изучения субпопуляционного состава В-лимфоцитов [4]. CD27, член семейства рецепторов TNF (фактор некроза опухоли), индуцирует дифференцировку клеток, экспрессируется на большинстве В-клеток памяти и активируется на плазмобластах [15]. Экспрессия CD20 снижается при дифференцировке В-клеток памяти крови в плазмобласты. Популяция плазмобластов является источником плазматических клеток, секретирующих антитела (АТ). Различия в экспрессии поверхностных маркеров CD19 и CD27 и экспрессии IgD (иммуноглобулин D) обуславливают разделение В-клеток памяти на «переключенные» (switched, CD27⁺IgD⁻) и «непереключенные» (non-switched, CD27⁺IgD⁺) [10, 13]. В-клетки памяти с фенотипом CD27⁺IgD⁻ в результате гипермутагенеза «переключились» на изотипы АТ IgG (иммуноглобулин G) и IgA (иммуноглобулин А) и не экспрессируют на своей поверхности IgD. Показано, что данные клетки несут на своей поверхности BCR (В-клеточные рецепторы, B cell receptors), которые специфично узнают антигены. Считают, что «переключенные» В-клетки памяти являются основными клетками, обеспечивающими быстрый антительный ответ при повторной встрече с антигеном. «Непереключенные» В-клетки памяти не проходят этапа переключения изотипов АТ, экспрессируют IgD рецепторы и поверхностные IgM (иммуноглобулин M). При повторной антигенной стимуляции CD27⁺IgD⁺ «непереключенные» В-клетки памяти проходят дифференцировку в герминативных центрах. Экспрессия поверхностного маркера CD38 наблюдается на поверхности Т- и В-лимфоцитов, плазматических клеток, NK-клеток, моноцитов. CD38 катализирует образование циклических АДФ-рибозы и НАДФ и регулирует сигналы Ca²⁺ в лимфоидных клетках. Оценка экспрессии CD38 позволяет судить о степени дифференцировки и активации Т- или В-лимфоцитов [7].

Результаты опубликованных исследований указывают на влияние вакцинации гриппозными вакцинами на уровни отдельных субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови у человека [5, 11, 12, 14]. В короткие сроки после инфекции или вакцинации антиген-специфические В-клетки активируются в лимфатических узлах и становятся АТ-секретирующими плазмобластами, временно циркулирующими в периферии. Было показано, что после введения противогриппозных вакцин пик плазмобластов обнаруживается в кровотоке на 6-7-е сутки. Опубликованные данные подтверждают связь между количеством плазмобластов, а также продукцией

этим клетками поликлональных АТ и титрами сывороточных нейтрализующих АТ [5, 9]. Кроме того, иммунизация ИГВ значительно увеличивает процент циркулирующих В-клеток памяти, специфичных для вируса гриппа [11]. Важное значение оценки субпопуляционного состава лимфоцитов подтверждается, в том числе, результатами исследований, свидетельствующими о снижении В-клеточного ответа на вакцинацию при повторных иммунизациях сезонными ИГВ и у пожилых людей [9, 12]. Однако особенности формирования В-клеточного ответа на фоне иммунизации различными типами гриппозных вакцин до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

В связи с этим **целью нашего исследования** является изучение динамики субпопуляционного состава В-лимфоцитов периферической крови при иммунизации различными типами вакцин «Гриппол плюс», «Совигрипп» и «Ультрикс».

Материалы и методы

Проведено наблюдательное проспективное исследование на базе клинического отделения ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в период с октября 2018 г. по декабрь 2019 г. Протокол исследования «ПЭВ-2018/2019» был одобрен локальным этическим комитетом НИИ гриппа.

В исследовании приняли участие 39 добровольцев, вакцинированных одной из трех нижеперечисленных ИГВ. Критерии включения в исследование: возраст от 18 лет и старше, отсутствие острых, хронических или аллергических заболеваний в стадии обострения, отсутствие аллергических реакций на куриный белок, интервал не менее 1 месяца после последней иммунизации другими негриппозными вакцинами. Со всеми добровольцами было подписано письменное информированное согласие на участие в исследовании. Вакцина вводилась внутримышечно в верхнюю треть плеча в дозе 0,5 мл однократно после осмотра врача, термометрии и измерения АД.

Для иммунизации использовали следующие ИГВ. Вакцина «Гриппол плюс», инактивированная субъединичная, содержащая по 5 мкг гемагглютинаина (ГА) каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, В и 500 мкг иммуноадьюванта Полиоксидоний® в дозе 0,5 мл (ООО «НПО Петровакс Фарм»). Вакцина «Совигрипп», инактивированная субъединичная, содержащая по 5 мкг ГА двух эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2, 11 мкг – штамма В и 500 мкг адьюванта «Совидон» в дозе 0,5 мл (АО «НПО «Микроген»). Вакцина «Ультрикс» инак-

тивированная расщепленная, содержащая по 15 мкг ГА каждого из трех эпидемических штаммов вирусов гриппа типов А/Н1N1pdm09, А/Н3N2 и В в дозе 0,5 мл (ООО «Форт»).

Исследования содержания различных популяций В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии [4]. Оценку проводили на трех сроках – до (0-й день), через 7 дней и 21 день после вакцинации. Мононуклеарные клетки периферической крови (МПК) выделяли из венозной крови методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина. Для анализа использовали образцы криоконсервированных МПК с концентрацией 1×10^6 клеток/образец. В исследованиях применяли панель флуоресцентно-меченных антител к поверхностным антигенам CD3, CD19, CD20, CD27, CD38, IgD, IgA (BioLegend, США). Обработка полученных данных осуществлялась с помощью штатного программного обеспечения (Н., Cytexpert, Beckman Coulter, Inc., США) и дополнительного ПО Kaluza 2.0 software (Beckman Coulter, Inc., США).

