

ОЦЕНКА Т-КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ ПО ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ CD45⁺ У ЛЮДЕЙ, ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ РЕАССОРТАНТНОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ

Найхин А.Н., Кореньков Д.А., Петухова Г.Д.,
Чиркова Т.В., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г.

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, отдел вирусологии им. акад. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург

Резюме. Полноценность развития поствакцинального иммунитета определяет Т- и В-клеточная иммунологическая память, формирующаяся в ответ на введение вакцинного штамма. Однако способность существующих и разрабатываемых вакцин стимулировать Т-клеточную иммунологическую память исследована крайне слабо. Настоящее исследование является первой попыткой проанализировать данный вопрос в отношении живой мукозальной реассортантной гриппозной вакцины.

В исследовании участвовало 57 здоровых молодых людей, в периферической крови которых до и после вакцинации определяли процент Т-клеток следующих фенотипов: CD45RO⁺, CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺.

После вакцинации было отмечено повышение среднего уровня Т-клеток всех изученных фенотипов только у волонтеров, ответивших на прививку достоверным увеличением титров сывороточных антител. Анализ индивидуальных данных показал, что среди лиц, давших такой ответ, число добровольцев с увеличением уровня Т-клеток по маркеру CD45RO⁺ составило 35-57%, а у вакцинированных людей без такого иммунного ответа — только 11-22% ($p < 0,05$; $< 0,01$). По маркеру CD45RA⁺ среди волонтеров первой группы этот показатель колебался от 14 до 36%, а у лиц из второй группы был зафиксирован только 1 случай с достоверным увеличением уровня экспрессии CD8⁺CD45RA⁺ на Т-клетках в поствакцинальный период.

Таким образом, однократная иммунизация живой гриппозной вакциной сопровождается достоверным увеличением в периферической крови уровня ЦТЛ (CD8⁺) и Th (CD4⁺) фенотипов CD45RO⁺ («иммунологической памяти») и CD45RA⁺ («наивных») у значительной части вакцинированных лиц (35-60%). Существует определенная связь между поствакцинальным накоплением Т-клеток памяти в периферической крови и наличием системного гуморального ответа на прививку. Однако эта связь не абсолютна, поскольку увеличение доли этих клеток после вакцинации происходит также и у части лиц без такого ответа (до 25% иммунизированных).

Ключевые слова: иммунологическая память, противогриппозная вакцинация.

Naikhin A.N., Koren'kov D.A., Petukhova G.D., Chirkova T.V., Grigorieva E.P., Rudenko L.G.

EVALUATION OF T CELL IMMUNOLOGICAL MEMORY BY MEANS OF CD45⁺ EXPRESSION IN HUMANS VACCINATED WITH LIVE REASSORTANT INFLUENZA VACCINE

Адрес для переписки:

Найхин Анатолий Нойевич
197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,
ГУ НИИЭМ РАМН, отдел вирусологии
им. акад. А.А. Смородинцева.
Тел.: (812) 234-68-60, 234-42-92.
Факс: (812) 234-94-89.
E-mail: vaccine@mail.ru

Abstract. A full-scale development of post-vaccinal immunity is determined by T and B cell-dependent immunological memory which is formed in response to vaccine injection. However, a capacity of existing and newly developed vaccines to stimulate T cell-dependent immunological memory is very poorly studied. Present work is a first attempt of analyzing this issue, with respect to effects of live mucosal influenza vaccine.

The study involved fifty-seven healthy young persons, in whom percentage of T cells with CD45RO⁺,

CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RO⁺, and CD8⁺CD45RA⁺ phenotypes was determined pre- and post-vaccination.

Following vaccination, increased average T cell levels of all the mentioned phenotypes was revealed in those volunteers who responded to the vaccine with elevated serum antibody titers. Individual data analysis has shown that, among individuals with antibody response, a percentage of persons with CD45RO⁺ T cells was 35 to 57%, as compared to vaccinated persons without such antibody response (11 to 22%, $p < 0.05$; $p < 0.01$). When using CD45RA⁺ marker, appropriate values among group 1 volunteers varied between 14 and 36%, whereas for group 2, only one case was detected with expression with significantly increased CD8⁺CD45RA⁺, expression on T cells post-vaccination.

