

УДК 578.7; 571.21

ИММУНОГЕННОСТЬ И ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНАКТИВИРОВАННЫХ И ЖИВЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ ГОМОЛОГИЧНОГО И ГЕТЕРОСУБТИПИЧЕСКОГО ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУСАМИ ГРИППА*

© 2020 Е.Ю. Боравлева¹, А.В. Луницин², А.П. Каплун³, Н.В. Быкова³,
И.В. Красильников⁴, А.С. Гамбарян^{1**}

¹ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов
им. М.П. Чумакова РАН, 108819 Москва, Россия; электронная почта: al.gambaryan@gmail.com

² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии»,
601125 пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

³ Московский университет тонкой химической технологии
им. М.В. Ломоносова, 119571 Москва, Россия

⁴ Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток,
ФМБА, 198320 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 19.02.2020

После доработки 19.03.2020

Принята к публикации 20.03.2020

Было проведено параллельное тестирование инактивированных (цельновирионных, сплит, субъединичных и адьювантных вакцин) и живых вакцин для сравнения иммуногенности и защитной эффективности. Исследовали гомологическую и гетеросубтипическую защиту от заражения вирусами гриппа H5N1 и H1N1 на мышинной модели. Однократная иммунизация живой или цельновирионной вакциной H5N1 вызвала высокий уровень сывороточных антител и обеспечила полную защиту от заражения летальной дозой вируса A/Chicken/Kurgan/3/05 (H5N1). Сплит-вакцины, применяемые в однократной дозе, были гораздо менее эффективными. Адьюванты повышали уровень антител. В то же время добавление одного из них (Iso-SANP) к сплит-вакцине приводило к парадоксальному результату: уровень антител повышался, но защитный эффект вакцины снижался. Все протестированные адьюванты изменяли соотношение антител IgG1 и IgG2a. Иммунизация любым из протестированных гетеросубтипических живых вирусов обеспечивала частичную защиту от заражения H5N1 и снижала смертность мышей до низкого уровня, тогда как инактивированная вакцина против H1N1 вообще не обеспечивала защиты от вируса гриппа H5N1. После иммунизации субъединичными вакцинами с адьювантом и заражения гетеросубтипическим вирусом мы наблюдали более тяжелое течение болезни и более быструю смерть по сравнению с непривитыми животными.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вирус гриппа А, живая инактивированная вакцина, адьювант.

DOI: 10.31857/S0320972520050048

ВВЕДЕНИЕ

Вакцинация является главным инструментом профилактики гриппа. По оценкам, в сезон 2018–2019 гг., вакцинация предотвратила 4,4 миллиона заболеваний, 2,3 миллиона посещений врачей, 58 000 госпитализаций и 3500 смертей от гриппа в США [1].

Вакцинация снижает риск заболевания гриппом на ~50% в зависимости от сезона, обстановки, возрастной группы, типа вируса и степени антигенного соответствия между вакцинами и циркулирующими вирусами [2]. Производятся различные типы противогриппозных вакцин: инактивированные вакцины из целого вируса (цельновирионные) (цИГВ), расщеплен-

Принятые сокращения: КЭ – куриные яйца с развивающимся эмбрионом; ВАЖ – вирусосодержащая аллантоисная жидкость; НА – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; цИГВ, цельновирионная инактивированная вакцина против гриппа; ИГВ – трехвалентная инактивированная вакцина против гриппа; ЖГВ – живая аттенуированная вакцина против гриппа; EID₅₀ – 50% инфекционная доза в КЭ; TCID₅₀ – 50% инфекционная доза в культуре клеток; LD₅₀ – 50% летальная доза; SANP – тритерпеноиды коры березы; Ха – холодоадаптированный.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-045, 12.05.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ные (сплит), субъединичные вакцины, содержащие только поверхностные антигены, и вакцины с добавлением адъювантов (адъювантные). Кроме того, производятся живые аттенуированные вакцины (ЖГВ) [3].

Цельновирионные инактивированные вакцины (цИГВ). Цельновирионные вакцины вызывают более сильный иммунный ответ, чем сплит и субъединичные вакцины, обеспечивая специфическую индукцию CD8⁺ Т-клеток и защищая мышью от летального гомологического и гетеросубтипического заражения [4]. ЦИГВ индуцируют две волны иммунного ответа: ранний (независимый от Т-клеток) В-клеточный прирост высокоаффинных антител и поздний Т-клеточный ответ, в то время как сплит-вакцины вызывают только поздние Т-клеточные ответы. В то же время именно высокоаффинные антитела обладают хорошей вируснейтрализующей активностью [5].

В отличие от сплит-вакцин, цИГВ обеспечивают значительное снижение лейкоцитов периферической крови у мышью. При этом наблюдается быстрое индуцирование и массовое продуцирование альфа-интерферона (IFN α). Сплит и субъединичные вакцины, изготовленные из того же штамма вируса гриппа, не вызывают этих эффектов [6].

Воспалительные реакции в месте введения являются ограничивающим фактором для широкого применения цИГВ. Тем не менее моновалентные цельновирионные вакцины могут быть оптимальными в условиях пандемии, когда ключевым фактором является время производства [7].

Сплит и субъединичные вакцины. Сплит и субъединичные вакцины менее реактогенны, но их недостатком является низкая эффективность [8].

Адъювантные вакцины. Одним из способов повышения эффективности вакцин является добавление адъювантов, которые могут играть важную роль в доставке антигена к антигенпрезентирующим клеткам [9]. MF59, AS03 и гидроксид алюминия, наиболее часто используемые в качестве адъювантов, усиливают иммунный ответ и способствуют выработке более высокого уровня антител [8].

Данные наблюдений и клинических испытаний свидетельствуют о безопасности MF59 и его способности повышать эффективность вакцин против гриппа у детей и пожилых людей [10]. Адъюванты MF59 и AS03 стимулировали выработку более эффективных антител, даже если они использовались с меньшей дозой антигена H5N1, чем вакцина без адъюванта [11]. В рандомизированном исследовании у здоровых пожи-

лых добровольцев вакцина с адъювантом MF59 продемонстрировала более высокую иммуногенность, чем обычная субъединичная вакцина. Однако связанная с вакцинацией генерализованная миалгия наблюдалась у 8,1% и 0,9% для адъювантной и обычной вакцин соответственно [12]. В исследовании, проводимом на общей популяции детей, относительная эффективность, иммуногенность и безопасность адъювантной субъединичной противогриппозной вакцины с MF59 (aP1V4) и лицензированной в США неадъювантной вакцины была одинаковой, в то время как в подгруппе 6–23 месяцев эффективность aP1V4 была значительно выше, чем у вакцины-компаратора. Профили безопасности были схожими, но побочные эффекты регистрировались чаще для aP1V4, чем при использовании компаратора [13, 14].

Трехкратная вакцинация хорьков рекомбинантным гемагглютинином (НА) с добавлением аддавакса, MF59-подобного адъюванта, вызвала более высокие приросты антител с более широким перекрестно-реактивным потенциалом, чем индуцированные инфекцией вируса гриппа, и этот перекрестно-реактивный ответ, вероятно, коррелировал с повышенным уровнем антител против стеблевой части гемагглютина [15].

В слепом рандомизированном исследовании на пожилых людях сравнивали сезонную трехвалентную противогриппозную вакцину с адъювантной вакциной. Частота CD4⁺ Т-клеток, специфичных к вакцинным штаммам, была выше у реципиентов адъювантной вакцины [16].

Была проведена оценка иммуногенности и безопасности цельновирионной вакцины препандемического гриппа А/Н5N1 с гидроокисью алюминия (MG1109). Введение двух доз MG1109 не вызывало побочных эффектов у взрослых и вызывало сильный гуморальный иммунный ответ [17]. Недостатком алюминиевого адъюванта, особенно когда он используется с субъединичными вакцинами, является слабый клеточный иммунный ответ, поскольку алюминий стимулирует только Th2 клетки [18].

Новый адъювант на основе сапонина G3, содержащий дитерпеноид стевииол-гликозидов, индуцировал анамнестические вирус-специфические ответы CD8⁺ Т-клеток, которые обеспечивают более широкую защиту от антигенно отличных вирусов гриппа [19]. Провели сравнение адъювантов G3 и гидроокиси алюминия по степени индукции Th1 и Th2 ответов у мышью, иммунизированных антигриппозной сплит-вакциной. G3 повышал уровни как IgG1, так и IgG2a, тогда как Al(OH)₃ подавлял продукцию IgG2a. Результаты указывают на сильную способность

G3 индуцировать как клеточные, так и гуморальные иммунные ответы [20].

Испытывали на хорьках адъювант САF01 с доказанной способностью индуцировать CD4⁺ Т-клеточные и гуморальные ответы. САF01-адъювантная сплит-вакцина индуцировала защиту после гетерологичного заражения, несмотря на отсутствие специфических антител. Иммунитет, индуцированный этой вакциной, уменьшал симптомы системного заболевания и выделение вируса, но не уменьшал локальное воспаление в полости носа [21].

Адъювант глюкопиранозил-липид (агонист TLR4), в виде стабильной водно-масляной эмульсии (GLA-SE) в сочетании со сплит-вакциной, повышал титры антител в сыворотке, повышал соотношение IgG2c/IgG1 и усиливал защиту у старых мышей [22].

Адъювант CpG подавлял индукцию и размножение антиген-специфических клеток Treg, которые ослабляют противовирусный иммунитет против инфекции вирусом гриппа. CpG-адъювантные пептидные вакцины обеспечивали гетеросубтипическую защиту от гриппа, вероятно, путем ингибирования развития Treg и усилению Т-клеточного иммунитета [23].

Легочный сурфактант человека с карбоксивиниловым полимером, повышающим вязкость (SF-10), при добавлении к субъединичной антигриппозной вакцине индуцировал гемагглютинин-специфические цитотоксические Т-лимфоциты и повышал экспрессию гранзимы В в селезеночных CD8⁺ Т-клетках. Такие Т-клетки обладали высокой цитотоксичностью по отношению к клеткам-мишеням, экспрессирующим гемагглютинин. SF-10 индуцировал более высокую, опосредованную Т-лимфоцитами, цитотоксичность в легких на ранней стадии инфекции вирусом гриппа по сравнению с безадъювантной вакциной [24].

Гемозоин, синтетическая версия гемозоина, вызывающего малярию, был протестирован в качестве адъюванта для цельновирионной антигриппозной вакцины на мышинной модели. Гемозоин повышал иммуногенность вирионов и оказался перспективным адъювантом для цИГВ [25].