Статистический анализ данных был проведен с использованием программ STATISTICA Version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, США), GraphPad Prism Version 5.0 (США) и R-studio. При статистической обработке данных использовали методы описательной и параметрической статистики. Различия с данными до вакцинации оценивали с использованием U-теста Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящее исследование включены 39 человек, из них 13 мужчин (33,3%), 26 женщин (66,7%), средний возраст составил $46,0 \pm 14,5$ года. Из них привито вакцинами: «Гриппол плюс» – 14 человек, в том числе 4 мужчины (28,6%) и 10 женщин (71,4%), средний возраст $43,0 \pm 12,0$ года; «Совигрипп» – 15 человек, в том числе 7 мужчин (46,7%) и 8 женщин (53,3%), средний возраст $46,0 \pm 14,4$ года; «Ультрикс» – 10 человек, в том числе 2 мужчины (20,0%) и 8 женщин (80,0%), средний возраст $51,0 \pm 17,5$ года.

Использованная панель флуорохром-конъюгированных антител позволила выявить следующие популяции В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺): наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁻IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁻IgD⁻), плазмобласты (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-клеток, относящихся к популяциям наивных, эффекторных В-лимфоцитов, переключенных и

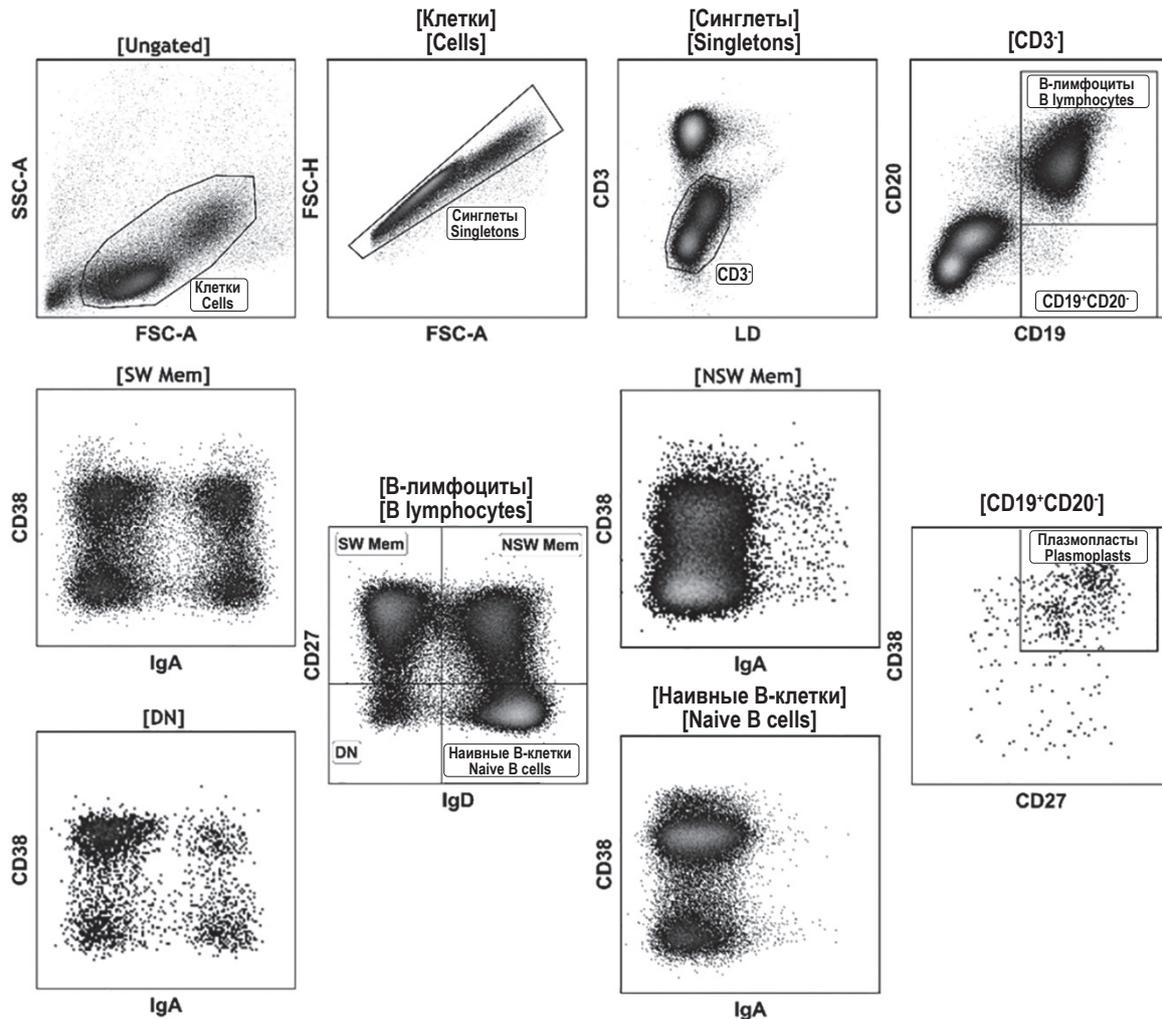


Рисунок 1. Тактика гейтирования изучаемых субпопуляций В-лимфоцитов

Примечание. На основании характеристик прямого и бокового светорассеивания (FSC/SSC), исключения «дублетов» (FSC-H/FSC-A), флюоресценции Zombie Aqua и наличия CD3 из анализа исключали нежизнеспособные клетки и CD3⁺ лимфоциты. Среди В-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁺) выделяли следующие субпопуляции: наивные В-клетки (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), непереключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), переключенные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), эффекторные В-клетки памяти (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), плазмобласты (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). Активацию В-клеточного иммунного ответа оценивали путем измерения относительного содержания CD38⁺В-лимфоцитов, относящихся к различным субпопуляциям. Обозначения: SW Mem – переключенные В-клетки памяти, NSW Mem – непереключенные В-клетки памяти, DN – эффекторные В-клетки памяти.