Hence, a single immunization with live influenza vaccine is followed by significantly increased levels of peripheral CTLs (CD8⁺) and Th (CD4⁺) with CD45RO⁺ (memory cells) and CD45RA⁺ (naive) phenotypes in sufficient cohort of immunized persons (35 to 60%). Certain relations exist between post-vaccinal accumulation of memory T cells in peripheral blood, and development of a systemic humoral response to vaccination. However, this connection is not absolute, since an increase in these cells post-vaccination occurs in some persons without such a response (up to 25% of immunized individuals). (*Med. Immunol.*, vol. 10, N 6, pp 535-542)

Введение

Полноценность развития у людей поствакцинального иммунного ответа к возбудителям инфекций зависит от способности вакцинных штаммов индуцировать Т- и В-клеточную иммунологическую память, которая определяет защищенность организма при последующем его контакте с «диким» вирулентным патогеном [3]. Механизм такой защиты связан с ускоренной, усиленной и более длительной продукцией эффекторных факторов адаптивного иммунитета [11]. Однако способность существующих и разрабатываемых вакцин стимулировать Т-клеточную иммунологическую память исследована крайне слабо. Только в последнее десятилетие это направление вакцинальной иммунологии начало активно развиваться в связи с открытием новых маркеров Т-клеточной памяти [10-13].

Сказанное в полной мере относится и к противогриппозным вакцинам, поскольку, по нашему глубокому убеждению, ответ на длительно дискутируемый вопрос об оптимальном способе вакцинопрофилактики этой инфекции может быть получен только после накопления данных о способности тех или иных вакцинных препаратов стимулировать и «обновлять» пул клеток памяти. Американскими авторами опубликована работа, отражающая способность коммерческих инактивированных гриппозных вакцин (ИГВ) влиять на состояние Т-клеточной иммунологической памяти у людей [8]. В этой работе изучались количественные показатели изменения пулов CD45RO⁺ и CD45RA⁺Т-клеток в периферической крови. Настоящее исследование является первой попыткой проанализировать данный вопрос в отношении живой реассортантной гриппозной вакцины (ЖГВ).

Материалы и методы

Объект исследования. Обследовано 57 условно здоровых молодых людей в возрасте 18-20 лет, привитых однократно интраназально коммерческой ЖГВ (32 человека) или препаратом плацебо

(25 человек), и 70 непривитых здоровых лиц того же возраста.

Вакцина. ЖГВ (холодоадаптированная реассортантная трехвалентная живая гриппозная вакцина производства ФГУ «Микроген», Иркутское предприятие по производству иммунобиологических препаратов) вводили с помощью распылителя в оба носовых хода по 0,25 мл жидкости. Аналогичным образом апплицировали препарат плацебо (лиофилизированная аллантоисная жидкость незараженных куриных эмбрионов). В состав вакцины входили следующие реассортантные штаммы: А/17/Калифорния/04/6 Н3N2, А/17/Новая Каледония/99/45 Н1N1, В/60/Джиллин/01/1. До и через 21 день после иммунизации у добровольцев отбирали из локтевой вены по 15 мл крови, которую исследовали в иммунологических тестах. От каждого волонтера было получено письменное добровольное информированное согласие об участии в исследовании.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) выполнялась по общепринятой методике с использованием 4 АЕ/0,1 мл вакцинного вируса гриппа. Для удаления ингибиторов гемагглютинации сыворотки прогревали при 56°С 30 минут и обрабатывали RDE (Receptor Destroying Enzyme, «Denka Seiken», Япония). За достоверный прирост титров сывороточных антител принимали их увеличение в 4 и более раза.

Выделение и приготовление суспензий мононуклеаров периферической крови (МПК) осуществляли путем центрифугирования образцов крови в 70% градиенте LSM («ICN Pharmaceutical», США) по стандартной методике [2].

Пролиферативную активность МПК оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с помощью МТТ-теста [9]. Клетки инкубировали в плоскодонных 96-луночных планшетах с посевной дозой 5×10^5 клеток на лунку в культуральной среде RPMI с добавлением или без добавления 20 ГАЕ инактивированного исследуемого вируса. Индекс стимуляции определяли как отношение оптической плотности стимулированного вирусом образца к контрольному.

