

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР  
СВЕРДЛОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ  
МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

---

На правах рукописи  
УДК 576.858.095.5

АХМЕТОВА Людмила Ивановна

АНТИГЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ И КЛОНОВ  
ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2) И ПЕРСПЕКТИВЫ  
ПОЛУЧЕНИЯ АВИДНЫХ АНТИТЕЛ

14.00.36 - аллергология и иммунология  
03.00.06 - вирусология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители :  
доктор медицинских наук,  
профессор З.Н.КОНДРАШОВА  
кандидат медицинских наук,  
доцент С.В.КОЛОТВИНОВ

О Г Л А В Л Е Н И Е

|  | СТР. |
|--|------|
| ВВЕДЕНИЕ .....   | 4    |
| ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 7    |
| ГЛАВА I. НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ ГРИППА И КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ .....   | 7    |
| I.1. Особенности неспецифической резистентности и иммунного реагирования при гриппе .....  | 7    |
| I.2. Авидитет антител. Значение авидности антител для их протективной активности .....   | 17   |
| I.3. Гетерогенность популяции вируса гриппа по иммуногенной активности .....   | 22   |
| I.4. Препараты для специфической профилактики гриппа .....   | 28   |
| I.5. Общее заключение по обзору литературы .....   | 38   |
| ЧАСТЬ II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....   | 40   |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....  | 40   |
| ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА А ПО СПОСОБНОСТИ ИНДУЦИРОВАТЬ СИНТЕЗ АВИДНЫХ АНТИТЕЛ .....  | 52   |
| ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ОСОБЕННОСТЕЙ РЕАГИРОВАНИЯ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАРИАНТОВ ВИРУСА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АВИДОГЕННОЙ СПОСОБНОСТИ ..... | 71   |
| 4.1. Изучение протективной активности вариантов вируса, различающихся по способности индуцировать синтез авидных антител .....   | 71   |
| 4.2. Изучение клеточных реакций при использовании вариантов вирусов, различающихся по авидоген-  |      |

|   |     |
|---|-----|
| ной способности .....   | 76  |
| ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ОСОБЕННОСТЕЙ<br>СТРОЕНИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ АВИДОГЕННЫХ И<br>НЕАВИДОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ..... | 79  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 93  |
| ВЫВОДЫ .....  | 104 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....  | 107 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ .....  | 133 |

## В Б Е Д Е Н И Е

Повсеместное распространение, высокая эпидемическая заболеваемость и тяжелые последствия для отдельных групп населения определяют чрезвычайную актуальность проблемы гриппа.

До настоящего времени основным методом борьбы с этой инфекцией остается вакцинопрофилактика. Однако требования, предъявляемые к вакцинным штаммам, несмотря на значительный прогресс наших знаний в области генетики вирусных популяций, остаются неизменными.

Между тем, полученные в настоящее время экспериментальные данные свидетельствуют о гетерогенности популяции вируса гриппа А как по иммуногенной активности [14,16,125,134,136], так и по способности индуцировать синтез антител с широким спектром активности [24,40,70].

Особый интерес представляет изучение гетерогенности вирусной популяции по способности вызывать синтез высокоавидных антител, поскольку доказано, что иммунная защита определяется не только уровнем антител в организме, но и в значительной степени их авидностью [108], оцениваемой по критериям авидитета: скорость, полнота образования нейтрального комплекса "антиген-анти тело" и его прочность [35]. Однако, оценка степени гетерогенности популяции вируса гриппа А по способности индуцировать синтез авидных антител до сих пор не проводилась.

Между тем, исследования в этом направлении важны как для формирования теоретических представлений о характере иммунологических реакций на близкие по структуре антигены, так и в прикладном плане - для разработки рациональных критериев отбора вариантов вируса для производства диагностических и профилактических препаратов.

В связи с изложенным, целью нашей работы явилось изучение гетерогенности популяции вируса гриппа А(Н3N2) по иммуногенной активности, отбор и изучение вариантов вируса, способных индуцировать синтез высокоавидных антител.

В задачи исследования входило :

- изучение гетерогенности популяции вируса гриппа А(Н3N2) по иммуногенной активности и селекция вариантов вируса, различающихся по этому признаку ;
- генетический и антигенный анализ вариантов вируса, различающихся по способности индуцировать синтез авидных антител ;
- изучение взаимосвязи признака иммуногенности с другими генетическими маркерами ;
- изучение особенностей реагирования Т- и В-систем иммунитета при введении в макроорганизм вариантов вируса гриппа А(Н3N2), различающихся по авидогенной способности.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Популяция вирусов гриппа А(Н3N2) гетерогенна по способности индуцировать синтез авидных антител.
- Авидогенные, высокорепродуктивные варианты вируса гриппа можно селекционировать, используя метод генетической рекомбинации.
- Авидогенные варианты вируса гриппа имеют наиболее доступные (экспонированные) антигенные детерминанты.
- Авидогенные варианты вируса гриппа обладают свойствами высокой интерферогенной активности и способны эффективно активировать Т-систему иммунитета.

Научная новизна.

Показана возможность использования разработанного метода оценки avidности антигенов и антител для изучения гетерогенности популяции вирусов гриппа А по способности индуцировать синтез avidных антител. Впервые установлено, что avidогенная способность вирусов гриппа А передается в процессе рекомбинации с геном гемагглютинина. Показано, что avidогенные варианты могут обладать способностью эффективно активировать Т-систему иммунитета и вызывать сенсibilизацию лимфоцитов к гетерологичным штаммам. Впервые проведено сравнительное исследование вариантов вируса гриппа А, различающихся по avidогенной способности, с помощью моноклональных антител. Быявлена прямая корреляционная связь между признаками avidогенности и интерферогенной активности.

#### Практическая ценность работы.

Материалы проведенных исследований вошли в методические рекомендации "Оценка функциональной активности вирусных антигенов при взаимодействии с антителами" (Свердловск, УНЦ АН СССР, 1986). Установлена возможность получения рекомбинантов вируса гриппа А, сочетающих в себе признаки высокой avidогенной и репродуктивной активности. Рекомбинантные варианты вируса (aSV RI-54 и aSV RII-I69), сочетающие указанные свойства, депонированы в Государственную коллекцию вирусов (Институт вирусологии АМН СССР, номера депонентов ГКВ №2224, 2225).

## ЧАСТЬ I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### ГЛАВА I. НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ИММУНОЛОГИИ ГРИППА И КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИИ.

#### I. I. Особенности неспецифической резистентности и иммунного реагирования при гриппе.

Человеческая популяция чрезвычайно гетерогенна по восприимчивости к инфицированию вирусом гриппа. Помимо влияния таких факторов как социально-бытовые условия, возраст, пол и др., восприимчивость к гриппу детерминирована генетически. Исследованиями последних лет выявлена корреляция между невосприимчивостью к гриппозной инфекции и наличием определенных антигенов главного комплекса гистосовместимости (H L A).

Доказано, что лица с тканевыми антигенами B8 и B12 наиболее восприимчивы к гриппу типа А, тогда как носители антигена B40 болеют гриппом во много раз реже [87]. К. Аннун с соавт. [3] показали, что лица, носители антигена HL A/Bw 35 отвечают более активной выработкой антител на вирус типа А (H1N1 и H3N2), чем лица, не имеющие данного антигена. Использование в качестве генетического маркера группы крови в системе AEO показало, что дети, имеющие группу крови A(II), чаще болеют гриппом и ОРЗ, чем дети с другими группами крови [49]. Найхин А.Н. с соавт. [84] на основании своих исследований пришли к выводу, что наиболее чувствительны к гриппу А и В лица с группой крови АВ(IV), а наиболее резистентны лица с группой крови O(I).

Работы, посвященные изучению генетической детерминации невосприимчивости к гриппу пока немногочисленны, однако развитие исследований в этом направлении может оказать существенное влияние на стратегию проведения профилактических мероприятий про-

тив гриппа [ 92 ] .

При проникновении вируса гриппа в макроорганизм, внеклеточная нейтрализация и инаktivация вируса осуществляется неспецифическими ингибиторами и тепловым воздействием (повышение температуры тела) [ 97, 131 ] . Вируснейтрализующей активностью обладают термолабильные  $\beta$ -ингибиторы, к которым чувствительны почти все сероподтипы вируса гриппа типа А и вирус гриппа типа В, и термостабильные  $\gamma$ -ингибиторы, активные только в отношении вируса гриппа типа А(H2N2) [ 76 ] . Ограничение вирусной репродукции может быть обусловлено механизмом обратимой ингибиции эндогенного дыхания клетки-хозяина. Поскольку большинство этапов вирусной репродукции энергозависимы, то подавление клеточной энергетики может служить дополнительным фактором её защиты [ 82 ] . Ограничение внутриклеточной репродукции вируса происходит также за счет системы интерферонов, синтез которых наблюдается уже на ранних сроках заболевания. Различают три типа интерферонов, обозначаемых как  $INF-\alpha$ ,  $INF-\beta$  и  $INF-\gamma$  . Продукентами  $INF-\alpha$  и  $INF-\beta$  служат *in vitro* лейкоциты крови, фибробласты, клетки лимфобластоидных линий.  $INF-\gamma$  продуцируют Т- и В-лимфоциты [ 205 ] . Синтез всех видов интерферонов носит индуцибельный характер. Для  $INF-\alpha$  и  $INF-\beta$  в качестве индукторов служат вирусы, синтетические двуспиральные полинуклеотиды, для  $INF-\gamma$  - антигены и поликлональные митогены [ 56 ] . Клетки-продукенты интерферонов секретируют их во внешнюю среду, после чего интерфероны фиксируются на специфических мембранных рецепторах клеток-мишеней. По-видимому, клеточные рецепторы для  $INF-\alpha$  и  $INF-\beta$  идентичны по строению. В то же время для  $INF-\alpha$  имеются особые рецепторы [ 163 ] . Наиболее общим свойством интерферонов можно считать торможение трансляции мРНК вирусного или клеточного происхождения [ 27 ] . Противовирусное действие интерферонов опосредуется через его

многофакторное влияние на иммунокомпетентные клетки. Интерферон воздействует на активность эффекторных Т-клеток, повышает реактивность цитотоксических Т-лимфоцитов, увеличивает активность К-клеток в реакциях антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, активирует НК-клетки (натуральные киллеры) [210,166]. Интерферон стимулирует образование лимфоцитами интерлейкина-I и интерлейкина-II, влияет на продукцию антител В-лимфоцитами [166]. Способность интерферонов усиливать экспрессию антигенов на поверхности иммунокомпетентных клеток, синтез которых контролируется генами основного комплекса гистосовместимости, может служить ещё одним дополнительным механизмом противовирусного иммунитета, позволяющим цитотоксическим Т-лимфоцитам лучше распознать клетки-мишени, инфицированные вирусом [163].

В недавно опубликованном обзоре Haller и Staeheli [168] приводятся данные о том, что у мышей в хромосоме 16 расположен ген Mx, который регулируется  $\alpha/\beta$  интерфероном и кодирует ядерный белок с молекулярной массой 72000. При заражении вирусом гриппа локальное образование интерферона приводит к накоплению белка Mx в соседних клетках, что способствует освобождению пораженных клеток от вируса. Arnheiter [144] обнаружил, что в клетках мышей и крыс для развития резистентности к заражению вирусом гриппа A/WSN требовалось образование и накопление функционирующих Mx-белков. Введение 1000 ед/мл интерферона  $\alpha/\beta$  в питательную среду мышинных клеток индуцировало в ядрах синтез белка Mx. Накопление белка Mx коррелировало с подавлением синтеза вирусспецифических белков. Шуратов с соавт. [133] провели изучение интерферогенной активности 38 штаммов вируса гриппа типов А и В. Вирусы гриппа А(H1N1) по интерферогенной активности разделены на три подгруппы: слабые, сильные и умеренные. Слабой интерферогенной активностью обладали все использованные штаммы вируса

гриппа серотипа А(Н<sub>2</sub>Н<sub>2</sub>) и большинство вирусов гриппа В. Наиболее сильными индукторами интерферона являлись рекомбинатные вирусы. Известно, что штаммы вируса гриппа различаются и по чувствительности к действию интерферона. Б.Д.Соловьев с соавт. [100] приводят данные по определению чувствительности 98 штаммов вируса гриппа А к действию интерферона. Бысокочувствительными к действию интерферона оказались 68 штаммов, малочувствительными - 30. Имеются данные о том, что способность клеток периферической крови людей к синтезу интерферона в присутствии соответствующего штамма вируса гриппа выражено совпадает с устойчивостью к этому возбудителю [130].

Большое значение среди факторов неспецифической противовирусной защиты принадлежит естественным киллерным клеткам (НК-клетки). Вирусные антигены на поверхности клеток распознаются в качестве мишеней НК-клетками, осуществляющими надзор за постоянством физиологического гомеостаза [57,82]. Инкубация лимфоцитов с интактными препаратами вируса гриппа по данным Али е.а. [139] и Джен е.а. [187] индуцировала значительное повышение цитотоксической активности НК. Однако обработка лимфоцитов препаратами очищенного гемагглютинина приводила к быстрому снижению цитотоксической активности НК в 40-45 раз по сравнению с исходным уровнем. Али е.а. [139] высказывают предположение, что НК могут играть регуляторную роль на завершающих стадиях антителообразования. Жданов В.М. и Трушинская Г.Н. [112] считают, что благодаря тому, что интактные вирионы и изолированные белки вируса гриппа модулируют активность НК разнонаправленно, на определенном этапе в клетках дыхательных путей конкретного хозяина активно и беспрепятственно реплицируется один из наименее представленных антигенных мутантов гетерогенной популяции вируса гриппа.

По мнению Я.С.Шварцмана с соавт. [132] в ряде случаев именно НК и интерферон определяют, завершится ли вирусная инфекция поражением ограниченного числа клеток или разовьётся клинически выраженный процесс.

### Факторы иммунологической реактивности.

#### Макрофаги.

Выделяют три формы участия макрофагов в иммунологической реактивности организма при заражении вирусом гриппа : 1) . Выполнение функции эффекторов клеточного иммунитета [ 54,171 ] . 2) Инициация индуктивной фазы гуморального и клеточного иммунитета - поглощение антигена, его подготовка и представление на поверхностной мембране для Т- и В-лимфоцитов, индукция этих клеток к пролиферации и дифференцировке в эффекторы [ 67,171,193]\*. 3) Выполнение регуляторных функций : макрофаги продуцируют лимфокины и медиаторы (интерлейкин, интерферон, колониестимулирующий фактор и др.), способствуют созреванию и формированию Т-лимфоцитов, повышают активность НК-клеток, усиливают пролиферацию лимфоцитов в ответ на действие митогенов и др. [ 58,171 ] .

Доказана важная роль макрофагов в определении аффинности антител. Показано, что факторы, стимулирующие активность макрофагов способствуют выработке высокоаффинных антител у мышей, которые обычно синтезируют низкоаффинные антитела [ 108 ] . Кроме того показано, что факторы, подавляющие функцию макрофагов, приводят к образованию низкоаффинных антител у мышей, в норме вырабатывающих высокоаффинные антитела [ 203 ] . Логично предположить,

---

\* Т.Я.Дубровиной с соавт. [ 67 ] показано, что величина антигенного стимула коррелировала с концентрацией введенного вируса, но не зависела от дисперсности антигена из нативного вируса, что, по мнению авторов свидетельствует о независимости индуктивной фазы иммунного ответа от фагоцитарной активности макрофагов.

что сниженная функция макрофагов может служить причиной того, что "обработка" антигена и его передача иммунокомпетентным клеткам становятся неполноценными [108].

### T- и B-лимфоциты.

Особенности взаимодействия T- и B-лимфоцитов мышей в ответ на белки вируса гриппа исследовали Scherle и Gerhard [195]. Бестимусным мышам адоптивно переносили клон хелперных T-клеток, прекоммитированных к гемагглютнину, нейраминидазе, матричному белку или нуклеопротеину вируса гриппа A/PR/8/34. Через сутки после инфицирования тем же штаммом у мышей регистрировали синтез антител. Противовирусный ответ был направлен преимущественно к гемагглютнину и требовал взаимодействия T- и B-клеток. Оказалось, что B-клетки, распознающие поверхностные белки вируса гриппа (HA и NA) могут воспринять помощь T-хелперов специфичных для любого из главных структурных вирусных белков. Наоборот, B-клетки, отвечающие на внутренние белки вируса гриппа (M и NP), воспринимают помощь только тех клонов T-хелперов, которые обладают соответствующей специфичностью.

Mills e.a. [180] показали, что взаимодействие T-хелперов с гемагглютинином вируса гриппа имеет конформационную зависимость. Получив панель T-хелперных клонов от доноров-мышей, предварительно инфицированных вирусом гриппа A/X31, авторы исследовали их специфичность. Было установлено, что узнавание гемагглютинина некоторыми клонами T-хелперов зависит от конформационной структуры гемагглютинина. Показано, что у пяти клонов T-хелперов, прекоммитированных к гемагглютнину, отсутствовала способность узнавать мутантные варианты P-19 и P-20 вируса гриппа A/X31, у которых в молекуле гемагглютинина в положении I7 аминокислота гистидин заменена на аргинин. Авторы считают, что замена аминокис-

лоты в этом положении влияет на конформационную стабильность гемагглютинина. В другой своей работе Mills e.a. [ 179 ] подтверждают, что специфичность узнавания Т-хелперами гемагглютинина определяется конформационной детерминантой тримера гемагглютинина. Анализ аминокислотных последовательностей показал, что ключевую роль в узнавании играют аминокислоты в положении 53,54 или 62 НАI. Однако авторы полагают, что узнавание гемагглютинина Т-хелперами не ограничивается лимитированным числом эпитопов в консервативных областях гемагглютинина. Brown e.a. [ 159 ] показали, что на все эпитопы, узнаваемые клонами Т-хелперов, влияла одиночная аминокислотная замена в положении 60 или 63 НАI. Т-хелперы оказались чувствительны к аминокислотным заменам в НАI естественных вариантов вируса гриппа, а это даёт основание предположить, что Т-хелперы могут оказывать иммунное давление на антигенную вариабельность гемагглютинина [ 179,180 ] ,

Eisenlohr e.a. [ 161 ] определили, что гликопротеины НА и НА<sub>2</sub>, а также NP и М белки вируса гриппа узнаются Т-хелперами в контексте с антигенами главного комплекса гистосовместимости. Авторы считают, что для представления антигенов иммунокомпетентным клеткам, включаются многоступенчатые процессы рецептор-опосредованного эндоцитоза. Предполагается, что В-лимфоциты, дендритные клетки и клетки, экспрессирующие молекулы класса II главного комплекса гистосовместимости с включенными вирусными антигенами способны активировать Т-хелперы.

Изучена зависимость стимуляции лимфоцитов от формы используемых антигенов [ 160 ] : интактный вирус, в противоположность денатурированному, а также фрагментам и синтетическим пептидам стимулирует Т-клетки более эффективно. Было установлено, что иммуностимулирующая активность интактного вируса гриппа проявляется вследствие прикрепления вируса к остаткам сиаловой кислоты

на поверхности антигенпредставляющих клеток. Менее чем за 10 минут от начала взаимодействия вируса и антигенпредставляющих клеток (при 20°C) регистрировали максимальный уровень стимуляции Т-клеток. Взаимодействие блокируется антителами к гемагглютинину и при обработке антигенпредставляющих клеток нейраминидазой.

Briggs [148], Suss e.a. [169] показали, что в результате вакцинации может активироваться антиген-специфическая супрессорная активность. Авторы делают вывод, что при высоких иммунологических показателях вакцинацию проводить не следует. А.А. Сохин с соавт. [17] пришли к аналогичному заключению показав, что для оптимального развития иммунного ответа на антигены вируса гриппа существенное значение имеет концентрация исходных антител, регистрируемая у лиц, подлежащих вакцинации. Иммунизация людей, имеющих высокий титр антител, приводит к подавлению иммунного ответа. Авторы считают, что при планировании ежегодной предсезонной иммунизации против гриппа необходимо исключить из числа подлежащих прививкам лиц, сохранивших защитные титры антител.

### Антитела.

Среди исследователей имеются разногласия о роли секреторных антител в защите от гриппозной инфекции. Некоторые полагают, что местный иммунитет имеет решающее значение для предотвращения инфицирования вирусом гриппа, а поэтому наиболее обоснованным считают способ профилактики инфекции с помощью живых вакцин [96]. В то же время другие исследователи сообщают о незначительной роли секреторных антител в защите от гриппа по сравнению с сывороточными антителами [189]. В обзоре Я.С. Шварцмана с соавт. [132] приводятся многочисленные доказательства важной роли секреторных антител в защите от гриппозной инфекции и подчеркивается, что свои защитные функции секреторные антитела выполняют

в тесном взаимодействии с антителами сыворотки крови.

По современным данным в состав вируса гриппа входят следующие белки : два поверхностных – гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), внутренние – белок нуклеопротеида (НР), неструктурные белки (*NSI* и *NSII*), белки полимеразного комплекса (РВ1, РА, РВ2), матриксные белки (М1 и М2) [15,174]. Имеется мнение, что антитела к НР и М-белкам не защищают от гриппозной инфекции [189]. Защитные свойства антигемагглютинирующих антител убедительно доказаны в десятках работ [33,76,132 и др.]. В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что защитная активность антинейраминидазных антител тоже очень высока и что оба вида антител кооперируют в защите от инфицирования [6,33,63,76,111,132].

До недавнего времени считалось, что антитела воздействуют на вирус гриппа путем его нейтрализации в межклеточном пространстве. Этот процесс предупреждает возможность проникновения вируса внутрь клетки и репликации в ней [207]. Исследования, проведенные в 1981–1982 гг. показали, что различные штаммы вируса гриппа А в комплексе с присоединившимися к НА антителами сохраняют способность прикрепляться к поверхностной мембране фибробластов и проникать в цитоплазму так же активно, как и интактный вирус гриппа. Антитела не способны вызывать деструкцию РНК. В то же время анализ вирионной транскриптазы нейтрализованного антителами вируса гриппа показал, что её активность снижалась семикратно по сравнению с активностью транскриптазы свободного вируса. По мнению авторов, полученные данные свидетельствуют о том, что антитела, взаимодействуя с гемагглютинином, приводят к аллоsterическим изменениям его молекулы, которые за счет белок-белковых взаимодействий оказывают влияние на внутренние компо-

ненты вирусной частицы [188]. Эти данные подтверждены Taylor и Dimmock, которые изучали механизм нейтрализации вируса гриппа [209]. Авторы показали, что вирус, нейтрализованный IgG или мономерным Ig A, прикрепляется и проникает в клетки ВНК-21 со скоростью, идентичной нативному вирусу. Из этого следует, что нейтрализация вируса гриппа Ig A и IgG протекает на стадиях более поздних, чем проникновение. В отличие от этих иммуноглобулинов, секреторные Ig A и Ig M - антитела полностью блокируют прикрепление вирионов. Я.С.Шварцман с соавт. [132] полагают, что механизм нейтрализации вируса гриппа антигемагглютинирующими антителами является многофакторным процессом и включает в себя: А) прерывание репродукции вируса в результате развития антителозависимой клеточной цитотоксичности и иммунного цитолиза, опосредованного комплементом; Б) уменьшение возможности инфицирования чувствительных клеток, благодаря формированию во внеклеточном пространстве вирусных агрегатов вследствие перекрестного связывания антител; В) нарушение процесса репродукции за счет инактивации вирусной транскриптазы; Г) взаимодействие антител с эпитопами гемагглютинина препятствует прикреплению вируса гриппа к клеткам.

Вопрос о механизме протективного действия антинейраминидазных антител до сих пор не решен однозначно и требует дальнейшего изучения [132].

Конформационная зависимость антигенных детерминант вируса гриппа и нейтрализующих антител продемонстрирована работами Arcus и Knight [143], которые показали, что разрушение дисульфидных связей в молекуле гемагглютинина приводит к полной и необратимой утрате способности взаимодействовать с антителами. Both и Jennigs [147] выявили, что антигенные детерми-

нанты вируса гриппа чувствительны к конформационным изменениям.

Melnick [178] в своем обзоре, касаясь перспектив использования синтетических полипептидов в качестве противогриппозных вакцин, отмечает необходимость соответствия антигенных детерминант таких препаратов вирусному антигену не столько по аминокислотным последовательностям, сколько по конформационным особенностям, определяемым последовательностями, расположенными за пределами антигенных детерминант. Показано [176], что некоторые моноклональные антитела при связывании с I из 4 главных антигенных сайтов гемагглютиниона вируса гриппа, индуцируют конформационные изменения в топологически перекрывающихся эпитопах другого сайта, в результате которых значительно усиливается связывание антител, специфичных к этим эпитопам.

### 1.2. Авидитет антител. Значение авидности антител для их протективной активности.

Термин "авидитет" начал применяться в начале XX века. В настоящее время термины "авидность" и "аффинность" часто употребляются как синонимы, что не всегда верно. По определению М.Стьюарда [108] аффинность представляет собой термодинамическое выражение первичной энергии связывания антигенной детерминанты с антигенсвязывающей областью антитела и определяется возникающими в процессе взаимодействия силами притяжения и отталкивания. Таким образом, аффинность характеризует степень соответствия индивидуальных активных центров антигена и антитела. В экспериментальной работе этот термин более всего подходит для системы моновалентный гаптен - антигаптенное антитело. Но так как молекулы антител обладают поливалентностью, для описания энергии связывания антигенсвязывающих центров антитела с антигенными детерминантами поливалентного антигена используют термин

"функциональная аффинность" (авидность). Авидность не следует понимать как суммарную аффинность. Авидность в значительной мере зависит не только от сродства отдельных антигенных детерминант соответствующим активным центрам антител, но и от ряда других факторов, обеспечивающих связывание [ 108 ]. Поскольку встречающиеся в природе антигены, такие, как вирусы и бактерии, имеют повторяющиеся антигенные структуры на своей поверхности, очевидно, что в иммунном ответе на инфекцию *in vivo* более важную роль играет функциональная аффинность (авидность) антител.

Большой вклад в изучение авидитета антигенов и антител внесли советские исследователи - В.В.Фризе [ 121,122 ]; Л.А. Зильбер [ 34,35 ]; В.Б.Фрейман [ 117,118 ]; Э.А.Фридман, Е.К. Болдасов [ 119,120 ]; В.С.Кокорев, Т.Т.Федотова [ 50,116 ]; Е.В.Чернохвостова [ 128 ]; Л.С.Субботина [ 109 ]; С.С.Галитаров [ 19 ]; С.В.Колотвинов [ 51 ] и другие.

В настоящее время доказано, что авидность антител находится под полигенным контролем, который осуществляется независимо от механизма, контролирующего уровень образующихся антител

108,172 . В последние годы получено много данных о изменении авидности антител в ходе иммунного ответа. Было показано, что в течение времени аффинитет антител возрастает. Это явление названо "созреванием иммунного ответа" [ 200 ]. Е.В.Чернохвостова [ 128 ] считает, что такое изменение свойств антител в процессе иммунного ответа (функциональное "созревание" антител) зависит от изменения структуры активного центра : увеличения его размеров, смены типа легких цепей, в результате чего возрастает его комплементарность. А.Ц.Торосян [ 110 ] в своем обзоре указывает, что в процессах связывания антител с антигенами имеет значение форма и глубина активного центра.