Figure 1. Gating strategy for phenotypic characterizations of B cell subpopulations

Note. Based on forward and side scatter characteristics (FSC/SSC), “doublet” exclusion (FSC-H/FSC-A), Zombie Aqua fluorescence, and presence of CD3, non-viable cells and CD3⁺ lymphocytes were excluded from the analysis. In the population of B lymphocytes (CD3⁺CD19⁺), the following subpopulations were isolated: naive B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), non-switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), switched memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), effector memory B cells (CD20⁺CD27⁺IgD⁺), plasmablasts (CD20⁺CD38^{hi}CD27^{hi}). To assess the activation of the B cell immune response, the relative content of CD38⁺B cells belonging to the different subpopulations were counted. The level of B cells expressing membrane-associated IgA was also measured. Abbreviation: SW Mem, switched memory B cells; NSW Mem, non-switched memory B cells; DN, effector memory B cells.

непереключенных В-клеток памяти. Тактика гейтирования для выявления указанных популяций представлена на рисунке 1.

Результаты оценки динамики основных субпопуляций В-клеток на фоне вакцинации разными ИГВ приведены на рисунке 2. На 7-й день после вакцинации у добровольцев, получавших

вакцину «Ультрикс», отмечалось достоверное увеличение общего числа В-клеток в периферической крови ($p = 0,0009$) (рис. 2А). У лиц, получавших вакцину «Гриппол плюс», на данном сроке также происходило повышение относительного содержания В-лимфоцитов, однако достоверные различия с исходными значениями

были достигнуты на 21-й день ($p = 0,005$). У добровольцев, привитых вакциной «Совигрипп», изменения носили менее выраженный характер, однако в среднем уровень В-клеток также увеличивался на 7-й и 21-й дни после вакцинации. Все

три вакцины способствовали увеличению общего содержания В-лимфоцитов в периферической крови, что отражает способность изучаемых вакцин стимулировать пролиферацию В-клеток. Наиболее выраженные изменения были харак-