ТАБЛИЦА 1. ИНДУКЦИЯ ЖГВ РАЗНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПРИВИВКУ ЖГВ

Группа*	Число лиц	Время отбора образцов крови**	Среднее арифметическое значение доли (%) субпопуляций Т-лимфоцитов, экспрессирующих исследуемые CD-молекулы от общего числа лимфоцитов					
			CD45RO ⁺			CD45RA ⁺		
			CD45RO ⁺	CD4 ⁺ CD45RO ⁺	CD8 ⁺ CD45RO ⁺	CD45RA ⁺	CD4 ⁺ CD45RA ⁺	CD8 ⁺ CD45RA ⁺
Привитые ЖГВ	РТГА(+)	I	21,0	12,4	5,7	42,3	12,4	13,5
		II	27,7	14,6	7,5	46,8	15,7	16,3
	РТГА(-)	I	24,2	12,5	7,1	48,5	13,5	16,1
		II	25,0	13,0	7,1	46,8	14,3	16,4
Получившие препарат плацебо		I	25,6	12,6	7,6	51,1	15,7	17,0
		II	21,6	10,6	6,1	42,2	12,7	14,1

Примечания. * – здесь и далее: РТГА(+) – давшие диагностический прирост титров антител в РТГА к одному или более вакцинному штамму, РТГА(-) – не давшие такого прироста; ** – I – до иммунизации, II – через 21 день после иммунизации.

Распределение лимфоцитов по мембранным маркерам. Для определения количества Т-клеток CD45RO⁺, CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺ фенотипов (% от общего числа лимфоцитов) использовали моноклональные антитела к этим молекулам («BD Biosciences Pharmigen», США). Учет результатов проводили по данным проточной цитометрии на приборе «BD FACSCalibur», США.

Локальные IgA-антитела в носовых секретах определяли в непрямом варианте иммуноферментного анализа с использованием ранее разработанного метода [4]. За титр антител принимали последнее разведение образца, оптическая плотность (ОП) которого в 2 и более раза превышала среднее арифметическое значение ОП контрольных лунок (все реагенты кроме образцов СВДП).

Статистический анализ данных проводился в программе MS Excel с применением непараметрических методов (U-критерий Манна–Уитни, тест Вилкоксона для парных сравнений и коэффициент корреляции по Спирмену). За уровень статистической значимости была принята $p < 0,05$.

Результаты

На сегодняшний день отсутствуют общепринятые нормы распределения изучаемых субпопуляций лимфоцитов в периферической крови. Поэтому прежде чем приступить к основным исследованиям, мы оценили распределение изучаемых подтипов клеток в наблюдаемой нами группе волонтеров 18-20 лет (70 человек).

Частота выявления у этих лиц CD45RA⁺ лимфоцитов оказалась в 2 раза выше по сравнению с частотой обнаружения CD45RO⁺ лимфоцитов (соответственно 47 и 23%, $p < 0,001$). Примерно такое же соотношение наблюдалось между долями цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) фенотипов CD8⁺CD45RA⁺ и CD8⁺CD45RO⁺ (16 и 6%, $p < 0,001$), тогда как показатели обнаружения Т-хелперных (Th) лимфоцитов фенотипов CD4⁺CD45RA⁺ и CD4⁺CD45RO⁺ отличались очень незначительно (соответственно 14 и 13%, $p > 0,05$). Число CD4⁺CD45RO⁺ клеток превышало уровень CD8⁺CD45RO⁺ клеток в 2 раза (соответственно 13 и 6%, $p < 0,001$).

Таким образом, в пуле подвергшихся цитометрическому анализу Т-клеток преобладали «наивные» лимфоциты с маркером CD45RA⁺ и CD8⁺CD45RA⁺, а среди клеток иммунологической памяти – CD4⁺CD45RO⁺Th.

В таблице 1 отображены усредненные данные о пред- и поствакцинальных уровнях экспрессии CD45RO⁺ и CD45RA⁺ молекул на Т-лимфоцитах. Эти показатели определяли у трех групп добровольцев: у привитых ЖГВ, давших иммунный