Несколькими группами исследователей показано, что avidность рецепторов для антигенов на антигенсвязывающих клетках коррелирует с avidностью секретируемых антител [ 152,153,156,157 ] . Высказывается предположение [ 108 ] , что созревание иммунного ответа можно рассматривать как постепенный отбор преимущественно тех стимулированных антигеном клеток, которые несут рецепторы с наиболее высокой аффинностью.

До настоящего времени среди исследователей нет единого мнения по вопросу наличия зависимости avidности антител от способа иммунизации и свойств антигена. Рядом авторов показано, что меньшие дозы антигена вызывают образование антител с большей avidностью [ 140,141,165 ] . Другие исследователи не выявили такой зависимости [ 213 ]. На модели инфекций гриппа и полиомиелита выявлена зависимость степени avidности антител от кратности иммунизации [ 52,103 ] . Однако, другие исследователи получили противоположные результаты [ 172 ] .

Показано [ 108 ] , что если иммунизация проводится с помощью антигенов, введенных в полном адьюванте Фрейнда, то, как правило, образуются антитела высокой avidности. Другие адьюванты, такие, как неполный адьювант Фрейнда, липополисахарид В, БДЖ, уголь, латекс и др., также способны увеличивать количество антител против белков и повышать их аффинность [ 108 ] .

#### Значение avidности антител для их протективной активности.

Ещё в начале века учеными было высказано предположение о несоответствии лечебной силы сывороток и количеством содержащихся в них антител, что было подтверждено дальнейшими исследованиями.

Brunner , Ward [ 149 ] определяли антитела различной avidности в человеческих сыворотках в острой фазе заболевания полиомиелитом и в период выздоровления. Присутствие высокоавидных

антител в фазе выздоровления дало авторам основание высказать гипотезу о ведущей роли высокоавидных антител в защите организма от вирусных инфекций. Те же выводы сделал Sabin [194]. Он обнаружил, что у больных полиомиелитом в начале заболевания обнаруживаются антитела низкой авидности, а в период реконвалесценции - антитела как низкой, так и высокой авидности.

Steward e.a. [204], исследуя линии мышей, высокочувствительных к развитию индуцированной вирусом хориоменингита болезни расстворимых иммунных комплексов и резистентных к болезни иммунных комплексов, выяснили, что первые продуцируют антитела низкой, а вторые - антитела высокой авидности. Антитела низкой авидности слабо элиминируют антиген, что ведет к персистенции последнего с последующими патологическими нарушениями в организме.

Авидность антител при клещевом энцефалите изучали Б.Ф.Семенов и Н.С.Карасаева [91]. Они нашли, что при различных клинических формах клещевого энцефалита период циркуляции антител низкой авидности неодинаков. У больных с одноволновым течением эти антитела обнаруживаются в течение первых семи дней. При двухволновом клещевом энцефалите низкоавидные антитела определяются до 4-й недели. Эти данные, а также данные, полученные при изучении образования антител различной авидности при вакцинации, позволили авторам говорить о ведущей роли высокоавидных антител в защите организма от клещевого энцефалита.

Уменьшение элиминации HBsAg у больных гепатитом В, приводящее к хроническим формам инфекции, по данным Brown e.a. [158] ассоциировалось с более низким (на порядок)'affинитетом иммуноглобулинов у этих больных по сравнению с показателями при остро протекающих заболеваниях. Ahlstedt e.a. [138] изучая протективную активность антител различной авидности в отношении O-антигена E.coli показали, что низкоавидные антитела менее протектив-

ны, чем высокоавидные. По данным К.В.Бунина с соавт. [42] степень выраженности клинических проявлений при сальмонеллезе коррелирует с показателями авидности антител. Ранее этими авторами была отмечена более высокая авидность антител у больных сальмонеллами группы В по сравнению с больными, от которых выделялись сальмонеллы других серологических групп [71]. В.Л.Черкасов с соавт. [127] отмечают достоверную зависимость между тяжестью течения болезни и степенью авидности сывороточных антител у больных паратифом В.

Таким образом, вопрос о прививочной роли высокоавидных антител в организме не вызывает сомнений и имеет практическое подтверждение.

Изучение авидности антител важно не только при характеристике иммунного ответа, но и при оценке вакцин. Так, Brown e.a. [137], характеризуя качество нативной и синтетических вакцин к гепатиту В, показали, что оценивать эффективность вакцин следует не только по увеличению титров, но и по авидности образующихся антител. Авторы полагают, что значения авидности антител после вакцинации должны быть в пределах или выше значений авидности антител при природной инфекции.

Н.А.Иванова с соавт. [70] определили, что штамм вируса гриппа А Н3N2 А/Ленинград/101/83 вызывает выработку антител с более широким спектром активности, нейтрализующих все предшествующие варианты вируса гриппа А(Н3N2). В работе В.В.Блоха с соавт. [40] подтверждена гетерогенность антител, вырабатываемых к гемагглютинину вируса гриппа. Авторами показано наличие различных популяций антител к гемагглютинину штамма А/Хабаровск/15/76, часть из которых обладает большим сродством к гемагглютинину штамма МRC-II, чем к гемагглютинину собственного штамма. Изучение осо-

бенностей генома и антигенной специфичности вариантов вируса гриппа А H1N1, циркулировавших в эпидемический период 1982-83 г.г., позволило И.И.Акоповой с соавт. [24] выбрать штамм, способный вызывать образование антител, реагирующих с гемагглютинидами большинства как старых, так и новых вариантов, одновременно циркулирующих в ходе одной эпидемии. В то же время эти исследования показали, что некоторые новые антигенные варианты (например, штамм А/Дунедин/27/83) индуцируют антитела, обладающие слабой способностью взаимодействовать с гемагглютинидами других вариантов этого же подтипа. Авторами сделан вывод, что при подборе кандидатов в вакцинные штаммы для инактивированной гриппозной вакцины необходимо выбирать только те варианты, которые индуцируют синтез антител, способных реагировать с гемагглютинидами большинства социркулирующих вариантов данного подтипа вируса.

### 1.3. Гетерогенность популяции вируса гриппа по иммуногенной активности

Исследованиями последних лет убедительно доказана гетерогенность популяции вируса гриппа по иммуногенности, что подтверждает необходимость поиска антигенных вариантов вируса с повышенной иммуногенной активностью для использования их в качестве штаммов - кандидатов в вакцинные.

Г.П.Жилова с соавт. [32] обнаружили существенные колебания в иммуногенной активности у одинаковых по антигенным характеристикам малопассированных вирусов гриппа А(H3N2) 1968-1969 г.г. выделения и выявили значительные преимущества иммуногенных потенциалов вируса А/Гонконг/1/68 по сравнению с "местными" ленинградскими штаммами. Показано, что иммуногенная активность вируса находится в прямой корреляции с его эпидемической активностью. Авторы делают заключение, что в решении задач отбора кандидатов

в вакцинные штаммы главным ориентиром служит характеристика биологической активности вируса для человека, при этом необходимо опираться на эпидемическую активность как на ведущее свойство, обладая которым вирус будет иметь и высокую иммуногенность и антигенно актуальный профиль. Ранее этими авторами была показана прямая корреляция между вирулентностью и иммуногенной активностью вируса гриппа [14]. Изучая иммуногенную активность вирусов гриппа А, выделенных в период эпидемии 1977-1980 г.г. Г.П.Жилова с соавт. [125] показали, что в отличие от вариантов вируса гриппа А(Н3N2), циркулировавших в 1968-76 годах, обладающих высокой иммуногенной и репродукционной активностью, вирусы гриппа А, вызвавшие эпидемии на территории СССР в период 1977-80 г.г. либо совсем не обладали способностью размножаться в зеве и отличались слабой иммуногенностью, либо интенсивно размножались в слизистой оболочке зева, однако не создавали иммунологической защиты после перорального их введения людям. В другой своей работе [136], сравнивая эффективность живых гриппозных вакцин, полученных из пассажного и рекомбинантного вакцинных штаммов, авторы пришли к заключению, что рекомбинантные штаммы содержат дефектную генетическую информацию, а приготовленные из них как живые, так и инактивированные вакцины формируют у привитых менее надежную защиту от эпидемического вируса по сравнению с препаратами из оригинальных вирусов гриппа с естественной констелляцией генов. Однако, по данным других исследователей [25,134], рекомбинантные штаммы обладают более высокой иммуногенной активностью, чем родительские вирусы. М.В.Щипанова с соавт. [134] показали, что вирусы гриппа с антигенной формулой H1N1 обладают менее выраженной иммуногенной активностью по сравнению с вирусами гриппа H3N2. Рекомбинантные штаммы обоих типов вируса иммуногенно активнее по сравнению с исходными штаммами, но раз-

личаются по степени напряженности иммунитета, которая в свою очередь не коррелирует с титрами антител. Авторы считают, что для получения более точной информации об иммуногенной активности вирусов гриппа необходимо изучать напряженность иммунитета по отношению к антигенно близкому (лучше гомологичному) патогенному вирусу.

По данным Тарноск е.а. [208] хелодоадаптированные штаммы (ХА) вируса гриппа А(Н1, Н2 и Н3) были менее иммуногенны при интраназальной иммунизации мышей CSL, чем родительские дикие штаммы тех же вирусов. ХА-штаммы менее защищали мышей при последующем заражении вирулентным штаммом. Иммуногенность ХА-штаммов повышалась при двукратной иммунизации мышей, зависела от поверхностных антигенов и составляла у Н3 и Н2 > Н1.

Результаты исследований, проведенных Г.С.Скрипченко с соавт.[16] свидетельствуют о существовании природных популяций вируса гриппа А, различающихся по способности стимулировать образование антител в ранние и поздние сроки после иммунизации. "Быстрое" антителообразование вызывают варианты с повышенной иммуногенностью, "медленное" антителообразование - низкоиммуногенные варианты.

Авторы считают, что дифференциация вирусов по этому признаку является необходимым условием отбора вакцинных штаммов. Решающее значение при таком отборе должно сыграть изучение молекулярно-генетической детерминации признака повышенной и пониженной иммуногенности, а также "медленного" и "быстрого" антителообразования.

Н.А.Ивановой с соавт.[126] на модели эпидемического цикла вируса гриппа А/Гонконг показано, что в процессе длительной циркуляции вирусов гриппа их признак температурочувствительности меняется в сторону резкого увеличения удельного веса термочувствительных вариантов к концу цикла. Выявлено также, что пос-

ледние в цикле эпидемии гриппа А(Н3N2) и современные эпидемии гриппа А(H1N1), индуцированные в основном термочувствительными возбудителями, имели сравнительно легкое течение, характеризующееся более низким процентом осложнений и тяжелых форм заболеваний.

Изучая особенности течения у мышей гриппозной инфекции, вызванной высоко- и низкоиммуногенными вариантами вируса гриппа, полученными из вакцинного штамма А/Виктория/35 путем иммуноселекции, моделирующей действие естественного отбора, А.А.Фролов с соавт. [ 69 ] обнаружили, что низкоиммуногенный вариант, в отличие от исходного вируса и высокоиммуногенного варианта, был способен длительно циркулировать в организме, вызывал развитие хронических воспалительных процессов и появление новообразований. Авторы предполагают, что сниженная иммуногенность является приспособительным механизмом агрессии, позволяющим популяции вируса гриппа уходить из-под контроля специфического гуморального иммунитета.

Целый ряд исследований был предпринят с целью выявления связи между различной иммуногенной активностью вируса гриппа и его антигенной структурой, а также другими биологическими признаками. А.Л.Платонова с соав. [ 5 ] выявили, что эффективность антител, способных ингибировать гемагглютинин, нейтрализовать биологическую активность вируса гриппа, зависит от качественного и количественного состава антигенных детерминант гемагглютинина вируса гриппа. Наибольший вакцинирующий эффект дают гомологичная вакцина, а также вакцины, имеющие в своем составе две общие антигенные детерминанты с разрешающим вирусом. Даже вакцина, сходная лишь по одной антигенной детерминанте с разрешающим вирусом, способна почти в два раза уменьшить гибель мышей

от гриппа. Было показано [197], что конформационные изменения в антигенном участке гемагглютинаина вируса гриппа играют существенную роль в иммуногенности и антигенных характеристиках вируса. Russell e.a. [142] на основании проведенных исследований делают вывод, что штаммоспецифические и перекрестнореагирующие антитела представляют собой условные категории антител, которые направлены против одних и тех же участков на молекуле гемагглютинаина. Авторы пришли к выводу, что антигенные детерминанты на поверхности гемагглютинаина могут индуцировать выработку гетерогенной популяции антител, связывающихся с этими детерминантами с различной авидностью. К аналогичным выводам пришли Г.Н.Трушинская с соавт. [41], которые считают, что кроме антигенных детерминант, имеются другие участки гемагглютинаина, которые в составе данного вируса не индуцируют синтез антител, но способны взаимодействовать с антителами, индуцированными антигенными детерминантами другого вируса. Это их свойство, по мнению авторов, указывает на то, что участки гемагглютинаина сходной структуры ведут себя по-разному в составе разных вирусных штаммов. Можно предполагать, что неспособность участков сходной структуры разных вирусных штаммов индуцировать синтез антител, обусловлена особенностями пространственной структуры молекул гемагглютинаина, в результате чего определенные участки могут быть недоступными для узнавания иммунокомпетентными клетками.

С.Ф.Шендерович с соавт. [37] показали, что отщепление сахаров не влияет на иммуногенные свойства вирионов и не изменяет антигенной специфичности вируса при инициации антител. Вместе с тем, наблюдалась частичная утрата способности модифицированного вируса соединяться с гомологичными антителами и резкое снижение гемагглютинирующей активности вируса.

Pemberton e.a. [185] изучили морфологию и антигенные

свойства трех реассортантов вируса гриппа А(Н3N2) с различной иммуногенностью для хомяков. При электронной микроскопии вакцинных препаратов, полученных из этих реассортантов, подтверждено наблюдение о связи небольших размеров вирионов и низкой иммуногенности. Однако после разделения вакцинных препаратов в градиенте плотности сахарозы не выявлена популяция вирионов, иммуногенные свойства которой коррелировали бы с плотностью, размером, морфологией и целостностью вирионов. Ранее подобные исследования были выполнены Е.С.Кокоревым с соавт. [50] на модели вируса клещевого энцефалита. При исследовании антигенной активности фракций вируса клещевого энцефалита после разделения на колонке с сефарозой 2В обнаружено, что иммуногенная активность отдельных фракций одного и того же штамма вируса клещевого энцефалита различна и коррелирует с размером и/или молекулярным весом вирусных частиц. Исследования, проведенные Е.В.Сидоренко с соавт. [93] показали, что субпопуляциям вируса гриппа А/Гонконг/1/68, различающимся по силе связи с ионообменником ДЭАЭ-сефадексом А-50, свойственна неодинаковая иммуногенность. Вирионы, характеризующиеся слабой связью с ионообменником, стимулировали образование антител у белых крыс в меньшей степени, чем вирионы с наибольшей силой связи с ионообменником. Индукция антител не зависела от инфекционных и гемагглютинирующих титров вводимого вируса, содержащего одинаковое количество белка. Авторы считают, что иммуногенные различия субпопуляций штамма вируса гриппа обусловлены структурными особенностями вирионов. Они проявляются также в образовании сывороточных антител в различном соотношении - после иммунизации субпопуляциями штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68, обозначенных авторами А-68/0,1 и А-68/1,0, уровень сывороточных IgM был значительно ниже уровня IgG, при иммунизации субпопуляцией А-68/0,5 уровень IgM преобладал над уровнем IgG. Наиболее

длительное иммунодепрессивное действие оказывала А-68/1,0 субпопуляция, в состав которой входили ДИ-частицы.

В работе Г.С.Скрипченко с соавт. [101] приведены данные, свидетельствующие о различной иммуногенной активности вируса гриппа А в зависимости от их антигенной структуры и некоторых других биологических признаков. Варианты вируса с повышенной иммуногенной активностью были ближе по антигенным связям к вирусам более поздних лет выделения, чем исходные штаммы, характеризовались замедленной элюцией с эритроцитов, терморезистентным гемагглютинином, повышенной чувствительностью к ингибиторам, морфологическими особенностями - наличие в популяции вирионов, покрытых плотными, утолщенными, примыкающими друг к другу шипами. Варианты вируса с повышенной способностью вызывать антителообразование в опытах на животных также проявляли более высокую иммуногенную активность при иммунизации добровольцев.

#### 1.4. Препараты для специфической профилактики гриппа.

Активная иммунизация с помощью живой или инактивированной вакцины является ведущим направлением профилактики гриппа [11, 26, 76, 95, 97] .

В нашей стране широко применялась живая вакцина, стимулирующая при интраназальном введении развитие бессимптомной инфекции с формированием гуморального, секреторного и клеточного иммунитета [29, 76, 96] . В СССР разработка принципов активной иммунизации против гриппа с помощью живой вакцины была осуществлена А.А. Смородинцевым с сотрудниками в 1937 году. Начиная с 1938 года в нашей стране были организованы широкие клинические и эпидемиологические испытания живой гриппозной вакцины, которая до 1947 г. готовилась из легочной ткани белых мышей, а в дальнейшем - из аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов [29, 97] .

Аттенуацию вируса в течение многих лет проводили путем пассажей очередного актуального эпидемического штамма в курином эмбрионе при оптимальной температуре 34°C [31,154]. Для ускорения процесса аттенуации вируса гриппа, длившегося месяцами, в начале 70-х годов разрабатываются способы получения вакцинных штаммов с помощью метода генетической рекомбинации [1]. В Англии и Бельгии были испытаны рекомбинанты, полученные на основе вируса A/PR/8/34 - мутанта с измененным кругом хозяев, длительно пассированного в лабораторных условиях. При изучении рекомбинантов, полученных при скрещивании вируса A/PR/8/34 с эпидемическими штаммами, было установлено, что его аттенуация обеспечивается мутациями в генах, кодирующих поверхностные белки. Замена этих генов в рекомбинантах на немутантные гены вирулентных вирусов является одной из причин восстановления вирулентности реассортантов [182].

Группа Chanock и Murphy для опытов по рекомбинации использовали температурочувствительные мутанты, полученные с помощью химического мутагенеза [151,182]. Рекомбинанты, полученные при скрещивании вирулентных вирусов с этими мутантами наследовали признак температурочувствительности. Однако последующие испытания на ограниченных контингентах взрослых и детей показало недостаточную аттенуацию рекомбинантов и реверсию изолятов с возвратом вирулентности после репродукции вируса в верхних дыхательных путях привитых людей [206].

Г.И.Александрова с сотрудниками использовали рекомбинацию актуальных по антигенной характеристике эпидемических штаммов вируса гриппа с холодоадаптированными, хорошо изученными вариантами и последующий отбор полезных реассортантов [1,20]. Оптимальными донорами аттенуации явились холодоадаптированные штаммы A/Ленинград/134/47/57 (H2N2), имеющий 5 ts-мутаций в генах 1,2,5,7 и 8

и А/Ленинград/17/57 (H2N2), имеющий 3 ts-мутации в генах I,5, 7 [61]. В США в аналогичных исследованиях по получению аттенуированных рекомбинантов применялся холодоадаптированный штамм А/Энн-Арбор/6/60 (H2N2) [155]. Snyder e.a. [164] изучали гены, ответственные за холодоадаптированный, температурочувствительный (ts-) фенотипы и фенотип аттенуации вируса гриппа А/Энн-Арбор/6/60. Показано, что за холодоадаптированный фенотип вируса ответственен ген полимеразы PA. Гены PB1 и PB2 ответственны за ts-фенотип вируса. Фенотип аттенуации поддерживают 4 гена - PA, M, PB1 и PB2 дснора аттенуации. Наличие множественных мутаций в геноме вирусов А/Ленинград/134/57 и А/Энн-Арбор/6/60 явилось основой аттенуации и генетической стабильности холодоадаптированных вариантов, которые считаются наиболее надежными донорами аттенуации для живой гриппозной вакцины [154].

Живые вакцины имеют определенные преимущества перед убитыми вакцинами по экономичности и простоте производства [76]. В опытах на волонтерах, привитых живыми вакцинами [198] и в эксперименте на животных [59,77,199] установлена способность препаратов индуцировать невосприимчивость к заражению гетерологичным штаммом и даже подтипом вируса. Этот факт можно объяснить на основе изучения клеточных факторов иммунитета. Установлено, что естественная инфекция и живые вакцины активируют Т-киллеры, не дифференцирующие штаммы вируса по крайней мере в пределах серологического подтипа [145].

Живые вакцины, вводимые интраназально, перорально, сочетанно с инактивированными препаратами, лицам разных возрастных групп и разным по численности контингентам, достаточно хорошо изучены в нашей стране и за рубежом [21,66,68,83,107,212 и др.]. Результаты исследований противоречивы, ряд исследователей [102,104,107,150,212] утверждают, что живые вакцины более альтерна-

тивны, чем инактивированные, по данным других авторов [38,105], инактивированные вакцины по иммуногенной активности не уступают, а зачастую и превосходят живые.

Широко в настоящее время в нашей стране и за рубежом используются инактивированные гриппозные вакцины [76].

Имеется три вида вакцин: 1) цельновирионные вакцины. Такие вакцины содержат очищенный вирус гриппа, выращенный в аллантоисной полости развивающихся куриных эмбрионов; 2) расщепленные или дезинтегрированные вирусные вакцины, представляющие собой взвесь структурных компонентов вириона; 3) субъединичные, содержащие только поверхностные структуры вириона - гемагглютинин и нейраминидазу. В соответствии со способом приготовления различают седиментационные (центрифужные), адсорбированные, дезинтегрированные и хроматографические инактивированные гриппозные вакцины. Однако, почти все перечисленные виды вакцин являются смешенными по способу их приготовления [76].

До начала 70-х годов ведущим способом приготовления большинства коммерческих вакцин был метод дифференциального центрифугирования. Этот способ не обеспечивал достаточной очистки вируса от внешних аллантоисных компонентов, что явилось основной причиной реактогенности подобных вакцин [196]. Поэтому в настоящее время для очистки вируса на одном из этапов применяют центрифугирование в градиенте плотности различных веществ, чаще всего сахарозы [76]. Дальнейшим усовершенствованием стало использование зональной сепаративной техники центрифугирования [192]. Использование градиентного центрифугирования для получения очищенного вируса в больших объёмах стало возможным после создания вертикальных проточных роторов с зональным распределением градиента.

Адсорбированные цельновирионные вакцины были одними из первых убитых вакцин. Очистку и концентрирование вируса из аллан-

тоисной жидкости производили с помощью адсорбции и элюции на формализированных куриных эритроцитах [175]. Поскольку в этом случае использовали биологические свойства вируса, то описанный способ являлся наиболее физиологичным. Однако с его помощью не удавалось достичь достаточной очистки от внешнего аллантоисного компонента. Поэтому в дальнейшем адсорбцию вируса производили на гелях гидроокиси алюминия и др. [48].

Сравнительно недавно для получения высокоочищенных и концентрированных препаратов вируса гриппа стали использовать методы хроматографии и ультрафильтрации, применяя в качестве сорбента макропористое стекло с контролируемыми размерами пор [9]. Создание нескольких эффективных схем очистки и концентрирования вируса гриппа послужило основой для разработки промышленной технологии изготовления инактивированной хроматографической гриппозной вакцины [113]. Вариантами хроматографического принципа очистки и концентрирования вируса гриппа на макропористом стекле и других силикатных сорбентах являются: сорбционный метод [81], сочетание сорбции, хроматографии и ультрафильтрации [124], ситовая хроматография на модифицированном сорбенте [30], комбинация ситовой хроматографии с ультрафильтрацией [18] и др. Достоинствами инактивированной хроматографической гриппозной вакцины являются высокая чистота и сохранение нативных свойств вируса [62].

Дальнейшим развитием исследований на пути получения высокоочищенных цельновирioнных вакцин явилось использование методов иммуноаффинной хроматографии для полного освобождения хроматографической вакцины от овальбумина [64]. В нашей стране на основе этого метода разработана схема получения высокоочищенной цельновирioнной вакцины для профилактики гриппа у детей.

С целью уменьшения реактогенности создаются дезинтегриро-

ванные и субъединичные вакцины. Для дезинтегрирования вируса используют различные детергенты : эфир, дезоксихолат, твин, МЭСК, тритон X-101 и др. [12, 80, 123, 190] . Результаты многочисленных испытаний свидетельствуют об их малой реактогенности, однако в ряде работ установлена слабая иммуногенность этих вакцин [76,90] .

Предпринимаются попытки повысить эффективность вакцинации против гриппа с помощью комбинированного использования индукторов интерферона и вакцин [53] , применением противогриппозной вакцины с одновременным интраназальным введением левамизола [73] , введением вакцины БЦЖ перед введением вакцины против гриппа [214] , иммунизацией против гриппа одновременно с вакцинацией против основных паразитирующих в дыхательных путях патогенных бактерий [191] и др.

Результаты изучения защитного эффекта известных инактивированных вакцин весьма противоречивы. Имеются сообщения как о достаточно высоком уровне защиты, достигнутом после иммунизации [72,114] , так и о полной неэффективности применения инактивированных гриппозных вакцин [39,173] .

Нередко низкая эффективность живых и инактивированных вакцин объясняется почти постоянным несоответствием антигенной характеристики вакцинных штаммов эпидемическим вирусам. Несмотря на значительное сокращение сроков создания и проверки штаммов для живых и инактивированных вакцин, эти препараты все же запаздывают по отношению к естественной смене возбудителей гриппа [76] . А.А.Смородинцев [96] считал, что ближайшими задачами в области усовершенствования вакцинопрофилактики гриппа является повышение эффективности живой гриппозной вакцины путем получения вакцинных штаммов более широкого антигенного спектра (в пределах актуального подтипа). Т.В.Перадзе и Э.А.Фридман

[76] утверждают, что "в настоящее время единственно реальный практический метод, позволяющий достичь профилактического эффекта с помощью вакцинации в условиях антигенного дрейфа - разработка высокоиммуногенных вакцин, создающих невосприимчивость широкого диапазона, т.е. и в отношении гетерологичных штаммов."

В последние годы начаты исследования по созданию принципиально новых профилактических препаратов, обладающих антигенной универсальностью, введение которых защищало бы людей от любого варианта вируса гриппа А.

Glathe e.a. [211] предлагают использовать в качестве инактивированных вакцин вирионы вируса гриппа, лишенные тяжелой цепи (НА1) гемагглютинина. Поскольку на дистальном конце малой субъединицы (НА2) гемагглютинина вируса гриппа находятся белковые последовательности, обеспечивающие слияние вирусной оболочки с клеточной, и эти белковые последовательности идентичны у всех вирусов гриппа, авторы считают, что таким образом будут получены гриппозные вакцины с незначительной штаммоспецифичностью.