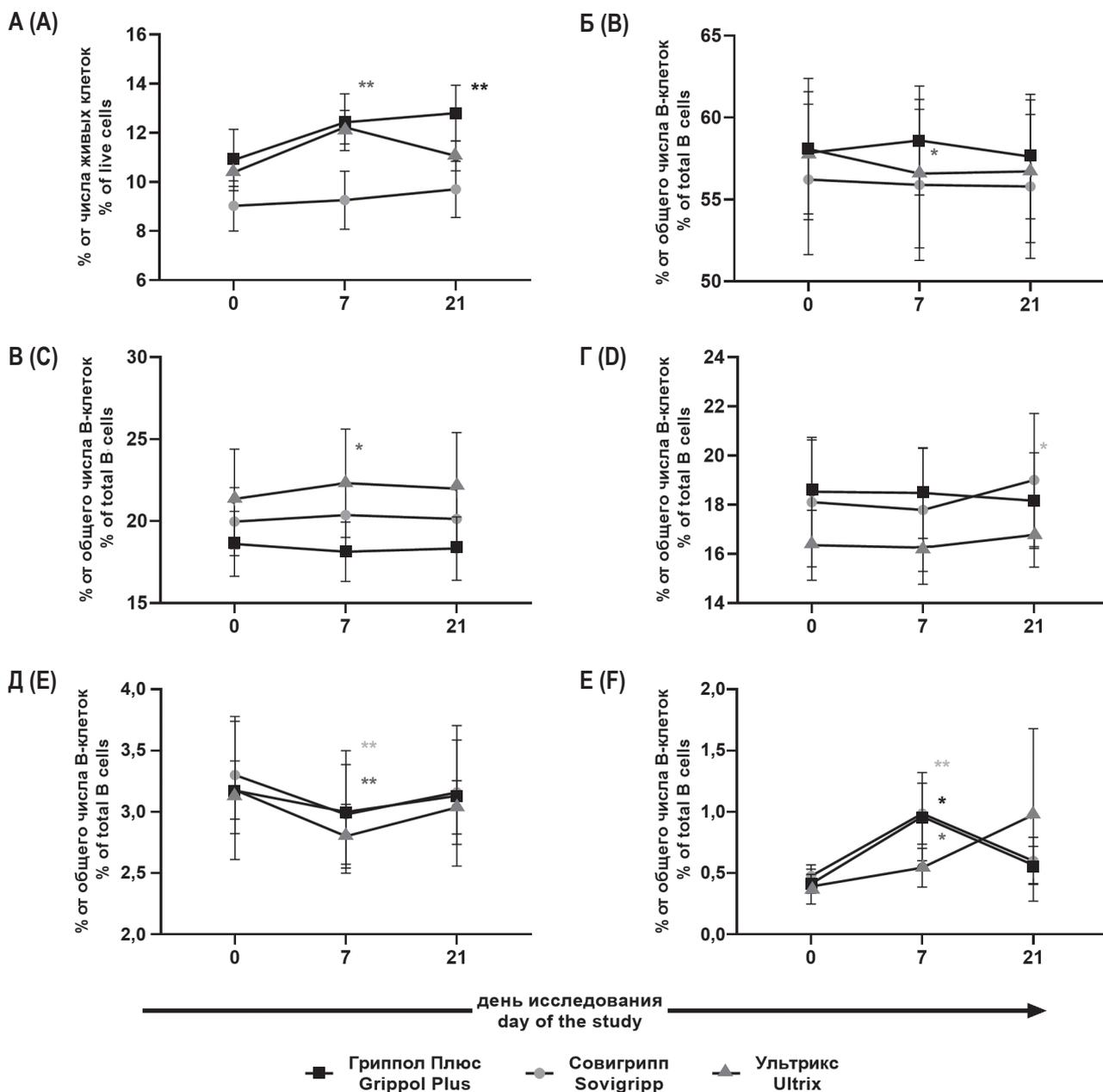


Рисунок 2. Динамика поствакцинального В-клеточного ответа в периферической крови добровольцев

Примечание. Представлены средние значения (Mean \pm SE) относительного содержания В-лимфоцитов и различных субпопуляций В-клеток (ось ординат) в периферической крови участников исследования до вакцинации, на 7-й и 21-й дни после вакцинации (ось абсцисс). А – В-лимфоциты. Б – наивные В-клетки. В – непереключенные В-клетки памяти. Г – переключенные В-клетки памяти. Д – эффекторные В-клетки памяти. Е – плазмобласты. Символом «*» отмечены достоверные различия с днем 0 (до вакцинации) в тесте Манна–Уитни (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$).

Figure 2. Dynamics of postvaccination B cell response in peripheral blood of healthy volunteers

Note. The mean values (Mean \pm SE) of the content of B lymphocytes and various subpopulations of B cells (ordinate axis) in the peripheral blood of the study participants before vaccination, on 7 and 21 days after vaccination (the abscissa axis) are presented. A, B lymphocytes. B, Naive B cells. C, Non-switched memory B cells. D, Switched memory B cells. E, Effector memory B cells. F, Plasmablasts. The symbol “*” marks significant differences with day 0 (before vaccination) in the Mann–Whitney test (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

теры для лиц, привитых вакцинами «Гриппол плюс» и «Ультрикс».

До введения вакцины в периферической крови плазмобласты составляли менее 1% от всех В-лимфоцитов. Было показано, что вакцины «Совигрипп» и «Гриппол плюс» индуцировали выраженное увеличение уровня плазмобластов в периферической крови на 7-й день после вакцинации ($p = 0,007$; $p = 0,03$) (рис. 2Е). На 21-й день происходило возвращение относительного содержания плазмобластов на уровень, отмеченный до вакцинации. Вакцина «Ультрикс» также вызывала достоверный ($p = 0,05$) прирост относительного содержания указанных клеток на 7-й день после введения, однако изменения носили менее выраженный характер. При этом в группе, получавшей «Ультрикс», в отличие от групп, получавших «Совигрипп» или «Гриппол плюс», не отмечено снижения относительного содержания плазмобластов на 21-й день. Таким образом, все три вакцины способствовали увеличению доли плазмобластов среди В-клеток на 7-й день после вакцинации. При этом наиболее выраженные изменения в количестве плазмобластов были характерны для групп, иммунизированных вакцинами «Совигрипп» или «Гриппол плюс». Различный характер ответа на вакцинацию в разных группах, по всей видимости, связан с использованием адъювантов в составе данных вакцин. Полученные в нашей работе данные подтверждаются опубликованными результатами других исследователей. Так, ранее было показано, что после вакцинации ИГВ доля плазмобластов среди В-клеток периферической крови возрастает до 1-1,5%, с максимумом на 7-й день [8]. После иммунизации ИГВ пик появления специфических для гриппа плазмобластов, секретирующих антитела, коррелирует с титрами антител к ГА [5].

В периферической крови у человека пул В-лимфоцитов состоит в среднем из 40% В-клеток памяти и 60% наивных В-клеток [8]. Содержание переключенных и непереключенных В-клеток памяти составляет 10-32% и 5-16% от всех В-клеток соответственно [10]. После введения ИГВ не было выявлено изменений в количестве В-клеток памяти [8]. В наших исследованиях частота определения данных субпопуляций В-лимфоцитов была сходной с данными, опубликованными ранее (рис. 2В, Г). После введения ИГВ на 21-е сутки наблюдали достоверное увеличение доли В-клеток с переключенным изотипом антител в группе лиц, привитых вакциной «Совигрипп», и выраженную тенденцию к увеличению в группе привитых «Ультрикс» (рис. 2Г).

Вакцинация оказала существенное влияние на относительное содержание эффекторных

В-клеток памяти (DN-клетки), для которых ранее была показана способность к дифференцировке в В-клетки памяти с переключенным изотипом антител [15]. Методом проточной цитометрии было определено, что в периферической крови у человека DNB-клетки памяти составляют в норме менее 5% от всех В-клеток [8], что согласуется с полученными в нашей работе данными. Было обнаружено, что количество этих клеток в периферической крови повышено у пациентов при волчанке. При заражении добровольцев респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) содержание DNB-клеток памяти в периферической крови возрастает на 4-12-й день. Есть данные, указывающие на то, что количество DNB-клеток памяти увеличивается у здоровых добровольцев после вакцинации против гриппа или вирусного энцефалита [8]. В нашем исследовании в группах, привитых вакцинами «Совигрипп» и «Ультрикс», отмечали снижение относительного содержания клеток данного фенотипа на 7-й день ($p = 0,005$, $p = 0,002$) (рис. 2Д). У лиц, получивших вакцину «Совигрипп», указанные изменения сопровождались приростом относительного содержания переключенных В-клеток памяти на 21-й день после вакцинации. Участие DNB-клеток памяти в поствакцинальном иммунном ответе требует дальнейшего изучения. В целом, повышение количества этих клеток отражает развитие воспалительного ответа и может потенциально вносить вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний.