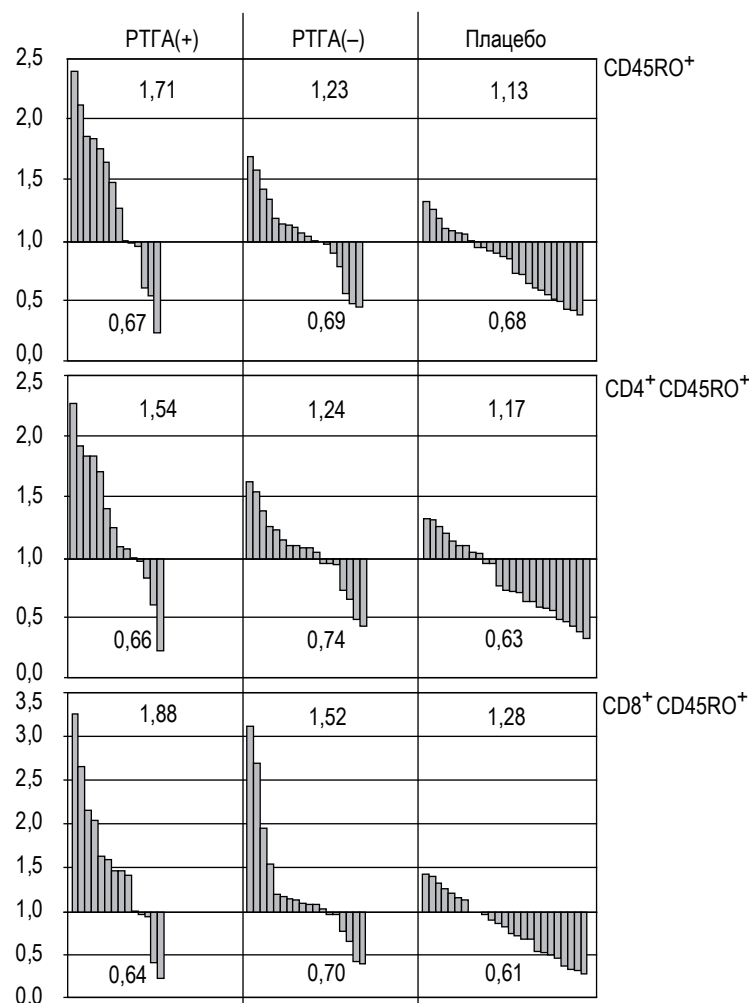


Рисунок 1. Кратность изменения уровней CD45RO⁺ лимфоцитов у волонтеров после вакцинации ЖГВ (индивидуальные показатели для каждого из волонтеров)

Примечания. Столбик – величина кратности изменения у конкретного волонтера. Кратность изменения – частное от деления поствакцинального уровня на предвакцинальный. Значения: > 1,0 – кратность прироста, < 1,0 – кратность снижения, 1,0 – без изменения. РТГА(+) и РТГА(-) – как в таблицах 1 и 2. Числами обозначены средние значения в группах по кратности прироста и кратности снижения.

ответ в РТГА, у вакцинированных без такового ответа и у лиц, получивших препарат плацебо.

После иммунизации ЖГВ средние арифметические уровни (%) CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺ клеток в первой группе увеличились на 2,2-6,7% ($p < 0,05$ и $p < 0,001$), во второй они практически не изменились ($p > 0,05$), а в контрольной группе снизились на 1,5-4,1% ($p < 0,05$). Весьма сходные данные получены и в отношении CD45RA⁺, CD4⁺CD45RA⁺ и CD8⁺CD45RA⁺ лимфоцитов.

Таким образом, после вакцинации было отмечено незначительное, но статистически достоверное повышение среднего уровня Т-клеток всех изученных фенотипов только у волонтеров, ответивших на прививку достоверным увеличением сывороточных антител. Это касалось лимфоцитов, несущих как RO⁺, так и RA⁺ изоформу CD45-молекул.

Далее мы проанализировали полученные данные с другой позиции: не по усредненным, а по индивидуальным показателям у тех же групп добровольцев. При этом об индивидуальных изменениях уровня этих клеток судили по кратности изменений данных уровней в поствакцинальный период по сравнению с предвакцинальным (рис. 1, 2).

Видно, что по этому показателю (кратность прироста) наиболее интенсивно увеличились уровни Т-лимфоцитов памяти (RO⁺) у лиц с достоверным гуморальным иммунным ответом и значительно менее интенсивно – у людей с отсутствием такого ответа (рис. 1). Близкие по значению результаты получены и в отношении «наивных» клеток фенотипа CD45RA⁺ (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что у лиц из контрольной группы не отмечено ни одного случая увеличения уровня этих субпопуляций

