

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВ
Кирилл Александрович

**УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ АНТИГЕННЫХ ДЕТЕРМИНАНТ
ВИРУСОВ ГРИППА А ПУТЕМ ПОДАВЛЕНИЯ
ИММУНОСУПРЕССОРНОЙ ФУНКЦИИ БЕЛКА NS1**

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Егоров Андрей Юрьевич,**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17),

Тел.: (812) 499 15 04;

E-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте www.influenza.spb.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 001.043.01
Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения вирус гриппа ежегодно вызывает от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных инфекций, из которых до 650 тысяч заканчиваются летальным исходом (WHO, 2019). Наиболее результативным способом защиты от гриппа и его осложнений является вакцинация, однако ни один из существующих подходов к вакцинопрофилактике данной инфекции не позволяет предотвратить сезонные вспышки заболевания, вызванные антигенным дрейфом, и периодические пандемии, обусловленные антигенным шифтом возбудителя.

Эффективность профилактической вакцинации у лиц в возрасте 18-65 лет составляет 59-75% (Osterholm et al., 2012). В то же время у лиц младшего и пожилого возраста, а также у людей с хроническими заболеваниями, данный показатель обычно находится ниже 60% (Jefferson et al., 2012). Лицензированные гриппозные вакцины требуют ежегодного пересмотра штаммового состава из-за чрезвычайно высокой эволюционной изменчивости и широкой генетической гетерогенности циркулирующих вирусов (Соминина и др., 2018). Нередко выпуск сезонных вакцин сопровождается ошибками прогнозирования циркулирующих штаммов вируса гриппа, что приводит к резкому снижению эффективности вакцинации (Zimmerman et al., 2016; CDC, Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness, 2005-2017). Эти факты указывают на необходимость создания вакцин, способных индуцировать кросс-протективный иммунный ответ против вирусов гриппа различных серотипов и дрейфовых вариантов вируса внутри одного подтипа (Цыбалова Л.М. и Киселев О.И., 2012; Sautto et al., 2018).

Перспективным подходом к созданию гриппозной вакцины широкого спектра действия является усиление иммуногенности консервативных антигенных детерминант вируса гриппа. Наибольшее число консервативных эпитопов входит в состав внутренних белков вируса, таких как NP, PA, PB1, PB2, NS1 и NS2. Данные антигены при естественной гриппозной инфекции вызывают, преимущественно, Т-клеточный иммунный ответ (Reber et al., 2018). Иммуногенность вирусных белков не является постоянной характеристикой, и зависит от доступности соответствующих эпитопов для презентации в составе молекул главного комплекса гистосовместимости МНС-I/II, дозы антигена и цитокинового микроокружения (Chen et al., 2004). При этом, сами вирусы гриппа оказывают существенное воздействие на иммунный ответ, подавляя продукцию цитокинов воспаления на ранних этапах инфекции за счет активности иммуносупрессорного белка NS1 (Wressnigg et al., 2009; Gack et al., 2009; Rajsbaum et al., 2012). Можно предположить, что подавление иммуносупрессорной функции данного белка приведет к усилению иммуногенности консервативных антигенных детерминант вируса гриппа и позволит расширить спектр штаммов, распознаваемых системой адаптивного иммунитета.

Степень разработанности темы исследования. Впервые идея использования вируса гриппа с модифицированным белком NS1 в качестве живой аттенуированной вакцины была сформулирована в работе Egorov et al., 1998. К

настоящему времени опубликовано большое число работ на различных модельных организмах, демонстрирующих формирование кросс-реактивных антител и гетеротипической защиты при иммунизации штаммами вируса гриппа А различных антигенных подтипов (Ferko et al., 2004; Quinlivan et al., 2005; Vincent et al., 2007; Romanova et al., 2009; Steel et al. 2009; Zhou et al., 2010; Mamerow et al., 2019; Wang et al., 2019) и гриппа В (Hai et al., 2008; Wressnigg et al., 2009) с делетированным или укороченным белком NS1. В ходе клинических исследований 1-2 фазы показана безопасность и иммуногенность живых интраназальных сезонных и пандемических вакцин на основе вируса гриппа с удаленной рамкой считывания белка NS1 (Wacheck et al., 2010; Mössler et al., 2013; Nicolodi et al., 2019).

Тем не менее, ряд аспектов иммунобиологии вирусов гриппа с модифицированным белком NS1 остается малоизученным. В частности, не исследованы механизмы врожденного иммунитета, обуславливающие повышенную иммуногенность и кросс-протективные свойства данных вирусов. Кроме того, не изучалась возможность усиления иммуногенности консервативных Т-клеточных эпитопов белков вируса гриппа за счет удаления функциональных доменов белка NS1.

Цель работы. Изучение иммунологических механизмов формирования кросс-протективного иммунного ответа на вирус гриппа с модифицированным белком NS1.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние модификации (делеции эффекторного домена) белка NS1 вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) на формирование гетерологичной защиты против вирусов гриппа А (H3N2) и В на модели гриппозной инфекции у мышей.
2. Провести сравнительный анализ продукции цитокинов воспаления, динамики популяционного состава и фенотипических маркеров активации клеток врожденного иммунитета (моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и нейтрофилов) при иммунизации вирусами гриппа А с укороченным и полноразмерным белком NS1.
3. Изучить влияние модификации белка NS1 на иммуногенность Т-клеточных эпитопов внутренних и поверхностных белков вируса гриппа А и на формирование антительного ответа на вирусы гриппа с полноразмерным и укороченным белком NS1.
4. Изучить клеточные иммунологические механизмы формирования перекрестной защиты при иммунизации вирусом гриппа с укороченным белком NS1.