Обсуждается возможность получения универсальной гриппозной вакцины из антигенных детерминант [8,28]. Однако эта задача чрезвычайно сложна. Гемагглютинин вируса гриппа имеет по крайней мере 4 антигенные детерминанты [162], с которыми связан специфический иммунитет к гриппу. Две из них относительно просты и образуются петлей из 6 аминокислотных остатков и  $\alpha$ -спиралью из 10 аминокислотных остатков. Стабильность трехмерных структур этих эпитопов обеспечивается справа и слева стабильными участками, состоящими преимущественно из гидрофобных аминокислотных остатков. Поэтому можно надеяться на формирование этих антигенных детерминант в результате генно-инженерного или даже простого химического синтеза. Между тем две другие детерминанты на-

верняка не смогут быть воспроизведены синтезом коротких олигопептидов, так как одна из них формируется при образовании дисульфидной связи между 52-м и 277-м аминокислотными остатками, а другая появляется на стыке мономеров при образовании из них тримеров. Пока нет оснований считать эти две детерминанты второстепенными так как известно, что мономеры гемагглютинаина на 2 или 3 порядка менее иммуногенны, чем тримеры в составе гемагглютинаина. Кроме того, недавно опубликованные данные показали существенное значение изменений в участках полипептидной цепи, примыкающих к антигенным детерминантам, для их иммунологической структуры [147,176,197] .

Многочисленная группа исследователей предлагает для повышения иммуногенности поверхностных белков вируса гриппа в качестве носителей использовать липосомы [2,79,86 и др.] . Основные достоинства липосом связаны с их способностью защищать включенные соединения от деградации, обеспечивать и повышать их проникновение через клеточные мембраны, снижая в то же время токсичность и скорость выведения из организма. В целом биологическая активность различных соединений в составе липосом значительно возрастает. Однако, опубликованные недавно данные [74] заставляют задуматься о возможных осложнениях, связанных с применением липосом в медицине. Введение мышам липосом одновременно с вирусом гриппа или спустя 24 часа после заражения оказывало стимулирующее действие на инфекцию. Средняя продолжительность жизни животных при добавлении липосом сокращалась в 1,5-2 раза. Такой эффект авторы объясняют дестабилизацией липидного бислоя плазматической мембраны клетки при действии липосом, что увеличивает эффективность проникновения вируса в клетки.

Весьма актуален вопрос создания антиидиотипических вакцин [13,46] . Антиидиотипические вакцины имеют определенные эконо-

мические, практические и биологические преимущества над вакцинами, применяемыми в настоящее время. Т-зависимые белковые вакцины можно применять при иммунонедостаточности организма, производство их не требует больших количеств очищенного антигена, их можно связывать с сильными иммуногенными носителями. В ближайшие годы можно ожидать расширения работ, связанных с изучением эффекта взаимодействия идиотип-антиидиотип при вирусных инфекциях. Однако пока трудно сказать, когда начнется использование этих результатов в практике.

В научной литературе широко обсуждается возможность использования вируса осповакцины в качестве вектора для генно-инженерных вакцин [13,60,177]. Mackett [177] отмечает, что проблемами для применения таких вакцин является трудность установления контроля и ликвидации многих хронических инфекций с большими резервуарами возбудителей среди людей и животных, и формирование к вирусу вакцины длительного иммунитета, подавляющего репликацию рекомбинантов вируса вакцины в течение ряда лет. З.И. Меркалова с соавт. [65] считают необходимым обратить внимание на небезопасность использования вируса осповакцины в качестве вектора для генно-инженерных вакцин так как имеющиеся данные свидетельствуют о тесной связи морфологической и злокачественной трансформации клеток *in vitro* с инфицированием их вирусом осповакцины и о способности этого вируса влиять на функционирование генома клетки-хозяина. П. Смолл [60] сообщил, что при вакцинации мышей путем внутрикожного введения рекомбинанта вируса осповакцины, содержащего ген, кодирующий гемагглютинин вируса гриппа, наблюдалось образование IgG антител, однако секреторные IgA антитела в верхнем дыхательном тракте не обнаруживались. В то же время при интраназальном введении рекомбинантного вируса наблюдалось как образование IgG, так и образование IgA. Животные,

вакцинированные таким рекомбинантным штаммом вируса осповакцины внутривенно, оказались защищены при последующем интраназальном заражении вирусом гриппа только от вирусной пневмонии, а вакцинированные перорально - и от пневмонии, и от инфекции верхнего респираторного тракта. Учитывая, что пероральная или интраназальная вакцинация человека рекомбинантным штаммом вируса осповакцины вряд ли допустима, маловероятно, что рекомбинантный вирус осповакцины, содержащий ген или гены, кодирующие белки вируса гриппа, найдет широкое применение для профилактики гриппа.

Одно из перспективных направлений исследований по получению искусственных противогриппозных вакцин возглавили Р.В.Петров и В.М.Жданов [ 26,75 ]. В 1984 году для повышения иммуногенности вакцин, содержащих изолированные поверхностные белки вируса гриппа, были использованы полиионы. Изолированные вирусные антигены ковалентно конъюгировали с синтетическими сополимерами акриловой кислоты или N -винилпирролидона. В опытах на мышах, иммуногенность таких комплексов во много раз превышала иммуногенность исходных антигенов [ 47 ]. Однако этот препарат обладал тем же недостатком, что и традиционные вакцины - зависимость эффекта вакцинации от антигенного дрейфа. Чтобы преодолеть этот недостаток, предпринята попытка получить искусственные противогриппозные вакцины, содержащие комплексы М-белка с синтетическим полиэлектролитом [ 85 ] или содержащие комплексы синтетического N -концевого пептида HA2-субъединицы гемагглютинина с полиионами [ 43 ]. После иммунизации такими комплексами мыши приобрели устойчивость к вариантам вируса гриппа А разных серотипов. Таким образом, синтетические вакцины, подобные описанной выше, способны индуцировать биосинтез антител в обход T<sub>H</sub> -генного контроля т.е. без участия Т-хелперов (известно, что М-белок и константная часть молекулы гемагглютинина являются слабыми иммуно-

генами). Однако, результаты экспериментов, проведенных Smith e.a. [ 201 ] с большой степенью достоверности свидетельствуют о том, что продукция таких высокоэффективных в протективном отношении антител, как IgG антитела, находятся под контролем Т-хелперов. Структурные основы и механизм этого контроля ещё не ясны. По мнению А.Я.Кульберга [ 56 ] вплоть до того, пока они не будут раскрыты, моделирование полноценной синтетической вакцины не может быть завершено, поскольку иммунная защита с помощью антител зависит не только от их наличия в организме, но и в решающей степени от их биологических свойств.

#### I.5. Общее заключение по обзору литературы.

До настоящего времени к вакцинному штамму для убитых и живых вакцин предъявляются следующие требования [ 76 ] : во-первых, вакцинный штамм должен быть идентичен или как можно более близок по антигенной структуре эпидемическому штамму. Замена вакцинных штаммов производится по мере выявления антигенного дрейфа вируса. Во-вторых, вакцинный штамм должен обладать высокой репродуктивной способностью. В течение последних лет разработаны приемы быстрого получения высокорепродуктивных вакцинных штаммов с помощью метода генетической рекомбинации "диких" вирусов с хорошо репродуцирующимися лабораторными штаммами, чаще всего с вирусом A/PR/8/34, от которого рекомбинант наследует способность хорошо размножаться в куриных эмбрионах. Важное требование, предъявляемое к вакцинному штамму - гомогенность вирусной популяции, достигается путем быстрого клонирования вируса с использованием его способности к бляшкообразованию в монослое человеческого, цыплячьего или телячьего почечного эпителия. Применяется также метод пассажей предельных разведений вируса в курином эмбрионе с последующим массивным заражением.

Но такое важное свойство вакцинных штаммов, как способность вызывать образование авидных антител в ответ на его введение, до сих пор не учитывается при выборе штамма - кандидата в производственные. Между тем исследования советских и зарубежных ученых свидетельствуют, что оценивать эффективность вакцин следует не только по увеличению титров, но и по авидности образующихся антител.

В связи с изложенным нам представляется, что дальнейшие исследования с целью разработки рациональных критериев отбора штаммов вируса гриппа для производства вакцин необходимо проводить в следующих направлениях :

во-первых, исследовать гетерогенность популяции вируса гриппа А по способности индуцировать синтез авидных антител ;

во-вторых, изучить взаимосвязь признака иммуногенности с другими генетическими маркерами с целью дополнительной дифференциации штаммов, способных вызывать синтез авидных антител ;

в-третьих, определить особенности реагирования клеточных факторов иммунитета при иммунизации вариантами вируса, различающихся по способности индуцировать синтез авидных антител, для определения механизмов функционирования иммунной системы организма при введении таких вариантов вируса.

Указанные направления и определили наш подход к экспериментальной разработке темы.

ЧАСТЬ II. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Вирусы гриппа А

В работе использованы штаммы вируса гриппа А, полученные из Музея вирусов Всесоюзного НИИ гриппа МЗ СССР, г. Ленинград и Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, г. Москва. Штамм А/Ленинград/385/80 получен из Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича МЗ СССР, г. Москва.

Характеристика штаммов, полученных в нашей лаборатории клона и рекомбинантов, приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1.

| №№<br>п/п | Наименование штамма,<br>индекс клона и<br>рекомбинанта | Антигенная<br>формула | Источник          | Примечание |
|-----------|--|-----------------------|-------------------|------------|
| 1         | 2  | 3                     | 4                 | 5          |
| 1.        | A/PR/8/34  | H1N1                  | Музей ВНИИ гриппа |            |
| 2.        | A/Ленинград/229/80                                     | H3N2                  | "-                |            |
| 3.        | A/Ленинград/7/78                                       | H3N2                  | "-                |            |
| 4.        | A/Таллин/37/80   | H3N2                  | "-                |            |
| 5.        | A/Архангельск/127/79                                   | H3N2                  | "-                |            |
| 6.        | A/Алма-Ата/384/80                                      | H3N2                  | "-                |            |
| 7.        | A/Фрунзе/160/79  | H3N2                  | "-                |            |
| 8.        | A/Барнаул/3988/79                                      | H3N2                  | "-                |            |
| 9.        | A/СССР/2/85  | H3N2                  | "-                |            |
| 10.       | A/Днепропетровск/770/85                                | H3N2                  | "-                |            |
| 11.       | A/Алма-Ата/187/85                                      | H3N2                  | "-                |            |
| 12.       | A/Свердловск/427/85                                    | H3N2                  | "-                |            |
| 13.       | A/Воронеж/157/85                                       | H3N2                  | "-                |            |
| 14.       | A/Калининград/1174/85                                  | H3N2                  | "-                |            |
| 15.       | A/Хабаровск/14784/85                                   | H3N2                  | "-                |            |
| 16.       | A/Мурманск/203/85                                      | H3N2                  | "-                |            |

| 1   | 2  | 3                   | 4  | 5   |
|-----|--|---------------------|--|---|
| 17. | А/Ленинград/107/85                       | Н3N2                | -"-  |   |
| 18. | А/Ленинград/385/80                       | Н3N2                | ГИСК им.Тарасевича   |   |
| 19. | А/СССР/05/80/P <sub>m</sub> <sup>+</sup> | Н3N2                | Гос.коллекция<br>вирусов   |   |
| 20. | А/Аичи/2/68/P <sub>m</sub> <sup>+</sup>  | Н3N2                | Музей ВНИИ гриппа  |   |
|     |  | <u>КЛОН</u>         |  |   |
| 21. | asV27.123                                | Н3N2                | штамм А/Ленинград/229/80   | Получен в Свердловском мед. институте, 1985 г.      |
|     |  | <u>РЕКОМБИНАНТЫ</u> |  |   |
| 22. | P-16                                     | Н3N7                | А/Ленинград/385/80 х<br>А/Лошадь/1/Прага/56<br>Музей ВНИИ гриппа |   |
| 23. | asVRI-54                                 | Н3N2                | А/PR/8/34 х<br>asV27.123   | Рекомбинанты получены в Свердловском мед. институте |
| 24. | asVRII-169                               | Н3N1                | -"-  |   |
| 25. | asVRII-33                                | Н3N1                | -"-  |   |

Штаммы А/СССР/05/80/P<sub>m</sub><sup>+</sup> и А/Аичи/2/68/P<sub>m</sub><sup>+</sup> были использованы в опытах по определению протективной активности отобранных вариантов вируса. Остальные штаммы, клон и рекомбинанты использовались для получения иммунных сывороток и определения их авидности.

## 2. 2. Вирусологические методы

### 2.2.1. Культивирование вирусов

Штаммы вируса гриппа А, выделенный клон и рекомбинанты культивировали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов (заражающая доза  $10^2-10^3$  ЭИД<sub>50/0,2</sub> мл). Эмбрионы инкубиро-

вали при 36°C в течение 48-72 часов.

2.2.2. Определение гемагглютинирующей и инфекционной активности.

Гемагглютинирующую активность препаратов, содержащих вирус (аллантоисная жидкость, фракция после хроматографии или ультрацентрифугирования) определяли в реакции гемагглютинации (РГА). Постановку РГА осуществляли микрометодом [98], используя 0,75% взвесь куриных эритроцитов в физиологическом растворе (рН 7,2).

Инфекционный титр устанавливали путем заражения куриных эмбрионов серийными разведениями вируса (от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ ) с последующим учетом результатов в реакции гемагглютинации; титры рассчитывали по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина [7] и выражали в  $lg ЭИД_{50}/0,2 \text{ мл}$

2.2.3. Получение клонов и рекомбинантов

Клон вируса гриппа aSV27.I23 получали, используя следующий метод: готовили суспензию вируса в физиологическом растворе из расчета 1  $ЭИД_{50}$  в 4,0 мл и инфицировали большую партию куриных эмбрионов (300-500 шт.). В аллантоисную полость каждого эмбриона вводили 0,2 мл вирусосодержащего материала; при этом репродукция наблюдалась не более чем в 5% инфицированных эмбрионов. В этом случае полученные варианты вируса можно считать клонами с вероятностью более 99% [22]. Выделенный клон с целью стабилизации и поддержания генетической однородности пассировали в дальнейшем предельными разведениями.

Для получения рекомбинантов использовали высокорепродуктивный эталонный штамм A/PR/8/34 (H1N1) с инфекционным титром 9,25  $lg ЭИД_{50}/0,2 \text{ мл}$  и изолированный нами клон aSV 27.I23 (H3N2) с инфекционным титром 7,0  $lg ЭИД_{50}/0,2 \text{ мл}$ . Рекомбинацию про-

водили *in ovo*. 10-дневные куриные эмбрионы заражали смесью нативных родительских вариантов, содержащих  $10^2$  ЭИД<sub>50/0,2</sub> мл вируса A/PR/8/34 и  $10^5$  ЭИД<sub>50/0,2</sub> мл аSV 27.123. Инфицированные эмбрионы инкубировали при 35°C в течение 48 часов. Смешанную популяцию вирусов подвергали селекции :

- для получения рекомбинантов серии RI (антигенная формула H3N2) смешанную популяцию дважды пассировали в присутствии гипериммунной кроличьей сыворотки, содержащей антитела против поверхностных антигенов штамма A/PR/8/34 ;
- для получения рекомбинантов серии RII и RrII с антигенной формулой H3NI первый пассаж проводили в присутствии антител к штамму A/PR/8/34, а последующий с добавлением в репродукционную систему антител против вариантов вируса P-I7 (Неq IN2) ;
- с целью получения рекомбинантных вариантов вируса, обладающих высокой репродукционной (инфекционной и гемагглютинирующей) активностью использовали одновременно с иммунопрессингом "ускоренные пассажи" (28 часов инкубации инфицированных эмбрионов). Полученные популяции вируса клонировали описанным выше методом, типировали в РТГА и РПНА, определяли генный состав [ 184 ] .

#### 2.2.4. Получение очищенных и концентрированных препаратов вируса.

Для иммунизации животных использовали очищенные и концентрированные препараты вируса, которые получали методом хроматографии на модифицированном поливинилпирролидоном макропористом стекле [ 30,89 ] или использовали метод градиентного центрифугирования. Перед ультрацентрифугированием вируссодержащую аллантоисную жидкость осветляли при 2500 об/мин в течении 40 мин ( Mistral-6 , MSE ), концентрирование вируса проводили при

23000 об/мин в течение 1,5 часов (Superspeed -65, High - speed -25, ротор IOx IOO, 5°C). Осадок суспендировали в 2 мл физиологического раствора, наслаивали на ступенчатый градиент сахарозы (20-60%) и центрифугировали при 23000 об/мин в течение 17 часов, после чего вирусосодержащий материал ресуспендировали в физиологическом растворе и подвергали гомогенизации в гомогенизаторе Даунса. В полученных препаратах определяли гемагглютинирующую активность и содержание белка по Lowry [186]. Для иммунизации использовали препараты с гемагглютинирующей активностью 1:1024 и содержащие одинаковое количество белка.

### 2.3. Получение иммунных сывороток.

Для получения сывороток к штаммам, клону и рекомбинантам вируса гриппа А использовали линейных крыс породы "Вистар" (питомник Института экологии растений и животных УНЦ АН СССР), мышей линий СВА, С57ВL, BAL В/с (питомник лабораторных животных АМН СССР "Рапполово") одного пола и возраста. Крыс весом 250-300 г. иммунизировали очищенными и концентрированными препаратами вируса по 3,0 мл внутрибрюшинно, трехкратно, с недельными интервалами. Мышей весом 10-12 г. иммунизировали очищенными препаратами вируса по 0,3 мл внутрибрюшинно, двукратно, с недельным интервалом. На 7-й день после последней иммунизации животных обескравливали под эфирным наркозом. Кровь собирали в пробирки, помещали в термостат (37°C), после чего отделяли сгусток от стенок пробирки и выдерживали в течение 18-24 часов при 4°C. Затем сыворотки отсасывали пастеровской пипеткой, центрифугировали при 2500 об/мин и хранили при температуре -10°C.

Гипериммунные кроличьи сыворотки к штамму А/PR/8/34 (H1N1) и рекомбинанту Р-17 (НеqIN2) были любезно предоставлены нам для работы доктором Н.Е.Горевым (г. Ленинград, ВНИИ гриппа, лаборатория генетики и вакцинных штаммов).

В РТГА использовали сыворотки, обработанные периодатом калия ( $KIO_4$ ) и прогретые при  $56^{\circ}C$  в течение 1 часа для удаления неспецифических ингибиторов, а также истощенные взвесью куриных эритроцитов [98].

#### 2.4. Моноклональные антитела.

Моноклональные антитела к гемагглютнину НЗ штамма А/Бангкок/1/79 получены в лаборатории доктора Р.Вебстера (Детский госпиталь Св.Иуды, Мемфис, США). Используемые в работе серии моноклональных антител 4/1, 7/2, 13/3, 17/6, 20/2, 23/1, 31/5, 46/2 и 49/4 любезно предоставлены нам проф.Р.Я.Подчерняевой (Институт вирусологии им.Д.И.Ивановского, г.Москва).

#### 2.5. Серологические методы.

##### 2.5.1. Реакция торможения гемагглютинации и кинетическая реакция торможения гемагглютинации

Реакцию торможения гемагглютинации РТГА ставили микрометодом [98], используя 0,75% взвесь куриных эритроцитов на физиологическом растворе (рН 7,2) и рабочую дозу антигена 4 ГАЕ. Время контакта антигена и антитела - 90 минут при комнатной температуре. В качестве антигена использовали свежий аллантаоисный вирус.

Для постановки кинетической РТГА иммунные сыворотки титровали макрометодом и переносили на микропанели Такачи. Результаты кинетической РТГА регистрировали через 1, 15, 30, 60, 120 и 180 минут после соединения ингредиентов реакции.

##### 2.5.2. Реакция подавления нейраминидазной активности

Реакцию подавления нейраминидазной активности (РПНА) ставили безбутанольным способом, используя овомуцин в качестве субстрата для ферментативного расщепления [36].

#### 2.6. Изучение протективной активности вирусов.

Мышей линии СВА массой 10-12 г. иммунизировали внутрибрю-

шинно, двукратно, с недельным интервалом. Вирус вводили по 0,3 мл. Через 21 день после второй иммунизации мышей интраназально инфицировали пневмотропными, патогенными для мышей вариантами А/СССР/05/80/Р<sub>ш</sub><sup>+</sup>(НЗН2) и А/Аичи/2/68/Р<sub>ш</sub><sup>+</sup>(НЗН2) в дозах I<sub>0</sub>LD 50/0,05 мл и I<sub>00</sub>LD 50/0,05 мл. Через 14 дней учитывали процент выживших мышей.

## 2.7. Реакция торможения миграции лейкоцитов.

50 мл расплавленной 1,9% агарозы ("Serva") смешивали с 40 мл среды Игла и 10 мл эмбриональной телячьей сыворотки, разливали по 3,0 мл в чашки Петри диаметром 40 мм. Когда гель застывал, чашки инкубировали при 37°C в атмосфере с 2% CO<sub>2</sub> в воздухе. Перед внесением клеточной суспензии в геле делали по 5 лунок диаметром 3,0 мм. Мышей забивали путем цервикальной дислокации. Стерильно удаляли селезенки и помещали в охлажденную до 4°C среду I99. Селезенки размельчали в гомогенизаторе с притертým тефлоновым пестиком в среде Игла. Взвесь клеток, полученную от 5 селезенок, помещали в одну силиконированную пробирку и отмывали при 4°C 1500 об/мин. Лейкоциты ресуспендировали в среде Игла и дважды отмывали при 4°C 1500 об/мин. Живые клетки подсчитывали на основании их резистентности к окрашиванию трипановым синим. Процент живых клеток составлял 96-98%. Готовили суспензию, состоящую из 2,0-2,5 · 10<sup>8</sup> клеток/мл в среде Игла с 10% эмбриональной телячьей сывороткой. Для предотвращения снижения pH, к каждому миллилитру суспензии добавляли по 2 мкл 1,8 М NaHCO<sub>3</sub>. В центрифужные пробирки помещали 0,1 мл клеточной суспензии и 0,1 мл антигена (исследуемые штаммы вируса гриппа с гемагглютинирующим титром 1:1024). Пробирки инкубировали при 37°C 1 час. По окончании инкубации клетки ресуспендировали и заполняли ими по 10 мкл 5 отверстий в агарозе. Чашки с агарозой инкубировали при 37°C во влажной камере

с 2% CO<sub>2</sub> в воздухе. Через 20 часов чашки с агарозой заливали 10% формалином, ополаскивали водой. Слой агарозы снимали скальпелем, чашки высушивали и измеряли зоны миграции с помощью стерео-микроскопа. Индекс миграции рассчитывали по формуле [135]:

$$\text{ИМ} = \frac{\text{средняя площадь зоны миграции в присутствии антигена}}{\text{средняя площадь зоны миграции без антигена}}$$

## 2.8. Определение генетических маркеров

### 2.8.1. Терморезистентность гемагглютинаина (T<sub>56</sub>)

Аллантоисный вирус прогревали при 56°C в течение 6 часов. Гемагглютинирующую активность определяли, титруя образцы вируса в РГА через каждый час прогревания.

### 2.8.2. Способность к репродукции при различных температурных режимах (rct).

Определение rct-маркера проводили путем заражения 10-дневных куриных эмбрионов серийными разведениями вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-10</sup> с последующей инкубацией эмбрионов в течение 72 часов при температурах 28,36,40°C [129]. Значения выявленных инфекционных титров при данных температурных режимах выражали в lg ЭИД<sub>50</sub>.

### 2.8.3. Степень адсорбции-элюции на куриных эритроцитах (Ad<sub>rc</sub> - E<sub>rc</sub>).

Ad<sub>rc</sub> - E<sub>rc</sub> определяли по методу Padgett и Walker [183]. Адсорбцию проводили в течение 2 часов при 4°C. Остаточную гемагглютинирующую активность определяли через 15,30,60 и 120 минут от момента добавления к препаратам вируса формализованных куриных эритроцитов.

Элюцию проводили при 37°C. Количество вируса в элюатах устанавливали по титру гемагглютинации через 30,60,120 и 180 минут и выражали в % к исходной гемагглютинирующей активности вируса.

#### 2.8.4. Антигенная специфичность (Ag)

Серологический тип гемагглютини́на и нейраминидазы устанавливали в РТГА и РПНА соответственно. Методы определения описаны выше.

#### 2.8.5. Определение интерферогенной активности.

Источником лейкоцитов являлась кровь здоровых доноров. Для выделения лейкоцитов использовали методику [89]. Выделенные лейкоциты ресуспендировали из расчета 20 млн. клеток в 1 мл питательной среды I99, содержащей 3 ед/мл гепарина, 5% донорской плазмы, 0,1% трилона Б и 50 ед/мл мономицина. Клеточную суспензию помещали в плоскодонную колбу, добавляли вирус, интерферогенная активность которого определяется, из расчета - на 2 мл клеточной суспензии - 1 мл вируса (гемагглютинирующая активность 1:1024) и на 2 мл клеточной суспензии - 0,4 мл вируса с таким же титром. Клеточную суспензию с вирусом инкубировали в течение 1 часа при 37,5°C. Биосинтез интерферона проводили в стационарной культуре лейкоцитов [88]. Количество интерферона определяли, используя для титрования цветной микротест [106]. Содержание интерферона выражали в МЕ при сравнении с препаратами референс-интерферона.

#### 2.9. Определение avidности иммунных сывороток.

Изучение avidности полученных иммунных сывороток проводили в кинетической РТГА. Индекс avidности рассчитывали по формуле :

$$F = \frac{1}{T_0} \int_0^T C(t) dt$$

где F - индекс avidности ;

T - полное время реакции ;

C(t) - зависимость концентрации нейтрального комплекса от времени.

Каждую сыворотку исследовали, осуществляя постановку реакции

последовательно с 8-10 антигенами, относящимися к одной дрейф-группе, что позволяло нивелировать различия, связанные с авидностью антигенов. Расчет F по каждому антигену и определение среднего значения индекса авидности иммунной сыворотки - Fс проводили с использованием специально разработанной программы для ЭВМ (см. приложение). Программа предусматривает также возможность определения достоверности различий в авидности иммунных сывороток с использованием критерия Стьюдента.

## 2.10. Биометрические методы

Эксперименты с каждым конкретным вариантом вируса гриппа повторяли не менее трех раз. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием общепринятых методов биометрии [10,78].

Средние показатели изучаемых маркеров вируса гриппа рассчитывали по формуле :

$$M = \frac{\sum V}{n}$$

где M - средняя арифметическая ;

V - дата (отдельное значение признака) ;

n - число определений.

Для оценки разнообразия дат при вычислении средних индексов авидности иммунных сывороток использовали коэффициент вариации (CV) :

где  $\sigma$  - среднее квадратичное отклонение.

Доверительные интервалы средних арифметических показателей вычисляли по формуле :

$$I_p = \pm t_p \cdot m$$

где  $I_p$  - величина, на которую значения верхнего и нижнего пределов доверительного интервала отличаются от средней арифметической ;

$t_p$  - коэффициент Стьюдента-Фишера (при уровне значимости 5%)

m - ошибка средней арифметической :  $m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$

Достоверность различий средних величин определяли с помощью критерия Стьюдента :

$$t_d = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Различия считали достоверными, если найденное значение  $t_d$  было равно или превышало стандартные значения критерия Стьюдента, определяемое по числу степеней свободы  $\nu = n_1 + n_2 - 2$  для принятых уровней значимости (P).