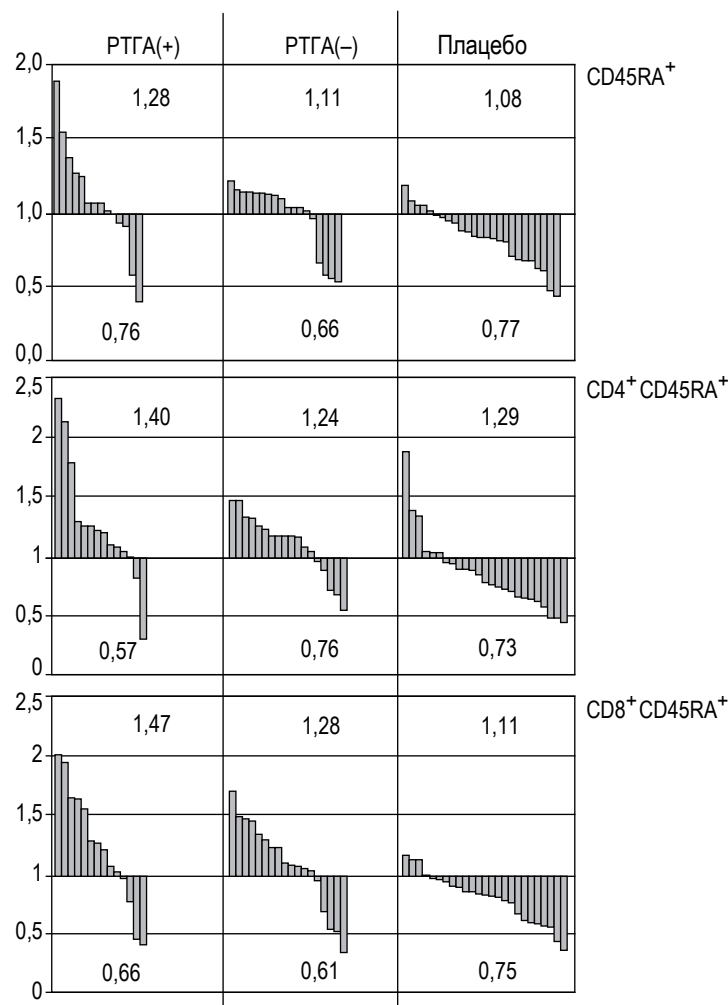


Рисунок 2. Кратность изменения уровней CD45RA⁺ лимфоцитов у волонтеров после вакцинации ЖГВ (индивидуальные показатели для каждого из волонтеров)

Примечания. Столбик – величина кратности изменения у конкретного волонтера. Кратность изменения – частное от деления поствакцинального уровня на предвакцинальный. Значения: > 1,0 – кратность прироста, < 1,0 – кратность снижения, 1,0 – без изменения. РТГА(+) и РТГА(-) – как в таблицах 1 и 2. Числами обозначены средние значения в группах по кратности прироста и кратности снижения.

лимфоцитов в 1,5 и более раза. Поэтому именно это значение мы выбрали в качестве достоверного возрастания их уровня в ответ на прививку. Данные величины (увеличения уровня в 1,5 раза) статистически достоверно превышали таковые показатели в группе плацебо ($p < 0,05$).

Материалы таблицы 2 отвечают на вопрос, какова доля лиц в тех же группах, у которых наблюдалось достоверное поствакцинальное возрастание (в 1,5 и более раза) уровня изучаемых Т-клеток.

Среди привитых с достоверным приростом сывороточных антител в РТГА число добровольцев с увеличением уровня Т-клеток по маркеру CD45RO⁺ составило 35–57%, а у вакцинированных людей без такого иммунного ответа только 11–22% ($p < 0,05$; $p < 0,01$). По маркеру RA⁺ среди волонтеров первой группы этот показатель колебался от 14 до 36%, а у лиц из второй группы

был зафиксирован только 1 случай с увеличением уровня экспрессии в поствакцинальный период в 1,5 и более раза молекул CD8⁺CD45RA⁺ на Т-клетках.

Таким образом, результаты индивидуального анализа свидетельствуют, что иммунизация ЖГВ молодых людей вызвала активацию не только Т-клеток иммунологической памяти (CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺), но и «наивных» Т-клеток (CD45RA⁺, CD4⁺CD45RA⁺ и CD8⁺CD45RA⁺). В большей части случаев активация клеток памяти наблюдалась у лиц с фиксированным системным гуморальным иммунным ответом на прививку (36–57%) и значительно реже (в 2,6–4,5 раза) у вакцинированных волонтеров без наличия подобного ответа. Среди активированных Т-лимфоцитов, несущих молекулу CD45RA⁺, преобладали ЦТЛ (CD8⁺).