Научная новизна работы. В работе впервые показана возможность усиления иммуногенности Т-клеточных эпитопов вируса гриппа путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. Впервые установлено, что тяжелая гриппозная инфекция, вызванная патогенным вирусом гриппа А (H1N1), приводит к формированию защиты как от вируса гриппа А подтипа H3N2, так и от вируса гриппа В у выживших мышей. Сопоставимый уровень протекции обеспечивает аттенуированный вирус гриппа А с укороченным белком NS1 при интраназальном

введении. Впервые установлено, что иммунизация вирусом гриппа А (H1N1) с укороченным белком NS1 приводит к предотвращению летальности и ослаблению воспалительной реакции при последующем заражении гетерологичным штаммом вируса гриппа А подтипа H3N2.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа включает как фундаментальные, так и практические аспекты. Полученные результаты расширяют существующие представления о механизмах формирования кросс-протективного иммунного ответа при экспериментальной гриппозной инфекции и интраназальной иммунизации вирусом гриппа с укороченным белком NS1.

Разработан подход, позволяющий проводить сравнительные иммунологические исследования вирусов гриппа с различной репликативной активностью в респираторном тракте мышей. Показано, что интраперитонеальная иммунизация является адекватной моделью изучения иммуногенности аттенуированных и патогенных вирусов в условиях равной антигенной нагрузки.

Методология и методы исследования. В работе применяли стандартные вирусологические, серологические, иммунологические, цитологические, биоинформатические и статистические методы. Исследования проводили на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Заражение мышей вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в дозе 1 LD₅₀/мышь приводит к формированию у выживших животных гетерологичной защиты от вирусов гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04. Аналогичный уровень гетерологичной защиты достигается при интраназальной иммунизации аттенуированным штаммом A/PR/8/34-NS124 с укороченным до 124 N-терминальных аминокислотных остатков белком NS1.
2. Интраперитонеальная иммунизация мышей вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, индуцирующая системный антительный и Т-клеточный иммунный ответ на вирус гриппа, не обеспечивает развития гетерологичной защиты от вирусов гриппа A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04.
3. Укорочение белка NS1 до 124 а.к. приводит к повышению иммуногенности вируса гриппа, проявляющегося усилением реакций врожденного иммунитета, и индукцией более выраженного антительного и CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа к эпитопам внутренних (NP, NS1) и поверхностных (HA) белков вируса с формированием полифункциональных эффекторных Т-лимфоцитов.
4. Механизм гетерологичной защиты при интраназальной иммунизации аттенуированным вирусом A/PR/8/34-NS124, включает не только уменьшение вирусной нагрузки, но и снижение уровня продукции провоспалительных цитокинов, а также уменьшение уровня макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации легких.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь при работе с клеточными линиями и при культивировании используемых в работе штаммов вируса гриппа была

оказана сотрудниками лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России Сергеевой М.С., Шурыгиной А-П. С., Романовской-Романько Е.А. и Пулькиной А.А.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены на международных конференциях: Trends in Influenza Research (18-20 сентября 2017 г., Санкт-Петербург, Россия); 12th Vaccine Congress (16-19 сентября 2018 г., Будапешт, Венгрия); OPTIONS X for the Control of Influenza (28 августа - 1 сентября 2019 г., Сингапур).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ: 2 научные статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 3 тезиса докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста, включая 1 таблицу и 30 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, шести глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 537 источников на русском и английском языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Клеточные культуры. В работе использовали культуру клеток почки собаки (MDCK, Madin–Darby canine kidney). Клетки поддерживались культивированием в среде DMEM (Invitrogen, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Также была использована культура клеток Vero, адаптированная к росту в бессывороточной среде OptiPro (Invitrogen, США) с добавлением 4 mM L-глутамина (Invitrogen, США).

Вирусы. Для иммунизации животных использовали штаммы на основе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (A/PR8), кодирующих (1) полноразмерный белок NS1 (A/PR/8/34), (2) укороченный до 124 а.к. белок NS1 (A/PR/8/34-NS124). Группы экспериментальных животных, получавших указанные штаммы, в настоящей работе сокращенно именуется NSfull и NS124. Штаммы были получены методом «обратной генетики» (Hoffmann and Webster, 2000; Pleschka et al., 1996), накоплены в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и очищены путем фракционирования в градиенте плотности сахарозы. Культивирование и определение инфекционной активности вирусов проводили на культуре клеток Vero в среде OptiPro, содержащей 4 mM L- глутамина и 5 мкг/мл трипсина (Sigma-Aldrich, Германия) при 37°C, 5% CO₂. Для заражения животных использовали вирусы A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04, полученные из коллекции штаммов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Лабораторные животные. Исследования выполнены согласно приказу № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г. Эксперименты на животных были одобрены

локальным этическим комитетом при ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева». В работе использованы самки мышей линии Balb/c в возрасте 6-8 недель, а также самки мышей линии C57Black/6 в возрасте 6-8 недель (Питомник лабораторных животных «Столбовая», Московская область).

Оценка репродукции вирусов в дыхательных путях животных. Для определения репродуктивной активности исследуемых штаммов (A/PR/8/34, A/PR/8/34-NS124, A/Aichi/2/68) в респираторном тракте мышам под легким эфирным наркозом вводили вирусную суспензию с известным титром в объеме 30 мкл. Для определения вирусной нагрузки легкие гомогенизировали с помощью прибора Tissue Lyser II (Qiagen, Германия). Определение репродуктивной активности штаммов в легких проводили титрованием гомогенатов тканей в культуре клеток MDCK. Учет результатов проводили визуально по наличию цитопатического эффекта и контролировали с помощью метода гемагглютинации с использованием 0.5% суспензии куриных эритроцитов. Расчет ТИД₅₀ проводили по методу Рида и Менча (Reed, Muench, 1938) и выражали в logТИД₅₀/мл.