Изменения относительного содержания В-лимфоцитов, находящихся на более ранних стадиях созревания, были продемонстрированы в группе, получавшей вакцину «Ультрикс». У лиц, привитых данной вакциной, было выявлено снижение уровня наивных В-лимфоцитов на 7-й день после вакцинации ($p = 0,03$) (рис. 2Б). Полученные в нашей работе данные подтверждаются опубликованными ранее результатами. В периферической крови здоровых добровольцев выявлено около 60% наивных В-клеток памяти. После вакцинации ИГВ происходило снижение процента наивных В-клеток на 7-й и 14-й день наблюдения [8]. Одновременно с этим, после вакцинации «Ультрикс» наблюдали увеличение относительного содержания непереключенных В-клеток памяти ($p = 0,02$) (рис. 2В). Тенденция к увеличению уровня данной популяции была выявлена также в группе, вакцинированной «Совигрипп» ($p = 0,053$).

На рисунке 3 представлены результаты изучения динамики относительного содержания основных популяций В-лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD38. Согласно полученным данным, наблюдалось увеличение

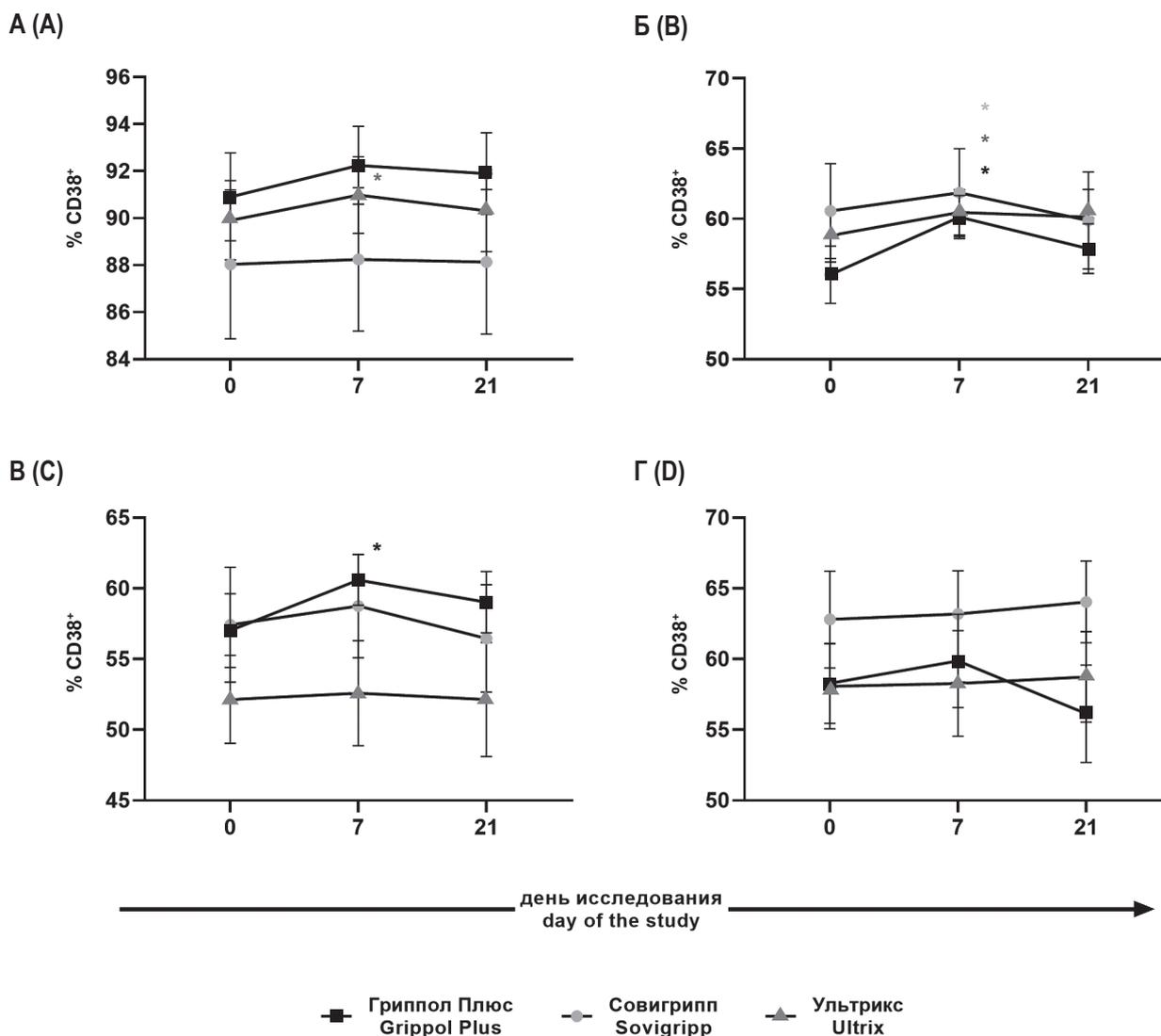


Рисунок 3. Динамика относительного количества В-лимфоцитов периферической крови, экспрессирующих активационный маркер CD38 после вакцинации

Примечание. Представлены средние значения (Mean \pm SE) доли различных субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих активационный маркер CD38 от общего числа клеток в соответствующей родительской популяции (ось ординат), до вакцинации, на 7-й и 21-й дни после вакцинации (ось абсцисс). А – наивные В-клетки. Б – переключенные В-клетки памяти. В – непереключенные В-клетки памяти. Г – эффекторные В-клетки памяти. Символом «*» отмечены достоверные различия с днем 0 (до вакцинации) в тесте Манна–Уитни (* – $p < 0,05$).