О степени и направленности корреляционной связи между отдельными генетическими признаками судили по коэффициенту корреляции  $r$ , который определяли по способу произведений :

$$r = \frac{\sum V_1 V_2 - \frac{\sum V_1 \cdot \sum V_2}{n}}{\sqrt{C_1 \cdot C_2}}$$

где  $V_1$  и  $V_2$  - даты первого и второго маркеров ;

$C_1$  и  $C_2$  - дисперсии по первому и второму маркеру :

$$C = \sum V^2 - \frac{(\sum V)^2}{n}$$

Достоверность коэффициента корреляции устанавливали по формуле :

$$t_r = \frac{r}{m_r}$$

где  $m_r$  - ошибка коэффициента корреляции :

$$m_r = \sqrt{\frac{1 - r^2}{n - 2}} \quad \text{или} \quad t_r = \frac{r \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

В том случае, когда  $t_r \geq t_{st}$  при  $\nu = n - 2$ , корреляцию считали достоверной.

Корреляционная связь является прямой, если  $r > 0$ , или обратной, если  $r < 0$ . Степень прямолинейности корреляции считается сильной при  $r \geq 0,75$ ; средней - при  $r \geq 0,5$  и слабой при  $r \leq 0,25$ .

Статистическая обработка материалов проводилась на базе ВЦ Свердловского Облздравотдела.

Исследования с использованием молекулярно-биологических методов исследования выполнены на базе Отдела молекулярной биологии и генетики Всесоюзного НИИ гриппа МЗ СССР. Работа с моноклональными антителами проводилась на базе Института вирусологии им. Д.И.Ивановского АМН СССР.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА А ПО СПОСОБНОСТИ ИНДУЦИРОВАТЬ СИНТЕЗ АВИДНЫХ АНТИТЕЛ

Полученные в настоящее время экспериментальные данные свидетельствуют о гетерогенности популяции вируса гриппа А как по иммуногенной активности [14,16,125,134,136 и др.], которую обычно оценивают по увеличению титров антител к вакцинирующему штамму, так и по способности индуцировать синтез антител с широким спектром активности, которую оценивают по способности реагировать с гемагглютинидами социркулирующих вариантов данного подтипа вируса [24,40,70]. Однако, оценка степени разнообразия популяции вируса гриппа А по способности индуцировать синтез авидных антител ни в одном случае не проводилась, хотя именно это свойство имеет решающее значение в биологической активности антител [108].

В связи с изложенным, представлялось целесообразным провести оценку степени гетерогенности и характера распределения штаммов в популяции вируса гриппа А (H3N2) по способности индуцировать синтез авидных антител.

С этой целью проведено сравнительное изучение авидогенной способности 8 штаммов вируса гриппа А 1978-1980 годов выделения и 9 штаммов вируса гриппа А 1985 года выделения.

Для иммунизации использовали крыс линии "Вистар". Каждая полученная сыворотка исследована в кинетической реакции торможения гемагглютинации с набором из 8-10 антигенов. Расчет индексов авидности проводился с помощью ЭВМ СМ-1У по разработанному нами методу (см.приложение).

Данные сравнительного изучения штаммов вируса гриппа А (H3N2) по способности индуцировать синтез авидных антител суммированы в таблице 3.1.

Как можно видеть, исследуемая популяция вирусов гриппа

Таблица 3.1.

Результаты сравнительного изучения штаммов вируса гриппа А (H3N2) по способности индуцировать синтез авидных антител.

| №№                               | Иммунизирующий вариант  | Гс*    | Доверительные интервалы | Коэффициент вариации |
|----------------------------------|-------------------------|--------|-------------------------|----------------------|
| Штаммы 1978-1980 годов выделения |                         |        |                         |                      |
| 1.                               | А/Ленинград/229/80      | 802,22 | 398,22-1206,22          | 54,33                |
| 2.                               | А/Ленинград/7/78        | 763,97 | 331,01-1196,93          | 67,77                |
| 3.                               | А/Таллин/37/80          | 759,17 | 510,46-1007,88          | 35,34                |
| 4.                               | А/Архангельск/127/79    | 744,57 | 355,54-1133,60          | 56,37                |
| 5.                               | А/Алма-Ата/384/80       | 583,08 | 223,06-943,10           | 73,84                |
| 6.                               | А/Фрунзе/160/79         | 551,63 | 244,91-858,35           | 72,34                |
| 7.                               | А/Барнаул/3988/79       | 337,87 | 231,84-443,90           | 40,82                |
| 8.                               | А/Ленинград/385/80      | 226,17 | 166,85-285,49           | 24,99                |
| Штаммы 1985 года выделения       |                         |        |                         |                      |
| 1.                               | А/Ленинград/107/85      | 226,32 | 175,31-277,33           | 26,95                |
| 2.                               | А/Мурманск/203/85       | 219,04 | 115,97-322,11           | 56,26                |
| 3.                               | А/Хабаровск/14784/85    | 198,23 | 93,98-302,48            | 62,89                |
| 4.                               | А/Львов/23/85           | 190,10 | 122,56-257,64           | 42,50                |
| 5.                               | А/Воронеж/157/85        | 167,50 | 78,14-256,86            | 57,68                |
| 6.                               | А/Свердловск/427/85     | 159,17 | 74,65-243,69            | 69,02                |
| 7.                               | А/Алма-Ата/187/85       | 145,50 | 60,12-230,88            | 70,18                |
| 8.                               | А/Днепропетровск/770/85 | 121,62 | 88,00-155,24            | 35,97                |
| 9.                               | А/СССР/2/85             | 31,48  | 22,04-40,92             | 43,04                |

Гс - индекс авидности иммунных сывороток (среднее арифметическое значение).

является гетерогенной по способности индуцировать синтез авидных антител. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1978-1980 г.г. выделения имеют значения в пределах 226,17 - 802,22 (минимальная величина - иммунная сыворотка к штамму А/Ленинград/385/80 ; максимальная - иммунная сыворотка, полученная к штамму А/Ленинград/229/80).

Однако, если судить о степени разнообразия признака в популяции по границам доверительных интервалов, то спектр его распределения расширится от 116,85 (нижняя граница доверительного интервала иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/385/80) до 1206,22 (верхняя граница доверительного интервала иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/229/80).

Иммунные сыворотки с крайними значениями индексов авидности (меньше 300 для иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/385/80 и больше 800 для иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/229/80) встречаются значительно реже по сравнению с иммунными сыворотками, имеющими средние значения индексов авидности (от 300 до 800), которые составили 75 % от исследованных (рис. 3.1.).

Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1985 года выделения, имеют значения в пределах 31,48 - 226,32 (минимальная величина - иммунная сыворотка, полученная к штамму А/СССР/2/85, максимальная величина - иммунная сыворотка, полученная к штамму А/Ленинград/107/85). Если учесть границы доверительных интервалов, то спектр распределения иммунных сывороток по авидности расширится от 22,04 (нижняя граница доверительного интервала иммунной сыворотки, полученной к штамму А/СССР/2/85) до 277,33 (верхняя граница доверительного интервала иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/107/85). Иммунные сыворотки с крайними значениями индексов авидности (меньше 100

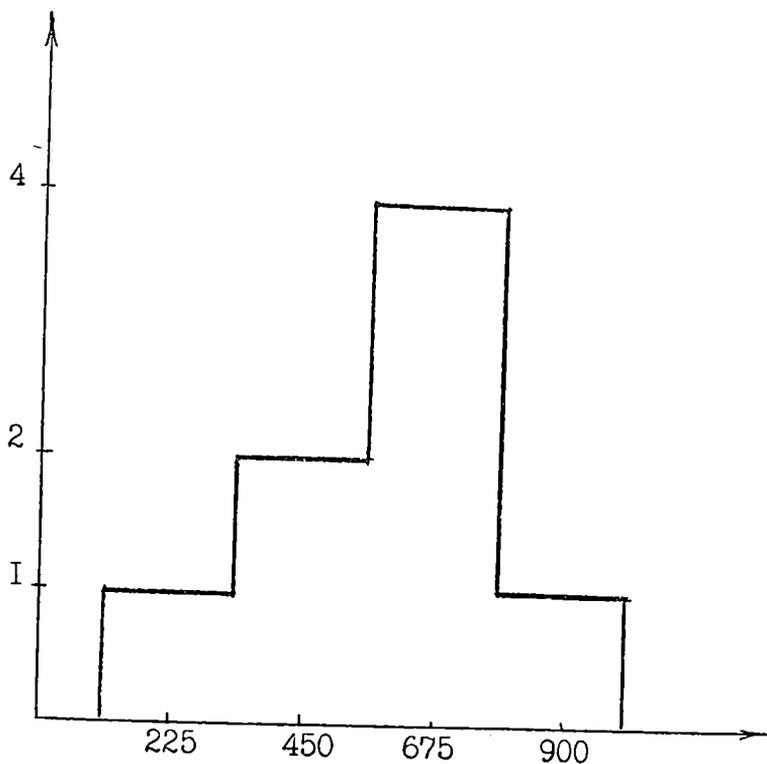


Рис. 3.1. Распределение штаммов по способности индуцировать синтез avidных антител в популяции вируса гриппа А(Н3N2) 1978-1980 годов выделения.

По оси ординат - количество штаммов ;

по оси абсцисс - индексы avidности иммунных сывороток.

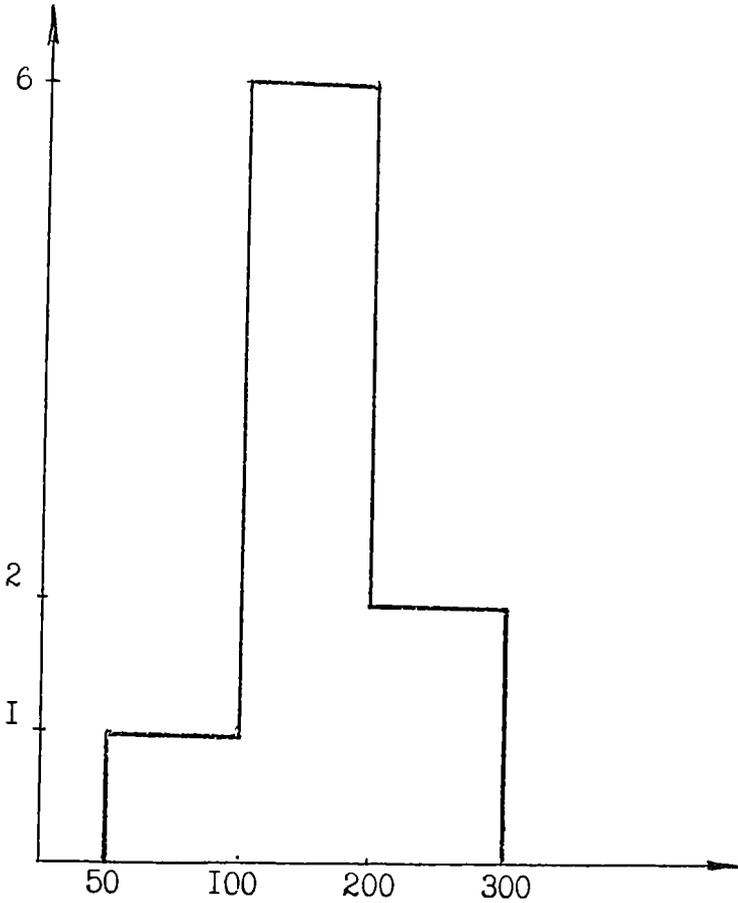


Рис. 3.2. Распределение штаммов по способности индуцировать синтез avidных антител в популяции вируса гриппа А(Н3N2) 1985 года выделения

По оси ординат - количество штаммов ;

по оси абсцисс - индексы avidности иммунных сывороток.

для иммунной сыворотки, полученной к штамму А/СССР/2/85 и больше 200 для иммунной сыворотки, полученной к штамму А/Ленинград/107/85 ) встречаются значительно реже по сравнению с иммунными сыворотками со средними значениями индексов авидности (от 100 до 200), которые составили 77% от исследованных (рис.3.2.).

Как можно видеть из таблицы 3.1. , варианты вируса 1985 года выделения стимулируют образование менее авидных антител по сравнению с вариантами 1978-1980 годов выделения. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам вируса гриппа 1985 года выделения (31,48 - 226,32) не превышают минимальных значений индексов авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1978-1980 годов выделения (минимальная величина индекса авидности 226,17 получена для иммунной сыворотки к штамму А/Ленинград/385/80). Средние значения индексов авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1978-1980 годов выделения (596,08) достоверно отличаются от средних значений индексов авидности (162,10) иммунных сывороток, полученных к вариантам 1985 года выделения ( $P < 0,001$ ).

Таким образом, можно говорить о гетерогенности популяции вируса гриппа А по способности индуцировать синтез авидных антител не только среди социркулирующих вариантов вируса, но и о гетерогенности популяции вируса в пределах шифт-вариантов вируса, что согласуется с данными литературы. Г.П.Жиловой с соавт. [14,32] показано, что иммуногенная активность вируса гриппа находится в прямой корреляционной связи с его эпидемической активностью.

Штаммы вируса гриппа А 1980 года выделения, наиболее отличающиеся по авидогенной способности, А/Ленинград/385/80 ( индекс авидности иммунной сыворотки 226,17 ) и А/Ленинград/229/80

Таблица 3.2.

Характеристика наиболее различающихся по авидогенной способности штаммов вируса гриппа А(Н3N2)

| Наименование иммунизирующего варианта вируса | Средние арифметические индексов авидности анти-тел и их ошибки<br>( $\bar{F}_c \pm m$ ) | Сравниваемые иммунные сыворотки         | P <  |
|--|---|---|------|
| А/Ленинград/229/80                           | 802,22 $\pm$ 165,11   | А/Ленинград/229/80 и А/Барнаул/3988/79  | 0,05 |
| А/Барнаул/3988/79                            | 337,87 $\pm$ 45,98  |   |      |
| А/Ленинград/385/80                           | 226,17 $\pm$ 23,04  | А/Ленинград/229/80 и А/Ленинград/385/80 | 0,01 |

(индекс авидности иммунной сыворотки 802,22) были выбраны для проведения дальнейших исследований (таблица 3.2.).

Поскольку вакцинный штамм должен обладать свойствами высокой репродуктивной активности и гомогенности, необходимо было получить рекомбинанты наиболее авидогенного варианта А/Ленинград/229/80, которые сочетали бы в себе все перечисленные признаки.

Штамм А/Ленинград/385/80 в начале 80-х годов был рекомендован для производства вакцины и обладал свойствами высокой репродуктивной активности и гомогенности (о чем свидетельствует и самый маленький коэффициент вариации - 24,99 среди всех исследованных штаммов.)

Для проведения опытов по рекомбинации из штамма А/Ленинград/229/80 был выделен клон аSV 27.123, а затем проведена рекомбинация *in ovo* между выделенным клоном и высокорепродуктивным штаммом А/PR/8/34 (H1N1). У выделенных рекомбинантов аSVRI-54, аSVRII-169 и аSVRrII-33 был определен генный состав.

Таблица 3.3.

Состав генома родительских вариантов и выделенных рекомбинантов вируса гриппа А

| Родительские вирусы и рекомбинанты | Происхождение РНК-фрагментов |       |       |       |      |        |
|------------------------------------|------------------------------|-------|-------|-------|------|--------|
|                                    | P(1,2,3)                     | HA(4) | NP(5) | NA(6) | M(7) | NS (8) |
| аSV 27.123                         | SV                           | SV    | SV    | SV    | SV   | SV     |
| А/PR/8/34                          | PR                           | PR    | PR    | PR    | PR   | PR     |
| аSVRI-54                           | PR                           | SV    | SV    | SV    | PR   | PR     |
| аSVRII-169                         | PR                           | SV    | PR    | PR    | PR   | PR     |
| аSVRrII-33                         | PR                           | SV    | PR    | PR    | PR   | PR     |

Как видно из таблицы 3.3. рекомбинант аSVRI-54 получил от родительского варианта А/PR/8/34 гены I,2,3(P), 7(M), 8(NS); гены 4(NA), 5(NP) и 6(NA) получены от варианта аSV 27.123. Рекомбинанты аSV RII-I69 и аSV RrII-33 унаследовали от варианта А/PR/8/34 семь генов - I,2,3(P), 5(NP), 6(NA), 7(M), 8(NS) и только один ген - ген гемагглютинаина (NA) они получили от родительского варианта аSV 27.123.

Таким образом, антигенная формула рекомбинанта аSVRI-54 H3N2; антигенная формула рекомбинантов аSV RII-I69 и аSV RrII-33 H3NI, что совпадает с результатами типирования поверхностных антигенов в реакциях торможения гемагглютинации и подавления нейраминидазной активности.

Полученные рекомбинанты обладали высокой репродукционной активностью ( аSVRI-54 1г ЭИД<sub>50/0,2 мл</sub> - 8,25; аSV RII-I69 1г ЭИД<sub>50/0,2 мл</sub> - 9,0; аSV RrII-33 1г ЭИД<sub>50/0,2 мл</sub> - 8,75) и, в результате клонирования - гомогенностью.

Оценка авидогенной способности полученных рекомбинантов (таблица 3.4.) показала, что рекомбинанты унаследовали от родительского варианта аSV 27.123 высокую авидогенную способность. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к рекомбинантам, находились в пределах 658,00-753,50, а с учетом доверительных интервалов, спектр распределения расширится от 506,73 до 1040,85. Наибольшую стабильность в проявлении данного признака имеет рекомбинант аSV RII-I69 (коэффициент вариации 21,90).

Кроме того, была проведена оценка авидогенной способности рекомбинанта Р-16 (H3N7), полученного из музея вирусов Института гриппа МЗ СССР. Вариант Р-16 получен доктором Н.Е.Горевым (г.Ленинград, ВНИИ гриппа, лаборатория генетики и вакцинных штаммов) путем рекомбинации между неавидогенным по нашим данным

Таблица 3.4.

Результаты сравнительного изучения рекомбинантов вируса гриппа А(Н3) по способности индуцировать синтез авидных антител.

| Наименование иммунизирующего варианта | Fc*    | Доверительные интервалы | Коэффициент вариации |
|---------------------------------------|--------|-------------------------|----------------------|
| asVRI-54                              | 783,50 | 526,15-1040,85          | 42,73                |
| asVR II-33                            | 662,86 | 445,45-880,27           | 42,67                |
| asVR II-169                           | 658,00 | 506,73-802,27           | 21,90                |
| P-16                                  | 305,98 | 228,81-383,15           | 30,17                |

\* Fc - индекс авидности иммунных сывороток (среднее арифметическое значение).

штаммом А/Ленинград/385/80 и штаммом А/Лошадь/Прага/1/56. Генный состав у данного рекомбинанта не определялся. Результаты типирования поверхностных антигенов в РТГА и РПНА показали, что ген гемагглютинаина рекомбинант P-16 унаследовал от штамма А/Ленинград/385/80, ген нейраминидазы - от штамма А/Лошадь/Прага/ 1/56. Индекс авидности иммунной сыворотки, полученной к рекомбинанту P-16 составил 305,98 (таблица 3.4.). Таким образом, рекомбинант P-16 унаследовал низкую авидогенную способность штамма А/Ленинград/385/80.

Полученные данные с большой долей достоверности позволяют сделать заключение, что способность индуцировать синтез авидных антител передается с геном гемагглютинаина, однако нельзя исключить полностью возможного влияния остальных генов.

На рис. 3.3 и 3.4. показана кинетика взаимодействия ан-

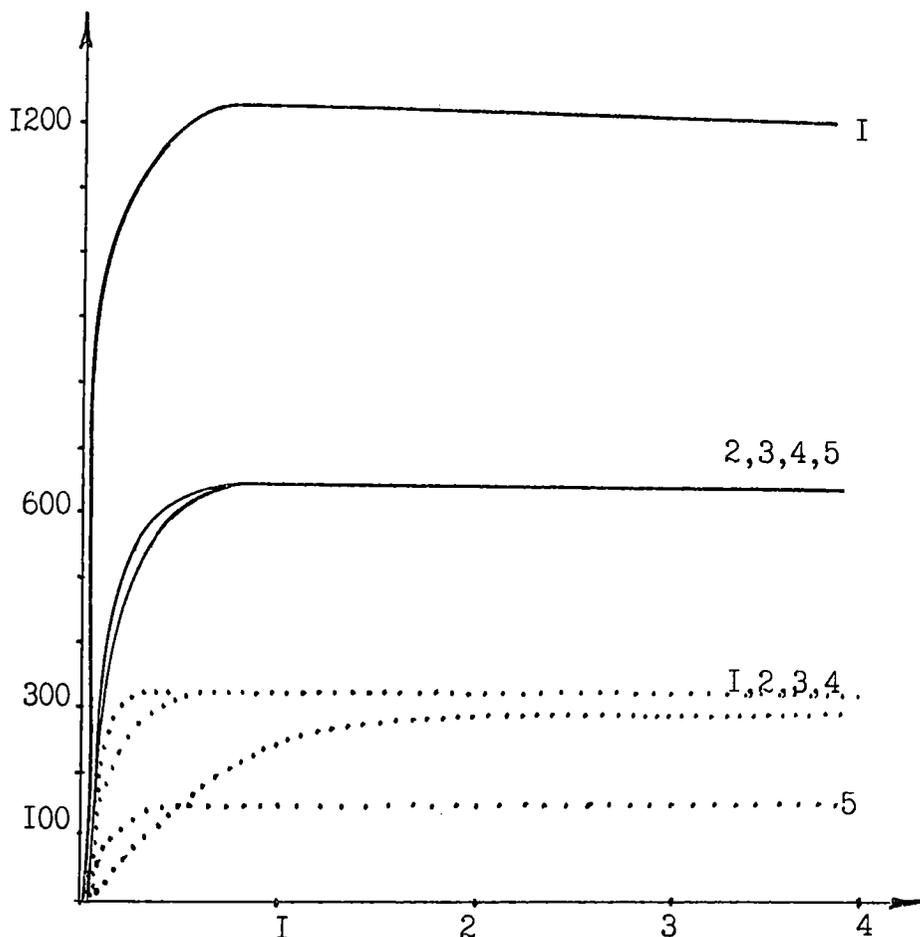


Рис.3.3. Кинетика взаимодействия avidных и неavidных антител с антигенными вариантами вируса гриппа в КРТГА

————— иммунная сыворотка, полученная к штамму aSV RrI-54

..... иммунная сыворотка, полученная к штамму P-16

Антигенные варианты : 1 - aSV RrII-33 ; 2 - А/Алма-Ата/384/80  
3 - А/Ленинград/229/80 ; 4 - А/Фрун-  
зе/160/79 ; 5 - А/Таллин/37/80 .

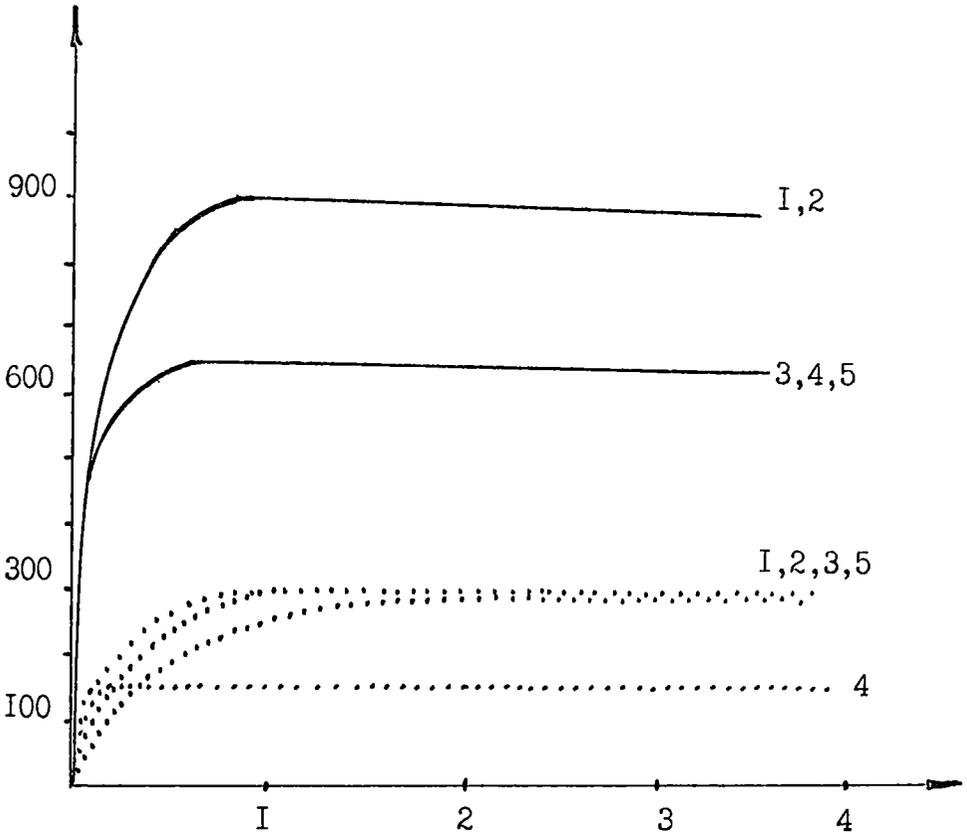


Рис. 3.4. Кинетика взаимодействия avidных и неavidных антител с антигенными вариантами вируса гриппа в КРТГА

————— иммунная сыворотка, полученная к штамму aSV RI-169  
..... иммунная сыворотка, полученная к штамму А/Ленинград/  
385/80

Антигенные варианты : 1 - А/Ленинград/7/78 ; 2 - aSV RI-54 ;  
3 - А/Фрунзе/160/79 ; 4 - А/Архангельск/  
127/79 ; 5 - А/Таллин/37/80 .

тител, полученных при иммунизации животных авидогенными (aSV RII-169 и aSV RI-54) и неавидогенными (А/Ленинград/385/80 и Р-16) штаммами с антигенными вариантами вируса гриппа. Как следует из данного рисунка, антитела, полученные при иммунизации авидогенными рекомбинантами реагируют с антигенами с большей скоростью и полнотой по сравнению с антителами, индуцированными введением неавидогенных вариантов вируса. Кинетические кривые взаимодействия авидных и неавидных антител с антигенными вариантами вируса гриппа образуют на графиках (рис. 3.3 и 3.4.) неперекрывающиеся зоны. Приведенные результаты наглядно демонстрируют степень различия вариантов, отобранных для дальнейших исследований, по способности индуцировать синтез авидных антител.

---

С целью подтверждения данных о высокой авидогенной способности клона aSV 27.123, рекомбинантов aSV RII-169 и aSV RI-54 и низкой авидогенности штамма А/Ленинград/385/80 и Р-16, а также для проведения иммунологических исследований, дальнейшие эксперименты проводились на мышах линии СВА, BAL В/с, С57ВL.

Мышей линий СВА, С57ВL и BAL В/с одного пола и возраста, весом 10-12 г. иммунизировали очищенным и концентрированным препаратом вируса (гемагглютинирующий титр 1:1024 и содержащее одинаковое количество белка).