Иммунизация животных. Для оценки иммуногенности штаммов A/PR/8/34, A/PR/8/34-NS124 мышей линий C57/Black-6 или Balb/c (самки) иммунизировали интраперитонеально в объеме 500 мкл или интраназально в объеме 50 мкл суспензией вируса с известным титром в натрий-фосфатном буфере (PBS, Биолот, Россия). Животные контрольной группы получали PBS в эквивалентном объеме.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Анализ проводили с использованием 96-луночных планшетов (NuncMaxisorp, Дания), в лунки вносили АГ (суспензия вирусов) в концентрации 4 мкг/мл, разведенные в PBS (100 мкл/лунка) и инкубировали в течение 12ч при 4°C. Затем, планшеты отмывали 0.1% раствором Tween20 (Serva, Германия) в PBS и инкубировали в течение 2 ч в PBS, содержащем 5% FBS (Gibco, США) и 0.1% Tween20. На таком же буфере были приготовлены серийные двукратные разведения анализируемых сывороток. Планшеты с сыворотками инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После интенсивной промывки PBS с 0.1% Tween20, в планшеты вносили вторичные антитела. Развитие цветной реакции после добавления 100 мкл/лунку субстрата ТМБ (KPL) останавливали добавлением 100 мкл/лунку 1N H₂SO₄. Измерение оптической плотности (при длине волны 450nm) и расчет титра антител проводили, используя программное обеспечение Gen5 software.

Анализ продукции цитокинов. Концентрацию цитокинов в перитонеальных смывах определяли при помощи мультиплекс системы LEGENDplex (Biolegend, США), согласно инструкции производителя. Перитонеальные смывы получали через 12 ч после иммунизации. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 500g и температуре 4°C, после чего супернатанты использовали для определения концентрации цитокинов

Проточная цитометрия. Подготовка клеток легочного интерстиция к окрашиванию включала механическую диссоциацию с помощью гомогенизатора Tissue Lyser II с последующей обработкой ферментами (45 мин, 37°C раствор коллагеназы (Sigma, Германия) 0.5 мг/мл и ДНКазы I (Sigma, Германия) 10 мкг/мл). Селезенки гомогенизировали вручную при помощи пестиковых гомогенизаторов

для пробирок (Eppendorf, Германия). Лизис эритроцитарной примеси осуществляли при помощи реагента RBC Lysis Buffer (Biolegend, США). Для окрашивания использовали $2 \cdot 10^6$ клеток.

Для выявления популяций клеток врожденного иммунитета в легких и перитонеальных смывах и анализа уровня экспрессии активационных маркеров использовали две панели флуорохром-конъюгированных антител: 1) CD11b-PE/Cy7, CD11c-PE, МНСII-Alexa488, CD103-PerCP-Cy5.5, CD45-APC/Cy7, CD64-BV421, CD24-BV510; 2) CD45-APC/Cy7, МНСII-Alexa488, Ly6G-PerCP-Cy5.5, CD86-BV421, (Biolegend, США). При анализе Т-регуляторных лимфоцитов в легких использовали следующую панель антител: CD45-BV421 (Biolegend, США), CD4-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences, США), CD8-PE/Cy7 (Biolegend, США), Helios-PE/Dazzle и FoxP3-Alexa 488 (Biolegend, США). Окрашивание по FoxP3 проводили с использованием набора реагентов True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, США), согласно инструкции производителя.

Для выявления Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам вируса гриппа, клетки легких или селезенки рассеивали в плоскодонные планшеты в среде RPMI, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco) ($2 \cdot 10^6$ кл/100 мкл) и стимулировали пептидами, которые соответствовали эпитопам вируса А/PR/8/34. Для стимуляции использовали пептиды NP₃₆₆₋₃₇₄, NP₁₆₁₋₁₇₅, NP₁₉₆₋₂₁₀, NA₄₇₄₋₄₈₃, NA₃₂₃₋₃₃₇, NA₄₂₇₋₄₃₃ и NS₁₀₈₋₁₂₄. Клетки инкубировали со специфическим стимулятором в течение 6 ч в присутствии блокатора клеточного транспорта брефельдина А (Biolegend, США) при 37° С и 5% CO₂. После стимуляции клетки окрашивали флуорохром-конъюгированными антителами CD8-PE/Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD44-BV510, CD62L-APC/Cy7, IFN γ -FITC, TNF α -BV421, IL2-PE. Окраску проводили при помощи коммерческого набора реагентов Cytofix/Cytoperm (BD, США) согласно инструкциям производителя.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку результатов проводили в программе RStudio Desktop 1.0.153 (RStudio Inc, США). Для сравнения показателей в нескольких экспериментальных группах с одним контролем использовали критерий Даннета. Сравнение двух экспериментальных групп между собой осуществляли при помощи t-критерия Стьюдента. Сравнение нескольких групп между собой выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование перекрестной защиты при интраназальном введении вирусов гриппа с укороченным и полноразмерным белком NS1

Изучение патогенности и репродуктивной активности вирусов. Для сравнения патогенности штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, а также для изучения способности данных штаммов индуцировать кросс-протективный иммунный ответ, мышам линии Balb/c интраназально вводили вирус A/PR/8/34 в дозе 6 и 3 log ТИД₅₀/мышь (группы NSfull (6lg) и NSfull (3lg)) и вирус A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log ТИД₅₀/мышь (группа NS124 (6lg)). Исследования репликативной активности штаммов при заражении в дозе 6 log ТИД₅₀/мышь (рис. 1А) показали, что вирус с укороченным белком NS1 обладал ограниченной способностью к размножению в легких мышей на 2-й и 4-й дни после заражения, отставая более чем на 3 log ТИД₅₀ от уровня репродукции вируса гриппа с полноразмерным белком NS1 ($p = 0.003$).