Адъюванты полиоксидоний и совидон широко используются в вакцинах «Гриппол» и «Совигрипп» в России. На долю «Гриппола» приходится ~60% российского рынка противогриппозных вакцин, но серьезных испытаний «Гриппола» и «Совигриппа» не проводили [26].

Живые вакцины. Живые аттенуированные вакцины создают путем реассортации или с помощью обратной генетики, конструируя вирус с генами NA и NA от эпидемических штаммов и

шестью генами от аттенуированных, холодоадаптированных (Ха) донорских штаммов. Ха доноры A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) и A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) используются в США и в России соответственно.

В Соединенных Штатах в 2003 году была одобрена для использования живая аттенуированная вакцина против гриппа FluMist. Эта вакцина, вводимая интраназально, стимулировала местный иммунитет в верхних дыхательных путях и, имитируя естественную инфекцию, вызвала многоплановый иммунный ответ [27].

Многие исследования показали безопасность и эффективность ЖГВ, особенно для маленьких детей [28–40].

ЖГВ реже, чем трехвалентная инактивированная вакцина против гриппа (ИГВ), вызывает тяжелые побочные эффекты (синдром Гийена–Барре и паралич) [41]. У детей в возрасте от 6 месяцев до 7 лет ЖГВ превосходит ИГВ по показателям иммунного ответа и защиты [34, 36, 42].

Безопасность ЖГВ показана не только для когорт, вакцинация которых рекомендуется в первую очередь (дети 2–7 лет), но также для детей 6–24 месяцев, а также для детей с легкими формами астмы и рецидивирующего обструктивного бронхита [43]. ЖГВ характеризуется низким риском системных аллергических реакций у молодых людей с аллергией на яйца. Вакцина хорошо переносится пациентами с контролируемой астмой или обструктивным бронхитом [44]. Применение ЖГВ при астме не повышало риск побочных респираторных эффектов [45, 46].

Иммунизация ИГВ индуцирует более высокие средние геометрические титры антител, а ЖГВ продуцирует более высокие Т-клеточные ответы, особенно к гипервариабельным участкам HA [47]. Преимущество живых вакцин в первую очередь связано с продукцией CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, специфических к разнообразным вирусам гриппа, что обеспечивает более широкий иммунный ответ. Поэтому ЖГВ менее, чем ИГВ чувствительны к антигенному несоответствию между вакциной и циркулирующими вирусами [48]. ЖГВ значительно увеличивала количество наивных, запоминающих и переходных В-клеток на 30-й день после вакцинации, тогда как ИГВ повышала количество плазмобластов на 7-й день. Эти результаты свидетельствуют о том, что, ЖГВ и ИГВ индуцировали существенно отличающиеся В-клеточные ответы у вакцинированных детей [49].

У детей в возрасте 6–36 месяцев ЖГВ обеспечивала хорошую защиту от штаммов гриппа, отличных от вакцинного [50]. Индукция гетеросубтипической перекрестной защиты делает

возможным использование ЖГВ в качестве универсальной вакцины против гриппа в режиме первичной вакцинации в случае новой пандемии [51].

Несмотря на высокую эффективность ЖГВ среди маленьких детей, у взрослых ИГВ обычно более эффективен. Общенациональное когортное исследование в Финляндии в сезоне 2015/16 гг. показало, что ИГВ обеспечивает более эффективную защиту, чем ЖГВ [52]. В сезоне 2004–2005 гг., когда циркулирующие вирусы отличались от тех, которые были включены в вакцину, инактивированная вакцина эффективно предотвращала лабораторно подтвержденные заболевания гриппом у здоровых взрослых. Живая вакцина также предотвращала заболевания гриппом, но была менее эффективной [53, 54].

Все виды вакцин демонстрируют безопасность и эффективность в специальных исследованиях, тем не менее результаты рандомизированных контролируемых слепых исследований иногда не столь благополучны.

Анализ систематических обзоров из Кокрановской базы данных показал, что инактивированные противогриппозные вакцины снижают вероятность заболевания гриппом у здоровых взрослых с 2,3% без вакцинации до 0,9%. Частота гриппоподобных заболеваний (ГПЗ) также уменьшается после вакцинации, но степень защиты не постоянная. Доказательства сокращения госпитализаций и потери рабочего времени мало достоверны. Защита от гриппа и ГПЗ у матерей и новорожденных была еще ниже, чем в других популяциях. С другой стороны, вакцинация сопряжена с риском нежелательных побочных эффектов [2].

Иммунизация инактивированной вакциной у детей с ранее существовавшими заболеваниями не уменьшала число случаев респираторных заболеваний в течение сезона гриппа [55].

После вакцинации ИГВ иногда наблюдали парадоксальные эффекты. Эффективность вакцины против А (Н3N2) в сезон гриппа 2014–2015 гг. составляла –3% [56]. Вакцинация в предыдущем сезоне обычно обеспечивала остаточную защиту, но иногда при этом снижала эффективность текущей сезонной вакцинации [57]. В течение сезона 2015–2016 гг. эффективность вакцины в профилактике А (Н1N1) pdm09 была низкой, особенно для лиц, вакцинированных в предыдущем сезоне [58]. Gherasim et al. [59] и Rondy et al. [60] тоже отмечали отрицательное влияние предыдущей вакцинации на эффективность текущей вакцинации против вируса А (Н3N2).

Наилучший пример вакцинации наблюдали во время пандемии 1968 года. Моновалентная

цельновирионная вакцина, соответствующая циркулирующему вирусу, имела эффективность 66–93% [7].

Пандемии наиболее опасны для жизни и здоровья человека, поэтому эффективная защита от новых пандемий, возможно, важнее, чем защита в межпандемические сезоны.

Для определения оптимальной стратегии смягчения последствий пандемии использовали возрастную модель. Расчеты показали, что при ограниченном запасе вакцин в начале пандемии гриппа следует начать кампанию вакцинации на ранней стадии, чтобы задержать появление большой волны заболеваний и замедлить ее рост. Наиболее эффективной стратегией является использование сезонной ЖГВ и целевой возрастной группы 5–19 лет [61].

В этом исследовании мы описываем параллельное тестирование различных типов вакцин при гомологичном и гетеросубтипическом заражении. В экспериментах на мышах мы сравнивали цельновирионные, сплит-вакцины с адьювантами различной природы и без них, и живые вакцины. Изучали способность вакцин разных типов защищать от специфического и гетеросубтипического контрольного заражения вирусами гриппа H1N1 и H5N1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы. Список использованных в работе вирусов приводится в табл. 1.

Апатогенные вирусы диких птиц A/duck/Moscow/4203/2010, A/duck/Moscow/4238/2010, A/duck/Moscow/4182/2010 и A/duck/Moscow/4031/2010 выделены из фекалий кряквы, как описано ранее [62, 63]. Вирус VNH5N1-PR8/CDC-RG является реассортантом, сконструированным в США в отделе гриппа Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, USA), содержит модифицированный ген гемагглютинаина и ген нейраминидазы (NA) от вируса A/Vietnam/1203/2004, а остальные гены – от вакцинного штамма A/Puerto Rico/8/34. Данный вирус любезно предоставлен доктором R. Donis (CDC, USA). Ха штамм A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и реассортант A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57 были любезно предоставлены доктором Л.Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург). Ха реассортант A/Vietnam-Leningrad/134/17/57 был получен путем реассортации с донором A/Leningrad/134/17/57, как описано в работе Gambaryan et al. [64]. Не адаптированный к куриным яйцам с развивающимся эмбрионом (КЭ) вирус человека A/Nib/26/90M (H3N2) был

Таблица 1. Вирусы гриппа А, использованные в работе

Штамм	Субтип	Краткое обозначение	Примечание
A/Vietnam/1203/2004-PR8/CDC-RG	H5N1	rVN-PR	вакцинный штамм (CDC, Atlanta, USA)
A/Puerto Rico/8/34	H1N1	PR8	вакцинный штамм
A/Leningrad/134/17/57	H2N2	Len	Ха донор аттенуации
A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57	H1N1	NC-Len	Ха вакцинный штамм
Vietnam/1203/04-Leningrad/134/17/57	H5N2	VN-Len	Ха реассортант 1/7*
A/Nib/26/90-M	H3N2	H3N2 Hu	вирус гриппа человека
A/duck/Moscow/4203/2010	H3N8	H3 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4238/2010	H4N6	H4 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4182/2010	H5N2	H5 Avi	апатогенный вирус
A/duck/Moscow/4031/2010	H6N2	H6 Avi	апатогенный вирус
A/Chicken/Kurgan/3/05	H5N1	Ku/05	высоковирулентный вирус кур
A/Hamburg/5/2009-MA	H1N1	H1N1 pdm09	пандемический штамм, адаптированный к мышам

* Ген гемагглютинина H5 и 7 остальных генов от донорского штамма.

любезно предоставлен доктором Джеймсом Робертсоном (Национальный институт биологических стандартов и контроля, Соединенное Королевство). Пандемический вирус А/Hamburg/5/2009 (H1N1) любезно предоставлен доктором М.Н. Матросовичем (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany). Адаптированный к мышам вариант А/Hamburg/5/2009-МА получен путем семи пассажей через легкие мышей. Он отличается от исходного вируса заменами HA-Asp225Gly и HA-Lys123Asn [65].

Высоковирулентный вирус А/кураца/Курган/3/2005 H5N1 любезно предоставлен доктором С.С. Ямниковой (Институт вирусологии им. Ивановского, Москва). Все работы с этим вирусом выполняли в условиях третьего уровня биологической безопасности в Федеральном научном центре вирусологии и микробиологии, пос. Вольгинский, Владимирская область, Россия.

Культивирование вирусов. 10² инфекционных единиц (EID₅₀, 50% инфекционная доза в КЭ) вирусов инокулировали в десятидневные эмбрионированные куриные яйца и инкубировали 48 ч при 36 °С или 96 ч при 32 °С (для адаптированных к холоду штаммов). Собирали вирусосодержащие аллантоисные жидкости (ВАЖ) и оценивали содержание вируса методом гемагглютинации [26]. Инфекционность ВАЖ определяли титрованием на КЭ и выражали в EID₅₀.

Образцы для иммунизации. В работе использовали инактивированные цельновирионные вакцины, сплит-вакцины с адьювантами или без них, субъединичные вакцины с адьювантом полиоксидонием, а также живые вакцины

(табл. 2). Вакцина «Гриппол[®] плюс» («Petrovax», Россия), содержащая поверхностные антигены вирусов: H1N1 – А/Калифорния 7/2009/, H3N2 – А/Виктория 210/208 NYMC X-187, В/Брисбен/60/2008 (по 5 мкг HA каждого из вирусов) и 0,5 мг полиоксидония в одной человеческой дозе, до употребления хранили с соблюдением температурного режима строго по инструкции.