Как видно из таблицы 3.5., продукция относительно авидных антител наблюдалась в результате иммунизации животных рекомбинантами aSV RI-54 (индекс авидности колеблется в зависимости от линии животных от 84,25 до 177,18) и aSV RII-169 (индекс авидности колеблется в зависимости от линии животных от 76,87

Таблица 3.5.  
Индексы avidности и степень достоверности различий в avidности иммунных сывороток,  
полученных при иммунизации мышей разных линий вариантами вируса гриппа А(Н3)

| Наименование сывороток (иммунизирующий штамм/линия животных) | Индекс avidности | Степень достоверности различий в avidности сывороток |          |          |             |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
|--|------------------|--|----------|----------|-------------|---------|---------|--------------|------------|------------|-------------|-----------|-----------|---------------|------|
|  |                  | P-16 BAL B   | P-16 C57 | P-16 CBA | ЛЕН * BAL B | ЛЕН C57 | ЛЕН CBA | 27.123 BAL B | 27.123 C57 | 27.123 CBA | RI-54 BAL B | RI-54 C57 | RI-54 CBA | RII-169 BAL B |      |
| P-16/BAL B   | 37,79            |  |          |          |             |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| P-16/C57   | 16,17            | 0,95   |          |          |             |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| P-16/CBA   | 56,20            | -  | 0,95     |          |             |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| ЛЕН/BAL B  | 28,61            | -  | -        | -        | -           |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| ЛЕН/C57  | 60,81            | -  | 0,99     | -        | 0,95        |         |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| ЛЕН/CBA  | 62,71            | -  | 0,99     | -        | 0,95        | -       |         |              |            |            |             |           |           |               |      |
| 27.123/BAL B   | 51,97            | -  | 0,99     | -        | 0,95        | -       | -       |              |            |            |             |           |           |               |      |
| 27.123/C57   | 67,53            | 0,95   | 0,99     | -        | 0,99        | -       | -       | -            |            |            |             |           |           |               |      |
| 27.123/CBA   | 44,65            | -  | 0,99     | -        | -           | -       | -       | -            | 0,95       |            |             |           |           |               |      |
| RI-54/BAL B  | 84,25            | 0,95   | 0,99     | -        | 0,99        | -       | -       | -            | -          | 0,95       |             |           |           |               |      |
| RI-54/C57  | 85,71            | 0,95   | 0,99     | -        | 0,99        | -       | -       | -            | -          | -          |             |           |           |               |      |
| RI-54/CBA  | 177,18           | 0,99   | 0,99     | 0,95     | 0,99        | 0,95    | 0,95    | 0,95         | 0,95       | 0,95       | -           | -         |           |               |      |
| RII-169/BAL B  | 76,87            | 0,99   | 0,99     | -        | 0,99        | -       | -       | 0,95         | -          | 0,99       | -           | -         | 0,95      |               |      |
| RII-169/C57  | 80,57            | 0,99   | 0,99     | -        | 0,99        | -       | -       | 0,95         | -          | 0,99       | -           | -         | 0,95      | -             |      |
| RII-169/CBA  | 205,70           | 0,99   | 0,99     | 0,999    | 0,99        | 0,99    | 0,99    | 0,99         | 0,99       | 0,99       | 0,99        | 0,99      | -         | 0,99          | 0,99 |

\* - А/Ленинград/385/80

- достоверных различий не обнаружено

до 205,70). Антитела, обладающие значительно меньшей авидностью вырабатывались при иммунизации штаммом А/Ленинград/385/80 (индекс авидности в пределах от 28,61 до 62,71 в зависимости от линии животных) и рекомбинантом Р-16 (индекс авидности в пределах от 16,17 до 56,20 в зависимости от линии животных).

Достоверные различия в авидности антител имели место при иммунизации мышей разных линий одним и тем же вариантом вируса. Такие различия наблюдались как при иммунизации неавидогенными вариантами вируса ( Р-16/BAL B - Р-16/CBA ; Р-16/CBA - Р-16/C57BL ; ЛЕН/BAL B - ЛЕН/CBA ), так и при иммунизации вариантами, вызывающими синтез авидных антител ( RII-169/BAL B - RII-169/C57BL ; RII-169/C57BL - RII-169/CBA ).

Наиболее авидные антитела продуцировались при иммунизации мышей линии CBA (таблица 3.5.). Как видно из таблицы, мыши линии CBA при иммунизации рекомбинантами aSV RII-169 , aSVRI-54 , Р-16 и штаммом А/Ленинград/385/80 продуцируют антитела, имеющие индексы авидности больше, чем антитела, полученные при иммунизации этими же вариантами вируса мышей других линий.

В таблице 3.6. представлены средние значения индексов авидности антител. Полученные данные по трем взятым в опыт линиям животных сведены вместе по иммунизирующему варианту вируса. Эти данные можно рассматривать как данные, полученные при иммунизации гетерогенной "популяции" мышей. Как видно из таблицы, наиболее авидные антитела продуцируются при иммунизации рекомбинантами aSV RI-54 и aSV RII-169 ( индексы авидности 115,71 и 121,05 соответственно ). Авидность полученных антител с высокой степенью достоверности отличается от авидности антител, полученных при иммунизации вариантами Р-16 и А/Ленинград/385/80 (  $P < 0,001$  ).

Таблица 3.6.

Индексы avidности и степень достоверности различий в avidности иммунных сывороток " популяций" животных, иммунизированных вариантами вируса гриппа А

| Наименование сывороток<br>(по иммунизирующему варианту вируса) | Индекс avidности<br>(средние значения) | Степень достоверности различий в<br>avidности сывороток |       |        |       |
|--|--|---|-------|--------|-------|
|  |  | P-I6  | ЛЕН*  | 27.123 | RI-54 |
| P-I6   | 36,72                                  |   |       |        |       |
| A/Ленинград/385/80   | 50,71                                  | -   |       |        |       |
| aSV 27.123   | 54,72                                  | 0,95  | -     |        |       |
| aSV RI-54  | 115,71                                 | 0,999   | 0,99  | 0,99   |       |
| aSV RII-I69  | 121,05                                 | 0,999   | 0,999 | 0,999  | -     |

\* - A/Ленинград/385/80

"-" достоверных различий не выявлено

Следует также отметить, что рекомбинанты аSVRI-54 и аSVRII-169 индуцируют синтез более avidных антител, чем родительский вариант - донор гемагглютинаина аSV27.123. Индексы avidности антител, полученных к рекомбинантам аSVRII-169 и аSVRI-54 достоверно выше ( $P < 0,01$ ), чем индекс avidности антител, полученных к родительскому варианту аSV27.123 (таблица 3.6.).

В то же время, рекомбинант P-16 индуцирует синтез менее avidных антител, чем родительский штамм - донор гемагглютинаина А/Ленинград/385/80 (индекс avidности иммунной сыворотки при иммунизации вариантом P-16 - 36,72 ; при иммунизации штаммом А/Ленинград/385/80 - 50,71). Однако в этом случае выявленные значения не имели достоверных различий.

Таким образом, проведенные исследования на мышах разных линий позволили подтвердить высокую avidогенную способность полученных нами рекомбинантов. Показано, что рекомбинанты могут отличаться от родительских вариантов вируса по avidогенной способности, в связи с чем необходимо вести поиск штаммов -доноров высокой репродуктивности, не изменяющих иммуногенных свойств рекомбинантов. Выявлено, что наиболее удобной моделью, позволяющей с высокой степенью достоверности дифференцировать avidогенные и неavidогенные варианты вируса гриппа А(Н3), являются мыши СВА.

До настоящего времени иммуногенную активность вируса гриппа оценивают по увеличению титров антител к вакцинирующему штамму [33,38,114 и др.] .

Как видно из таблицы 3.7., если брать за критерий высокой иммуногенности способность индуцировать антитела, хорошо взаимодействующие с гомологичным антигеном, то наиболее активен в этом отношении вариант А/Ленинград/385/80 (средний гомологичный

Таблица 3.7.

Результаты сравнительного изучения авидогенной способности вариантов вируса гриппа А(Н3)

| Наименование сывороток<br>(по иммунизирующему варианту) | Гомологичный титр <sup>*</sup> | Индекс авидности (Fc) |
|---|--------------------------------|-----------------------|
| P-16  | 50,0                           | 36,7                  |
| A/Ленинград/385/80                                      | 245,1                          | 52,1                  |
| aSV27.123   | 53,1                           | 54,7                  |
| aSVRI-54  | 166,5                          | 115,7                 |
| aSVRII-169  | 119,7                          | 121,0                 |

\* - среднее арифметическое обратных величин титров, зарегистрированных в КРТА с гомологичным антигеном

титр 245,1), который в начале 80-х годов использовался для приготовления инактивированной вакцины.

Однако, если учитывать индекс авидности образующихся антител, определенный нашим методом (см.приложение), наиболее иммуногенными являются рекомбинанты aSVRI-54 и aSVRII-169, введение которых стимулирует образование антител, активно взаимодействующих как с гомологичными, так и с гетерологичными штаммами.

Как видно из таблицы 3.7. средний гомологичный титр и индекс авидности антител, полученных при введении данных рекомбинантов, имеют близкие значения и составляют соответственно 166,5 и 115,7 для aSVRI-54 ; 119,7 и 121,0 для aSVRII-169.

Введение рекомбинанта P-16 стимулирует образование антител, в низких титрах и плохо взаимодействующих как с гомологичным штаммом (средний гомологичный титр 50,0), так и с социркулиру-

ющими вариантами вируса (индекс avidности 36,72).

Штамм А/Ленинград/385/80 вызывает продукцию слабоавидных антител (индекс avidности 52,1), в то время как с гомологичным штаммом индуцированные антитела реагируют с большой скоростью и до значительных титров (средний гомологичный титр 245,1).

Однако, учитывая значительную скорость изменчивости вируса гриппа, совершенно ясно, что наибольшим защитным эффектом будут обладать варианты, индуцирующие синтез авидных антител, активно взаимодействующих как с гомологичным, так и с гетерологичными штаммами. Ведущие советские исследователи в области иммунологии гриппа считают, что " в настоящее время единственно реальным практическим методом, позволяющим достичь профилактического эффекта с помощью вакцинации в условиях антигенного дрейфа является разработка высокоиммуногенных вакцин, создающих невосприимчивость широкого диапазона т.е. и в отношении гетерологичных штаммов " [76] .

На основании проведенных исследований можно сделать заключение, что разработанный нами метод позволяет выявить среди гетерогенной популяции вируса гриппа А штаммы, способные индуцировать при введении в макроорганизм синтез авидных антител, активно взаимодействующих с большинством циркулирующих вариантов вируса. Используя отобранные авидогенные варианты, можно получить рекомбинанты вируса гриппа А(Н3), сочетающие в себе признаки высокой репродуктивной активности, гомогенности и высокой авидогенности.

## ГЛАВА 4 . ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ОСОБЕННОСТЕЙ РЕАГИРОВАНИЯ Т-СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА ПРИ ВВЕДЕНИИ ВАРИАНТОВ ВИРУСА, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО АВИДОГЕННОЙ СПОСОБНОСТИ.

### 4.1. Изучение протективной активности вариантов вируса, различающихся по способности индуцировать синтез авидных антител.

Исходя из полученных данных о возможности синтеза антител, отличающихся по авидности, при иммунизации вариантами вируса гриппа А, относящихся к одной дрейф-группе, необходимо было изучить протективную активность авидогенных ( аSVRI-54 и аSVRII-169) и неавидогенных (А/Ленинград/385/80 и Р-16) вариантов по отношению к пневмотропным, патогенным для мышей штаммам вируса гриппа А - А/СССР/05/80 Р<sub>ш</sub><sup>+</sup>(Н3N2) и А/Аичи/2/68 Р<sub>ш</sub><sup>+</sup>(Н3N2).

Работа выполнялась на мышах линии СВА, которые после двукратной иммунизации авидогенными и неавидогенными вариантами, заражались интраназально патогенными штаммами в дозах I<sub>0</sub>LD<sub>50/0,05</sub> и I<sub>0</sub>LD<sub>50/0,05</sub> мл . В течение 14 дней за животными велось наблюдение и отмечалось число летальных случаев. Контрольную группу составляли животные, привитые физиологическим раствором по той же схеме и зараженные аналогичными патогенными вирусами.

Показатели летальности контрольных животных, характеризующие инфекционные свойства вирусов и чувствительность животных, отражены в таблице 4.1.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что иммунизация мышей авидогенными вариантами вируса обеспечивает более выраженное защитное действие, независимо от инфицирующего варианта и дозы, используемой для инфицирования (таблица 4.2.)

Таблица 4.1.

КОЛИЧЕСТВО КОНТРОЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ, ВЫЖИВШИХ ПОСЛЕ ЗАРАЖЕНИЯ  
ПНЕВМОТРОПНЫМИ ВАРИАНТАМИ ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2)

| Заражающая<br>доза<br><br>LD <sub>50</sub> | Количество<br>зараженных<br>животных | Пневмотропные штаммы            |         |         |                                 |         |         |
|--|--------------------------------------|---------------------------------|---------|---------|---------------------------------|---------|---------|
|  |                                      | А /СССР /05 /80 Pm <sup>+</sup> |         |         | А /Аичи / 2 /68 Pm <sup>+</sup> |         |         |
|  |                                      | 7 сут.                          | 10 сут. | 14 сут. | 7 сут.                          | 10 сут. | 14 сут. |
| 10 LD <sub>50</sub>                        | 12                                   | 1 *                             | 0       | 0       | 1                               | 1       | 1       |
| 100 LD <sub>50</sub>                       | 12                                   | 0                               | 0       | 0       | 0                               | 0       | 0       |

\* - количество выживших животных

Таблица 4.2.

ПРОТЕКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ АВИДОГЕННЫХ И НЕАВИДОГЕННЫХ  
ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А

| Иммунизирующие<br>варианты                        | Инфицирующая<br>доза<br>$LD_{50}$ | Инфицирующий вариант вируса        |      |      |                                   |      |      |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|
|   |                                   | А / СССР / 05 / 80 Pm <sup>+</sup> |      |      | А / Аичи / 2 / 68 Pm <sup>+</sup> |      |      |
|   |                                   | Дни после заражения                |      |      |                                   |      |      |
|   |                                   | 7                                  | 10   | 14   | 7                                 | 10   | 14   |
| АВИДОГЕННЫЕ<br>( aSVRI-54 и<br>aSVRII-169 )       | 10                                | 90 *                               | 60   | 60   | 72,2                              | 50   | 38,9 |
|   | 100                               | 61,1                               | 38,9 | 38,9 | 55,5                              | 44,4 | 38,9 |
| НЕАВИДОГЕННЫЕ<br>( А/Ленинград/385/80<br>и Р-16 ) | 10                                | 66,7                               | 33,3 | 26,7 | 20                                | 13,3 | 6,7  |
|   | 100                               | 46,7                               | 26,7 | 20   | 20                                | 13,3 | 6,7  |

\* - процент выживших животных

Так, при введении пневмотропного варианта А/СССР/05/80 Pm<sup>+</sup> в дозе 10 LD<sub>50</sub> авидогенные варианты защищали от гибели на 14 день наблюдения на 33% , а при введении 100 LD<sub>50</sub> на 19% больше животных, чем неавидогенные.

При введении разрешающего вируса 1968 года выделения - А/Аичи/2/68 , авидогенные варианты защищали от гибели на 14 день наблюдения на 32% больше животных, чем неавидогенные. Таким образом подтверждено, что авидогенные варианты создают невосприимчивость широкого диапазона, т.е. и в отношении гетерологичных штаммов.

Изучение протективной активности вариантов вируса гриппа показало, что при введении пневмотропного штамма А/Аичи/2/68 (H3N2) более выраженное защитное действие среди авидогенных и неавидогенных вариантов обеспечивает иммунизация вариантами с антигенной формулой H3N2 (таблица 4.3.). Так, если сравнивать защитное действие штаммов А/Ленинград/385/80 (H3N2) и Р-16 (H3N7), то видно, что иммунизация вариантом А/Ленинград/385/80 (H3N2) защищает от гибели большее количество животных, чем иммунизация штаммом Р-16 (H3N7) ; однако различия были незначительными. Более выражено отмеченная закономерность прослеживается при сравнении защитного эффекта , достигнутого иммунизацией авидогенными штаммами. Введение варианта аSVRI-54 с антигенной формулой H3N2 защищало от гибели большее количество животных , чем иммунизация рекомбинантом аSVRII-169, имеющего антигенную формулу H3N1. Полученные данные свидетельствуют о важной роли нейраминидазного компонента в защите от гриппозной инфекции.

Таким образом, результаты проведенного исследования подтвердили результаты, полученные в эксперименте *in vitro* .

Таблица 4.3.

ОЦЕНКА ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ВАРИАНТОВ ВИРУСА В  
ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ АНТИГЕННОГО СТРОЕНИЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ  
ПНЕВМОТРОПНОГО ШТАММА А / АИЧИ / 2 / 68 P<sub>m</sub><sup>+</sup> (H3N2)

| Наименование<br>иммунизирую-<br>щего варианта | Антигенная<br>формула | Заражающая<br>доза<br>LD <sub>50</sub> | Дни после заражения |      |
|---|-----------------------|--|---------------------|------|
|   |                       |  | 7                   | 14   |
| asV RI-54                                     | H3N2                  | 10                                     | 87,5 *              | 62,5 |
|   |                       | 100                                    | 75                  | 75   |
| asV RII-I69                                   | H3NI                  | 10                                     | 60                  | 20   |
|   |                       | 100                                    | 40                  | 10   |
| А/Ленинград/<br>385/80                        | H3N2                  | 10                                     | 30                  | 10   |
|   |                       | 100                                    | 20                  | 0    |
| P-I6  | H3N7                  | 10                                     | 20                  | 20   |
|   |                       | 100                                    | 0                   | 0    |

\* - процент выживших животных

4.2. Изучение клеточных реакций при использовании вариантов вируса, различающихся по авидогенной способности.

Для характеристики специфической функциональной активности Т-системы иммунитета и оценки уровня сенсibilизации организма, которую вызывают варианты с различной способностью индуцировать синтез авидных антител, была использована реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) под слоем агарозы. В основе данного метода лежит тот факт, что лимфоциты после повторного контакта с антигеном, к которому они были сенсibilизированы, продуцируют лимфокины, влияющие на миграцию индикаторных клеток. Результаты реакции выражали в индексах миграции. В качестве контроля служили индексы миграции, полученные в опытах с клетками неиммунизированных животных. Индекс миграции (ИМ) вычисляли по формуле [135]:

$$\text{ИМ} = \frac{\text{средняя площадь зоны миграции в присутствии антигена}}{\text{средняя площадь зоны миграции без антигена}}$$

Как видно из таблицы 4.4., спленоциты, полученные от животных, иммунизированных вариантом aSVRI-54, отвечают торможением миграции после инкубации с гомологичным антигеном (ИМ - 0,42) и незначительным торможением миграции после инкубации с вариантом aSVRII-169 (ИМ 0,60), имеющего с гомологичным штаммом общий гемагглютинин. Инкубация с гетерологичными антигенами А/Ленинград/385/80 и Р-16 не влияет на миграцию индикаторных клеток (ИМ 1,68 и 2,32 соответственно), что свидетельствует об отсутствии сенсibilизации лимфоцитов этих животных к гетерологичным антигенам.

Спленоциты, полученные от животных, иммунизированных вариантом А/Ленинград/385/80 также отвечают торможением миграции

Таблица 4.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ МИГРАЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ  
ИНДЕКС МИГРАЦИИ ( $M \pm m$ )

| Вирусные<br>антигены | Иммунизирующий вариант вируса |             |                    |             |
|----------------------|-------------------------------|-------------|--------------------|-------------|
|                      | aSV RI-54                     | aSV RII-I69 | A/Ленинград/385/80 | Контроль    |
| aSV RI-54            | 0,42 ± 0,01                   | 0,21 ± 0,01 | 0,63 ± 0,19        | 0,95 ± 0,07 |
| aSV RII-I69          | 0,60 ± 0,07                   | 0,25 ± 0,03 | 1,40 ± 0,02        | 1,00 ± 0,02 |
| A/Ленинград/385/80   | 1,68 ± 0,01                   | 0,25 ± 0,03 | 0,30 ± 0,001       | 1,59 ± 0,26 |
| P-I6                 | 2,32 ± 0,30                   | 0,21 ± 0,01 | 0,30 ± 0,001       | 2,41 ± 0,38 |

после инкубации с гомологичным антигеном ( ИМ 0,30) и близкородственным вариантом Р-16 ( ИМ 0,30 ), имеющим общий гемагглютинин со штаммом А/Ленинград/385/80. Инкубация спленоцитов с гетерологичными антигенами приводит к незначительному торможению (при инкубации с антигеном аSVRI-54 ИМ - 0,63) или отсутствием торможения миграции индикаторных клеток (при инкубации с антигеном аSVRII-169 ИМ - 1,4).

В то же время, как видно из таблицы 4.4., иммунизация вариантом аSVPII-169 вызывает сенсibilизацию лимфоцитов как к гомологичным, так и к гетерологичным вариантам вируса гриппа, что выражается в угнетении миграции индикаторных клеток после инкубации с любым из четырех испытанных антигенов ( ИМ 0,21 - 0,25 ).

По нашим данным вариант аSVPII-169 является наиболее авидогенным, и индуцирует при введении в организм образование антител, активно взаимодействующих с гетерологичными, социркулирующими вариантами. Возможно, что выявленная способность сенсibilизировать лимфоциты к любому из испытанных антигенов отражает способность рекомбинанта аSVRII-169 эффективно активировать Т-систему иммунитета.

Вероятно, в гемагглютине варианте вируса гриппа аSVRII-169 существуют конформационные особенности, влияющие на распределение, доступность и иммуногенность антигенных детерминант, что позволяет антителам, образующимся в ответ на его введение, активно взаимодействовать с гемагглютинидами других дрейф-вариантов, а иммунокомпетентным клеткам - активно распознавать социркулирующие варианты вируса.

## ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ И ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ АВИДОГЕННЫХ И НЕАВИДОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА.

Проведенные нами исследования, результаты которых изложены в предыдущих главах, позволили предположить, что антигенные детерминанты авидогенных вариантов имеют определенные особенности, влияющие на их распределение, доступность и иммуногенность.

Выявить некоторые особенности строения антигенных детерминант позволяют результаты реакции взаимодействия штаммов с моноклональными антителами (Мкат). Нами были использованы моноклональные антитела к штамму А/Бангкок/1/79, полученные в лаборатории доктора Р.Вебстера (госпиталь Св.Иуды, Мемфис, США) и любезно предоставленные нам профессором Р.Я.Подчерняевой (Институт вирусологии им.Д.И.Ивановского, г.Москва).

Для проведения сравнительного исследования гемагглютини́на НЗ вариантов вируса гриппа с различной способностью индуцировать синтез авидных антител, были использованы авидогенные варианты аSV RII-169 и А/Таллин/37/80 (индексы авидности иммунных сывороток 658,00 и 759,17 соответственно), неавидогенный вариант А/Барнаул/3988/79 (индекс авидности иммунной сыворотки 337,87) и штамм А/Фрунзе/160/79, индуцирующий синтез антител средней авидности (индекс авидности иммунной сыворотки 551,63).

Как видно из таблиц 5.1 и 5.2., способность взаимодействовать с Мкат у антигенных сайтов гемагглютини́на варианта аSV RII-169 в 2-8 раз выше, чем у варианта А/Таллин/37/80, в 2-32 раза выше, чем у варианта А/Фрунзе/160/79.

Титры Мкат (средние геометрические значения), выявленные

Таблица 5.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ РТГА ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(Н3) С  
 МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К НА ШТАММА А/БАНГКОК/1/79

| Наименование<br>штамма | Моноклональные антитела |       |       |       |       |       |       |        |       |
|------------------------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
|                        | 4/1                     | 7/2   | 13/3  | 17/6  | 20/2  | 23/1  | 31/5  | 46/2   | 49/4  |
| aSVRII-169             | 51200                   | 51200 | 51200 | 25600 | 12800 | 25600 | 6400  | 102400 | 25600 |
| А/Таллин/37/80         | 12800                   | 25600 | 12800 | 6400  | 3200  | 3200  | 3200  | 12800  | 12800 |
| А/Фрунзе/160/79        | 25600                   | 1600  | 1600  | 6400  | 1600  | 1600  | 12800 | 6400   | 12800 |
| А/Барнаул/3988/79      | 400                     | 1600  | 1600  | 1600  | 800   | 400   | 3200  | 6400   | 3200  |
| А/Бангкок/1/79         | 400                     | 800   | 1600  | 3200  | 800   | 800   | 3200  | 3200   | 5400  |

Таблица 5.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ СПОСОБНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВОВАТЬ  
С М<sub>кат</sub> К НА ШТАММА А/БАНГКОК/1/79 ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(НЗ).

| Исследуемые штаммы                           | соотношение |      | титр М <sub>кат</sub> при взаимодействии с исследуемым вариантом |      |      |      |      |      |      |
|--|-------------|------|--|------|------|------|------|------|------|
|  |             |      | титр М <sub>кат</sub> при взаимодействии с вариантом аSV RII-169 |      |      |      |      |      |      |
| моноклональные антитела ( М <sub>кат</sub> ) |             |      |  |      |      |      |      |      |      |
|  | 4/1         | 7/2  | 13/3   | 17/6 | 20/2 | 23/1 | 31/5 | 46/2 | 49/4 |
| А/Таллин/37/80                               | 1/4         | 1/2  | 1/4  | 1/4  | 1/4  | 1/8  | 1/2  | 1/8  | 1/2  |
| А/Фрунзе/160/79                              | 1/2         | 1/32 | 1/32   | 1/4  | 1/8  | 1/16 | -    | 1/16 | 1/2  |
| А/Барнаул/3988/79                            | 1/128       | 1/32 | 1/32   | 1/16 | 1/16 | 1/64 | 1/2' | 1/16 | 1/8  |

- титр М<sub>кат</sub>, выявляемый при взаимодействии с исследуемым вариантом вируса не ниже, чем титр М<sub>кат</sub>, выявляемый вариантом аSV RII-169

в РТГА вариантом аSVRII-I69 в 16 раз превышали таковые у неавидогенного варианта А/Барнаул/3988/79 при взаимодействии с Мкат 17/6 , 20/2 и 46/2 ; в 32 раза - при взаимодействии с Мкат серии 7/2 и 13/3 ; в 64 раза - при взаимодействии с Мкат 23/1 и в 128 раз - при взаимодействии с Мкат серии 4/1. Различия при взаимодействии авидогенного и неавидогенного вариантов с моноклональными антителами 31/5 и 49/4 менее значительны, превышение титров соответственно составило в 2 и в 8 раз.

Таким образом, проведенные исследования показали, что антигенные детерминанты авидогенного варианта аSVRII-I69 наиболее доступны и экспонированы на поверхности молекулы гемагглютинина и, вероятно, имеют конформационную структуру, позволяющую быстро и прочно связываться с моноклональными антителами, полученными к социркулирующему варианту вируса.

В отличие от варианта аSVRII-I69 , неавидогенный вариант А/Барнаул/3988/79 имеет менее доступные и экспонированные антигенные детерминанты или, возможно более жесткую конформационную зависимость при взаимодействии с моноклональными антителами, полученными к варианту А/Бангкок/1/79.

Очевидно, что способность индуцировать синтез авидных антител зависит от структуры антигенных детерминант, однако, по-видимому, имеют значение и другие особенности строения.

Мы считали необходимым изучить комплекс генетических маркеров, проявление которых связано с особенностями поверхностных белков оболочки вирионов.

Такие исследования позволяют оценить роль белков суперкапсидной оболочки в проявлении признака высокой авидогенности и могут служить дополнительными маркерами для дифференциации штаммов, способных вызывать синтез авидных антител.

Работу проводили с авидогенными вариантами аSVRI-54 , аSVRII-I69 и неавидогенными вариантами А/Ленинград/385/80 и P-I6.