ТАБЛИЦА 2. КРАТНОСТЬ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ИЛИ ОТСУТСТВИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА ПРИВИВКУ ЖГВ

Группа		Число лиц	Доля лиц с увеличением в 1,5 и более раза количества Т-лимфоцитов					
			CD45RO ⁺			CD45RA ⁺		
			CD45RO ⁺	CD4 ⁺ CD45RO ⁺	CD8 ⁺ CD45RO ⁺	CD45RA ⁺	CD4 ⁺ CD45RA ⁺	CD8 ⁺ CD45RA ⁺
Привитые ЖГВ	РТГА(+)	14	7 (50,0%)	5 (35,7%)	8 (57,1%)	2 (14,3%)	3 (21,4%)	5 (35,7%)
	РТГА(-)	18	2 (11,2%)	2 (11,2%)	4 (22,2%)	0	0	1 (5,6%)
Получившие препарат плацебо		25	0	0	0	0	0	0

Далее был проведен анализ сочетанности результатов оценки активации Т-клеток памяти по трем фенотипам CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺.

При попарном сравнении этих клеток по показателю достоверного (1,5 и более раза) увеличения их уровня в поствакцинальный период наблюдалась очень значительная совпадаемость результатов при наличии высоких коэффициентов корреляции (табл. 3).

Обсуждение

Как уже упоминалось, ранее вопрос об индукции Т-клеточной памяти мукозальными вакцинами вообще и живыми аттенуированными гриппозными вакцинами в частности не изучался. Поэтому на примере ЖГВ мы попытались получить ответ на главный вопрос теоретического характера: происходила ли при интраназальном введении людям аттенуированных реасортантных вирусов гриппа активация периферических Т-лимфоцитов памяти, и если да, то какова количественная характеристика этого процесса. Практический аспект работы лежал в плоскости поиска простого и доступного метода оценки поствакцинальных изменений Т-клеточной иммунологической памяти, не прибегая к очень сложным высокотратным и пока еще мало отработанным для людей характеристикам этих клеток по специфичности [12], принадлежности к центральной и периферической памяти [10]

ТАБЛИЦА 3. СОЧЕТАЕМОСТЬ РЕЗУЛЬТАТОВ ОЦЕНКИ ИМУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ ПО ТРЕМ МАРКЕРАМ

Сравниваемые маркеры	Показатели	
	% совпадения результатов*	коэффициент корреляции при $p < 0,01$
CD45RO ⁺ – CD8 ⁺ CD45RO ⁺	84,4	0,90
CD45RO ⁺ – CD4 ⁺ CD45RO ⁺	87,5	0,88
CD45RO ⁺ CD4 ⁺ – CD8 ⁺ CD45RO ⁺	84,4	0,84

Примечание. * – увеличение показателей в 1,5 и более раза.

или к субпопуляциям малоизученных CD45RA⁺ Т-лимфоцитов памяти [5]. В работе были использованы наиболее исследованные маркеры Т-клеточной иммунологической памяти, основанные на тестировании CD45RA- и CD45RO-молекул [8, 13]. Прибегая к такому тестированию, мы понимали, что в пуле определяемых в проточной цитометрии этих клеток могут быть включены пре-лимфоциты памяти с двойной меткой CD45RA⁺CD45RO⁺. Однако вряд ли это могло повлиять на общие показатели, поскольку их доля весьма незначительна и не превышает 15% [8].

Перед проведением основных исследований необходимо было получить представление о распределении изучаемых субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых людей 18–20-летнего возраста. Оказалось, что у этих лиц преобладали «наивные» Т-клетки фенотипа CD45RA⁺ по сравнению с Т-лимфоцитами памяти фенотипа CD45RO⁺, а также CD45RA⁺ ЦТЛ над CD45RO⁺ ЦТЛ. Такое же соотношение между перечисленными субпопуляциями обнаружили американские авторы при обследовании доноров активного возраста [8].

Согласно существующему регламенту, иммуногенность гриппозных вакцин оценивается по двум критериям: 1) увеличению средних показателей концентрации гемагглютинирующих сывороточных антител (средние титры) в поствакцинальный период по отношению к предвакцинальному; 2) частоте индивидуальных достоверных приростов титров этих антител. Мы попытались применить тот же принцип к оценке индукции ЖГВ иммунологической памяти.

Использование усредненных до- и поствакцинальных показателей в отношении индукции Т-клеток памяти изученных фенотипов оказалось весьма неубедительно, поскольку величины их приростов были очень скромными (табл. 1). Близкие по значению результаты получили американские исследователи при использовании такого же подхода (средние значения) при оценке способности ИГВ стимулировать Т-клетки памяти [8]. Все это в совокупности побудило нас прибегнуть к другому методу анализа: по индивидуальным показателям изменений уровней

изучаемых Т-клеток (кратность изменения), тем более что в последние годы главной тенденцией в вакцинопрофилактике является ее индивидуализация, то есть разработка новых подходов как к вопросу о необходимости вакцинации, так и к методам оценки ее эффективности для каждого конкретного человека [3].