Адьюванты: гидроксид алюминия («Serva», Германия); сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазинбромид (полиоксидоний) и сополимер N-винилпирролидона и 2-метил-5-винилпиридина (совидон) («Петровакс Фарм», Россия). Положительно заряженные составные наночастицы гликофинголипида, мирамистина и дигидрохвертицина (GMD), отрицательно заряженные сферические аморфные наночастицы тритерпеноидов коры березы (SANP) и SANP с добавлением изопропилпальмитата (Iso-SANP) были получены, как описано в работе Каплун с соавт. [66].

Иммунизация мышей инактивированными препаратами. Использовали 6-ти недельных мышей породы BALB/c («Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). Вводили мышам по 100 мкл свежеприготовленных растворов антигенов и плацебо в каждую из задних лапок. Ежедневно взвешивали мышей; на 11-й, 18-й и 30-й после иммунизации отбирали по 100 мкл крови из хвоста.

Иммунизация мышей живыми штаммами вирусов гриппа. Вводили мышам интраназально по 50 мкл вирусосодержащих растворов под легким

Таблица 2. Характеристика инактивированных вакцинных препаратов, использованных в работе

Вакцинные композиции	Субтип	Краткое обозначение	Доза НА мкг/мышь	Адъювант мкг/мышь
Очищенный вирус VN-PR	H5N1	ц.вирионная	2	–
Очищенный вирус PR8	H1N1	H1N1 ц.вирионная	2	–
Расщепленный вирус VN-PR	H5N1	сплит	2	–
H5 сплит + Al(OH) ₃	H5N1	сплит + Al(OH) ₃	2	50
H5 сплит + полиоксидоний	H5N1	сплит + полиоксидоний	2	50
H5 сплит + совидон	H5N1	сплит + совидон	2	50
H5 сплит + GDM	H5N1	сплит + GDM	2	50
H5 сплит + SANP	H5N1	сплит + SANP	2	50
H5 сплит + Iso-SANP	H5N1	сплит + Iso-SANP	2	50
«Гриппол [®] плюс» с полиоксидонием	H1N1	Гриппол 2011	1	100
	H3N2		1	
	B		1	
НА и NA вируса A/NIB/26/90 с полиоксидонием	H3N2		2	100
Контроль			–	–

эфирным наркозом. Инфекционная доза составляла $\sim 10^7$ EID₅₀/мышь.

Взятие образцов крови мышей для определения антител. Отрезали мышам кончик хвоста и собирали кровь в забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) с 0,01 М цитратом натрия и 25 М.Е./мл гепарина. Центрифугировали, добавляли к супернатанту 1/10 объема 10%-ной суспензии каолина, выдерживали 5 ч, периодически встряхивая. Центрифугировали и хранили в замороженном виде. Концентрация сывороток, полученных таким образом, составляет 1/5 от цельной сыворотки.

Определение антител к вирусам гриппа в сыворотках мышей. Уровни сывороточных антител определяли методом ИФА. Плашки Nunc, MaxiSorp (Sigma-Aldrich, США) сенсibilизировали фетуином, добавляли вирусосодержащую аллантоисную жидкость, содержащую 64 гемагглютинирующие единицы вируса соответствующего субтипа, выдерживали в течение ночи при 4 °С, затем отмывали и блокировали 0,2% раствором БСА на PBS, 1 ч. Блокирующий раствор удаляли, в лунки вносили по 100 мкл буфера (0,2% БСА/Tween 20 = 1/1000 (v/v) на PBS) и титровали на нем сыворотки, начиная с разведения 1 : 20. Лунки без вируса служили отрицательным контролем. Инкубировали 4 ч при 4 °С. Отмывали и добавляли меченные пероксидазой

антитела против IgG1 и IgG2a иммуноглобулинов мыши («Serotec», Germany). Инкубировали 2 ч, промывали и проводили цветную реакцию с ортофенилендиамином [64].

Аэрозольное контрольное заражение мышей. Контрольное заражение проводили на 30-й день после иммунизации. Мышей метили и помещали в 50-литровую прозрачную пластиковую камеру с подводящей и отводящей трубками. По первой трубке поступал аэрозоль инфекционного вируса, полученный на ультразвуковом ингаляторе «Муссон» («Алтайский приборостроительный завод» Россия), а отводящая трубка через НЕРА-фильтр была подключена к перистальтическому насосу, работающему со скоростью 0,5 литра в минуту. Расчет содержания инфекционных вирусных частиц в единице объема аэрозоля и объема вдыхаемого воздуха производили, как описано ранее [67, 68].

Мышей подвергали воздействию аэрозоля, содержащего 10^5 – 10^6 EID₅₀ вируса на литр, в течение 10 мин. Дозировка вируса A/Chicken/Kurgan/3/05 на мышь составила $\sim 10^3$ EID₅₀/мышь, что составляет ~ 100 LD₅₀ (LD₅₀ – 50% летальная доза). Дозировка адаптированного для мыши вируса A/Hamburg/5/2009-MA на мышь составляла $\sim 10^4$ EID₅₀/мышь, что ниже, чем LD₅₀. На четвертый день после заражения отбирали легкие у 3-х мышей из каждой группы и

определяли титры вируса (TCID₅₀, 50% инфекционная доза в культуре клеток) в культуре MDCK, как описано ниже. Мышей ежедневно взвешивали и контролировали падеж.

Определение содержания вируса в легких мышей. Легкие мышей растирали с мелкодисперсным стеклом в стерильных условиях. Добавляли по 1 мл PBS с гентамицином (0,1 мг/мл), суспендировали и центрифугировали. Собирали супернатанты. Культуру MDCK, выращенную на 96-луночных планшетах промывали и добавляли в каждую лунки по 200 мкл среды Игла MEM с добавлением L-глутамина (0,1%, гентамицина (1 мг/мл) и БСА (5 мг/мл)). В крайние лунки добавляли по 50 мкл легочных элюатов и титровали в 7 лунках, перенося по 50 мкл раствора. Через 16 ч добавляли в лунки по 20 мкл раствора глутарового альдегида, до конечной концентрации 0,02%, выдерживали 30 мин, сливали среду и промывали лунки. Добавляли по 50 мкл раствора фетуина, меченного пероксидазой хрена в буфере (0,2% БСА/Tween 20 = 1/1000 (v/v) и 1 мкМ ингибитора нейраминидазы oseltamivir phosphate на PBS. Через 60 мин инкубации при 4 °С планшеты отмывали, добавляли раствор аминоэтилкорбазола с перекисью водорода и выдерживали 30 мин. Клетки, инфицированные вирусом, окрашивались в красный цвет. Подсчет окрашенных клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа БИОЛАМ П-1 («ЛОМО», Россия).

Статистическая обработка результатов. Для статистического анализа использовали критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение живой, цельновирионной и сплит-вакцин с адьювантами и без них. Эффективность экспериментальных вакцин исследовали на мышах. Группы мышей инокулировали интраназально живыми вакцинами или внутримышечно инактивированными вакцинами и плацебо. Для изучения влияния адьювантов на эффективность вакцинации сравнивали сплит-вакцины с добавками адьювантов со сплит-вакциной, цельновирионной и живой вакциной. В качестве адьювантов были протестированы широко используемые гидроксид алюминия, полиоксидоний и совидон, а также экспериментальные препараты GMD, SANP и Iso-SANP.

Потеря веса и выживаемость в группах мышей, иммунизированных инактивированными экспериментальными вакцинами, а также холодадаптированными реассортантами VN-Len и

NC-Len не отличались от группы плацебо (данные не представлены).

Цельновирионная и живая вакцины обеспечивали максимальный прирост антител и почти 100%-ную защиту от последующего контрольного заражения (челленджа) высокопатогенным вирусом H5N1. Сплит-вакцина обеспечивала меньший прирост антител и примерно 50%-ную защиту.

Добавление различных адьювантов к сплит-вакцине приводит к очень разным результатам. Три из них (гидроксид алюминия, полиоксидоний и SANP) повышали уровень антител и протективный эффект вакцинации. Совидон незначительно влиял на уровень антител и немного увеличивал выживаемость мышей. GMD незначительно влиял на уровень антител и снижал выживаемость мышей. Iso-SANP повышал уровень антител, но резко снижал защитный эффект сплит-вакцины ($p < 0,05$). Даже лучшие адьюванты: гидроксид алюминия, полиоксидоний и SANP не повысили качество сплит-вакцины до уровня цельновирионной и, тем более, живой вакцины (табл. 3).

Некоторые адьюванты, не причиняя мышам видимого вреда и повышая уровень суммарных анти-H5N1 IgG антител, приводят к ухудшению выживаемости мышей после челленджа. Для лучшего понимания этого явления мы изучили динамику накопления антител IgG1 и IgG2a отражающих уровень гуморального и клеточного иммунного ответа соответственно.

Соотношение IgG1/IgG2 у индивидуальных мышей при вакцинации цельновирионной, сплит-вакцинами с адьювантами и живой вакциной представлено на рис. 1.

Вакцины отличаются друг от друга не только по способности повышать уровень антител. Они отличались и по соотношению IgG1 к IgG2a, а также по разбросу уровней антител между отдельными животными. Наивысший уровень антител вызывается живой вакциной. Инактивированная цельная вакцина также индуцировала высокие и стабильные уровни антител, хорошо сбалансированные в соотношении IgG1/IgG2a. Сплит-вакцина индуцировала невысокие, но примерно равные уровни IgG1 и IgG2a у всех мышей. Гидроксид алюминия резко увеличивал уровень антител IgG1, что отражает повышенный гуморальный иммунитет, но у отдельных мышей уровень IgG2a был очень низок. Разброс уровней IgG2a между мышами в этой группе был более, чем в 50 раз. Иными словами, гидроксид алюминия у части мышей блокирует клеточный иммунитет. Полиоксидоний увеличивал уровень IgG2a, но у некоторых мышей резко снижался уровень IgG1, что указывало на ослабление гу-

Таблица 3. Влияние разных адъювантов на иммуногенность и протективность H5N1 вакцин

Инактивированные вакцины	Титр антител*	Защита**	% Защиты	Вирус в легких***
Сплит	352	26/59	44	4,0 ± 0,5
Сплит +Al(OH) ₃	1215	29/38	76	3,0 ± 0,7
Сплит + полиоксидоний	473	30/40	75	3,0 ± 0,5
Сплит + совидон	387	25/40	63	3,0 ± 0,8
Сплит +GDM	342	10/40	25	6 ± 1
Сплит + SANP	1031	31/39	79	3,0 ± 0,7
Сплит + Iso-SANP	619	0/40	0	6 ± 1
Цельновирионная	1966	59/60	98	2
Живая вакцина VN-Len	6514	79/80	99	2
Плацебо	<20	0/200	0	6 ± 1

Примечание. Приводятся суммарные данные нескольких опытов.