СПОСОБНОСТЬ К РЕПРОДУКЦИИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ  
ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ ( rct ) :

В таблице 5.3. представлены данные по изучению инфекционной активности авидогенных и неавидогенных вариантов вируса гриппа при температурных режимах 28°C , 36°C , 40°C. Оценку rct-маркера проводили согласно [ I29 ].

Если разница  $\lg \text{ЭИД}_{50}$  при 36°C и другой температуре культивирования была менее 2 , вирус считали устойчивым к температуре культивирования ( rct+ ), при разнице от 2 до 4 - фенотип считали rct<sub>±</sub> , более 4 - фенотип rct-.

Как можно видеть, репродукционная активность в аллантаической полости куриных эмбрионов при 36°C не отличалась у авидогенных и неавидогенных вариантов и составила 9,0  $\lg \text{ЭИД}_{50}$  у вариантов аSVRII-I69 и А/Ленинград/385/80 ; 8,25  $\lg \text{ЭИД}_{50}$  и 8,0  $\lg \text{ЭИД}_{50}$  у вариантов аSVRI-54 и P-I6 соответственно. Таким образом, взаимосвязи между степенью авидогенности и репродукционной активности не наблюдается.

Варианты аSVRI-54, аSVRII-I69 и А/Ленинград/385/80 имели rct+ фенотип при температуре культивирования 40°C . Хуже всего при этой температуре репродуцировался вариант P-I6 ( rct<sub>±</sub> фенотип).

При температуре 28°C плохо репродуцировались варианты аSVRI-54 и P-I6 ( rct - фенотип), варианты аSVRII-I69 и А/Ленинград/385/80 имели rct<sub>±</sub> фенотип.

Таким образом, каких-либо четких различий по rct-маркеру между авидогенными ( аSVRI-54 и аSVRII-I69) и неавидогенными (P-I6 и А/Ленинград/385/80) вариантами не обнаружено.

Таблица 5.3.

ИНФЕКЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ АВИДОГЕННЫХ И НЕАВИДОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ  
ВИРУСА ГРИППА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМАХ (rcr)

| Штаммы                 | lg ЭИД <sub>50</sub><br>36°С | 28°С                         |  |              | 40°С                         |  |              |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|--|--------------|------------------------------|--|--------------|
|                        |                              | lg ЭИД <sub>50</sub><br>28°С | lg $\frac{\text{ЭИД}_{50} 36^{\circ}}{\text{ЭИД}_{50} 28^{\circ}}$ | Фено-<br>тип | lg ЭИД <sub>50</sub><br>40°С | lg $\frac{\text{ЭИД}_{50} 36^{\circ}}{\text{ЭИД}_{50} 40^{\circ}}$ | Фено-<br>тип |
| АВИДОГЕННЫЕ            |                              |                              |  |              |                              |  |              |
| aSVRI-54               | 8,25                         | 3,50                         | 4,75   | -            | 8,00                         | 0,25   | +            |
| aSVRII-169             | 9,00                         | 6,25                         | 2,75   | ±            | 8,75                         | 0,25   | +            |
| НЕАВИДОГЕННЫЕ          |                              |                              |  |              |                              |  |              |
| P-16                   | 8,00                         | 3,50                         | 4,50   | -            | 6,00                         | 2,00   | ±            |
| A/Ленинград/<br>385/80 | 9,00                         | 5,25                         | 3,75   | ±            | 8,75                         | 0,25   | +            |

### ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ( $T_{56}$ - маркер )

Все исследованные варианты вируса обладали термостабильным гемагглютинином ( таблица 5.4. ). Гемагглютинирующий титр как авидогенных ( aSVRI-54 , aSVRII-I69 ), так и неавидогенных ( P-I6 , A/Ленинград/385/80 ) вариантов вируса не снижался за 6 часов прогревания при  $56^{\circ}\text{C}$  . Таким образом, все испытанные варианты имели  $T_{56}+$  фенотип .

### СТЕПЕНЬ АДСОРБЦИИ-ЭЛЮЦИИ НА КУРИНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ

(  $Ad_{rc} - E_{rc}$  )

Как видно из таблицы 5.5., все испытанные варианты достаточно полно и быстро адсорбировались на куриных эритроцитах. В то же время, наблюдались отличия в степени адсорбции авидогенных и неавидогенных вариантов вируса.

Наибольшие отличия выявлены в первые 15 минут адсорбции, поэтому статистическая обработка (расчет критериев достоверности, корреляционный анализ) проводилась для результатов, выявленных в этот временной интервал.

Неавидогенные варианты P-I6 и A/Ленинград/385/80 быстро и полно адсорбировались на куриных эритроцитах уже в первые 15 минут контакта (процент адсорбированного вируса составил 99% и 100% соответственно). Авидогенные варианты aSVRI-54 и aSVRII-I69 адсорбировались тоже достаточно хорошо, но процент адсорбированного вируса (85,6%) был ниже по сравнению с неавидогенными вариантами. При этом различия в степени адсорбции между вариантами aSVRI-54, aSVRII-I69 и P-I6 были статистически значимые (  $P < 0,05$  ), различия между вариантами aSVRI-54, aSVRII-I69 и A/Ленинград/385/80 выражены ещё сильнее (  $P < 0,01$  ).

Таблица 5.4.

ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ГЕМАГГЛУТИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АВИДОГЕННЫХ  
И НЕАВИДОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(НЗ) - Т<sub>56</sub> МАРКЕР

| Штаммы                 | Исходный<br>титр | Экспозиция при 56°С (время в часах) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                        |                  | 1                                   |     | 2   |     | 3   |     | 4   |     | 5   |     | 6   |     |
|                        |                  | ГА*                                 | %   | ГА  | %   |
| <b>АВИДОГЕННЫЕ</b>     |                  |                                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| asVRI-54               | 384              | 384                                 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 |
| asVRII-169             | 256              | 256                                 | 100 | 256 | 100 | 256 | 100 | 256 | 100 | 256 | 100 | 256 | 100 |
| <b>НЕАВИДОГЕННЫЕ</b>   |                  |                                     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| А/Ленинград/<br>385/80 | 384              | 384                                 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 | 384 | 100 |
| Р-16                   | 128              | 128                                 | 100 | 128 | 100 | 128 | 100 | 128 | 100 | 128 | 100 | 128 | 100 |

\* ГА - гемагглютинирующая активность (средние геометрические титры)

% - ГА вируса после прогревания в течении определенного времени по отношению к исходному титру.

Таблица 5.5.

СТЕПЕНЬ АДСОРБЦИИ АВИДОГЕННЫХ И НЕАВИДОГЕННЫХ ВАРИАНТОВ  
ВИРУСА ГРИППА А(НЗ) НА КУРИНЫХ ЭРИТРОЦИТАХ (  $A_{rc}$  - МАРКЕР )

| Штаммы             | % адсорбированного на эритроциты вируса ж |        |        |         |
|--------------------|---|--------|--------|---------|
|                    | 15 мин                                    | 30 мин | 60 мин | 120 мин |
| АВИДОГЕННЫЕ        |   |        |        |         |
| aSVRI-54           | 85,6                                      | 87,7   | 88,7   | 88,7    |
| aSVRII-169         | 85,6                                      | 85,6   | 87,7   | 87,7    |
| НЕАВИДОГЕННЫЕ      |   |        |        |         |
| А/Ленинград/385/80 | 100                                       | 100    | 100    | 100     |
| P-16               | 99  | 99     | 100    | 100     |

ж - вычисляется, исходя из средних значений титров гемагглютинации в надосадочной жидкости через определенные промежутки времени после добавления эритроцитов.

Таблица 5.6.

СТЕПЕНЬ ЭЛЮЦИИ С ЭРИТРОЦИТОВ АВИДОГЕННЫХ И НЕАВИДОГЕННЫХ  
ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А ( Е г с - МАРКЕР )

| Штаммы             | Элюирующая активность вируса в % к<br>исходному титру гемагглютинации |        |         |         | Фенотипическая<br>характеристика * |
|--------------------|---|--------|---------|---------|------------------------------------|
|                    | 30 мин  | 60 мин | 120 мин | 180 мин |                                    |
| АВИДОГЕННЫЕ        |   |        |         |         |                                    |
| asV RI-54          | 3,1   | 16,6   | 18,7    | 27,4    | ±                                  |
| asV RII-169        | 9,4   | 18,7   | 32,1    | 52,1    | +                                  |
| НЕАВИДОГЕННЫЕ      |   |        |         |         |                                    |
| А/Ленинград/385/80 | 6,25  | 16,6   | 25,0    | 50,3    | +                                  |
| Р-16               | 0   | 2,3    | 12,5    | 25,0    | ±                                  |

\* - Фенотипическая характеристика : вирус считали высокоэлюирующим, если за полное время элюции (180 мин) гемагглютинирующая активность в надосадочной жидкости превышала 50% исходного титра гемагглютинации; 20-50% - средняя активность элюции; менее 20% - малая.

Расчет коэффициентов корреляции подтвердил наличие сильной обратной корреляционной связи между признаками авидогенности и способности адсорбироваться на куриных эритроцитах ( коэффициент корреляции  $-0,98$  при  $P < 0,05$  ).

Элюирующая активность исследованных вариантов различалась (таблица 5.6.) и составила у вариантов аSVRII-169 и А/Ленинград/385/80 52,1% и 50,3% соответственно, у вариантов аSVRI-54 и P-16 - 27,4% и 25,0% .

Таким образом, варианты аSVRII-169 и А/Ленинград/385/80 являются высокоэлюирующими (имеют  $E_{rc} +$  фенотип). Варианты аSVRI-54 и P-16 имеют среднюю активность элюции с эритроцитов ( $E_{rc} \pm$  фенотип).

Каких-либо четких различий по  $E_{rc}$ -маркеру между авидогенными и неавидогенными вариантами не выявлено.

#### ИНТЕРФЕРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ВАРИАНТОВ ВИРУСА.

По данным ряда авторов [130,133] штаммы вируса гриппа различаются по интерферогенной активности. Показано [130] , что способность клеток периферической крови людей к синтезу интерферона в присутствии соответствующего штамма вируса гриппа выражено совпадает с устойчивостью к этому же возбудителю. Учитывая наши данные о различной протективной активности авидогенных и неавидогенных вариантов вируса, а также данные о неодинаковой способности вариантов вируса активировать Т-систему иммунитета, было интересно определить способность этих вариантов к индукции синтеза интерферона.

В качестве вирусов-индукторов использовались авидогенные ( аSVRI-54 , аSVRII-169 ) и неавидогенные ( P-16 и А/Ленинград/385/80 ) варианты вируса гриппа. Биосинтез интерферона проводился в стационарной культуре человеческих лейкоцитов.

Таблица 5.7.

## ОЦЕНКА ИНТЕРФЕРОНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА А(НЗ)

| Объем вируса-индуктора<br>Объем клеточной суспензии | Вирус - индуктор |          |                  |          |                                  |
|---|------------------|----------|------------------|----------|----------------------------------|
|   | P-I6             | RI-54    | ЛЕН *            | RII-I69  | Вирус бо-<br>лезни Нью-<br>касла |
| I / 2   | 7 ME/мл **       | 15 ME/мл | 15 ME/мл         | 30 ME/мл | 4 тыс.<br>ME/мл                  |
| I / 5   | 7 ME/мл          | 15 ME/мл | 15 - 30<br>ME/мл | 30 ME/мл | 8 тыс.<br>ME/мл                  |

\* - А/Ленинград/385/80

\*\* - титр интерферона в интерферон-содержащей надосадочной жидкости.

Вирус-индуктор добавляли в соотношении 1:2 или 1:5 от объема клеточной суспензии.

Как видно из таблицы 5.7., самым сильным индуктором интерферона из всех испытанных вариантов вируса гриппа являлся авидогенный вариант aSVRII-169. Самой слабой интерферогенной активностью обладал неавидогенный вариант P-16. Варианты aSVRI-54 и А/Ленинград/385/80 не отличались по способности индуцировать синтез интерферона.

Расчет коэффициентов корреляции показал наличие сильной прямой связи между признаками авидогенности и интерферогенной активности (коэффициент корреляции  $r + 0,76$  при  $P < 0,05$ ).

Однако следует отметить, что по сравнению с вирусом болезни Ньюкасла, который используется в качестве вируса-индуктора при производстве интерферона, все использованные варианты вируса гриппа являются слабыми интерферогенами, что совпадает с данными литературы [ 92,99 ] .

Результаты экспериментов, представленных в этой главе позволяют сделать следующие заключения :

- определены генетические маркеры авидогенных и неавидогенных вариантов вируса, проявление которых связано с особенностями структуры суперкапсидной оболочки вирионов ;
- показано, что авидогенные и неавидогенные варианты вируса гриппа достоверно отличаются по способности адсорбироваться на куриных эритроцитах : выявлена обратная корреляционная связь признака авидогенности и способности адсорбироваться на куриных эритроцитах.

Каких-либо четких различий по остальным определяемым маркерам у авидогенных и неавидогенных вариантов не выявлено;

- показано наличие прямой корреляционной связи между призна-

- ками авидогенности и способности к индукции интерферона ;
- опыты с моноклональными антителами показали, что антигенные детерминанты авидогенного варианта наиболее доступны и экспонированы на поверхности молекул гемагглютинина и/или имеют конформационную структуру, позволяющую активно взаимодействовать с моноклональными антителами.

## З А К Л Ю Ч Е Н И Е

Повсеместное распространение, высокая эпидемическая заболеваемость и тяжелые последствия для определенных групп населения определяют чрезвычайную актуальность проблемы гриппа.

До настоящего времени основным методом борьбы с этой инфекцией остается вакцинопрофилактика. Попытки получить универсальные синтетические вакцины пока не увенчались успехом [ 65,74 ], поэтому улучшение качества традиционных вакцинных препаратов является объектом внимания многих исследователей. Усилия ученых сосредоточены в основном на поиске оптимальных схем очистки и производства вакцин, вопросам отбора штаммов - кандидатов в вакцинные не уделяется должного внимания. Между тем, успех вакцинопрофилактики в значительной степени зависит от качества антител, образующихся в макроорганизме при введении вакцинного препарата [ 108,137 ] .

Как показали проведенные исследования, популяция вирусов гриппа А(Н3N2) 1978-1980 гг. выделения и 1985 г. выделения является гетерогенной по способности индуцировать при введении в макроорганизм синтез авидных антител.

Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1978-1980 годов выделения имели значения в пределах 226,17-802,22. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1985 года выделения составили 31,5-226,3.

Частота нахождения в исследуемой популяции штаммов, индуцирующих синтез высоко- и низкоавидных антител не превышает 10 - 12 % . 75 - 77 % исследованных штаммов индуцировали синтез антител, имеющих средние индексы авидности. Из приведенных в работе данных частоты нахождения высокоавидогенных вариантов следует, что минимальное количество штаммов, которое необходи-

мо исследовать для успешного поиска таких вариантов - 8-9. При увеличении количества исследованных вариантов вероятность нахождения высокоавидогенных вариантов возрастает.

Биологический смысл нахождения в популяции вируса гриппа А малого количества высокоавидогенных вариантов очевиден. Высокоавидные антитела, быстро и эффективно соединяясь с антигенами-социркулирующих вариантов вируса, приводят к отбору в популяции слабоиммуногенных вариантов. Антитела низкой авидности слабо элиминируют антиген, что способствует выживанию вируса в условиях давления иммунологического пресса с одной стороны и ведет к персистенции вируса в организме с другой стороны. Работами ряда исследователей [204,158] показано, что при хронических формах ряда вирусных инфекций в организме больных образуются низкоавидные антитела. А.Ф.Фролов с соавт. [69] обнаружили, что низкоиммуногенный вариант вируса гриппа, в отличие от исходного вируса и высокоиммуногенного варианта, был способен длительно циркулировать в организме, вызывая развитие хронических воспалительных процессов. Очевидно, что сниженная иммуногенность является приспособительным механизмом, позволяющим популяции вируса гриппа уходить из-под контроля специфического гуморального иммунитета.

Как показали проведенные нами исследования, варианты вируса гриппа А 1985 года выделения индуцируют синтез менее авидных антител, чем варианты вируса 1978-1980 годов выделения. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам вируса 1985 года выделения не превышают минимальных значений индексов авидности иммунных сывороток, полученных к вариантам 1978-1980 годов выделения. Очевидно, что по мере циркуляции популяции вируса гриппа происходит отбор менее авидогенных ва-

риантов. Сдвиг в сторону количественного увеличения в популяции вируса гриппа А низкоавидогенных вариантов является максимальным в конце циркуляции дрейф- и шифт-вариантов. В литературе имеются данные, касающиеся динамики изменения иммуногенности и ряда других маркеров популяции вируса гриппа А по мере циркуляции вируса. Г.П.Жиловой с соавт. [32,125] отмечен факт прогрессивного и последовательного снижения иммуногенной активности изолятов вируса гриппа по мере их удаления во времени от родоначальника пандемического цикла. Авторы считают, что иммуногенная активность вируса находится в прямой корреляции с его эпидемической активностью. Г.С.Скрипченко с соавт. [94] провели исследования по определению изменения иммуногенности и ряда других маркеров вируса гриппа под влиянием направленного отбора в изосистеме куриных эмбрионов, пассивно иммунизированных сыворотками к вирусам-предшественникам. Было показано, что при качественно однообразном действии селекционирующего отбора наблюдалось снижение иммуногенности ; изменялись и другие маркеры - понижалась элюирующая способность вирусов, термолabileную популяцию вируса заменяла популяция с термостабильным гемагглютинином. Все эти изменения авторы рассматривают как проявление "генетических механизмов самопрограммирования популяции, направленных на сохранение вида возбудителя". В.Д.Беляков [8] считает, что усиление типоспецифического иммунитета за счет развития эпидемии генерирует фазу повышения гетерогенности популяции вируса гриппа для формирования резервационного штамма, против которого у населения не создано иммунитета. Персистенция в людях, по мнению ряда авторов [4] является способом сохранения вирусов в межэпидемический и межпандемический периоды и вместе с тем механизмом сохранения и проявления антигенной гетерогенности по-

пуляции вируса гриппа А.

Поскольку вакцинный штамм должен обладать свойствами антигенной актуальности, высокой репродуктивности и гомогенности, необходимо было получить рекомбинанты авидогенного варианта. В качестве родительских вариантов использовались клон аSV27.123, выделенный из авидогенного варианта А/Ленинград/229/80 (H3N2) и высокоурожайный лабораторный штамм А/PR/8/34 (H1N1).

Так как клон аSV27.123 обладал низкой репродукционной активностью, в качестве второго "родителя" мы использовали высокоурожайный штамм А/PR/8/34, надеясь получить рекомбинанты, сочетающие в себе признаки высокой авидогенности и репродукционной активности. Последующее клонирование выделенных рекомбинантов позволяло получить гомогенную популяцию. В результате рекомбинации с последующей селекцией смешанной популяции и клонированием были получены рекомбинанты аSVRI-54 (H3N2), аSVRII-169 (H3N1) и аSVRII-33 (H3N1), сочетающие в себе признаки высокой авидогенности и репродукционной активности. Индексы авидности иммунных сывороток, полученных к рекомбинантам, превосходили индексы авидности иммунных сывороток, полученных к родительскому варианту.

В литературе имеются сведения о том, что рекомбинантные штаммы могут обладать более высокой иммуногенностью, чем родительские варианты [25,134]. Однако существует и другое мнение. Г.П.Жиловой с соавт. [136] было проведено сравнительное изучение эффективности живых гриппозных вакцин, полученных из пассажных и рекомбинантных штаммов. На основании проведенных исследований авторы делают заключение, что рекомбинантные штаммы создают у привитых менее надежную защиту от эпидемического вируса по сравнению с препаратами из оригинальных вирусов.

Проведенные нами исследования показали, что рекомбинантные штаммы могут как превосходить, так и быть менее авидогенными, чем родительские варианты. Так, полученные нами рекомбинанты аSVRI-54, аSVRII-169, аSVRII-33 были более авидогенными, чем клон аSV27.123, в то же время рекомбинант P-16, полученный доктором Н.Е.Горевым (г.Ленинград, ВНИИ гриппа, лаборатория генетики и вакцинных штаммов) индуцировал синтез менее авидных антител по сравнению с родительским вариантом А/Ленинград/385/80.

Учитывая, что перечисленные рекомбинанты были получены с использованием разных доноров ( в случае получения авидогенных рекомбинантов родительским вариантом являлся штамм А/PR/8/34, рекомбинанта P-16 - штамм А/Лошадь/Прага/1/56 ), можно сделать вывод о необходимости поиска штаммов-доноров, не изменяющих иммуногенных свойств родительских вариантов.

Проведение генного анализа полученных рекомбинантов показало, что передача только одного гена - гена гемагглютинина обеспечивает передачу признака высокой авидогенности. Очевидно, что решающую роль в проявлении признака высокой или низкой авидогенной способности играет гемагглютинин вируса гриппа. Этот вывод достаточно логичен, поскольку хорошо известно, что противогриппозный иммунитет в значительной степени связан с антигемагглютинирующими антителами [76,132]. Однако, как отмечалось выше, авидогенная способность полученных рекомбинантов отличалась от авидогенной способности родительских вариантов, а следовательно, несомненно то, что на степень проявления данного признака влияют белки, кодируемые остальными генами.

Рядом работ [143,147,178] было показано, что антигенные

детерминанты вируса гриппа чувствительны к конформационным изменениям, а, следовательно, могут изменяться и их иммуногенные свойства в результате белок-белковых взаимодействий гемагглютинина с белками, входящими в состав вириона или играющих роль в вирусной репликации. В последние годы доказано, что М-белок вируса гриппа является интегральной частью липидного бислоя нативных вирионов и существенная его часть выходит на поверхность вирусных частиц [181]. Известно, что М<sub>1</sub>-белок контролирует процессинг гемагглютинина [23] и определяет липидный состав суперкапсидной оболочки [167]. Исходя из этого, можно предположить, что матриксный белок оказывает влияние на конформационные особенности молекул гемагглютинина. Недавно опубликованные данные [146] свидетельствуют о том, что белок РВ1 может экспонироваться на поверхности вирионов вируса гриппа, а следовательно, белок РВ1 также может оказывать влияние на конформационные особенности молекул гемагглютинина. Кроме того, нельзя исключить влияния неструктурных белков, играющих значительную роль в процессах регуляции вирусной репликации и синтеза вирусспецифических белков [115]. Бесспорно, огромное значение имеет вирусная нейраминидаза – второй поверхностный белок вируса гриппа с которым связан противогриппозный иммунитет. [6, 63, 76, 132].

Однако, разобранные примеры о возможном воздействии структурных и неструктурных белков на проявление признака авидогенности не противоречат первоначальному выводу о решающей роли гемагглютинина в проявлении признака высокой или низкой авидогенной способности.

Проведенные нами опыты по изучению протективной активности авидогенных и неавидогенных вариантов вируса гриппа показа-

ли, что при совпадении серотипа нейраминидазы иммунизирующего и разрешающего штамма, защитный эффект был выражен сильнее. Таким образом подтверждено, что антинейраминидазные антитела играют важную роль в защите от гриппозной инфекции, что согласуется с данными других исследователей [ 6,63 ] .

Проведенные исследования по определению протективной активности вирусов, различающихся по авидогенной способности, подтвердили также правомерность использования нашего метода для расчета индексов авидности иммунных сывороток.

В литературе имеются немногочисленные данные по изучению формирования клеточного иммунитета при гриппе с помощью реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) [ 44,55 ] . При этом обычно оценивают способность сенсibilизированных лимфоцитов продуцировать фактор, угнетающий миграцию лейкоцитов (ФУМ), при инкубации их с гомологичным антигеном. Нами в качестве антигенов использовались четыре варианта вируса гриппа - рекомбинанты аSV RI-54, аSV RII-I69, P-I6 и штамм А/Ленинград/385/80 . Спленоциты мышей, иммунизированных авидогенными ( аSV RI-54 и аSV RII-I69) и неавидогенным (А/Ленинград/385/80) вариантами вируса гриппа инкубировали с каждым из перечисленных антигенов. Показано, что лимфоциты мышей, иммунизированных авидогенным вариантом

аSV RII-I69, сенсibilизированы к любому из испытанных антигенов, что выражается в торможении миграции индикаторных клеток.

Лимфоциты мышей, иммунизированных авидогенным рекомбинантом

аSV RI-54, продуцировали ФУМ только при инкубации с гомологичным антигеном т.е. в отличие от варианта аSV RII-I69, вариант

аSV RI-54 не вызывал при введении в организм сенсibilизации

T-лимфоцитов к гетерологичным, социркулирующим вариантам вируса.

Работами ряда авторов [ I59,I79,I80 ] показано, что вза-

имодействие Т-лимфоцитов с гемагглютинином вируса гриппа имеет конформационную зависимость.

Рекомбинаты aSVRII-I69 (H3N1) и aSVRI-54 (H3N2) имеют разный генный состав. Только один ген - ген гемагглютинина общий у этих рекомбинантов. Логично предположить, что авидогенный вариант aSVRII-I69 имеет оптимальный состав белков, определяемый констелляцией генов, в результате чего молекула гемагглютинина имеет конформационные особенности за счет возможного влияния остальных структурных и неструктурных белков.

В настоящее время для антигенного анализа детерминант вируса гриппа и обнаружения конформационных изменений, происходящих в антигенных сайтах, широко используются моноклональные антитела [ 45,170 ]. Нами было проведено сравнительное исследование гемагглютинина H3 вариантов вируса гриппа, различающихся по авидогенной способности. Использовались моноклональные антитела к штамму А/Бангкок/1/79, полученные в лаборатории доктора Р.Вебстера (Мемфис, США).

Моноклональный анализ позволил установить, что способность взаимодействовать с антителами у антигенных сайтов гемагглютинина варианта aSVRII-I69 значительно выше, чем у других испытанных вариантов. Титры моноклональных антител, выявленные в РТГА, были самые низкие при использовании штамма А/Барнаул/3988/79, имеющего и самый низкий индекс авидности иммунной сыворотки.

Таким образом очевидно, что гемагглютинин варианта aSVRII-I69 имеет конформационную структуру с наиболее доступными и экспонированными антигенными детерминантами, в результате чего происходит быстрое и прочное связывание моноклональных антител. Возможно, что доступность и экспонированность антигенных детерминант варианта aSVRII-I69 позволяет при введении его в мак-

роорганизм эффективно активировать Т-систему иммунитета и вызывать синтез авидных антител.

До настоящего времени в доступной нам литературе сведений о использовании моноклональных антител для анализа структуры антигенных детерминант у вирусов с различной иммуногенностью нет.

Russell e.a. [ 142 ], работая с поликлональными сыворотками, пришли к заключению, что антигенные детерминанты на поверхности гемагглютини́на могут индуцировать выработку гетерогенной популяции антител, связывающихся с этими детерминантами с различной авидностью. К аналогичным выводам пришли Г.Н.Трушинская с соавт. [ 41 ], которые считают, что кроме антигенных детерминант, имеются другие участки на молекуле гемагглютини́на, которые в составе данного вируса не индуцируют синтез антител, но способны взаимодействовать с антителами, индуцированными антигенными детерминантами другого вируса. Можно предполагать, что неспособность участков сходной первичной структуры разных вирусных штаммов индуцировать синтез антител, обусловлена особенностями пространственной структуры молекул гемагглютини́на, в результате чего определенные участки могут быть недоступны для узнавания иммунокомпетентными клетками.