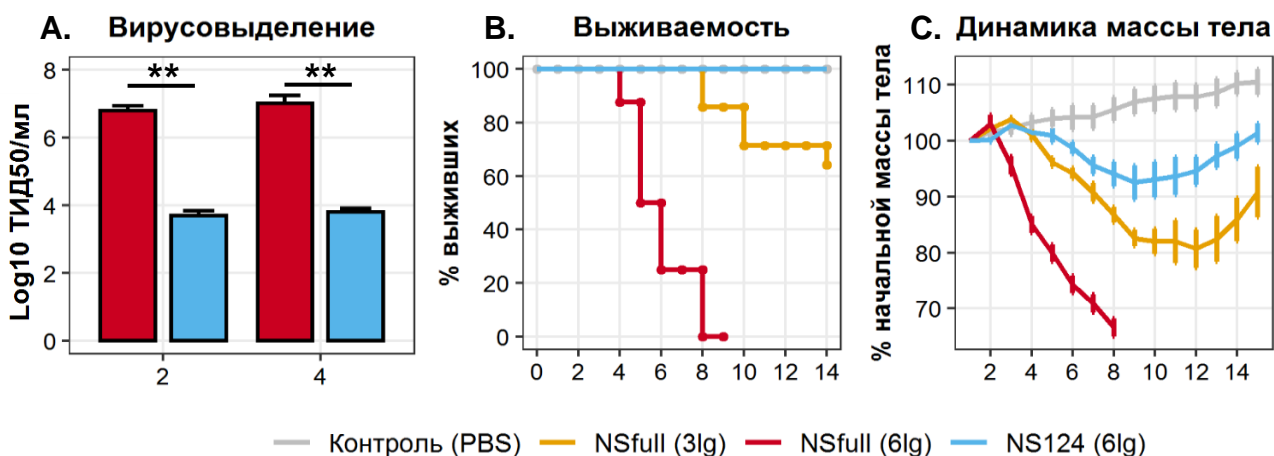


Рисунок 1. **А.** Уровень репликации вирусов A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) в легких мышей при заражении в дозе 6 log ТИД₅₀/мышь. (Mean±SEM; **: $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента). **Б.** Кривые Каплана-Майера, отражающие долю выживших животных (%) на различных сроках после интраназального введения вирусов. **С.** Динамика массы тела.

Введение мышам вируса A/PR/8/34 в дозе 6 log ТИД₅₀ приводило к стремительной потере массы тела и 100% гибели животных к 8-му дню после заражения. Животные, получившие указанный штамм в дозе 3 log ТИД₅₀, также демонстрировали существенное (до 23%) снижение массы тела в период со 2-го по 8-й дни исследования. Летальность в данной группе составила 36%. В то же время, введение мышам вируса A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log ТИД₅₀ приводило к умеренному (5-10%) снижению массы тела животных в период с 5-го по 10-й дни эксперимента и не сопровождалось их гибелью. Полученные результаты доказывают, что используемый в настоящей работе вирус гриппа с укороченным до 124 а.к. белком NS1 имеет аттенуированный фенотип по сравнению с аналогичным вирусом с полноразмерным белком NS1.

Изучение кросс-протекции. Для оценки протективных свойств изучаемых штаммов, мыши из группы NS124 (6 lg), а также выжившие животные из группы NSfull (3 lg) через 30 дней после интраназального введения вирусов были разделены на 3 группы и подвергнуты контрольному заражению гетерологичными штаммами A/Aichi/2/68 (H3N2) или B/Malaysia/06/04 или гомологичным штаммом A/PR/8/34 «дикого» типа в дозе 10 LD₅₀. На рис. 2 представлены данные по летальности и динамике массы тела экспериментальных животных после заражения.