Figure 3. Dynamics of the relative number of peripheral blood B lymphocytes expressing the activation marker CD38 after vaccination

Note. The average values (Mean \pm SE) of the proportion of different subpopulations of B lymphocytes expressing the activation marker CD38 from the total number of cells in the corresponding parent population (ordinate axis) are presented before vaccination, on 7 and 21 days after vaccination (the abscissa axis). A, Naive B cells. B, Switched memory B cells. C, Non-switched memory B cells. D, effector memory B cells. The symbol "*" marks significant differences with day 0 (before vaccination) in the Mann–Whitney test (*, $p < 0.05$).

числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител через 7 дней после введения вакцин «Совигрипп», «Гриппол плюс» и «Ультрикс» ($p = 0,03$; $p = 0,04$; $p = 0,02$, соответственно) (рис. 3Б). Популяция активированных переключенных В-клеток памяти, наравне с плазмобластами выделяется как биомаркер

В-клеточного ответа. Кроме того, у лиц, получивших вакцины «Ультрикс» и «Гриппол плюс», происходило увеличение относительного содержания наивных CD38+ В-лимфоцитов ($p = 0,02$) и непереключенных В-клеток памяти, экспрессирующих CD38 ($p = 0,02$) (рис. 3А, В). Таким образом, вакцинация приводила к увеличению

относительного содержания активированных В-лимфоцитов, находящихся на различных стадиях созревания.

Заключение

Проведенные исследования выявили значительные изменения в популяционном составе В-лимфоцитов в ответ на вакцинацию всеми исследованными ИГВ. Происходило увеличение общего количества В-лимфоцитов, а также их

субпопуляций, в том числе плазмобластов и активированных переключенных В-клеток памяти. Для адьювантных вакцин «Гриппол плюс» и «Совигрипп» по сравнению с расщепленной вакциной «Ультрикс» было показано раннее увеличение относительного количества плазмобластов на 7-й день исследования. При этом все три вакцины в одинаковой мере способствовали увеличению числа активированных В-клеток памяти с переключенным изотипом антител.

Список литературы / References

1. Лиознов Д.А., Харит С.М., Ерофеева М.К., Зубкова Т.Г., Горчакова О.В., Николаенко С.Л. Оценка реактогенности и иммуногенности вакцины гриппозной четырехвалентной инактивированной субъединичной // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика, 2018, Т. 17, № 3. С. 57-62. [Lioznov D.A., Kharit S.M., Erofeeva M.K., Zubkova T.G., Gorchakova O.V., Nikolaenko S.L. Assessment of reactogenicity and immunogenicity of the quadrivalent live attenuated influenza vaccine. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2018, Vol. 17, no. 3, pp. 57-62. (In Russ.)]
2. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности и иммуногенности отечественной субъединичной адьювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика, 2014. № 2 (75). С. 72-78. [Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Feldblyum I.V., Rudenko L.G. The results of the study of the safety and immunogenicity of the domestic subunit adjuvant vaccine "Sovigripp" in volunteers aged 18-60 years. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2014, no. 2 (75), pp. 72-78. (In Russ.)]
3. Селькова Е.П., Гренкова Т.А., Алешкин В.А., Гудова Н.В., Лыткина И.Н., Михайлова Е.В., Яшина А.Я., Федякина И.Т. Изучение иммуногенности, эффективности и переносимости отечественной вакцины «Ультрикс» среди лиц повышенного риска инфицирования и заболеваемости гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы, 2016. № 4. С. 59-66. [Selkova E.P., Grenkova T.A., Aleshkin V.A., Gudova N.V., Lytkina I.N., Mikhailova E.V., Yashina A.Ya., Fedyakina I.T. The study of the immunogenicity, efficacy and tolerability of the domestic vaccine "Ultrix" among people at increased risk of infection and morbidity with influenza and acute respiratory viral infections. *Epidemiologia i infeksionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Issues*, 2016, no. 4, pp. 59-66. (In Russ.)]
4. Cossarizza A., Chang H.-D., Radbruch A., Acs A., Adam D., Adam-Klages S., Agace W.W., Aghaepour N., Akdis M., Allez M., Almeida L.N., Alvisi G., Anderson G., Andr a I., Annunziato F., Anselmo A., Bacher P., Baldari C.T., Bari S., Barnaba V., Barros-Martins J., Battistini L., Bauer W., Baumgart S., Baumgarth N., Baumjohann D., Baying B., Bebawy M., Becher B., Beisker W., Benes V., Beyaert R., Blanco A., Boardman D.A., Bogdan C., Borger J.G., Borsellino G., Boulais P.E., Bradford J.A., Brenner D., Brinkman R.R., Brooks A.E.S., Busch D.H., B scher M., Bushnell T.P., Calzetti F., Cameron G., Cammarata I., Cao X., Cardell S.L., Casola S., Cassatella M.A., Cavani A., Celada A., Chatenoud L., Chattopadhyay P.K., Chow S., Christakou E.,  i in- ain L., Clerici M., Colombo F.S., Cook L., Cooke A., Cooper A.M., Corbett A.J., Cosma A., Cosmi L., Coulie P.G., Cumano A., Cvetkovic L., Dang V.D., Dang-Heine C., Davey M.S., Davies D., de Biasi S., del Zotto G., dela Cruz G.V., Delacher M., Bella S.D., Dellabona P., Deniz G., Dessing M., di Santo J.P., Diefenbach A., Dieli F., Dolf A., D rner T., Dress R.J., Dudziak D., Dustin M., Dutertre C. A., Ebner F., Eckle S.B.G., Edinger M., Eede P., Ehrhardt G.R.A., Eich M., Engel P., Engelhardt B., Erdei A., Esser C., Everts B., Evrard M., Falk C.S., Fehniger T.A., Felipe-Benavent M., Ferry H., Feuerer M., Filby A., Filkor K., Fillatreau S., Follo M., F rster I., Foster J., Foulds G.A., Frehse B., Frenette P.S., Frischbutter S., Fritzsche W., Galbraith D.W., Gangaev A., Garbi N., Gaudilliere B., Gazzinelli R.T., Geginat J., Gerner W., Gherardin N.A., Ghoreschi K., Gibellini L., Ginhoux F., Goda K., Godfrey D.I., Goettlinger C., Gonz lez-Navajas J.M., Goodyear C.S., Gori A., Grogan J.L., Grummitt D., Gr tzkau A., Haftmann C., Hahn J., Hammad H., H mmerling G., Hansmann L., Hansson G., Harpur C.M., Hartmann S., Hauser A., Hauser A.E., Haviland D.L., Hedley D., Hern ndez D.C., Herrera G., Herrmann M., Hess C., H fer T., Hoffmann P., Hogquist K., Holland T., H llt T., Holmdahl R., Hombrink P., Houston J.P., Hoyer B.F., Huang B., Huang F.-P., Huber J.E.,