* Средняя геометрического титра анти-H5N1 антител в группах.

** Число выживших/числу зараженных на 14-й день после челленджа 100 LD₅₀ вируса A/chicken/Kurgan/3/2005.

*** Содержание вируса A/chicken/Kurgan/3/2005 в легких мышей на третий день после челленджа (lg TCID₅₀).

морального иммунитета. Низкие уровни IgG1 были обнаружены также у части мышей, иммунизированных композицией «сплит + совидон».

Сплит и живые вакцины повышали уровни IgG1 и IgG2a вплоть до 30 дней после иммунизации (табл. 4). Al(OH)₃, полиоксидоний и SANP, которые повышали качество сплит-вакцины, повышали уровни IgG1 и IgG2a по сравнению с сплит-вакциной без адъювантов; и высокий уровень антител сохранялся до 30-го дня. В то же время адъювант Iso-SANP повышал уровень IgG2a до 11 дня, но дальнейшего роста не происходило, и к 30-му дню уровни антител были ниже, чем после вакцинации сплит-вакциной.

Понятно, почему выживаемость мышей в группе «сплит + Iso-SANP» ниже, чем в группе «сплит». Более интересно, что мыши в группе «сплит + Iso-SANP» умирали даже раньше, чем невакцинированные мыши с нулевым уровнем антител против H5N1. Это указывает на глубокую дезорганизацию защитных сил организма.

Эффективность различных типов вакцин при гетеросубтипической иммунизации. Чтобы изучить возможные последствия неспецифической иммунизации, мы провели серию экспериментов, в которых мышам вакцинировали вирусом гриппа одного субтипа, а затем заражали вирусами гриппа другого субтипа. В первую очередь

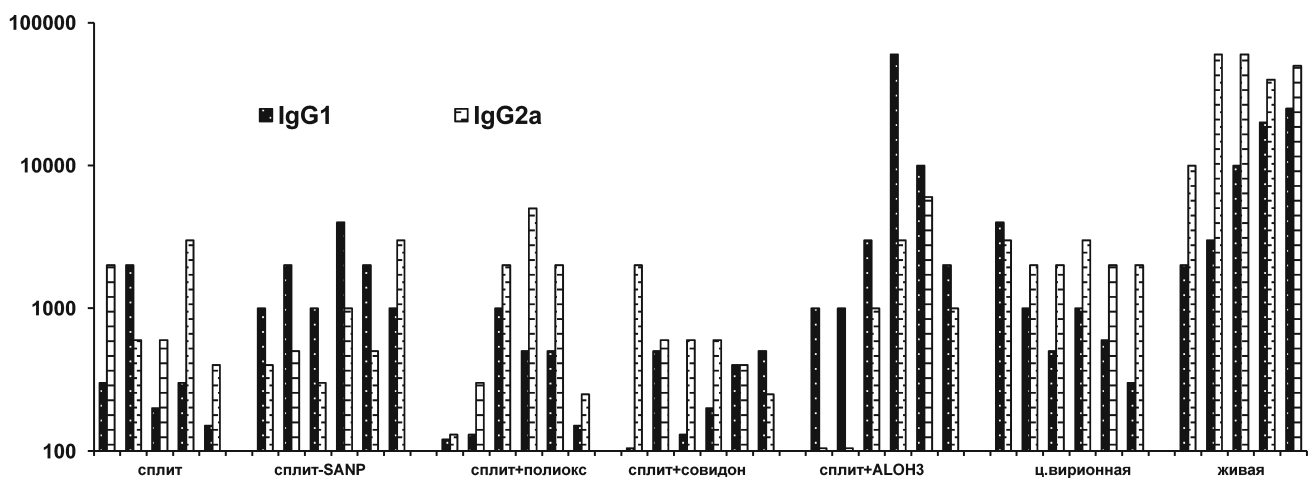


Рис. 1. Уровни анти-H5N1 IgG1 и IgG2a в сыворотках индивидуальных мышей при вакцинации сплит, сплит с добавками адъювантов, цельновирионной и живой вакцинами. Каждая пара столбцов на диаграмме показывает уровни антител у одной мыши

Таблица 4. IgG1 и IgG2a антитела к H5N1 в сыворотках мышей после вакцинации и динамика гибели мышей после челленджа

Вакцины	Тип антител	Титры антител (дни)*			Выживание (дни)**		
		11	18	30	7	8	9
Сплит	IgG1	37	192	203	80	50	40
	IgG2a	126	640	672			
Сплит + Al(OH) ₃	IgG1	197	2543	4121	100	80	70
	IgG2a	146	524	637			
Сплит + полиокс	IgG1	51	142	221	95	75	60
	IgG2a	138	670	715			
Сплит + совидон	IgG1	52	193	197	80	55	50
	IgG2a	156	450	430			
Сплит + SANP	IgG1	139	640	664	95	85	80
	IgG2a	304	658	672			
Сплит + Iso-SANP	IgG1	26	42	47	5	0	0
	IgG2a	238	182	154			
Цельновирioнная	IgG1	322	354	490	100	95	95
	IgG2a	4321	4538	4216			
Живая VN-Len	IgG1	721	1583	2534	100	100	100
	IgG2a	1532	3241	10 675			
Плацебо	IgG1	<20	<20	<20	40	10	0
	IgG2a	<20	<20	<20			

* Антитела к H5N1 на 11, 18 и 30 день после вакцинации, средние геометрические значения титров в ИФА.
 **% Выживания на 7, 8 и 9 день после контрольного заражения вирусом H5N1.
 Каждая группа содержала 20 мышей. Различия между группой плацебо и группой «сплит + Iso-SANP» статистически значимы ($p < 0,05$).

нас интересовал вопрос, как влияет субклиническое заболевание вирусом гриппа на выживаемость от последующего заражения высоковирулентным вирусом другого субтипа.

Мышей инфицировали Ха вирусами H1N1 и H2N2, вирусом человека A/Nib/26/90M (H3N2) и непатогенными вирусами гриппа диких уток с гемагглютинидами H3, H4, H5 и H6. У мышей, зараженных этими вирусами, признаков заболевания не наблюдали. Через 20 дней провели контрольное заражение высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1).

На рисунке 2 показана выживаемость предварительно инфицированных и контрольных мышей. Все контрольные мыши умерли к 8 дню, тогда как во всех ранее зараженных группах выжило 40–95% мышей. Таким образом, бессимптомная инфекция гетеросубтипическими вирусами гриппа в какой-то степени защищает от последующего заражения летальной дозой высоковирулентного вируса.

Для изучения сравнительной способности живых и инактивированных вакцин к перекрес-

стной защите от вирусов гриппа других субтипов мы иммунизировали мышей H5N1- и H1N1-вакцинами, после чего проводили челлендж высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1) (рис. 3).

Мыши, вакцинированные живым Ха реассортантом H5N2, после контрольного заражения продолжали прибавлять в весе и не проявили признаков заболевания. Среди вакцинированных цельновирioнной H5N1 вакциной часть мышей были угнетены, теряли аппетит, вследствие чего кривая среднего веса имеет небольшой провал на 4–7 дни. Падежа после челленджа в первых двух группах не наблюдали. В группе, вакцинированной H5N1 сплит-вакциной, кривая веса после челленджа резко идет вниз и до 50% мышей гибнет. Выжившие мыши начинали набирать вес после 10 дня.

Все мыши из группы, вакцинированной инактивированным H1N1 вирусом PR8, погибли так же, как и мыши из контрольной (не вакцинированной) группы. Мыши, иммунизированные живой Ха H1N1 вакциной A/New

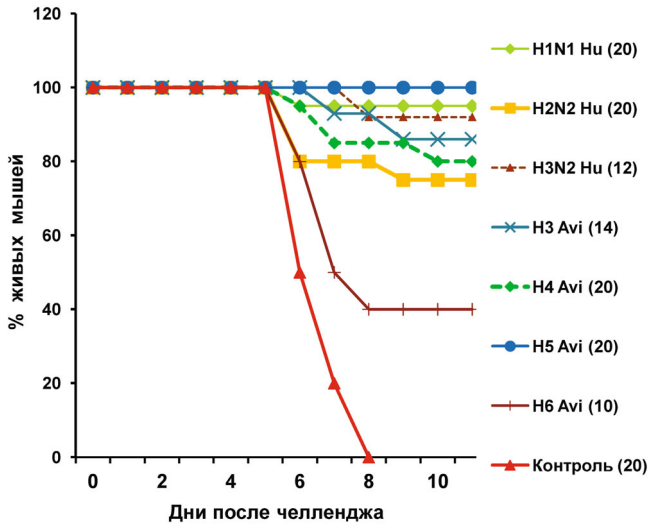


Рис. 2. Выживаемость интактных и предварительно инфицированных гетеросубтипическими вирусами гриппа мышей после контрольного заражения вирусом A/chicken/Kurgan/3/2005 (H5N1). Вирусы: холодадаптированный (Ха) вакцинный штамм A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57 (H1N1 Hu), Ха вирус A/Leningrad/134/17/57 (H2N2 Hu) и вирусы человека и диких уток (обозначения в табл. 1). В скобках указано число мышей в группах. Приведен результат типичного опыта. (С цветным вариантом рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

Caledonia-Leningrad/134/17/57, в первые дни после контрольного заражения заболевали и теряли в весе так же, как и контрольные мыши. Но начиная с 8-го дня, мыши начали набирать вес, и 90–100% из них выживало. Эти данные демонстрируют принципиальное различие между живыми и инактивированными вакцинами после гетеросубтипической иммунизации. Гетеросубтипическая вакцинация инактивированной вакциной бесполезна, а живая вакцина резко снижает летальность.

Для изучения вопроса, как влияет стандартная вакцинация от текущих штаммов на исход заболевания в случае появления нового пандемического вируса, мы вакцинировали мышей сезонной вакциной «Гриппол[®] плюс», содержащей поверхностные антигены вирусов: H1N1 — A/Калифорния 7/2009/, H3N2 — A/Виктория 210/208 NYMC X-187, B/Брисбен/60/2008 и 0,5 мг полиоксидония в одной человеческой дозе, а через 29 дней проводили челлендж высокопатогенным H5N1 вирусом. Группами сравнения служили мыши, вакцинированные специфической H5N1 сплит-вакциной, и интактные мыши. Кривые выживаемости после челленджа приведены на рис. 4.