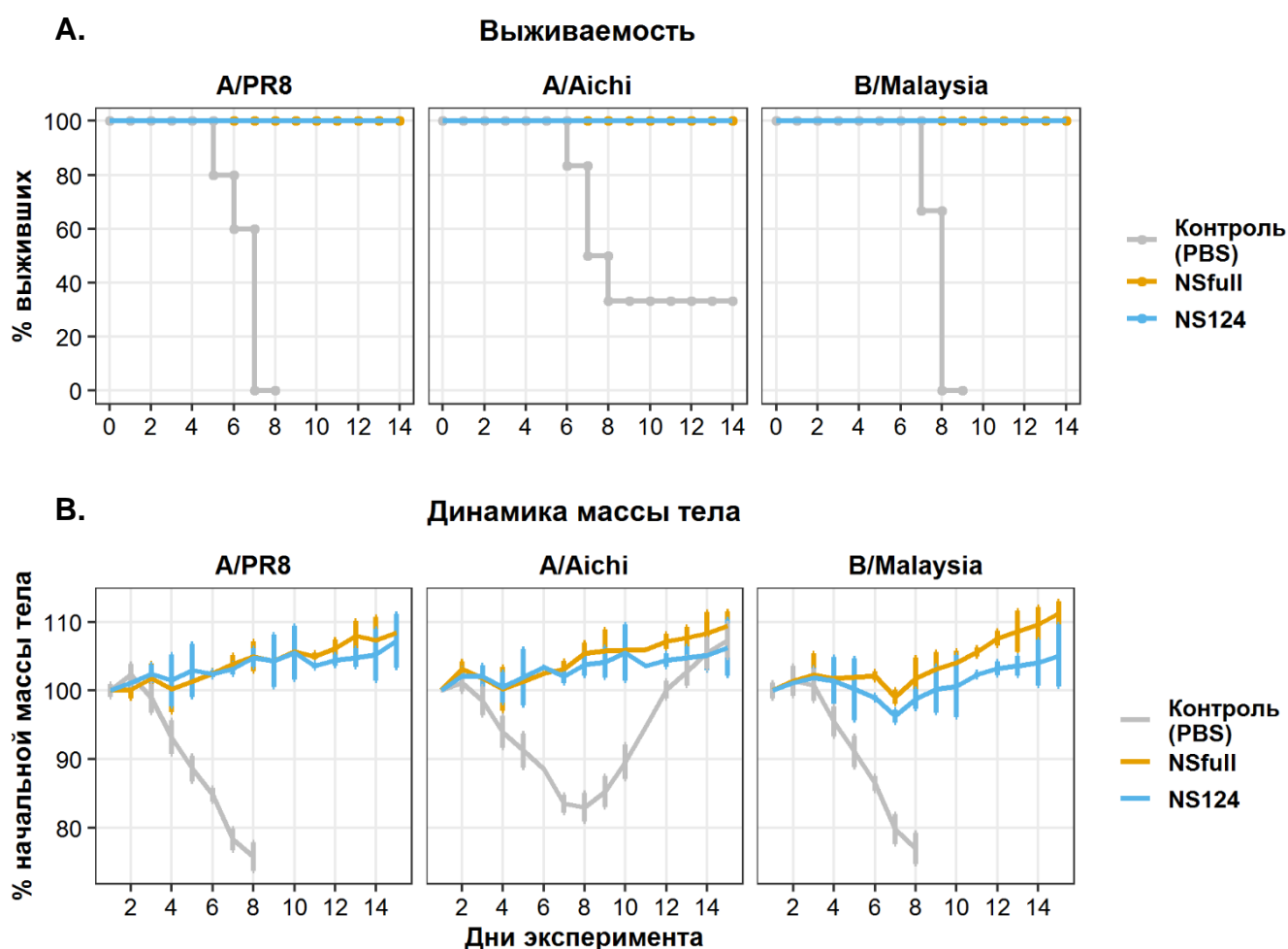


Рисунок 2. **А.** Кривые Каплана-Мейера, отражающие долю выживших животных, получавших вирусы A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) на различных сроках после контрольного заражения. **Б.** Динамика массы тела после контрольного заражения. Число животных: n=7 в группах, зараженных A/Aichi и B/Malaysia, n = 6 в группах, зараженных A/PR/8/34.

Полученные данные указывают на формирование гетерологичной защиты против вирусов гриппа А (H3N2) и В у мышей, перенесших тяжелую гриппозную инфекцию, вызванную вирулентным вирусом A/PR/8/34 (H1N1). Аналогичный кросс-протективный эффект был достигнут при интраназальной иммунизации аттенуированным вирусом A/PR/8/34-NS124 (H1N1) с укороченным белком NS1 в дозе 6 log ТИД₅₀/мышь. Можно предположить, что высокие кросс-протективные

свойства вируса A/PR/8/34-NS124 обусловлены усилением иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа в результате укорочения белка NS1. Для сравнения иммуногенности двух вирусов, различающихся по репродуктивной активности в легких, была использована интраперитонеальная иммунизация.

Вирус A/PR/8/34-NS124 характеризуется повышенной иммуногенностью по сравнению с A/PR/8/34 при интраперитонеальном введении

Согласно литературным данным, вирусы гриппа не размножаются в перитонеальной полости мышей (Reading et al., 2010), однако сохраняют способность индуцировать выраженный гуморальный и клеточный вирус-специфичный иммунный ответ (Ferko et al., 2004). Для изучения иммуногенности вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в условиях равной антигенной нагрузки мыши линии C57Black/6 были интраперитонеально иммунизированы указанными штаммами в дозе $7 \log$ ТИД₅₀/мышь. Контрольная группа получала PBS в соответствующем объеме (500 мкл/мышь). Врожденный иммунный ответ оценивали при помощи измерения концентрации цитокинов воспаления и динамики относительного состава популяций клеток врожденного иммунитета в перитонеальных смывах мышей через 12 и 24 ч после иммунизации. Активацию антиген-презентирующих клеток анализировали по уровню экспрессии ко-стимуляторного маркера CD86 на поверхности CD45⁺МНСII⁺ клеток. На 8-й и 21-й дни после иммунизации (д.п.и.) оценивали уровень системного антиген-специфичного Т-клеточного иммунного ответа и уровень вирус-специфичных антител класса IgG.

Анализ врожденного иммунного ответа. Анализ концентрации цитокинов воспаления в перитонеальных смывах мышей через 12 ч после введения исследуемых вирусов показал, что для вируса A/PR/8/34-NS124 характерна более высокая цитокиногенная активность по сравнению с вирусом A/PR/8/34 (рис.3). Наиболее существенные различия между двумя экспериментальными группами были получены по уровням IFN β , IL-27 и TNF α ($p \ll 0.0001$; $p = 0.0007$; $p = 0.0002$). Вирус A/PR/8/34-NS124 индуцировал более выраженную экспрессию активационного маркера CD86 на антиген-презентирующих клетках (АПК) через 24 ч после иммунизации по сравнению с A/PR/8/34 ($p = 0.006$).

На основании полученных данных можно заключить, что укорочение белка NS1 приводило к усилению способности вируса гриппа стимулировать систему врожденного иммунитета. Повышенная иммуногенность штамма A/PR/8/34-NS124 выражалась в более интенсивной продукции провоспалительных цитокинов и усиленной экспрессии ко-стимуляторного маркера CD86 в ответ на иммунизацию. Полученные результаты позволяют предположить, что увеличение антиген-презентирующей активности клеток врожденного иммунитета приведет к более выраженному адаптивному иммунному ответу на антигенные детерминанты вируса гриппа с укороченным белком NS1 по сравнению с вирусом A/PR/8/34.