Huehn J., Hundemer M., Hunter C.A., Hwang W.Y.K., Iannone A., Ingelfinger F., Ivison S.M., Jäck H.-M., Jani P.K., Jávega B., Jonjic S., Kaiser T., Kalina T., Kamradt T., Kaufmann S.H.E., Keller B., Ketelaars S.L.C., Khalilnezhad A., Khan S., Kisielow J., Klenerman P., Knopf J., Koay H.-F., Kobow K., Kolls J.K., Kong W.T., Kopf M., Korn T., Kriegsmann K., Kristyanto H., Kroneis T., Krueger A., Kühne J., Kukat C., Kunkel D., Kunze-Schumacher H., Kurosaki T., Kurts C., Kvistborg P., Kwok I., Landry J., Lantz O., Lanuti P., LaRosa F., Lehuen A., LeibundGut-Landmann S., Leipold M.D., Leung L.Y.T., Levings M.K., Lino A.C., Liotta F., Litwin V., Liu Y., Ljunggren H. G., Lohoff M., Lombardi G., Lopez L., López-Botet M., Lovett-Racke A.E., Lubberts E., Luche H., Ludewig B., Lugli E., Lunemann S., Maecker H.T., Maggi L., Maguire O., Mair F., Mair K.H., Mantovani A., Manz R.A., Marshall A.J., Martínez-Romero A., Martrus G., Marventano I., Maslinski W., Matarese G., Mattioli A.V., Maueröder C., Mazzoni A., McCluskey J., McGrath M., McGuire H.M., McInnes I.B., Mei H.E., Melchers F., Melzer S., Mielenz D., Miller S.D., Mills K.H.G., Minderman H., Mjösberg J., Moore J., Moran B., Moretta L., Mosmann T.R., Müller S., Multhoff G., Muñoz L.E., Münz C., Nakayama T., Nasi M., Neumann K., Ng L.G., Niedobitek A., Nourshargh S., Núñez G., O'Connor J. E., Ochel A., Oja A., Ordonez D., Orfao A., Orłowski-Oliver E., Ouyang W., Oxenius A., Palankar R., Panse I., Pattanapanyasat K., Paulsen M., Pavlinic D., Penter L., Peterson P., Peth C., Petriz J., Piancone F., Pickl W.F., Piconese S., Pinti M., Pockley A.G., Podolska M.J., Poon Z., Pracht K., Prinz I., Pucillo C.E.M., Quataert S.A., Quatrini L., Quinn K.M., Radbruch H., Radstake T.R.D.J., Rahmig S., Rahn H. P., Rajwa B., Ravichandran G., Raz Y., Rebhahn J.A., Recktenwald D., Reimer D., Sousa C.R., Remmerswaal E.B.M., Richter L., Rico L.G., Riddell A., Rieger A.M., Robinson J.P., Romagnani C., Rubartelli A., Ruland J., Saalmüller A., Saeys Y., Saito T., Sakaguchi S., Sala-de-Oyanguren F., Samstag Y., Sanderson S., Sandroock I., Santoni A., Sanz R.B., Saresella M., Sautes-Fridman C., Sawitzki B., Schadt L., Scheffold A., Scherer H.U., Schiemann M., Schildberg F.A., Schimisky E., Schlitzer A., Schlosser J., Schmid S., Schmitt S., Schober K., Schraivogel D., Schuh W., Schüler T., Schulte R., Schulz A.R., Schulz S.R., Scottá C., Scott-Algara D., Sester D.P., Shankey T.V., Silva-Santos B., Simon A.K., Sitnik K.M., Sozzani S., Speiser D.E., Spidlen J., Stahlberg A., Stall A.M., Stanley N., Stark R., Stehle C., Steinmetz T., Stockinger H., Takahama Y., Takeda K., Tan L., Tárnok A., Tiegs G., Toldi G., Tornack J., Traggiai E., Trebak M., Tree T.I.M., Trotter J., Trowsdale J., Tsoumakidou M., Ulrich H., Urbanczyk S., van de Veen W., van den Broek M., van der Pol E., van Gassen S., van Isterdael G., van Lier R.A.W., Veldhoen M., Vento-Asturias S., Vieira P., Voehringer D., Volk H.-D., von Borstel A., von Volkman K., Waisman A., Walker R.V., Wallace P.K., Wang S.A., Wang X.M., Ward M.D., Ward-Hartstonge K.A., Warnatz K., Warnes G., Warth S., Waskow C., Watson J.V., Watzl C., Wegener L., Weisenburger T., Wiedemann A., Wienands J., Wilharm A., Wilkinson R.J., Willimsky G., Wing J.B., Winkelmann R., Winkler T.H., Wirz O.F., Wong A., Wurst P., Yang J.H.M., Yang J., Yazdanbakhsh M., Yu L., Yue A., Zhang H., Zhao Y., Ziegler S.M., Zielinski C., Zimmermann J., Zychlinsky A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.*, 2019, Vol. 49, no. 10, pp. 1457-1973.