В согласии с нашими предыдущими данными однократная вакцинация специфической сплит-вакциной обеспечила 40% выживаемость

при том, что все контрольные мыши погибли к 9-му дню. Мыши, иммунизированные неспецифической вакциной «Гриппол», не только погибли поголовно, но и начали гибнуть на день раньше контрольных мышей.

Схожий результат был получен при вакцинации мышей поверхностными антигенами H3N2 вируса A/NIB/26/90 с полиоксидонием (2 мкг HA + 100 мкг полиоксидония на мышью) и последующим челленджем пандемическим H1N1 вирусом. Вирулентность H1N1 вируса A/Hamburg/5/2009 была повышена путем 7 пассажей через мышинные легкие, что привело к заменам HA-Asp225Gly и HA-Lys123Asn. У контрольных мышей этот вирус вызывал хорошо регистрируемое заболевание с максимальной потерей веса к 5–7 дню после заражения, после чего мыши начинали набирать вес и, как правило, выздоравливали к 10-му дню.

На рисунке 5 представлены индивидуальные кривые веса вакцинированных и контрольных мышей после челленджа. Видно, что большинство вакцинированных мышей теряет в весе сильнее и начинают выздоравливать в среднем на два дня позже, чем контрольные мыши. Вероятно, предварительная гетеросубтипическая вакцинация истощает иммунную систему и замедляет образование защитных антител, что и обуславливает наблюдаемые эффекты повышения летальности и замедления выздоровления.

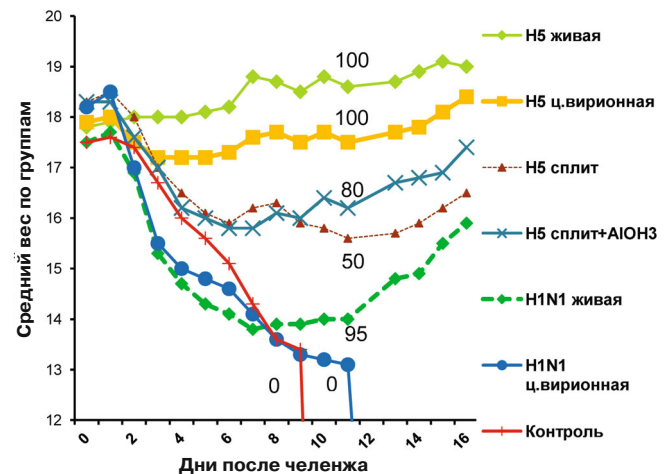


Рис. 3. Динамика веса мышей, иммунизированных специфическими и гетеросубтипическими вакцинами, после челленджа H5N1 вирусом. Цельновирионная, сплит, сплит+Al(OH)₃ — H5N1 вакцины; живая H5 — Ха реассортант VN-Len (H5N2), цельновирионная инактивированная H1N1 — A/Puerto Rico/8/34, живая H1N1 — Ха вакцина A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57. В каждой группе было по 20 мышей. Под кривыми среднего веса указан процент выживания в данной группе. Приведен результат типичного опыта

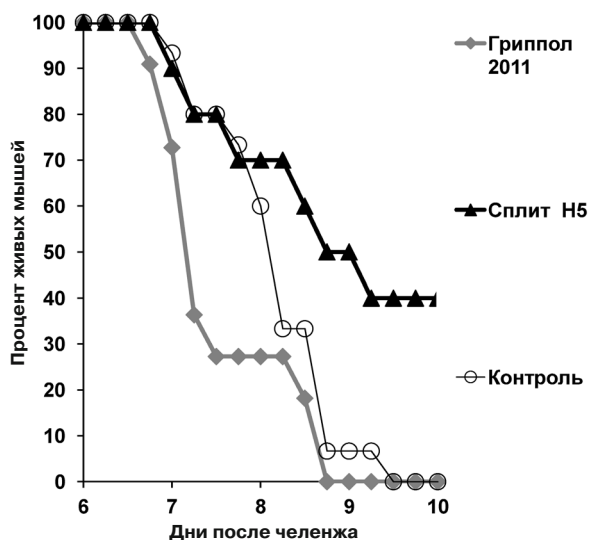


Рис 4. Выживаемость мышей, вакцинированных специфической и гетеросубтипической сплит-вакцинами, после челленджа вирусом H5N1. Состав субъединичной вакцины «Гриппол[®] плюс» и сплит-Н5 вакцины описан в разделе «Материалы и методы» и в табл. 2. Различия между группами статистически значимы ($p = 0,09$; логарифмический критерий). Приведен результат типичного опыта

Выводы:

- 1) Гетеросубтипическая вакцинация живой вакциной не предотвращает заболевания при последующем заражении H5N1 вирусом, но способствует выздоровлению и практически полностью предотвращает гибель мышей.
- 2) Гетеросубтипическая вакцинация инактивированной цельновирионной вакциной не обеспечивает никакой защиты от последующего заражения H5N1 вирусом.
- 3) Гетеросубтипическая субъединичная вакцина с полиоксидонием делает мышей более уязвимыми к последующему заражению H5N1 и H1N1 вирусами.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стратегия вакцинации против гриппа продолжает оставаться предметом дискуссий. В прошлом веке считалось, что вакцинироваться должны только люди из групп риска.

В 2003 году Всемирная ассамблея здравоохранения рекомендовала увеличить охват вакцинацией против гриппа с целью достижения к 2006 году охвата пожилого населения не менее, чем на 50% (http://www.who.int/immunization/sage/1_WHA56_19_).

В 2005 году, из-за опасений по поводу пандемии H5N1, вторая совместная комиссия Всемирной/Европейской Организаций Здравоохранения рекомендовала пересмотреть политику

вакцинации против сезонного гриппа. Цель состояла в том, чтобы увеличить сезонное потребление и тем самым способствовать увеличению глобального потенциала производства противогриппозных вакцин [69].

В 2012 году Стратегическая консультативная группа экспертов ВОЗ рекомендовала причислить беременных женщин к группам риска, которым показана вакцинация против сезонного гриппа. Другими группами риска были: работники здравоохранения, дети в возрасте 6–59 месяцев, пожилые люди и лица с высоким уровнем риска (www.who.int/wer/2012/wer8721.pdf).

В 2017 году Рекомендация Центра по контролю и профилактике заболеваний гласила: «Каждый человек в возрасте 6 месяцев и старше, включая беременных женщин и людей с определенными заболеваниями, должен проходить вакцинацию против гриппа каждый сезон, за редким исключением» (<https://www.cdc.gov/features/fluhighrisk/index.html>).

Такие рекомендации могут вызывать скептицизм, учитывая умеренную эффективность вакцинации в межпандемический период и риск побочных эффектов [2]. Ежегодная вакцинация может привести к негативному взаимодействию предыдущей и текущей вакцинаций [60, 59].

В некоторых странах практикуется ежегодная вакцинация школьников от гриппа [70]. Од-

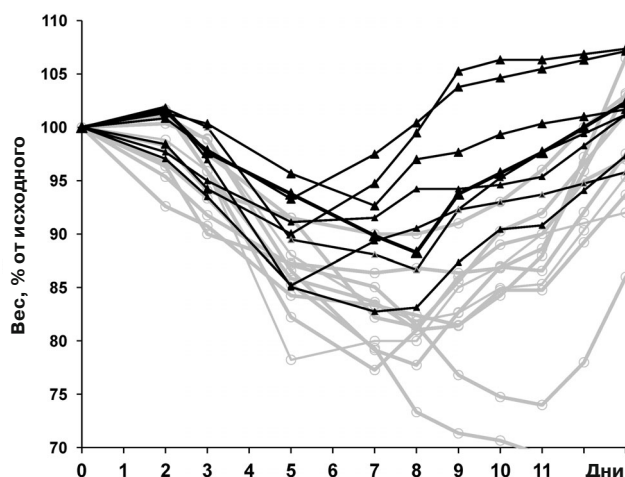


Рис 5. Динамика веса мышей, вакцинированных субъединицами H3N2 вируса с полиоксидонием, после челленджа пандемическим вирусом A/Hamburg/5/2009-MA (H1N1). Представлены индивидуальные кривые веса для каждой мыши. Черные кривые – неиммунизированные мыши, серые кривые – мыши, вакцинированные гетеросубтипической вакциной с полиоксидонием. Состав вакцины приведен в табл. 2. Различия в продолжительности заболевания между группами статистически значимы ($p = 0,03$; логарифмический критерий). Показан результат типичного эксперимента

нако такая практика может вызывать беспокойство. Ежегодные вакцины против гриппа эффективны против сезонного гриппа, но могут сделать людей более уязвимыми к новым пандемиям [71]. «У невакцинированных здоровых детей наблюдали возраст-зависимое повышение специфической реакции CD8⁺ Т-клеток на вирус гриппа, которое отсутствовало у привитых детей. Вакцинация против гриппа эффективна против сезонного гриппа, но препятствует развитию вирус-специфических CD8⁺ Т-клеточных ответов» [72].

Было показано, что «цитотоксические Т-лимфоциты, распознающие эпитопы вируса гриппа А, расположенные в относительно консервативных белках, таких как нуклеопротеин, перекрестно реагируют с различными субтипами. Это подразумевает, что эти CD8⁺ Т-лимфоциты могут способствовать защитному гетеросубтипическому иммунитету, вызванному случайной инфекцией вирусом гриппа А» [73].

Повторные прививки инактивированными субъединичными вакцинами предотвращают естественную иммунизацию циркулирующими вирусами гриппа. Антитела вырабатываются только к поверхностным белкам и не обеспечивают перекрестную защиту от новых штаммов. В случае пандемии такие неоднократно привитые дети особенно уязвимы.

Инактивированные вакцины не эффективны против гетеросубтипической инфекции [73, 74]. Сезонная инактивированная вакцина 2009–2010 гг. не обеспечивала защиту от пандемического вируса [75]. В то же время перекрестную защиту при использовании живых вакцин отмечали многие авторы [73, 76–80].

В полном соответствии с вышеуказанными работами наше исследование показывает, что иммунитет, индуцируемый живым вирусом, не только предотвращает заражение близкородственными вирусами, но также обеспечивает частичную защиту от антигенно удаленных вирусов гриппа. Сравнение способности различных типов вакцин к перекрестной защите показало, что предшествующее заражение любым непатогенным вирусом гриппа (адаптированная к холоду вакцина, малопатогенный вирус человека или вирус диких птиц) обеспечивает защиту от заражения гетеросубтипическим вирусом, в то время как иммунизация инактивированной вакциной совершенно бесполезна в таком случае.