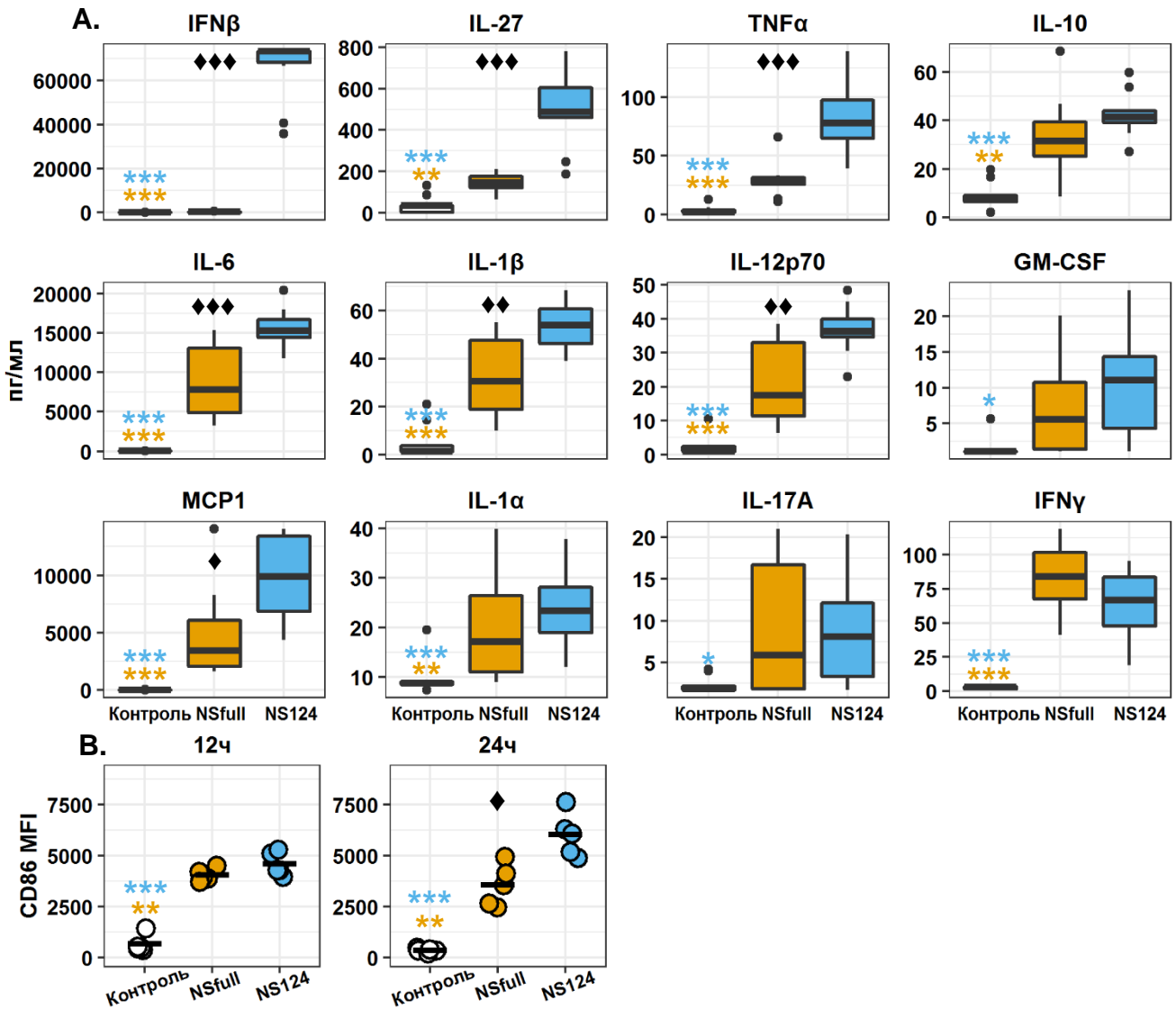


Рисунок 3. **А.** Концентрация цитокинов в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). **В.** Уровень экспрессии молекулы CD86 на АПК перитонеальной полости мышей. Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом \blacklozenge отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, критерий Тьюки, $n = 5$).

Анализ адаптивного иммунного ответа. Для оценки влияния модификации белка NS1 на иммуногенность антигенных детерминант вируса гриппа, спленоциты мышей, интраперитонеально иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, были простимулированы *in vitro* при помощи пептидов, соответствующих эпитопам белков вируса гриппа NP₃₆₆₋₃₇₄, NP₁₆₁₋₁₇₅, NP₁₉₆₋₂₁₀, HA₃₂₃₋₃₃₇, HA₄₇₄₋₄₈₃, NA₄₂₇₋₄₃₃ и NS1₁₀₈₋₁₂₄. Выбор эпитопов осуществляли при помощи базы данных IEDB (www.iedb.org). При выборе эпитопов для включения в исследование учитывались данные по их консервативности среди различных штаммов вируса гриппа, а также их способности взаимодействовать с молекулами МНС мышей линии C57Black/6. Описание выбранных эпитопов приведено в таблице 1.

Таблица 1. Т-клеточные эпитопы вируса гриппа

Эпитоп	Последовательность	Консервативность*
NP ₃₆₆₋₃₇₄	ASNENMETM	1.8% (63 / 3448)
NP ₁₆₁₋₁₇₅	PRMCSLMQGSTLPRR	98.9% (3411 / 3448)
NP ₁₉₆₋₂₁₀	MIKRGINDRNFWRGE	67.28% (2320 / 3448)
NS1 ₁₀₈₋₁₂₄	KQKVAGPLCVRMDQAIM	4.9% (247 / 4945)
HA ₃₂₃₋₃₃₇	YVKSTKLRLATGLRN	41.9% (4174 / 9949)
HA ₄₇₄₋₄₈₃	KEIGNGCFEF	47.7% (4750 / 9949)
NA ₄₂₇₋₄₃₃	SISFCGV	42.2% (3288 / 7776)

*Консервативность эпитопов определялась путем вычисления количества уникальных последовательностей соответствующих белков вируса гриппа А, содержащих данный эпитоп. Для анализа использовали последовательности, представленные в базе данных Influenza Research Database. В скобках представлено отношение числа последовательностей, содержащих указанный эпитоп, к общему числу проанализированных последовательностей.

Иммунизация вирусом с укороченным белком NS1 приводила к усилению антиген-специфичного иммунного ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов на ряд эпитопов белков вируса гриппа (NP₃₆₆₋₃₇₄ (p = 0.013), HA₄₇₄₋₄₈₃ (p = 0.03), NP₁₉₆₋₂₁₀ (p = 0.05) и NS1₁₀₈₋₁₂₄ (p = 0.015)) через 8 д.п.и. Наиболее выраженные различия между группами NSfull и NS124 были получены при рестимуляции пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄ (рис. 4А). Иммунный ответ на все изученные эпитопы вируса гриппа характеризовался преобладанием популяций полифункциональных CD8⁺ Т-лимфоцитов (IFNγ⁺IL-2⁺TNFα⁺ и IFNγ⁺IL2⁺TNFα⁺). При этом в группе NS124 относительное содержание данных популяций было выше, чем в группе NSfull. На рис. 4С относительный состав популяций антиген-специфичных цитокин-продуцирующих Т-клеток проиллюстрирован на примере ответа на стимуляцию пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄. На столбчатых диаграммах представлены средние значения доли различных популяций цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа эффекторных CD8⁺ Т-клеток (CD8⁺CD44⁺CD62L). На круговых диаграммах представлено относительное содержание популяций, продуцирующих 1, 2 или 3 цитокина одновременно в общем пуле цитокин-продуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-клеток. Достоверное увеличение уровня полифункциональных CD8⁺ Т-лимфоцитов в группе NS124 по сравнению с NSfull было получено в ответ на стимуляцию пептидами NP₃₆₆₋₃₇₄ (p = 0.0008), HA₄₇₄₋₄₈₃ (p = 0.03), HA₃₂₃₋₃₃₇ (p = 0.04) и NS1₁₀₈₋₁₂₄ (p = 0.04).