5. Halliley J.L., Kyu S., Kobie J.J., Walsh E.E., Falsey A.R., Randall T.R., Treanor J., Feng C., Sanz I., Lee F.E.-H. Peak frequencies of circulating human influenza specific antibody secreting cells correlate with serum antibody response after immunization. *Vaccine*, 2010, Vol. 28, no. 20, pp. 3582-3587.

6. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, 2016, Vol. 37, no. 4, pp. 487-500.

7. Piedra-Quintero Z.L., Wilson Z., Nava P., Guerau-de-Arellano M. CD38: An immunomodulatory molecule in inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 597959. doi: 10.3389/fimmu.2020.597959.

8. Ruschil C., Gabernet G., Lepennetier G., Heumos S., Kaminski M., Hracsko Z., Irmeler M., JBeckers J., Ziemann U., Nahnsen S., Owens G.P., Bennett J.L., Hemmer B., Kowarik M.C. Specific induction of double negative B cells during protective and pathogenic immune responses. *Front. Immunol.*, 2020, Vol. 11, 606338. doi: 10.3389/fimmu.2020.606338.

9. Sanyal M., Holmes T.H., Maecker H.T., Randy A., Albrecht R.A., Dekker C.L., He X.-S., Greenberg H.B. Diminished B-cell response after repeat influenza vaccination. *J. Infect. Dis.*, 2019, Vol. 219, no. 10, pp. 1586-1595.

10. Sanza I., Weia C., Leeb F.E.-H., Anolik J. Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Semin. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 1, pp. 67-82.

11. Sasaki S., Jaimes M.C., Holmes T.H., Dekker C.L., Mahmood K., Kemble G.W., Arvin A.M., Greenberg H.B. Comparison of the influenza virus-specific effector and memory B-cell responses to immunization of children and adults with live attenuated or inactivated influenza virus vaccines. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 1 pp. 215-228.

12. Sasaki S., Sullivan M., Narvaez C.F., Holmes T.H., Furman D., Zheng N.-Y., Nishtala M., Wrammert J., Smith K., James J.A., Dekker C.L., Davis M.M., Wilson P.C., Greenberg H.B., He X.-S. Limited efficacy of inactivated

influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased production of vaccine-specific antibodies. *J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 121, no. 8, pp. 3109-3119.

13. Taylor J.J., Jenkins M.K., Pape K. A. Heterogeneity in the differentiation and function of memory B cells. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 12, pp. 590-597.

14. Turner J.S., Zhou J.Q., Han J., Schmitz A.J., Rizk A.A., Alsoussi W.B., Lei T., Amor M., McIntire K.M., Meade P., Strohmeier S., Brent R.I., Richey S.T., Haile A., Yang Y.R., Klebert M.K., Suessen T., Teefey S., Presti R.M., Krammer F., Kleinstejn S.H., Ward A.B., Ellebedy A.H. Human germinal centers engage memory and naïve B cells after influenza vaccination. *Nature*, 2020, Vol. 586, no. 7827, pp. 127-132.

15. Wu Y.C.B., Kipling D., Dunn-Walters D.K. The relationship between CD27 negative and positive B cell populations in human peripheral blood. *Front. Immunol.*, 2011, Vol. 2, 81. doi: 10.3389/fimmu.2011.00081.

Авторы:

Шурыгина А.-П.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Васильев К.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Варюшина Е.А. — д.б.н., ведущий специалист в области лабораторных исследований лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ладьгина М.Д. — ведущий специалист в области лабораторных исследований лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Shurygina A.-P.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Vasiliev K.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Varyushina E.A., PhD, MD (Biology), Leading Specialist in Laboratory Studies, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Ladygina M.D., Leading Specialist in Laboratory Studies, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Зубкова Т.Г. — к.м.н., заведующая клиническим отделением ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Zubkova T.G., PhD (Medicine), Head of the Clinical Department, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Бузицкая Ж.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Buzitskaya Zh.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Стукова М.А. — к.м.н., заведующая лабораторией векторных вакцин лабораторией ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Stukova M.A., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Vected Vaccines, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Леонов Д.А. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Lioznov D.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.11.2022

Отправлена на доработку 07.12.2022

Принята к печати 20.02.2023

Received 11.11.2022

Revision received 07.12.2022

Accepted 20.02.2023