При изучении ряда генетических маркеров авидогенных и неавидогенных вариантов вируса гриппа было показано, что все варианты обладали термостабильным гемагглютини́ном.

Г.С.Скрипченко и Т.М.Рыбакова [ 94 ] показали, что в процессе специфически направленного отбора в экспериментальных условиях, термолабильную популяцию вируса гриппа заменяет популяция с термостабильным гемагглютини́ном. Биологическое значение этого явления, по мнению авторов - предотвращение термической

денатурации молекул гемагглютинаина.

При определении степени адсорбции-элюции на куриных эритроцитах показано, что неавидогенные варианты Р-16 и А/Ленинград/385/80 быстрее и полнее сорбируются на куриных эритроцитах, чем авидогенные рекомбинанты аSVRI-54 и аSVRII-169. Известно, что рецептором для молекулы гемагглютинаина служат остатки сиаловой кислоты на поверхности клеток [15,207]. Рецептор связывается с углублением ("карманом") на поверхности молекулы гемагглютинаина, состоящим из консервативных аминокислотных остатков [207]. Вокруг этого кармана располагаются антигенные детерминанты. Можно предположить, что молекула гемагглютинаина неавидогенных штаммов имеет конформационную структуру с открытым и доступным рецепторным карманом, но при этом изменяется конформационная структура антигенных сайтов так, что они недоступны или недостаточно экспонированы на поверхности молекулы гемагглютинаина, в результате чего они не узнаются иммунокомпетентными клетками.

Учитывая, что интерферон оказывает многофакторное влияние на иммунокомпетентные клетки и является важным фактором противовирусной защиты [163,166,205,210], интересно было определить интерферогенную активность вариантов вируса, различающихся по способности индуцировать синтез авидных антител. Показано, что авидогенный рекомбинант аSVRII-169 в наибольшей степени стимулирует синтез интерферона в стационарной культуре человеческих лейкоцитов. Возможно, что способность варианта аSVRII-169 эффективно активировать Т-систему иммунитета связано с его способностью эффективно активировать синтез интерферона. Корреляционный анализ показал наличие сильной прямой корреляционной связи между признаками авидогеннос-

ти и интерферогенной активности.

Таким образом очевидно, что ответ макроорганизма на введение вариантов вируса гриппа зависит от конформационных особенностей структуры вириона и затрагивает все этапы развития иммунного ответа, в том числе - индукцию синтеза интерферона, эффективность активирования Т-системы иммунитета, синтез антител той или иной авидности.

## ВЫВОДЫ

1. Популяция вируса гриппа гетерогенна по способности индуцировать синтез авидных антител.
2. Признак высокой авидогенной способности передается в процессе рекомбинации при передаче гена гемагглютинаина от авидогенного родительского варианта.
3. Рекомбинанты могут отличаться от родительских вариантов вируса по авидогенной способности, в связи с чем необходимо подбирать оптимальные штаммы - доноры высокой репродуктивности, не изменяющие иммуногенных свойств рекомбинантов.
4. Иммунизация животных вариантами вируса, обладающих авидогенным гемагглютинином, дает более выраженный протективный эффект, который ещё более выражен при совпадении серотипа не только гемагглютинаина, но и нейраминидазы иммунизирующего и разрешающего вариантов вируса.
5. Авидогенные варианты могут обладать способностью эффективно активировать Т-систему иммунитета и вызывать сенсibilизацию лимфоцитов к гетерологичным штаммам за счет большей экспонированности и/или конформационных особенностей антигенных детерминант.
6. Выявлена прямая корреляционная связь между признаками авидогенности и интерферогенной активности. Выявлена обратная корреляционная связь между признаками авидогенности и способностью адсорбироваться на куриных эритроцитах. Не установлено корреляции с признаками термостабильности, элюции с куриных эритроцитов, способности к репродукции при различных температурах.
7. Способность штамма вируса гриппа индуцировать при введении в макроорганизм синтез авидных антител необходимо учитывать

как один из важнейших критериев при выборе штаммов - кандидатов  
э вакцинные.

В заключение приношу свою искреннюю благодарность ассистенту кафедры микробиологии Свердловского медицинского института И.П.Мановой, старшим научным сотрудникам В.П.Сухинину, С.С.Галитарову ( ВНИИ гриппа МЗ СССР, г.Ленинград ), Н.Н.Александровой ( Свердловский НИИ вирусных инфекций ) за поддержку и помощь при выполнении диссертационной работы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа // Вопр. вирусологии.-1977.-№4.-С.387-395.
2. Анджапаридзе О.Г., Торчилин В.П., Мажуль Л.А. Защитное действие виросом, содержащих антигены вируса гриппа, при интраназальном способе введения // Вопр. вирусологии.-1987.-№1.-С.112-114.
3. Аннун К., Энротт Ж., Доссэ Ж. Реакция антител на противогриппозную вакцинацию, система Н1А и эритроцитарный магний // Этиол. и эпидем. процесс при гриппе в современных условиях.-Л., 1985.-С.145-153.
4. Антигенная гетерогенность популяции вирусов гриппа А человека и ее роль в эпидемическом процессе / В.Д.Беляков, Д.Б.Голубев, В.А.Зуев и др.// Вестник АМН СССР.-1983.-№5.-С.23-28.
5. Антигенные детерминанты гемагглютининов вирусов гриппа гонконгской разновидности и их роль в создании резистентности к гриппозной инфекции / А.Л.Платонова, Е.И.Исаева, З.И.Ровнова, П.Н.Косяков // Вопр. вирусологии.-1980.-№6.-С.712-715.
6. Антинейраминидазные сывороточные антитела при естественном инфицировании гриппом А и иммунизации гриппозными вакцинами / А.Н.Найхин, И.М.Царицина, Л.Г.Сыроедова и др.// Вопр. вирусологии.-1983.-№2.-С.154-159.
7. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.-Л.:Медгиз, 1962.-180 с.
8. Беляков В.Д. Конструирование вакцин против гриппа в связи с эпидемиологией гриппозной инфекции // Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1984.-№3.-С.115-119.
9. Бреслер С.Е. Физико-химическое обоснование принципа полу-

- чения вирусных вакцин с помощью адсорбционной хроматографии// Убитая гриппозная вакцина.-Л.:НИИЭМ им.Пастера.,1976.-С.13-19.
10. Бейли Н. Статистические методы в биологии /Пер. с англ. В.П.Смилги.-М.:Мир.,1964.-271с.
11. Вакцинопрофилактика гриппа за рубежом /Под ред. проф. М.П. Зыкова.-М.,1981.-83с.
12. Васильева Г.А. Методические основы получения субъединичных вакцин //Этиология и специфическая профилактика гриппа.-Тр.НИИЭМ им.Пастера,1982.-С.129-133.
13. Вакцины третьего поколения /Р.В.Петров, Р.М.Хаитов, А.В.Некрасов и др.-М.,1987.-75с.
14. Взаимосвязь вирулентности и иммуногенности вируса гриппа / Г.П.Жилова, В.А.Орлов, О.М.Ермолаева, Л.К.Тарос//Тр.Казахск. ин-та эпидемиол.,микробиол. и инфекцион.болезней.-1979.- С.48-52.
15. Вирусы гриппа и грипп./ Под ред.Э.Д.Кильбурна.-М.:Медицина, 1978.-584с.
16. Влияние иммуногенности вируса гриппа на "быстрое" и "медленное" антителообразование /Г.С.Скрипченко, И.М.Безброж, Т.М.Рыбакова, А.Г.Власова //Молекул.биол.вирусов Ч.1.,1985.- С.56-61.
17. Влияние иммунологического фона и вида антигена на синтез противогриппозных антител / А.А.Сохин, К.А.Денисов, В.И. Гордиенко и др.//2-й Съезд инфекционистов УССР, Донецк, 15-17 сентября,1983.- Киев,1983.-С.102-103.
18. Возможность изготовления инактивированной гриппозной вакцины комбинацией гель-хроматографии с ультрафильтрацией / Э.А.Фридман, А.И.Ермолаев, М.А.Бичурина и др.//Этиология

и специфическая профилактика гриппа.-Тр.НИИЭМ им.Пастера.  
Л.,1979.-С.103-107.

19. Галитаров С.С. Выявление критерия авидности и его значение у штаммов вируса азиатского гриппа для определения их структуры в РТГА // Материалы XVII сессии института вирусологии - АМН СССР.-М.,1964.-С.18-20.
20. Гармашова Л.М., Полежаев Ф.И., Александрова Г.И. Холодоадаптированный штамм А/Ленинград/134/47/57 (H2N2) - специальный донор аттенуации живой гриппозной вакцины для детей и полученные на его основе рекомбинанты //Вопр.вирусологии.-1984.-№1.-С.28-31.
21. Гармашова Л.М. Иммуногенная активность живых рекомбинантных гриппозных вакцин для взрослых и детей, полученных на основе холодоадаптированных доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и А/Ленинград/134/47/57 //Нов. в эпидемиол. и профилактик. вирус. инфекций.-Л.,1986.-С.101-108.
22. Гендон Ю.З. Генетика вирусов человека и животных.-М.:Наука, 1967.-335с.
23. Гендон Ю.З., Маркушин С.Г. Изучение температурочувствительных мутантов вируса чумы птиц, имеющих мутационные повреждения в генах, кодирующих белки Р1,Р3,М и нейраминидазу // Молекул.генет.,микробиол. и вирусол.-1983.-№12.-С.19-27.
24. Геномный и антигенный анализ штаммов вируса гриппа А(H1N1) 1982-1983 гг. выделения : подходы к выбору оптимального вакцинного штамма / И.И.Акопова, А.И.Климов, С.С.Унанов и др.// Вопр.вирусологии.-1986.-№3.-С.288-292.
25. Ёлкин В.С. Получение рекомбинантных штаммов вируса гриппа А и В и перспективы их практического использования.-Автореф. дис.канд.мед.наук.-М.,1988.-22с.

26. Жданов В.М. Грипп : состояние проблемы и перспективы её решения //Вестник АМН СССР.-1982.-№12.-С.8-15.
27. Жданов В.М., Ершов Ф.И. Роль интерферона в гомеостазе // Вопр.вирусологии.-1983.-№6.-С.757-761.
28. Жданов В.М. Проблемы гриппа и генная инженерия //Молекул. генет.микробиол. и вирусол.-1984.-№7.-С.3-6.
29. Жданов В.М., Александрова Г.И., Гендон Ю.З. Живая гриппозная вакцина в СССР : разработка, изучение и практическое использование //Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1986.-№7.-С.3-13.
30. Жидкосная ситовая хроматография вируса гриппа на модифицированных пористых стеклах / Б.В.Мчедlishвили, С.П.Жданов, Н.В.Катушкина и др. //Убитая гриппозная вакцина.-Л:НИИЭМ им.Пастера, 1976.-С.43-49.
31. Жилова Г.П. Итоги теоретических и прикладных исследований по профилактике гриппа живой вакциной.-Автореф.дис.д-ра мед. наук.-Л., 1979.-42с.
32. Жилова Г.П., Орлов В.А. Использование данных эпидемиологического и этиологического надзора за гриппом в решении задач обновления штаммового состава гриппозной вакцины // Эпидемиол.надзор за гриппом и прогнозир.эпидемий.-Л., 1987.-С.131-139.
33. Зыков М.П., Руденко Л.Г., Кустикова Ю.Г. Патогенетические иммунологические подходы к оценке гриппозных инактивированных вакцин //Этиология и патогенез гриппа и ОРЗ.-Л., 1981.-С.128-139.
34. Зильбер Л.А., Любарский В.А. Иммунитет.-М.-Л.Биомедгиз., 1937.-515с.
35. Зильбер Л.А. Основы иммунологии.-М.:Медгиз, 1958,-С.436-439.

36. Идентификация гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа / Е.Б.Гринбаум, А.И.Банников, Н.А.Иванова и др. // Методические рекомендации. - Каз.АН, Алма-Ата, 1985. - 20с.
37. Изменение антигенных свойств вируса гриппа при отщеплении сахаров / С.Ф.Шендерович, Л.Я.Закстельская, В.Э.Березин, И.Г.Харитоненков // Вопр. вирусологии. - 1980. - №4. - С.412-415.
38. Изучение иммуногенной активности вирусного гемагглютинина и нейраминидазы живых и инактивированных гриппозных вакцин / Ю.Г.Кустикова, В.М.Гагаринова, Н.Е.Горев, А.С.Шадрин // Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1983. - №4. - С.79-84.
39. Изучение эффективности ежегодных повторных прививок против гриппа разных серотипов и тактика массовой вакцинации / А.Н.Слепушкин, Э.И.Счастный, Н.П.Обросова-Серова и др. // Вопр. вирусологии. - 1987. - №6. - С.656-660.
40. Изучение гетерогенности моноспецифических антител к гемагглютинину вируса гриппа H3N2 методом радиоиммунологического анализа / В.В.Блоха, С.С.Ямникова, Л.Г.Карпович и др. // Вопр. вирусологии. - 1984. - №6. - С.672-675.
41. Изучение антигенных детерминант гемагглютинина в составе вирусов гриппа А подтипа H1N1 методом непрямого твердофазового радиоиммунологического анализа / Г.Н.Трушинская, О.Н.Березина, З.И.Ровнова и др. // Вопр. вирусологии. - 1982. - №3. - С.24-31.
42. Изучение показателей авидности слюны и сывороточных антител у больных сальмонеллезом / К.В.Бунин, Д.Н.Нечаев, Э.Г.Кравцов и др. // Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1985. - №5. - С.69-71.
43. Индукция антител к вирусам гриппа синтетическими пептид-полиэлектролитными комплексами со специфичностью констант-

- ной части молекулы гемагглютинаина / Р.В.Петров, Р.М.Хаитов, А.Л.Лиознер и др.//Иммунология.-1985.-№5.-С.24-27.
44. Исмагулов А.Т., Черетенко Н.Л., Андреева Н.А. Реакция торможения миграции лейкоцитов периферической крови с антигенами вируса гриппа А у вакцинированных инактивированными гриппозными вакцинами //Тр.Ин-та микробиол. и вирусол. АН Каз.ССР.-1982.-С.155-158.
45. Использование моноклональных антител для антигенного анализа гемагглютинаина вирусов гриппа А(Н3N2), изолированных в СССР за 1979-1980 гг. / С.С.Ямникова, А.Р.Дуглас, Д.Д.Снейл и др.//Вопр.вирусологии.-1980.-№5.-С.555-558.
46. Использование антиидиотипической сетевой теории Ерне для совершенствования средств и методов иммунологической защиты против вирусов /Редакционная заметка//Вопр.вирусологии.-1985.-№3.-С.383-384.
47. Использование конъюгатов вирусных белков с синтетическими полимерами в качестве вакцинирующих комплексов для защиты от гриппозной инфекции / Р.В.Петров, В.М.Жданов, В.А.Кабанов и др.//Иммунология.-1984.-№4.-С.50-52.
48. Исупов Ф.Г., Егоров П.А., Афанасьев Г.А. Использование рекомбинантного штамма вируса гриппа для приготовления адсорбированной гриппозной химической вакцины //Проблемы гриппа и ОРЗ.-Л.,1975.-С.123-125.
49. Карпова Л.С. Эпидемиологическая оценка взаимодействия неоднородных вирусных популяций и разных по восприимчивости детей при гриппе и других респираторных инфекциях.-Автореф. дис.канд.мед.наук.-Л.,1982.-20с.
50. Кокорев В.С., Филипповец Р.В., Леденцова Р.Ю. Изучение иммуногенной активности различных вирусосодержащих фракций

антигенного препарата //Арбовирусы.-1981.-С.127-132.

51. Колотвинов С.В., Субботина Л.С., Зубенко А.В. Некоторые методические подходы к селекционированию вариантов вируса клещевого энцефалита различной авидности //Арбовирусы.-Свердловск,1977.- С.104-112.
52. Коллас В.Н., Александрова Г.И., Смородинцев А.А. Изучение авидности антител к вирусу гриппа в сыворотках реконвалесцентов или лиц, иммунизированных живой противогриппозной вакциной // Acta virol .-1969.-№6.-С.488-498.
53. Комбинированное использование индукторов интерферона с рекомбинантными вирусами гриппа для защиты от заболевания / Р.Я.Подчерняева, М.В.Щипанова, Н.Н.Носик и др.//Вопр.вирусологии.-1984.-№2.-С.173-175.
54. Косяков П.Н., Бердинских М.С., Киселева А.С. Фагоцитоз в иммунитете к вирусам : к 100-летию фагоцитарной теории иммунитета И.И.Мечникова //Иммунология.-1983.-№1.-С.34-38.
55. Критерии отбора и оценки эффективности вакцинопрофилактики различных по восприимчивости к гриппу и ОРЗ групп населения//Методические рекомендации.-Алма-Ата.-1983.-37с.
56. Кульберг А.Я. Регуляция иммунного ответа.-М.:Медицина.-1986.-224с.
57. Ломакин М.С., Майский И.Н. НК-клетки как фактор иммунологического надзора //Успехи соврем.биол.-1985.-вып.2.-С.249-263.
58. Манько В.М., Хаитов Р.М. Макрофаги : гетерогенность и роль в иммунных реакциях //Успехи соврем.биол.-1985.-вып.1.-С.110-122.
59. Майорова Л.П., Смородинцев А.А. Защитная эффективность сывороток крови и клеток иммунной системы мышей, иммунизиро-

- ванных живым или инактивированным вирусом //Вопр. вирусологии.-1984.-№5.-С.540-543.
60. Международный симпозиум "Выбор путей борьбы с гриппом // Вопр. вирусологии.-1986.-№3.-С.375-381.
61. Молекулярно-генетические основы апатогенности холодоадаптированных штаммов вируса гриппа /А.И.Климов, Т.Е.Медведева, Ю.З.Гендон, Г.И.Александрова //Стратегия возбудителя в организме хозяина.-Л.,1987.-С.80-86.
62. Некоторые итоги изучения технологии изготовления инактивированной хроматографической гриппозной вакцины /С.Г.Пейсель, А.И.Нифонтова, Г.Н.Бохневич и др.//Этиология и специфическая профилактика гриппа.-Тр.НИИЭМ им.Пастера.,1982.-С.65-66.
63. Нейраминидаза вируса гриппа и её роль в противогриппозном иммунитете / Е.И.Исаева, А.Л.Платонова, З.И.Ровнова, П.Н.Косяков //Вопр. вирусологии.-1979.-№6.-С.615-619.
64. О возможности выделения вируса гриппа методом аффинной хроматографии / Л.И.Крашенюк, А.Б.Жебрун, В.Г.Какмов и др. // Этиология и специфическая профилактика гриппа.-Тр.НИИЭМ им. Пастера.,Л.,1979.-С.148-150.
65. О возможной связи вируса осповакцины с канцерогенезом / З.И.Меркалова, Н.П.Мазуренко, А.В.Воронов и др. //Вопр. вирусологии.-1987.-№3.-С.323-327.
66. Орлов В.А., Жилова Г.П. Повышение эффективности живой гриппозной вакцины //Нов. в эпидемиол. и профилактик. вирус.инфекций.-Л,1986.-С.125-131.
67. Особенности взаимодействия вируса гриппа и макрофагов в реализации иммунного ответа / Т.Я.Дубровина, Г.Ф.Леонтьева, И.Е.Мещерякова и др.//Бюл.эксперим.биологии и медицины.-

1980.-№8.-С.192-194.

68. Особенности иммунологического и защитного эффекта при одновременном и раздельном применении живых и убитых гриппозных вакцин / В.А.Орлов, Г.П.Жилова, А.А.Смородинцев и др. // Вопр.вирусологии.-1985.-№3.-С.280-285.
69. Особенности гриппозной инфекции, вызванной высоко- и низкоиммуногенными штаммами вируса гриппа / А.Ф.Фролов, Г.С.Скрипченко, А.М.Щербинская и др.//Ж.гигиены, эпидемиол.,микробиол. и иммунол.(ЧССР).-1985.-№3.-С.323-329.
70. Особенности возбудителей эпидемии гриппа А(Н3N2) в Ленинграде в 1983 г./ Н.А.Иванова, В.К.Кудрявцева, Г.Н.Неведомская и др.//Вопр.вирусологии.-1984.-№3.-С.286-290.
71. Оценка степени авидности антител у больных пощевыми токсикоинфекциями сальмонеллезной этиологии с помощью реакции торможения непрямой гемагглютинации / К.В.Бунин, В.И.Фирсанов, Л.В.Чупрасова, Э.Г.Кравцов //Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1978.-№5.-С.53-57.
72. Оценка эффективности массовой профилактики гриппа с использованием инактивированной хроматографической вакцины в Ленинграде / Ю.Г.Иванников, И.Б.Ефименко, И.Г.Маринич и др.// Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1980.-№11.-С.18-27.
73. Павлишин В.В., Савцова Э.Д., Гюллинг Э.В. Повышение эффективности противогриппозной вакцинации с помощью левамизола // Вопр.вирусологии.-1984.-№2.-С.248-250.
74. Петрова И.Г., Слепушкин В.А., Букринская А.Г. Стимулирующее действие липосом на экспериментальную гриппозную инфекцию //Вопр.вирусологии.-1988.-№6.-С.662-663.
75. Петров Р.В., Кабанов В.А., Хаитов Р.М. Искусственные антигены и вакцины //Иммунология.-1986.-№6.-С.5-24.

76. Перадзе Т.В., Фридман Э.А., Шилд Дж. Противогриппозные профилактические препараты.- М.: Медицина, 1986.-271с.
77. Перекрестная реактивность цитотоксических лимфоцитов мышей, иммунизированных вирионами патогенного и непатогенного штаммов вируса гриппа и мембранным белком / О.Г.Анджапаридзе, Ю.Д.Сорокина, А.В.Чернушкина, О.Н.Агеева //Вопр. вирусологии.-1983.-№2.-С.136-139.
78. Плохинский Н.А. Биометрия.-Новосибирск : Сибирское отделение АН СССР, 1961.-364с.
79. Повышение иммуногенности поверхностных белков вируса гриппа при их включении в липосомы / И.Г.Харитоненко, Н.Г.Ярославцева, Е.С.Исаева и др.//Вопр. вирусологии.-1986.-№2.-С.162-167.
80. Получение очищенных гликопротеидов вируса гриппа и исследование их антигенной и иммуногенной активности./ В.Э.Березин, Е.С.Исаева, А.Ф.Артамонов и др.//Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1983.-№6.-С.81-88.
81. Полянская Н.Ю., Оганова Н.Ю. Получение концентрированных препаратов вируса гриппа методом адсорбционной жидкостной хроматографии //Этиология и специфическая профилактика гриппа.-Тр.НИИЭМ им.Пастера, 1979.-С.99-103.
82. Поляк Р.Я., Дубровина Т.Я., Леонтьева Г.Ф. Молекулярные и клеточные механизмы противовирусной защиты.-Итоги науки и техники.ВИНИТИ.Иммунология, 1986.-С.147-176.
83. Показатели клеточного иммунитета у больных гриппом и вакцинированных противогриппозной вакциной типа А / Е.С.Кетиладзе, С.А.Демидова, Т.Я.Лярская и др.//Вакцинопрофилактика и иммунология гриппа. Материалы 3-го сов.-франц. симпозиума, 1979.-1980.-С.75-82.

84. Показатели коллективного иммунитета к гриппу в зависимости от группы крови и пола обследуемого населения / А.Н.Найхин, Л.Г.Каторгина, И.М.Царицына и др.//Вопр.вирусологии.-1989.-№4.-С.419-423.
85. Протективный эффект конъюгата М-белка вируса гриппа с синтетическим полиэлектролитом / Р.В.Петров, Р.М.Хаитов, В.М.Жданов и др.//Иммунология.-1985.-№6.-С.60-62.
86. Протективное действие включенных в липосомы поверхностных антигенов вируса гриппа при различных способах иммунизации/ С.А.Бурханов, Л.А.Мажуль, В.П.Торчилин и др.//Вопр.вирусологии.-1988.-№2.-С.151-153.
87. Распределение лейкоцитарных антигенов у лиц с различной восприимчивостью к гриппозной инфекции / Л.М.Цыбалова, Т.Л.Попова, Н.Г.Захарова и др.//Иммунология.-1982.-№4.-С.53-56.
88. Регламент производства человеческого лейкоцитарного интерферона №302-82.Т.У.42.14.
89. Регламент производства вакцины гриппозной хроматографической инактивированной жидкой №124-79.
90. Руденко Л.Г., Зыков М.П. Сравнительная оценка реактогенности и антигенной активности отечественных гриппозных инактивированных вакцин //Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1984.-№6.-С.79-84.
91. Семенов Б.Ф., Карасаева П.С. Изучение авидности антител при КЭ //Тезисы докл. IX Международ. конгресс по микробиол.-М., 1966.-С.601.
92. Семенов Б.Ф., Каулен Д.Р., Баландин И.Г. Клеточные и молекулярные основы противовирусного иммунитета.-М.: Медицина, 1982.- 240с.

93. Сидоренко Е.В., Зеленская Т.П., Игнатенко Т.П. Отличие по иммунологическим свойствам вирионов популяции вируса гриппа // Пробл. общ. и молекул. биол. - Киев, 1986. - №5. - С. 86-88.
94. Скрипченко Г.С., Рыбакова Т.М. Преобразование признаков популяции вируса гриппа типа А при иммуноселекции // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1987. - №3. - С. 97-104.
95. Смородинцев А.А., Коровин А.А. Грипп. - Л.: Медгиз, 1961. - 372 с.
96. Смородинцев А.А., Майорова Л.П. Теоретические и прикладные вопросы вакцинопрофилактики острых вирусных инфекций // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1984. - №8. - С. 8-13.
97. Смородинцев А.А. Грипп и его профилактика. - Л.: Медицина, 1984. - 382 с.
98. Смородинцев А.А. Реакция торможения гемагглютинации // Иммунологическая диагностика вирусных инфекций; ред. Т.В. Перадзе и П. Халонена. - М.: Медицина, 1985. - С. 49-76.
99. Смородинцев А.А., Иовлев В.И., Степанов А.Н. Интерферон. - Итоги науки и техники. ВИНТИ. Вирусология, 1987. - 156 с.
100. Соловьев В.Д. Интерферон: теория и практика // Вестник АМН СССР. - 1983. - №12. - С. 58-62.
101. Сопоставление иммуногенности и других признаков вируса гриппа А(Н3N2) и А(Н2N2) / Г.С. Скрипченко, Л.Г. Власова, В.Ю. Бощенко и др. // Вирусы и вирусные заболевания. - Киев, 1980. - вып. 8. - С. 14-17.
102. Состояние и перспективы специфической профилактики гриппа и других ОРЗ / Т.А. Бектимиров, Н.И. Лонская, Л.Н. Кастрикина и др. // Вопр. вирусологии. - 1987. - №4. - С. 389-397.
103. Специфичность кроличьих IgM и IgG антител при внутригрупповой дифференциации штаммов полиовируса типа I / Ю.В. Первиков, Л.А. Грачева, М.К. Ворошилова, М.И. Чумаков //

- Arch. ges. virusforsch .-1973.-№1-2.-С.7-13.
104. Сравнительный анализ формирования антигенреактивных клеток при иммунизации мышей нативным и инактивированным вирусом гриппа А / А.П.Волгарев, Н.Р.Розаева, М.А.Бичурина и др.//Иммунология.-1985.-№4.-С.71-72.
105. Сравнительная оценка эффективности массового применения живых и инактивированных гриппозных вакцин / А.С.Шадрин, Г.И.Карпухин, А.Я.Дударев и др.//Вакцинопрофилактика и иммунология гриппа.Материалы 3-го сов.-франц. симпозиума, 1979.-1980.-С.48-56.
106. Сравнительные результаты применения макро- и микровариантов титрования противовирусной активности человеческого лейкоцитарного интерферона с использованием гетерологичной линии перевиваемых клеток / А.В.Мисенжиков, В.Ф.Мас-сольд, С.Н.Лазаревич, Н.Ф.Галаутдинова //Тез.докл.научной конференции.-Пермь,1987.-С.36.
107. Стимуляция гриппозными вакцинами антител к различным вариантам вируса гриппа А / А.Н.Найхин, А.В.Исполатова, Н.В.Цыбульская и др.//Вопр.вирусологии.-1985.-№3,-С.290-296.
108. Стьюард М. Аффинность реакции антиген-антитело и её биологическое значение //Структура и функции антител ; ред. Л.Глинна, М.Стьюарда.-М.:Мир,1983.-С.113-147.
109. Субботина Л.С. Авидитет штаммов и антител в связи с вопросами пассивной иммунизации (на модели клещевого энцефалита) //Вирусы и вирус.инфекции человека. Тез.конференции.-М.,1981.-С.65.
110. Торосян А.Ц. Аффинность антител //Успехи соврем.биол.-1980.-№3.-С.419-431.