Сравнение этих величин в трех группах волонтеров (рис. 1, 2) показало, что кратность прироста оказалась самой высокой у лиц с наличием гуморального иммунного ответа на вакцинацию (средние значения для CD45RO⁺ лимфоцитов 1,5-1,9, для CD45RA⁺ лимфоцитов 1,3-1,5) и существенно меньше у привитых волонтеров без иммунного ответа (соответственно 1,1-1,3 и 1,1-1,5). Самые низкие значения фиксировали у людей из контрольной группы плацебо (соответственно 1,1-1,2 и 1,0-1,3). При этом в отличие от привитых у последних не наблюдалось ни одного случая увеличения уровней всех субпопуляций Т-клеток в 1,5 и более раза (то есть на 50% и более), тогда как доля таких лиц среди вакцинированных первой группы достигала 36-57% для CD45RO⁺ и 14-36% для CD45RA⁺ лимфоцитов (табл. 2).

На наш взгляд, полученные результаты свидетельствуют о следующем.

Во-первых, интраназальная вакцинация ЖГВ приводит у значительной части людей к активации CD45RO⁺Th и CD45RO⁺ ЦТЛ памяти. По-видимому, эту активацию можно фиксировать в проточной цитометрии в периферической крови, используя только одну из выбранных нами меток, поскольку результаты, полученные по всем трем меткам (CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺), имели очень высокий уровень корреляции. Конечно, такой анализ не дает полного представления о пуле активированных клеток памяти, специфичных к вирусу гриппа. Безусловно, они присутствуют в популяции изученных клеток (об этом свидетельствуют убедительные отличия результатов в группе лиц с антигенным стимулом, т.е. у привитых ЖГВ, и без такового, т.е. в контрольной группе). Но ответить на вопрос, какова доля таких клеток, можно будет только после разработки более или менее простой методики их тестирования. В настоящее время нами такая методика разрабатывается.

Во-вторых, мы обнаружили достоверное поствакцинальное увеличение у волонтеров не только Т-клеток иммунологической памяти, но и «наивных» лимфоцитов фенотипа CD45RA⁺, хотя интенсивность такого увеличения была ниже (рис. 2, табл. 2). При парентеральной иммунизации ИГВ аналогичный феномен отсутствовал [8]. В этой связи можно высказать предположение о том, что индукция этих клеток является особенностью мукозальной вакцинации ЖГВ. С другой стороны, недавно обнаружен феномен реэкспрессирования на Т-клетках молекул

CD45RA⁺ при острых инфекциях людей, вызванных вирусом Эпштейна–Барр [5] и цитомегаловирусом [14]. Такие клетки оказались устойчивыми к апоптозу и несли ряд CD-молекул фенотипа памяти. На основании этих данных авторы отнесли их к особому фенотипу клеток памяти. Не исключено, что после вакцинации мы фиксировали прирост именно этих клеток.

В-третьих, во всех группах присутствовали лица со снижением уровня всех изучаемых подтипов Т-лимфоцитов в поствакцинальный период (рис. 1, 2). Правда, у абсолютного большинства из них кратность такого снижения оказалась недостоверной. Тем не менее, вполне вероятно, что данный феномен отражает общее снижение напряженности противогриппозного иммунитета у части добровольцев в период между заборами образцов крови. Отбор материалов проходил в октябре 2005 г. Именно в этот период (октябрь–ноябрь) отмечено ежегодное снижение уровня коллективного противогриппозного иммунитета населения [1].

И наконец, полученные результаты (рис. 1, табл. 2) свидетельствуют о наличии определенной связи между поствакцинальным накоплением Т-клеток памяти в периферической крови, с одной стороны, и наличием системного гуморального ответа на прививку, с другой. Однако эта связь не абсолютна, поскольку у части людей (10-25%), не ответивших на ЖГВ достоверным увеличением концентрации сывороточных антител, наблюдалось возрастание уровня CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺ и CD8⁺CD45RO⁺Т-лимфоцитов. При более детальном рассмотрении иммунного статуса таких лиц оказалось, что у подавляющего большинства из них (86%) были обнаружены поствакцинальные приросты показателей клеточного иммунитета по данным МТТ-теста и/или накопление локальных IgA-антител в секретах носа (иммуноферментный анализ).