В ходе изучения экспериментальных адъювантных композиций мы обнаружили, что мыши, вакцинированные сплит-вакциной с адъювантом Iso-SANP, после контрольного зараже-

ния гибнут даже раньше, чем те, которые не были вакцинированы. Некоторые из адъювантов, будучи безопасными для мышей и повышающими уровень антител после вакцинации, влияли на выживаемость мышей после заражения в противоположном направлении.

Тем не менее иногда эффективность адъювантов определяется только путем измерения иммунного ответа, без проверки защитного эффекта [81].

Даже широко используемые в медицине полиоксидоний и гидроокись алюминия, повышая среднестатистические показатели иммунного ответа и выживаемости, изменяют баланс IgG1/IgG2 и увеличивают разброс уровня антител между животными – в результате чего у отдельных животных блокируется либо клеточный, либо гуморальный иммунитет. Большой разброс в уровнях антител у разных животных и резкий сдвиг в уровнях IgG1/IgG2 вызывают беспокойство, поскольку при увеличении средней эффективности такие адъюванты в отдельных случаях приносят вред.

Редкие нарушения иммунной системы могут остаться незамеченными в человеческих испытаниях. Это требует особой осторожности при использовании адъювантных вакцин. Вакцина может быть признана пригодной для практического использования, но при широком применении, у отдельных привитых могут возникать недопустимые осложнения.

Стратегия вакцинации против гриппа должна учитывать не только защиту от эпидемических штаммов, но и возможный риск новой пандемии. В последнем случае лица, вакцинированные живыми вакцинами, будут частично защищены, а привитые субъединичными адъювантными вакцинами могут оказаться в более опасном положении, чем непривитые.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 11-04-00517-а и № 17-04-00148-а).

Благодарности. Авторы выражают благодарность доктору R. Donis (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) за предоставление вакцинного штамма VN5N1-PR8/CDC-RG; доктору Л.Г. Руденко (Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург) за предоставление штаммов A/Leningrad/134/17/57 и A/New Caledonia-Leningrad/134/17/57; доктору С.С. Ямниковой (Институт вирусологии им. Ивановского, Москва) за предоставление штамма A/Chicken/Kurgan/3/2005; доктору J. Robertson (National Institute for Biological

Standards and Control, United Kingdom) за предоставление штамма A/Nib/26/90-M и доктору М.Н. Матросовичу (Institute of Virology, Philipps University, Marburg, Germany) за предоставление штамма A/Hamburg/5/2009 (H1N1).

Вклад авторов. Каплун А.П., Красильников И.В. и Гамбарян А.С. — проектирование экспериментов; Боравлева Е.Ю. и Луницин А.В. — экспериментальная часть; Боравлева Е.Ю. и Гамбарян А.С. — написание статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений, в которых проводились исследования и согласно документу: «Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (<http://www.msu.ru/bioetika/doc/recom.doc>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chung, J. R., Rolfes, M. A., Flannery, B., Prasad, P., O'Halloran, A., Garg, S., Fry, A. M., Singleton, J. A., Patel, M., and Reed, C. (2020) Effects of influenza vaccination in the United States during the 2018-2019 influenza season, *Clin. Infect. Dis.*, doi: 10.1093/cid/ciz1244.
- Demicheli, V., Jefferson, T., Ferroni, E., Rivetti, A., and Di Pietrantonj, C. (2018) Vaccines for preventing influenza in healthy adults, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2**, CD001269, doi: 10.1002/14651858.CD001269.pub6.
- Grohskopf, L. A., Sokolow, L. Z., Broder, K. R., Walter, E. B., Bresee, J. S., Fry, A. M., and Jernigan, D. B. (2017) Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices – United States, 2017–18 influenza season, *MMWR Recomm. Rep.*, **66**, 1-20, doi: 10.15585/mmwr.r6602a1.
- Budimir, N., de Haan, A., Meijerhof, T., Gostick, E., Price, D. A., Huckriede, A., and Wilschut, J. (2013) Heterosubtypic cross-protection induced by whole inactivated influenza virus vaccine in mice: influence of the route of vaccine administration, *Influenza Other Respir. Viruses*, **7**, 1202-1209, doi: 10.1111/irv.12142.
- Onodera, T., Hosono, A., Odagiri, T., Tashiro, M., Kaminogawa, S., Okuno, Y., Kurosaki, T., Ato, M., Kobayashi, K., and Takahashi, Y. (2016) Whole-virion influenza vaccine recalls an early burst of high-affinity memory B cell response through TLR signaling, *J. Immunol.*, **196**, 4172-4184.
- Ato, M., Takahashi, Y., Fujii, H., Hashimoto, S., Kaji, T., Itamura, S., Horiuchi, Y., Arakawa, Y., Tashiro, M., and Takemori, T. (2013) Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis, *Vaccine*, **31**, 2184-2190, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.016.
- Jefferson, T. O., Rivetti, D., Di Pietrantonj, C., Rivetti, A., and Demicheli, V. (2010) Vaccines for preventing influenza in healthy adults, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **7**, CD001269, doi: 10.1002/14651858.CD001269.pub4.
- Allwinn, R., and Doerr, H. W. (2011) Comparison of seasonal influenza vaccines: composition and properties, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **136**, 2315-2318, doi: 10.1055/s-0031-1292046.
- Even-Or, O., Samira, S., Ellis, R., Kedar, E., and Barenholz, Y. (2013) Adjuvanted influenza vaccines, *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 1095-1108, doi: 10.1586/14760584.2013.825445.
- Black, S. (2015) Safety and effectiveness of MF-59 adjuvanted influenza vaccines in children and adults, *Vaccine*, **33**, Suppl. 2:B3-5, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.11.062.
- Guo, Q., Liu, Z., Gao, J., Zhou, J., Hu, W., Cun, Y., Li, W., and Liao, G. (2016) Immunogenicity and safety of pandemic influenza H5N1 vaccines in healthy adults through meta-analysis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **40**, 921-932.
- Seo, Y. B., Choi, W. S., Lee, J., Song, J. Y., Cheong, H. J., and Kim, W. J. (2014) Comparison of the immunogenicity and safety of the conventional subunit, MF59-adjuvanted, and intradermal influenza vaccines in the elderly, *Clin. Vaccine Immunol.*, **21**, 989-996, doi: 10.1128/CI.00615-13.
- Vesikari, T., Forstén, A., Arora, A., Tsai, T., and Clemens, R. (2015) Influenza vaccination in children primed with MF59-adjuvanted or non-adjuvanted seasonal influenza vaccine, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **11**, 2102-2112, doi: 10.1080/21645515.2015.1044167.
- Vesikari, T., Kirstein, J., Devota Go, G., Leav, B., Ruzicky, M. E., Isakov, L., de Bruijn, M., Oberye, J., and Heijnen, E. (2018) Efficacy, immunogenicity, and safety evaluation of an MF59-adjuvanted quadrivalent influenza virus vaccine compared with non-adjuvanted influenza vaccine in children: a multicentre, randomised controlled, observer-blinded, phase 3 trial, *Lancet Respir. Med.*, **6**, 345-356.
- Wang, J., Hilchey, S. P., DeDiego, M., Perry, S., Hyrien, O., Nogales, A., Garigen, J., Amanat, F., Huertas, N., Krammer, F., Martinez-Sobrido, L., Topham, D. J., Treanor, J. J., Sangster, M. Y., and Zand, M. S. (2018) Broad cross-reactive IgG responses elicited by adjuvanted vaccination with recombinant influenza hemagglutinin (rHA) in ferrets and mice, *PLoS One*, **13**, e0193680, doi: 10.1371/journal.pone.0193680.
- Couch, R. B., Bayas, J. M., Caso, C., Mbawuikie, I. N., López, C. N., Claeys, C., El Idrissi, M., Hervé, C., Laupèze, B., Oostvogels, L., and Moris, P. (2014) Superior antigen-specific CD4⁺ T-cell response with AS03-adjuvanted of a trivalent influenza vaccine in a randomised trial of adults aged 65 and older, *BMC Infect. Dis.*, **14**, 425, doi: 10.1186/1471-2334-14-425.
- Song, J. Y., Choi, M. J., Noh, J. Y., Choi, W. S., Cheong, H. J., Wie, S. H., Lee, J. S., Woo, G. J., Lee, S. H., and Kim, W. J. (2017) Randomized, double-blind, multicenter, phase III clinical trial to evaluate the immunogenicity and safety of MG1109 (egg-based pre-pandemic influenza A/H5N1 vaccine) in healthy adults, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **13**, 1190-1197, doi: 10.1080/21645515.2016.1263410.
- Li, P., and Wang, F. (2015) Polysaccharides: candidates of promising vaccine adjuvants, *Drug Discov. Ther.*, **9**, 88-93, doi: 10.5582/ddt.2015.01025.
- Van de Sandt, C. E., Kreijtz, J. H., Geelhoed-Mieras, M. M., Vogelzang-van Trierum, S. E., Nieuwkoop, N. J., van de Vijver, D. A., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., Morein, B., and Rimmelzwaan, G. F. (2014) Novel G3/DT adjuvant promotes the induction of protective T cells responses after vaccination with a seasonal trivalent inactivated split-virion influenza vaccine, *Vaccine*, **32**, 5614-5623, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.003.
- Hjertner, B., Bengtsson, T., Morein, B., Paulie, S., and Fossum, C. (2018) A novel adjuvant G3 induces both Th1