- III. Трубина Л.М., Яковенко Э.Ф., Блонская Л.Н. Роль антинейраминидазного иммунитета в формировании невосприимчивости к гриппу // Вирусы и вирусные заболевания (Киев). - 1981. - №9. - С.63-67.
- II2. Трушинская Г.Н., Жданов В.М. К вопросу о роли естественных цитотоксических лимфоцитов (естественных киллеров) в патогенезе гриппа // Вопр. вирусологии. - 1988. - №1. - С.105-110.
- II3. Убитая гриппозная вакцина. - Л.: НИИЭМ им. Пастера, 1976. - 178с.
- II4. Унанов С.С., Юминова Н.В., Акопова И.И. Оценка эффективности инаktivированных гриппозных вакцин по иммунологическим показателям // Вопр. вирусологии. - 1984. - №6. - С.757-760.
- II5. Участие гена NS в регуляции синтеза РНК-сегментов вируса гриппа А / Л.В.Губарева, С.Г.Маркушин, Н.Л.Варич, Н.В.Наверин // Молекул. генет., микробиол. и вирусол. - 1988. - №12. - С.38-42.
- II6. Федотова Т.Т., Кокорев В.С., Циция В.А. Функциональная активность арбовирусов, антител и ингибиторов по результатам кинетической РТГА // Диагностика и профилактика вирус. инфекций. - Свердловск, 1974. - С.203-206.
- II7. Фрейман В.Б. Авидитет агглютинирующих сывороток // Труды Пермского НИИВС., Пермь., 1959. - I(5). - С.55-62.
- II8. Фрейман В.Б. Исследование авидитета иммунных сывороток. - Автореф. дис. д-ра. мед. наук. - М., 1961. - IIс.
- II9. Фридман Э.А. Неоднородность структуры популяции вируса гриппа А2 // Acta virol. - 1960. - №4. - С.274-282.
- I20. Фридман Э.А., Болдасов В.К. Данные по изучению специфической авидности вируса гриппа типа А2 // Acta virol. - 1962. - №9. - С.132-139.
- I21. Фризе В.В. Avidität гемолитинов // Ж. эксперим. биологии и

- медицины.-1925.-№2.-С.62-87.
122. Фризе В.В. Avidität микробов//Ж.эксперим.биологии и медицины.-1927.-№2.-С.360-368.
123. Харитоненков И.Г., Веселов С.Ю. Изоляция индивидуальных молекул из вирионов гриппа //Вопр.вирусологии.-1983.-№5.-С.530-539.
124. Характеристика вакцинных препаратов, полученных путем сочетания методов адсорбции, хроматографии и ультрафильтрации/ Н.В.Железнова, Э.А.Фридман, М.А.Бичурина и др. //Этиология и специфическая профилактика гриппа.-Л.:Тр.НИИЭМ им.Пастера, 1979.-С.88-92.
125. Характеристика репродукционной и иммуногенной активности вирусов гриппа А, выделенных в период эпидемии 1977-1980 гг. / Г.П.Жилова, В.А.Орлов, О.М.Ермолаева, А.А.Сморозинцев //Вопр.вирусологии.-1982.-№6.-С.686-690.
126. Характеристика возбудителей различных эпидемий гриппа А по ts -признаку / Н.А.Иванова, Е.Б.Гринбаум, Л.Ю.Тарос и др.//Этиология и диагностика гриппа и других ОРЗ.-Л., 1982.-С.138-142.
127. Черкасов В.Л., Еровиченко А.А., Рубцов И.В. Определение avidности сывороточных антител в сопоставлении с инфекционной О-антигемией у больных паратифом В //Ж.микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.-1987.-№5.-С.61-64.
128. Чернохвостова Е.Б. Биологические особенности антител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов //Успехи современ.биол.-1972.-№3.-С.444-457.
129. Швачкина В.И., Соколов М.И., Парасюк Н.А. Изучение генетических признаков и их взаимосвязи у вирусов гриппа. Сообщение I. Взаимосвязь вирулентности и репродукции при

- повышенной и пониженной температуре //Вопр. вирусологии.-  
1968.-№6.-С.716-720.
130. Шварцман Я.С., Исполатова А.В., Цыбульская Н.В. Проблемы специфического клеточного противогриппозного иммунитета // Успехи соврем.биол.-1979.-том 88.-вып.1(4).-С.77-97.
131. Шварцман Я.С., Цыбульская Н.В., Исполатова А.В. Особенности противогриппозного иммунитета и перспективы совершенствования специфической профилактики гриппа //Успехи соврем. биол.1982.-том 94.-вып.3(6).-С.446-460.
132. Шварцман Я.С., Найхин А.Н., Корчанова Н.Л. Проблемы иммунологии гриппа .-М.,1984.-56с.
133. Щуратов И.Х., Шахворостова Л.И., Саятов М.Х. Интерферонгенная активность вирусов гриппа А и В в органных культурах белых мышей //Ред.ж.Вопр.вирусологии.-М.,1987,-IIс. (Рукопись деп. в ВИНТИ 15.10.87. №7274-В87).
134. Щипанова М.В., Подчерняева Р.Я., Блинова В.К. Иммуногенные свойства эпидемических и рекомбинантных штаммов вирусов гриппа H1N1 и H3N2 //Вопр.вирусологии.-1984.-№3.-С.273-276.
135. Эммрих Й., Фельбер Ф. Реакция миграции лейкоцитов под слоем агарозы //Иммунологические методы ; ред. Г.Фримеля.- М.:Медицина,1987.-С.311-317.
136. Эффективность живых гриппозных вакцин, полученных путем рекомбинации и пассажей штаммов / Г.П.Жилова, В.А.Орлов, Э.В.Маликова, В.М.Кожухов //Вопр.вирусологии.-1987.-№6.- С.675-681.

137. Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides / Brown S.E., Howard C.R., Zuckerman A.S., Steward M.W. // *Lancet*. - 1984. - Vol. 28. - P. 184-187.

138. Ahlstedt S., Holmgren I., Hanson L. Protective capacity antibodies against E. coli O-antigen with special reference to the avidity // *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.* - 1974. - N 3. - P. 470-480.

139. Ali S.A., Rees R.S., Oxford J. Modulation of human natural killer cytotoxicity by influenza virus and its subunit protein // *J. Immunol.* - 1984. - Vol. 52. - P. 687-695.

140. Andersson B. Studies on the regulation of avidity at the level of the single antibody formation cell // *J. Exp. Med.* - 1970. - Vol. 132. - P. 77-88.

141. Andersson B., Wigrell H. Studies of antibody affinity at the cellular level correlation between binding properties of secreted antibody and cellular receptor for antigen on immunological memory cells. / *J. Exp. Med.* - 1972. - Vol. 135. - P. 312-322.

142. Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin III. Competitive binding of antibodies directed against "common" and "strain-specific" antigenic determinants of A /Memphis/ 72 hemagglutinin /Russell R.I., Burns W.H., White D.O. et al. // *J. Immunol.* - 1979. - N 2. - P. 825-832.

143. Arcus Y.M., Knight C.A. Antigenic peptides of influenza virus hemagglutinin: reactivity with virus-neutralising antibodies // *J. Intervirology.* - 1981. - N 3. - P. 145-153.

144. Arnheiter H., Haller O. Antiviral state against influenza virus neutralized by microinjection of antibodies to interferon-induced Mx proteins // *"EMBO Journal"*. - 1988. - N 5. -

P. 1315-1320.

145. Askonas B.A. Our immune defence against influenza // Biochem. Soc. Trans. - 1980. - N 3. - P. 257-260.

146. Eastin J.M., Townsend Alain R.?, McMichael A.S. Specific recognition of influenza virus polymerase protein (PB1) by a murine cytotoxic T-cell clone // J. Virology. - 1987. - N 1. - P. 278-280.

147. Both G.W., Jennings P.A. Gene cloning to study viral antigens: prospects for novel influenza and rotavirus vaccines // Biotechnol. and Comp. Med. Basel e.a. - 1987. - P. 179-202.

148. Briggs W. Influence of prior cellular immunity on the in vitro lymphocyte response to virus antigens after influenza vaccination // Infec. and Immunol. - 1981. - N 2. - P. 503-507.

149. Brunner K.T., Ward H. Differences in stability of antigen-antibody complex formed with polio virus and acute and convalescent phase human sera // J. Immunol. - 1959. - N 4. - P. 405-410.

150. Comparison of inactivated and live influenza. A virus vaccines /Clements M.L., Betts R.F., Tierney E.L., Murchy B.R. // Options Contr. Influenza Proc. Viratek-Ucla Symp., Reystone, Colo, Apr. 20-25, 1985. New York. - 1986. - P. 255-269.

151. Chanock R.M., Murphy B.R. Genetic approaches to control of influenza // Perspect. Biol. Med. Supplem. - 1979. - Vol. 22. - P. 37-48.

152. Claflin L., Merchant B., Inman J. Antibody-binding characteristics at the cellular level. I. Comparative maturation of hapten-specific IgM and IgG plaque-forming cell populations // J. Immunol. - 1973. - Vol. 110. - P. 241-251.

153. Claflin L., Merchant B. Antibody-binding characteristics at the cellular level. II. Presence of cells secreting high affinity IgG antibody at the onset of the immune response // J. Immunol. - 1973. - Vol. 110. - P. 252-261.

154. Cox N.J. Progress and limitations in understanding the genetic basis for attenuation of line attenuated influenza vaccines // J. Options Contr. Influenza, Proc. Viratek-Ucla Synp., Reystone, Colo. Apr. 20-25, 1985. New York. - 1986. - P. 207-221.

155. Cox N.J., Maassab H.F., Rendal A.P. Comparative studies of wild-type and cold-mutant (temperature sensitive) influenza viruses: nonrandom reassortment of genes during preparation of line virus vaccine candidates by recombination at 25° between recent H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> and H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> epidemic strains and cold-adapted A/Ann Arbor/6/60 // J. Virol. - 1979. - N 1. - P. 190-197.

156. Davie S.M., Paul W.E. Receptors on immunocompetent cells. IV. Direct measurement of avidity of cell receptors and cooperative binding of multivalent ligands // J. Exp. Med. - 1972. - Vol. 135. - N 1. - P. 643-659.

157. Davie S.M., Paul W.E. Receptors on immunocompetent cells. V. Cellular correlates of the "maturation" of the immune response // J. Exp. Med. - 1972. - Vol. 135. - N 1. - P. 660-674.

158. Determination of the affinity of antibodies hepatitis B surface antigen in human sera / Brown S.E., Howard C.R., Zuckerman A.J., Steward M.W. // J. Immunol. Meth. - 1984. - Vol. 72. - P. 41-48.

159. Distinct epitopes recognized by I-A-restricted T-cell clones within antigenic site E on influenza virus hemagglutinin / Brown L.E., Ferench R.A., Gawler J.M., et al. // J. Virol. -

1988. - N 1. - P. 305-312.

160. Eisenlohr L.C., Gerhard Walter, Hackett C. Role of receptor-binding activity of the viral hemagglutinin molecule in the presentation of influenza virus antigens to helper T-cells // J. Virol. - 1987. - N 5. - P. 1375-1383.

161. Eisenlohr L.C., Gerhard W., Hackett C. Presentation of influenza virus antigens to Helper T-cells: viral hemagglutinin activity in antigen focusing and identification of transitory stages in antigen presentation // J. "Vaccines 87: Mod. Approaches New Vaccines: Prev. AIDS and Virol., Bact. and Parasit Diseases: Proc. Conf., Cold Spring Harbor. - 1987." Cold Spring Harbor. - 1987. - P. 44-49.

162. Enumeration of antigenic sites of influenza virus hemagglutinin / Jackson D.C., Murray J.M., White D.O., Gerhard W.U. // Infec. and Immunol. - 1982. - N 3. - P. 912-918.

163. Faltynek Connie R., Kung Hsiang-fu. The biochemical mechanisms of action of the interferons // Biofactors - 1988. - N 3. - P. 227-235.

164. Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor 16/60(H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines / Snyder M.H., Betts R.E., Deborde D. et al. // J. Virol. 1988. - N 2. - P. 488-495.

165. Furuich K., Koyama Y. The effect of antigen dose on the amounts and affinities of guinea pig IgG, and IgG<sub>2</sub> anti-hapten antibodies // Immunochemistry. - 1976. - Vol. 13. - N 10. - P. 807-812.

166. Gastl G., Huber C. The biology of interferon actions // Blut. - 1988. - N 5. - P. 193-199.

167. Gregoriades A., Frangione B. Insertion of influenza M

protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion // J. Virol. - 1984. - Vol. 40. - N 1. - P. 323-328,

168. Haller O., Staehell P. MX gene control of influenza virus susceptibility // Mol. Basis Viral and Microbiol. Pathogenesis: 38 Collog. Ges. Biol. Chem., Mosbach/Baden, 9-11 Apr., 1988. Berlin e.a. - 1988. - P. 95-101.

169. Immunologische Reaktionen nach Influenzavirus-Schutzimpfung / Suss J., Schmidt S., Groh A. et al. // Z. gesamte Hyg. und Grenzgeb. - 1985. - N 3. - P. 149-153.

170. Jackson D.C., Nestorowicz A. Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. XI. Conformational changes detected by monoclonal antibodies // Virology. - 1985. - N 1. - P. 79-83.

171. Kaltreider H.B. Alveolar macrophages. Enhancers or suppressors of pulmonary immune reactivity ? // Chest. - 1982. - Vol. 82. - P. 261-262.

172. Katz F.E., Steward M.W. Studies on the generic control of antibody affinity: the independent control of antibody level and affinity in Biozzi mice // J. Immunol. - 1976. - Vol. 117. - N 2. - P. 477-479.

173. Keitel W.A., Cate T.R., Couch R.B. Efficacy of sequential annual vaccination with inactivated influenza virus vaccine // Amer. J. Epidemiol. - 1988. - N 2. - P. 353-364.

174. Lamb R.A., Zebades S.L., Richardson C.P. Influenza virus M<sub>2</sub> protein as an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface // J. Cell Biochem. - 1985. - N 9. - P. 293.

175. Lawer W.G. Purification of influenza viruses // Fundamental techniques in virology Academic Press, New York and

London. - 1979. - P. 82-86.

176. Lubeck M., Gerhard W. Conformational changes at topologically distinct antigenic sites on the influenza A/PR/8134 virus HA molecule are induced by the binding of monoclonal antibodies // *J. Virology*. - 1982. - N 1. - P. 1-7.

177. Mackett M. Maccinia virus recombinants: potential vaccines // *Acta trop.* - 1987. - N 12. - P. 94-97.

178. Melnick J.L. Virus vaccines: 1986 update // *Progr. Med. Virol.* - 1986. - Vol. 33. - P. 134-170.

179. Mills K.H., Skehel J.J., Thomas D.B. Extensive diversity in the recognition of influenza virus hemagglutinin by murine T-helper clones // *J. Exp. Med.* - 1986. - N 6. - P. 1477-1490.

180. Mills K.H., Skehel J.J., Thomas D.B. Conformational-dependent recognition of influenza virus hemagglutinin by murine T-helper clones // *Eur. J. Immunol.* - 1986. - N 3. - P. 276-280.

181. Monoclonal antibodies detect M-protein epitopes on the surface of influenza virions / Joassin L., Vencenzotto C., Cloes J.-M. et al. // *Arch. Virol.* - 1987. - N 3-4. - P. 183-195.

182. Murphy B.K., Chanock R.M. Genetic variation among influenza viruses // *New York*. - 1981. - P. 601-616.

183. Padgett B.L., Walker L. Enzymatic variants of influenza virus I isolation and characterization of slowly reacting enzymatic variants of influenza V virus // *J. Exp. Med.* - 1957. - Vol. 106. - P. 53-68.

184. Palésc P., Schulman J.L. Differences in RNA patterns of influenza A viruses // *J. Virol.* - 1976. - Vol. 17. - N 3. - P. 876-884.

P. 876-884.

185. Pemberton R.M., Jennings R., Smith T.L. Morphology and antigenicity studies on reassortant influenza (H3N2) viruses for use in inactivated vaccines // J. Hyg. - 1985. - N 2. - P. 229-239.

186. Protein measurement with the tolin phenol reagent / Lowry O.V., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 143. - P. 265-275.

187. Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes cruss / Djeu J.Y., Stocks N., Zoon K. et al. // J. Exp. Med. - 1982. - Vol. 156. - P. 1222-1234.

188. Possee R.D., Schild G.C., Dimmock N.J. Studies on the mechanism of neutralisation of influenza virus by antibody: Evidence that neutralising antibody (anti-haemagglutinin) inactivates influenza virus in vivo by inhibiting virion transcriptase activity // J. Gen. Virol. - 1982. - Vol. 58. - N 2. - P. 373-386.

189. Potter C.W., Oxford J.X. Determinants of immunity to influenza infection in man // Brit. med. Bull. - 1979. - Vol. 35. - P. 69-75.

190. Purification of influenza virus glycoproteins for the preparation and standardisation of immunological potency testing reagents / Pbelan M.A., Magner R.E., Bucber D.J., Ennis F.A. // J. Biol. Stand. - 1980. - N 3. - P. 233-242.

191. Raefitig H., Schimmrich B. Tierexperimente zur kombinierten lokalen Immunisierung gegen eine Influenzavirus-Erkrankung // Z. Erkr. Atmungsorgane. - 1979. - N 2. - S. 250-253.

192. Reimer C.B., Baker K.S., Nemlin T.E. Purification of

large quantities of influenza virus by density gradient centrifuge // *J. Virol.* - 1967. - Vol. 1. - N 6. - P. 207-211.

193. Roberts N.J., Horan P.K. Expression of viral antigens after infection of human lymphocytes, monocytes and macrophages with influenza virus // *J. Infec. Diseases.* - 1985. - N 12. - P. 308-313.

194. Sabin A.B. Cellular biology nucleic acid and viruses. Properties of attenuated polio-viruses and their behavior in human beings // *J. Acad. Sci. Spec.* - 1957. - N 5. - P. 113.

195. Scherle P.A., Gerhard W. Differential ability of B cells specific for external vs. internal influenza virus proteins to respond to help from influenza virus-specific T-cell clones in vivo // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1988. - Vol. 85. - N 12. - P. 4446-4450.

196. Schild G.C., Oxford J.S., Wood J.M. Influenza vaccine license requirements and laboratory control // *Bull. World Health Org.* - 1976. - Vol. 53. - P. 78-80.

197. Schulze G.U., Klenk H.D., Beyreuther K. Immunogenicity of loop-structured short synthetic peptides mimicking the antigenic site A of influenza virus hemagglutinin // *Eur. J. Biochem.* - 1986. - N 2. - P. 283-289.

198. Serological evaluation of an influenza A virus cold-adapted reassortant live vaccine, CR-37(H1N1), in Japanese adult volunteers // Yamane N., Nakamura Y., Yuki M. et al. // *J. Hyg.* - 1984. - N 2. - P. 231-242.

199. Sequential infection or immunization of ferrets with a series of influenza A(H3N2) strains / Potter C.W., Jennings R., Ali M.J. et al. // *J. Epidemiol. and Infec.* - 1987. - N 2. - P. 501-515.

200. Siskind G.W., Benacerraf B. Cell selection by antigen in the immune response // *Adv. Immunol.* - 1969. - N 10. - P. 1-50.

201. Smith F.I., Tesch H., Rajewsky R. Heterogeneous and monoclonal helper T cells induce similar anti 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl (NP) antibody populations in the primary adoptive response // *J. Immunol.* - 1984. - Vol. 14. - P. 188-194.

202. Steward M.W., Petty R.E. The antigen-binding characteristics of antibody pools of different relative affinity // *Immunology.* - 1972. - Vol. 23. - P. 881-887.

203. Steward M.W., Voller A. The effect of malaria on the relative affinity of mouse antiprotein antibody // *Brit. J. Exp. Pathol.* - 1973. - Vol. 54. - P. 198-202.

204. Steward M.W., Petty R.B., Soothill K.F. Low affinity antibody its possible immunopathologic significance // *Allergy and Appl. Immunol.* - 1973. - N 2. - P. 176-179.

205. Steward W.E. The interferon system // *Verlag* - 1979. - P. 376.

206. Stuart-Harris Ch. The present status of live influenza virus vaccine // *J. Infect.* - 1980. - Vol. 142. - N 5. - P. 784-793.

207. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid / Weis W., Brown J.H., Cusack S. et al. // *Nature.* - 1988. - N 6172. - P. 426-431.

208. Tannock G.A., Sudilh P.A., Barry R.D. Relative immunogenicity of the cold-adapted influenza virus A/Ann Arbor /6/60/A/AA/6/60-Ca/, recombinants of A/AA/6/60-Ca/ and parental strains with similar surface antigens // *Infec. and Immun.* - 1984. - N 2. - P. 457-462.

209. Taylor H.P., Dimmock N.J. Mechanisms of neutralization of influenza virus by monomeric and polymeric antibodies // J. Virus Res. - 1985. - N 1. - P. 115.

210. Tot J.L. The interferons // Clin. exp. Immunol. - 1983. - Vol. 54. - P. 1-13.

211. Verfahren zur Herstellung von influenza-Inaktivimpfstoffen mit geringer Stammabhängigkeit / Glathe H., Kunze M., Klenz G., Malur J. // Institut für Angewandte Virologie. Пат. 228757 A<sub>1</sub> ГДР. Заявл. 6.II.84. № 2691322. Опубл. 23.IO.85. МКМ A6I K39/I45.

212. Wright P.F., Karzon D.T. Live attenuated influenza vaccines // Progr. Med. Virol. - 1987. - Vol. 34. - P. 70-88.

213. Yamada K., Benedict A.A. Class amounts and affinities of anti-dinitrophenyl antibodies in chickens. II. Production of a restricted population of high affinity antibodies by injection of antigen emulsified in adjuvant // J. Immunol. - 1975. - Vol. 115. - N 3. - P. 759-764.

214. Zykov M.P., Subbotina T.I. Modulation of humoral immune response to influenza vaccines by BCG // Acta Virol. - 1985. - N 5. - P. 403-409.

П Р И Л О Ж Е Н И Е



АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

# ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ

ИМЕНИ Д. И. ИВАНОВСКОГО

198, г. Москва, ул. Гамален, 16

Телефон: 190-26-71

Телеграфный: Москва, Д-98, Институт вирусологии

№ \_\_\_\_\_

№ \_\_\_\_\_

## УДОСТОВЕРЕНИЕ

выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 5.1.90 г. депонирован оригинальный авторский рекомбинантный клон  $\alpha$ SV $\alpha$ П - 169 вируса гриппа А ( антигенная формула H3N1). Клон получен путем рекомбинации *in ovo* штамма А/РДВ/34 (H1N1) и авидного клона  $\alpha$ SV 27.123, выделенного из штамма А/Ленинград/229/80 (H3N2).

Штамму присвоен номер депонента ГКВ № 2224.

Авторами штамма являются доцент СГМИ Колотвинов С.В., ассистент СГМИ Манова И.П., ассистент СГМИ АХМЕТОВА Л.И., профессор Института вирусологии Подчерняева Р.Я., ст.н.с. ВНИИ гриппа Галитаров С.С., ст.н.с. ВНИИ гриппа Сухинин В.П..

Директор Института вирусологии  
И.И. Ивановского АМН СССР,  
академик АМН СССР

Львов Д.К.

Зав. Государственной коллекцией  
вирусов, профессор

Фадеева Л.Л.



АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

# ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ

ИМЕНИ Д. И. ИВАНОВСКОГО

108, г. Москва, ул. Гамалеи, 16

Телефон: 190-25-74

Телеграфный: Москва, Д-98, Институт вирусологии

№ \_\_\_\_\_

№ \_\_\_\_\_

## УДОСТОВЕРЕНИЕ

выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 5.1.90 г. депонирован оригинальный авторский рекомбинантный клон  $\alpha\text{SVR I} - 54$  вируса гриппа А (антигенная формула  $\text{H3N2}$ ) и авидного клона  $\alpha\text{SV} 27.123$ , выделенного из штамма А/Ленинград/229/80 ( $\text{H3N2}$ ).

Штамму присвоен номер депонента ГКВ № 2225.

Авторами штамма являются ассистент СГМИ Манова И.П., доцент СГМИ Колотвинов С.В., ассистент СГМИ Ахметова Л.И., ст.н.с. ВНИИ гриппа Галитаров С.С., ст.н.с. ВНИИ гриппа Сухинин В.П..

Директор Института вирусологии

им. Д. И. Ивановского АМН СССР,

академик АМН СССР

Зав. Государственной коллекцией

вирусов, профессор



Львов Д.К.

Фадеева Л.Л.



АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР

# ИНСТИТУТ ВИРУСОЛОГИИ

ИМЕНИ Д. И. ИВАНОВСКОГО

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 16

Телефон: 190-25-74

Телеграфный: Москва, Д-98, Институт вирусологии

№ \_\_\_\_\_

на № \_\_\_\_\_

## УДОСТОВЕРЕНИЕ

выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 5.1.90 г. депонирован оригинальный авторский рекомбинантный клон  $\alpha$ SVR $\alpha$ П-33 вируса гриппа А (антигенная формула H3N1). Клон получен путем рекомбинации *in ovo* штамма А/PR/8/34 (H1N1) и авидного клона  $\alpha$ SV 27.123, выделенного из штамма А/Ленинград/229/80 (H3N2).

Штамму присвоен номер депонента ГКВ № 2227.

Авторами штамма являются ассистент СГМИ Манова И.П., доцент СГМИ Колотвинов С.В., ассистент СГМИ Ахметова Л.И., ст.н.с. ВНИИ гриппа Галитаров С.С., ст.н.с. ВНИИ гриппа Сухинин В.П., ст.н.с. ВНИИ гриппа Жилинская И.Н..

Директор Института вирусологии  
Д. И. Ивановский АМН СССР,  
академик АМН СССР



Зав. Государственной коллекцией  
вирусов, профессор

Львов Д.К.

Фадеева Л.Л.