Таким образом, обобщая полученные данные, можно отметить следующее.

Впервые проведено исследование у людей активационной способности мукозальной вакцины (ЖГВ) в отношении ЦТЛ (CD8⁺) и Th (CD4⁺) периферической крови фенотипов CD45RO⁺ и CD45RA⁺.

Показано, что у значительной части вакцинированных (35-60%) однократная иммунизация ЖГВ сопровождается достоверным увеличением уровня этих клеток.

Увеличение доли этих клеток после вакцинации происходит не только у лиц с системным гуморальным иммунным ответом на прививку, но и у людей без такого ответа (до 25% иммунизированных).

Данные об изменении поствакцинальных уровней всех изученных субпопуляций Т-лимфоцитов памяти (CD45RO⁺, CD4⁺CD45RO⁺,

CD8⁺CD45RO⁺) имеют высокий уровень корреляции.

В ответ на иммунизацию ЖГВ происходит возрастание в периферической крови количества не только Т-лимфоцитов с маркером иммунологической памяти (CD45RO⁺), но и «наивных» Т-лимфоцитов фенотипа CD45RA⁺.

Необходима разработка метода оценки иммуногенности гриппозных вакцин с позиции стимуляции этими препаратами специфических субпопуляций клеток памяти.

Список литературы

1. Денисов Г.М., Иванников Ю.Г., Скрипченко Г.С., Найхин А.Н. Методические рекомендации по изучению коллективного иммунитета к вирусу гриппа в рамках эпидемиологического надзора за этой инфекцией в стране: Метод. рекомендации. — Л., 1984. — 68 с.
2. Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — 395 с.
3. Медуницын Н.В. Вакцинология. — М.: Триада-Х, 2004. — 448 с.
4. Найхин А.Н., Доница С.А., Кустикова Ю.Г., Каторгина Л.Г., Руденко Л.Г. Моноклональная иммуноферментная тест-система для оценки секреторного иммунитета к вирусам гриппа А и В // *Вопр. вирусологии*. — 1997. — № 5. — С. 212-215.
5. Dunne P.J., Faint J.M., Gudgeon N.H., Fletcher J.M., Plunkett F.J., Soares M.V., Hislop A.D., Annels N.E., Rickinson A.B., Salmon M., Akbar A.N. Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential // *Blood*. — 2002. — Vol. 100, N 3. — P. 933-940.
6. Faint J.M., Annels N.E., Curnow S.J., Shields P., Pilling D., Hislop A.D., Wu L., Akbar A.N., Buckley C.D., Moss P.A., Adams D.H., Rickinson A.B., Salmon M. Memory T cells constitute a subset of the human CD8⁺CD45RA⁺ pool with

distinct phenotypic and migratory characteristics // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 167. — P. 212-220.

7. Hermiston M.L., Xu Z., Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells // *Ann. Rev. Immunol.* — 2003. — Vol. 21. — P. 107-134.

8. McElhaney J.E., Pinkoski M.J., Meneilly G.S. Changes in CD45 isoform expression vary according to the duration of T-cell memory after vaccination // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 1995. — Vol. 2. — P. 73-81.

9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular-growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Meth.* — 1983. — Vol. 65. — P. 55-63.

10. Sallusto F., Geginat J., Lanzavecchia A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance // *Annu. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 22. — P. 745-763.

11. Sallusto F., Lanzavecchia A. Exploring pathways for memory T cell generation // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 108. — P. 805-806.

12. Waldrop S.L., Pitcher C.J., Peterson D.M., Maino V.C., Picker L.J. Determination of antigen-specific memory/effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 99. — P. 1739-1750.

13. Williams M.A., Bevan M.J. Effector and Memory CTL Differentiation // *Annu. Rev. Immunol.* — 2007. — Vol. 25. — P. 171-192.

14. Wills M.R., Carmichael A.J., Weekes M.P., Mynard K., Okecha G., Hicks R., Sissons J.G. Human virus-specific CD8⁺ CTL clones revert from CD45RO^{high} to CD45RA^{high} in vivo: CD45RA^{high} CD8⁺ T cells comprise both naive and memory cells // *J. Immunol.* — 1999. — Vol. 162. — P. 7080-7087.

поступила в редакцию 27.05.2008

принята к печати 31.05.2008