- and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine, *Vaccine*, **36**, 3340-3344, doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.054.
21. Christensen, D., Christensen, J. P., Korsholm, K. S., Isling, L. K., Erneholm, K., Thomsen, A. R., and Andersen, P. (2018) Seasonal influenza split vaccines confer partial cross-protection against heterologous influenza virus in ferrets when combined with the CAF01 adjuvant, *Front. Immunol.*, **8**, 1928, doi: 10.3389/fimmu.2017.01928.
 22. Baldwin, S. L., Hsu, F.-C., Van Hoesen, N., Gage, E., Granger, B., Guderian, J. A., Larsen, S. E., Lorenzo, E. C., Haynes, L., Reed, S. G., and Coler, R. N. (2018) Improved immune responses in young and aged mice with adjuvanted vaccines against H1N1 influenza infection, *Front. Immunol.*, **9**, 295, doi: 10.3389/fimmu.2018.00295.
 23. Lin, P. H., Wong, W. I., Wang, Y. L., Hsieh, M. P., Lu, C. W., Liang, C. Y., Jui, S. H., Wu, F. Y., Chen, P. J., and Yang, H. C. (2018) Vaccine-induced antigen-specific regulatory T cells attenuate the antiviral immunity against acute influenza virus infection, *Mucosal Immunol.*, doi: 10.1038/s41385-018-0004-9.
 24. Hyejin, K., Kimoto, T., Sakai, S., Takahashi, E., and Kido, H. (2018) Adjuvanting influenza hemagglutinin vaccine with a human pulmonary surfactant-mimicking synthetic compound SF-10 induces local and systemic cell-mediated immunity in mice, *PLoS One*, **13**, e0191133, doi: 10.1371/journal.pone.0191133.
 25. Uraki, R., Das, S. C., Hatta, M., Kiso, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Ozawa, M., Coban, C., Ishii, K. J., and Kawaoka, Y. (2014) Hemozoin as a novel adjuvant for inactivated whole virion influenza vaccine, *Vaccine*, **32**, 5295-5300, doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.079.
 26. Ельчина Г. А., Горбунов М. А., Шерварли В. И., Лонская Н. И., Павлова Л. И., Хайтов Р. М., Некрасов А. В., Иванова А. С., Магросович М. Н., Пучкова Н. Г., Белашев В. П., Малиновский А. А. (1998) Оценка эффективности противогриппозной трехвалентной полимерной субъединичной вакцины «Гриппол», *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.*, **3**, 40-43.
 27. Shannon, I., White, C. L., and Nayak, J. L. (2019) Understanding immunity in children vaccinated with live attenuated influenza vaccine, *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.*, **9**, (Supplement 1), S10-S14, doi: 10.1093/jpids/piz083.
 28. Subbarao, K. (1999) Influenza vaccines: present and future, *Adv. Virus Res.*, **54**, 349-373.
 29. Piedra, P. A., Gaglani, M. J., Kozinetz, C. A., Herschler, G. B., Fewlass, C., Harvey, D., Zimmerman, N., and Glezen, W. P. (2007) Trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine administered during the 2003-2004 influenza type A (H3N2) outbreak provided immediate, direct, and indirect protection in children, *Pediatrics*, **120**, e553-e564.
 30. Carter, N. J., and Curran, M. P. (2011) Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): a review of its use in the prevention of seasonal influenza in children and adults, *Drugs*, **71**, 1591-1622.
 31. Hoft, D. F., Babusis, E., Worku, S., Spencer, C. T., Lottenbach, K., Truscott, S. M., Abate, G., Sakala, I. G., Edwards, K. M., Creech, C. B., Gerber, M. A., Bernstein, D. I., Newman, F., Graham, I., Anderson, E. L., and Belshe, R. B. (2011) Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children, *J. Infect. Dis.*, **204**, 845-853, doi: 10.1093/infdis/jir436.
 32. Chen, G. L., Lau, Y. F., Lamirande, E. W., McCall, A. W., and Subbarao, K. (2011) Seasonal influenza infection and live vaccine prime for a response to the 2009 pandemic H1N1 vaccine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 1140-1145.
 33. Loving, C. L., Vincent, A. L., Pena, L., and Perez, D. R. (2012) Heightened adaptive immune responses following vaccination with a temperature-sensitive, live-attenuated influenza virus compared to adjuvanted, whole-inactivated virus in pigs, *Vaccine*, **30**, 5830-5838, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.033.
 34. Osterholm, M. T., Kelley, N. S., Sommer, A., and Belongia, E. A. (2012) Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Infect. Dis.*, **12**, 36-44, doi: 10.1016/S1473-3099(11)70295-X.
 35. Moore, D. L., Canadian Paediatric Society, and Infectious Diseases and Immunization Committee (2014) Vaccine recommendations for children and youth for the 2014/2015 influenza season, *Paediatr. Child. Health*, **19**, 440-444.
 36. Andersohn, F., Bornemann, R., Damm, O., Frank, M., Mittendorf, T., and Theidel, U. (2014) Vaccination of children with a live-attenuated, intranasal influenza vaccine – analysis and evaluation through a Health Technology Assessment, *GMS Health Technol Assess*, **10**, Doc03, doi: 10.3205/hta000119.
 37. Helmeke, C., Gräfe, L., Irmscher, H.-M., Gottschalk, C., Karagiannis, I., Oppermann, H. (2015) Effectiveness of the 2012/13 trivalent live and inactivated influenza vaccines in children and adolescents in Saxony-Anhalt, Germany: a test-negative case-control study, *PLoS One*, **10**, e0122910, doi: 10.1371/journal.pone.0122910.
 38. Schotsaert, M., and García-Sastre, A. (2017) Inactivated influenza virus vaccines: the future of TIV and QIV, *Curr. Opin. Virol.*, **23**, 102-106, doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.005.
 39. Brooks, W. A., Zaman, K., Lewis, K. D., Ortiz, J. R., Goswami, D., Feser, J., Sharmeen, A. T., Nahar, K., Rahman, M., Rahman, M. Z., Barin, B., Yunus, M., Fry, A. M., Bresee, J., Azim, T., and Neuzil, K. M. (2016) Efficacy of a Russian-backbone live attenuated influenza vaccine among young children in Bangladesh: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet Glob. Health*, **4**, e946-e954, doi: 10.1016/S2214-109X(16)30200-5.
 40. Raburn, M. M., Yu, J., Kameo, S., Tanaka, M., Rito, K., Itoh, Y., and Dubovsky, F. (2018) The safety and efficacy of quadrivalent live attenuated influenza vaccine in Japanese children aged 2-18 years: results of two phase 3 studies, *Influenza Other Respir. Viruses*, **12**, 438-445, doi: 10.1111/irv.12555.
 41. Sarntivijai, S., Xiang, Z., Shedden, K. A., Markel, H., Omenn, G. S., Athey, B. D., and He, Y. (2012) Ontology-based combinatorial comparative analysis of adverse events associated with killed and live influenza vaccines, *PLoS One*, **7**, e49941, doi: 10.1371/journal.pone.0049941.
 42. Ambrose, C. S., Levin, M. J., and Belshe, R. B. (2011) The relative efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in children and adults, *Influenza Other Respir. Viruses*, **5**, 67-75.
 43. Ambrose, C. S., Dubovsky, F., Yi, T., Belshe, R. B., and Ashkenazi, S. (2012) The safety and efficacy of live attenuated influenza vaccine in young children with asthma or prior wheezing, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31**, 2549-2557.
 44. Turner, P. J., Southern, J., Andrews, N. J., Miller, E., Erlewyn-Lajeunesse, M., and SNIFFLE study investigators (2015) Collaborators (12) safety of live attenuated influenza vaccine in atopic children with egg allergy, *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **136**, 376-381, doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1925.
 45. Duffy, J., Lewis, M., Harrington, T., Baxter, R., Belongia, E. A., Jackson, L. A., Jacobsen, S. J., Lee, G. M., Naleway, A. L., Nordin, J., Daley, M. F., and Vaccine Safety Datalink (2017) Live attenuated influenza vaccine use and safety in children and adults with asthma, *Ann. Allergy*