Продукция вирус-специфических антител класса IgG по данным ИФА была достоверно выше в группе NS124 по сравнению с NSfull на сроках 7, 14 и 21 д.п.и. (p = 0.01; p = 0.05; p = 0.00001, рис. 4С). Кроме того, у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, отмечался значительный прирост уровня IgG к 21 д.п.и., тогда как в группе NSfull общее количество антител увеличивалось на 14-й день, но на более позднем сроке дальнейшего прироста не наблюдалось.

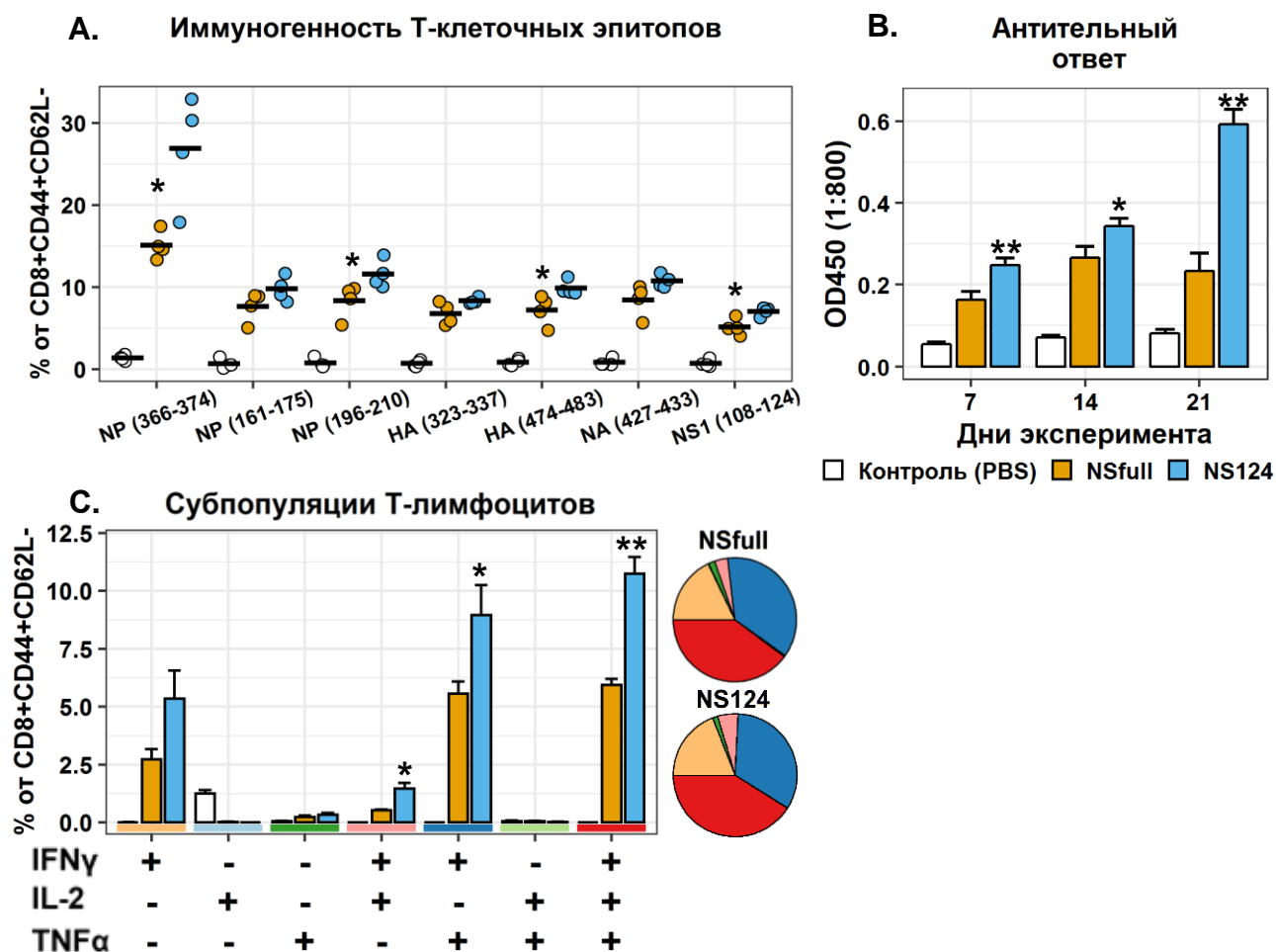


Рисунок 4. **А.** Доля цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа $CD8^+CD44^+CD62L^-$ Т-клеток в селезенках мышей в ответ на стимуляцию пептидами. **В.** Уровень IgG, специфичных к вирусу гриппа A/PR8/34, в сыворотках крови мышей (средняя оптическая плотность образца при разведении сыворотки 1:800; Mean \pm SD, n = 10). **С.** Популяционный состав цитокин-продуцирующих эффекторных $CD8^+$ Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄ (Mean \pm SE, n = 4). На всех графиках символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки). Для всех групп были получены достоверные различия с контролем (p<0.05, критерий Тьюки, не показано на графиках).

Резюмируя результаты изучения Т-клеточного и гуморального иммунного ответа, можно заключить, что укорочение белка NS1 привело к усилению иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа и способствовало формированию более выраженного системного адаптивного иммунного ответа у мышей, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124, по сравнению с A/PR/8/34 в условиях равной антигенной нагрузки.