- Asthma Immunol.*, **118**, 439-444, doi: 10.1016/j.anai.2017.01.030.
46. Turner, P. J., Fleming, L., Saglani, S., Southern, J., Andrews, N. J., Miller, E., and SNIFFLE-4 study investigators (2019) Safety of live attenuated influenza vaccine (LAIV) in children with moderate to severe asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.*, doi: 10.1016/j.jaci.2019.12.010.
 47. Basha, S., Hazenfeld, S., Brady, R. C., and Subbramanian, R. A. (2011) Comparison of antibody and T-cell responses elicited by licensed inactivated- and live-attenuated influenza vaccines against H3N2 hemagglutinin, *Hum. Immunol.*, **72**, 463-469, doi: 10.1016/j.humimm.2011.03.001.
 48. Cheng, X., Zengel, J. R., Suguitan, A. L. Jr., Xu, Q., Wang, W., Lin, J., and Jin, H. (2013) Evaluation of the humoral and cellular immune responses elicited by the live attenuated and inactivated influenza vaccines and their roles in heterologous protection in ferrets, *J. Infect. Dis.*, **208**, 594-602, doi: 10.1093/infdis/jit207.
 49. Cao, R. G., Suarez, N. M., Obermoser, G., Lopez, S. M., Flano, E., Mertz, S. E., Albrecht, R. A., Garcia-Sastre, A., Mejias, A., Xu, H., Qin, H., Blankenship, D., Palucka, K., Pascual, V., and Ramilo, O. (2014) Differences in antibody responses between trivalent inactivated influenza vaccine and live attenuated influenza vaccine correlate with the kinetics and magnitude of interferon signaling in children, *J. Infect. Dis.*, **210**, 224-233, doi: 10.1093/infdis/jiu079.
 50. Tricco, A. C., Chit, A., Soobiah, C., Hallett, D., Meier, G., Chen, M. H., Tashkandi, M., Bauch, C. T., and Loeb, M. (2013) Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains: a systematic review and meta-analysis, *BMC Med.*, **11**, 153, doi: 10.1186/1741-7015-11-153.
 51. Junwei, L., Arévalo, M. T., Chen, Y., Chen, S., and Zeng, M. (2014) T-cell-mediated cross-strain protective immunity elicited by prime-boost vaccination with a live attenuated influenza vaccine, *Int. J. Infect. Dis.*, **27**, 37-43, doi: 10.1016/j.ijid.2014.05.016.
 52. Nohynek, H., Baum, U., Syrjänen, R., Ikonen, N., Sundman, J., and Jokinen, J. (2016) Effectiveness of the live attenuated and the inactivated influenza vaccine in two-year-olds – a nationwide cohort study Finland, influenza season 2015/16, *Euro Surveill.*, **21**, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.38.30346.
 53. Ohmit, S. E., Victor, J. C., Rotthoff, J. R., Teich, E. R., Truscon, R. K., Baum, L. L., Rangarajan, B., Newton, D. W., Boulton, M. L., and Monto, A. S. (2006) Prevention of antigenically drifted influenza by inactivated and live attenuated vaccines, *N. Engl. J. Med.*, **355**, 2513-2522.
 54. Monto, A. S., Ohmit, S. E., Petrie, J. G., Johnson, E., Truscon, R., Teich, E., Rotthoff, J., Boulton, M., and Victor, J. C. (2009) Comparative efficacy of inactivated and live attenuated influenza vaccines, *N. Engl. J. Med.*, **361**, 1260-1267.
 55. De Hoog, M. L. A., Venekamp, R. P., Meijer, A., Sanders, E. A. M., and Brujning-Verhagen, P. C. J. L. (2019) Inactivated influenza vaccine does not reduce all cause respiratory illness in children with pre-existing medical conditions, *Vaccine*, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.086.
 56. Petrie, J. G., Malosh, R. E., Cheng, C. K., Ohmit, S. E., Martin, E. T., Johnson, E., Truscon, R., Eichelberger, M. C., Gubareva, L. V., Fry, A. M., and Monto, A. S. (2017) The household influenza vaccine effectiveness study: lack of antibody response and protection following receipt of 2014-2015 influenza vaccine, *Clin. Infect. Dis.*, **65**, 1644-1651, doi: 10.1093/cid/cix608.
 57. Castilla, J., Navascués, A., Fernández-Alonso, M., Reina, G., Pozo, F., Casado, I., Guevara, M., Martínez-Baz, I., Barricarte, A., Ezpeleta, C., Primary Health Care Sentinel Network, and Network for Influenza Surveillance in Hospitals of Navarra (2016) Effectiveness of subunit influenza vaccination in the 2014-2015 season and residual effect of split vaccination in previous seasons, *Vaccine*, **34**, 1350-1357, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.054.
 58. Puig-Barberà, J., Guglieri-López, B., Tortajada-Girbés, M., López-Labrador, F. X., Carballido-Fernández, M., Mollar-Maseres, J., Schwarz-Chavarri, G., Baselga-Moreno, V., Mira-Iglesias, A., Díez-Domingo, J., and Valencia Hospital Network for the Study of Influenza, and Respiratory Viruses Disease (2017) Low influenza vaccine effectiveness and the effect of previous vaccination in preventing admission with A(H1N1)pdm09 or B/Victoria-Lineage in patients 60 years old or older during the 2015/2016 influenza season, *Vaccine*, **35**, 7331-7338, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.100.
 59. Gherasim, A., Martínez-Baz, I., Castilla, J., Pozo, F., Larrauri, A., and the cycEVA working group (2017) Effect of previous and current vaccination against influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), and B during the post-pandemic period 2010-2016 in Spain, *PLoS One*, **12**, e0179160, doi: 10.1371/journal.pone.0179160.
 60. Rondy, M., Launay, O., Castilla, J., Costanzo, S., Puig-Barberà, J., Gefenaite, G., Larrauri, A., Rizzo, C., Pitigoi, D., Syrjänen, R. K., Machado, A., Kurečić Filipović, S., Krisztina Horváth, J., Paradowska-Stankiewicz, I., Marbus, S., InNHOVE/I-MOVE+working group, and Moren, A. (2017) Repeated seasonal influenza vaccination among elderly in Europe: effects on laboratory confirmed hospitalised influenza, *Vaccine*, **35**, 4298-4306, doi: 10.1016/j.vaccine.2017.06.088.
 61. He, D. H., Chiu, A. P. Y., Wu, J. T. K., and Cowling, B. J. (2019) Pre-pandemic live-attenuated influenza vaccine, *Hong Kong Med. J.*, **25**, (Suppl. 9), S24-S27.
 62. Ломакина Н. Ф., Гамбарян А. С., Боравлева Е. Ю., Кропоткина Е. А., Кириллов И. М., Лаврентьев М. М., Ямникова С. С. (2009) Характеристика апатогенного вируса гриппа А/Чайка/Москва/3100/2006 (H6N2), выделенного в Москве, *Мол. Генет. Микробиол. Вирусол.*, **1**, 32-35.
 63. Heydarov, R. N., Lomakina, N. F., Boravleva, E. Yu., Kholodilov, I. S., Gambaryan, A. S., Mikhailovich, V. M., and Fesenko, E. E. (2017) The use of microarrays for the identification of the origin of genes of avian influenza viruses in wild birds, *Microbiol. Independ. Res. J.*, **4**, 21-30, doi: 10.18527/2500-2236-2017-4-1-21-30.
 64. Gambaryan, A. S., Lomakina, N. F., Boravleva, E. Y., Kroptkina, E. A., Mashin, V. V., Krasilnikov, I. V., Klimov, A. I., and Rudenko, L. G. (2012) Comparative safety, immunogenicity and efficacy of several anti-H5N1 influenza experimental vaccines in a mouse and chicken models, *Influenza Other Respir. Viruses*, **6**, 188-195.
 65. Гамбарян А. С., Ломакина Н. Ф., Боравлева Е. Ю., Мочалова Л. В., Садыкова Г. К., Прилипов А. Г., Матросович Т. Ю., Матросович М. Н. (2018) Изменение вирулентности пандемического вируса гриппа А(H1N1), обусловленное мутациями геммагглютинина и полимеразы, *Мол. Биол.*, **52**, 644-658, doi: 10.1134/S0026898418040055.
 66. Каплун А. П., Безруков Д. А., Попенко В. И., Швец В. И. (2011) Сферические аморфные наночастицы из триптероидов коры березы – новый тип субмикронного носителя для доставки лекарств, *Росс. Журн. Биофарм.*, **3**, 28-40.
 67. Ovcharenko, A. V., and Zhirnov, O. P. (1994) Aprotinin aerosol treatment of influenza and para-myxovirus bronchopneumonia of mice, *Antiviral Res.*, **23**, 107-118.
 68. Gambaryan, A. S., Boravleva, E. Y., Matrosovich, T. Y., Matrosovich, M. N., Klenk, H. D., Moiseeva, E. V., Tuzikov, A. B., Chinarev, A. A., Pazygina, G. V., and

- Bovin, N. V. (2005) Polymer-bound 6' sialyl-N-acetylactosamine protects mice infected by influenza virus, *Antiviral Res.*, **68**, 116–123.
69. Pandemic influenza preparedness planning, *Report on the second joint WHO/European Commission workshop, Copenhagen, 24–26 October 2005*, http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5.pdf
70. Fiore, A. E., Epperson, S., Perrotta, D., Bernstein, H., and Neuzil, K. (2012) Expanding the recommendations for annual influenza vaccination to school-age children in the United States, *Pediatrics*, **129**, Suppl. 2, S54–S62, doi: 10.1542/peds.2011-0737C.
71. Bodewes, R., Fraaij, P. L., Kreijtz, J. H., Geelhoed-Mieras, M. M., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2012) Annual influenza vaccination affects the development of heterosubtypic immunity, *Vaccine*, **30**, 7407–7410.
72. Bodewes, R., Fraaij, P. L., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2012b) Pediatric influenza vaccination: understanding the T-cell response, *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 963–971.
73. Hillaire, M. L., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2011) Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines, *J. Biomed. Biotechnol.*, **2011**, 939860.
74. Красильников И. В., Гамбарян А. С., Машин В. В., Лобастова А. К. (2010) Иммуногенные и протективные свойства инактивированных и живых кандидатных вакцин против высокопатогенных вирусов H5N1, *Вопр. Вирусол.*, **4**, 16–20.
75. Pelat, C., Falchi, A., Carrat, F., Mosnier, A., Bonmarin, I., Turbelin, C., Vaux, S., Werf, S., Cohen, J. M., Lina, B., Blanchon, T., and Hanslik, T. (2011) Field effectiveness of pandemic and 2009–2010 seasonal vaccines against 2009–2010 A(H1N1) influenza: estimations from surveillance data in France, *PLoS One*, **6**, e19621, doi: 10.1371/journal.pone.0019621.
76. Lu, X., Edwards, L. E., Desheva, J. A., Nguyen, D. C., Rekstin, A., Stephenson, I., Szretter, K., Cox, N. J., Rudenko, L. G., Klimov, A., Katz, J. M. (2006) Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses, *Vaccine*, **24**, 6588–6593.
77. Kreijtz, J. H., Bodewes, R., van Amerongen, G., Kuiken, T., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., and Rimmelzwaan, G. F. (2007) Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice, *Vaccine*, **25**, 612–620.
78. Jang, Y. H., and Seong, B. L. (2013) Cross-protective immune responses elicited by live attenuated influenza vaccines, *Yonsei Med. J.*, **54**, 271–282.
79. Sun, K., Ye, J., Perez, D. R., and Metzger, D. W. (2011) Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections, *J. Immunol.*, **186**, 987–993.
80. Chen, G. L., Min, J. Y., Lamirande, E. W., Santos, C., Jin, H., Kemble, G., and Subbarao, K. (2011) Comparison of a live attenuated 2009 H1N1 vaccine with seasonal influenza vaccines against 2009 pandemic H1N1 virus infection in mice and ferrets, *J. Infect. Dis.*, **203**, 930–936, doi: 10.1093/infdis/jiq144.
81. Beyer, W. E. P., Palache, A. M., Reperant, L. A., Boulfich, M., and Osterhaus, A. D. M. E. (2020) Association between vaccine adjuvant effect and pre-seasonal immunity. Systematic review and meta-analysis of randomised immunogenicity trials comparing squalene-adjuvanted and aqueous inactivated influenza vaccines, *Vaccine*, **38**, 1614–1622, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.12.037.

THE IMMUNE RESPONSE AND PROTECTIVE EFFICACY OF INACTIVATED AND LIVE INFLUENZA VACCINE AGAINST HOMOLOGOUS AND HETEROSUBTYPIC CHALLENGE*

E. Y. Boravleva¹, A. V. Lunitsin², A. P. Kaplun³,
N. V. Bykova³, I. V. Krasilnikov⁴, and A. S. Gambaryan^{1**}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences, 108819 Moscow, Russia; E-mail: al.gambaryan@gmail.com

² FSBSI Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125 Volginsky, Vladimir Region, Russia

³ Lomonosov Moscow University of Fine Chemical Technology, 119571 Moscow, Russia

⁴ Saint-Peterburg Institute of Vaccines and Sera, FMBA, 198320 St. Petersburg, Russia

Received February 19, 2020

Revised March 19, 2020

Accepted March 20, 2020

Parallel testing of inactivated (whole-virion, split, subunit, and adjuvanted vaccines) and live attenuated vaccine was conducted to compare the immunogenicity and protective efficacy. Homologous and heterosubtypic protection against challenge with H5N1 and H1N1 influenza viruses in mouse model were studied. A single immunization with live or inactivated whole virion H5N1 vaccine elicited a high level of serum antibodies and provided complete protection against challenge with the lethal virus A/Chicken/Kurgan/3/05 (H5N1). Split vaccines applied in a single dose was much less effective. Adjuvants increased antibody levels. In the same time, addition of one of them (Iso-SANP) to split vaccine led to paradoxical outcome: it increased the level of antibody but reduced the protective effect of vaccine. All adjuvants tested shifted the ratio of IgG1 and IgG2a antibodies. Immunization with any of tested heterosubtypic live viruses provided partly protection against H5N1 challenge and reduced the mortality of mice to low level, while inactivated H1N1 vaccine offered no protection at all. After immunization with adjuvanted subunit vaccines and challenge with the heterosubtypic virus, we observed more severe course of illness and more rapid death compared to unvaccinated animals.

Keywords: influenza virus A, live and inactivated vaccine, adjuvants