Изучение кросс-протективного иммунитета при интраперитонеальной иммунизации. Для оценки кросс-протективных свойств системного иммунитета, сформированного в результате интраперитонеальной иммунизации вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, мыши линии Balb/c были подвергнуты контрольному

заражению вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2), B/Malaysia/06/04 и A/PR8/34 (H1N1) через 30 д.п.и. На основании полученных данных (рис.5) можно заключить, что иммунизация вирусами гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 приводила к формированию полноценной защиты только от заражения гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) «дикого» типа, но не от гетерологичных вирусов гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04. Тем не менее, в группе NS124 после заражения вирусом A/Aichi/2/68 выжило 3 животных из 7. Масса тела выживших мышей восстановилась до 95% от исходной к концу периода наблюдения, что может свидетельствовать о повышении резистентности к гетерологичному штамму в результате интраперитонеальной иммунизации вирусом гриппа с укороченным белком NS1.

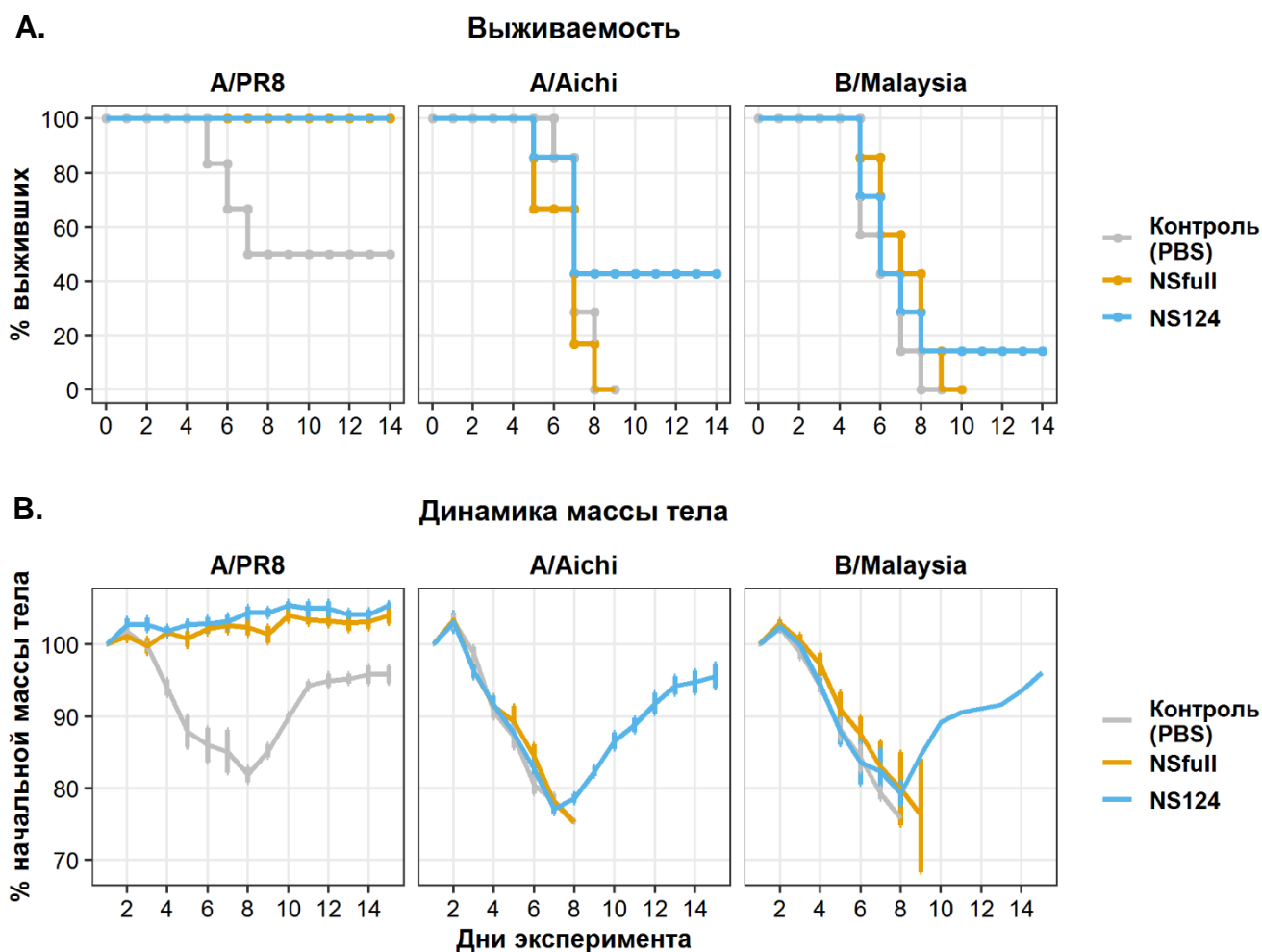


Рисунок 5. **А.** Кривые Каплана-Майера, отражающие долю выживших животных, интраперитонеально иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), после гетерологичной и гомологичной контрольной инфекции. **В.** Динамика массы тела. Число животных: $n = 7$ во всех группах.

На основании полученных данных можно заключить, что интраперитонеальное введение вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе 7 log ТИД₅₀/мышь приводит к формированию выраженного Т-клеточного и антительного ответа, но не обеспечивает полноценной гетерологичной защиты от вирусов A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04.

Изучение механизмов перекрестной защиты при интраназальной иммунизации штаммами A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34

Для выявления иммунологических механизмов перекрестной защиты после интраназальной иммунизации, мыши линии C57Black/6 были иммунизированы вирусами A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34. Доза вируса A/PR/8/34-NS124 составила 6 log ТИД₅₀/мышь. Для заражения мышей штаммом A/PR/8/34 была выбрана доза 2.5 log ТИД₅₀/мышь, не приводящая к гибели экспериментальных животных. Для подтверждения того, что иммунизация в указанных дозах вызывала эквивалентный уровень иммунного ответа в обеих группах, у мышей забирали сыворотки крови на сроке 30 д.п.и. для измерения содержания вирус-специфичных антител. Через 32 д.п.и. мыши были подвергнуты контрольному заражению гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10 LD₅₀/мышь. Результаты анализа выживаемости, динамики массы тела, вирусовыделения и антительного ответа представлены на рис. 6.

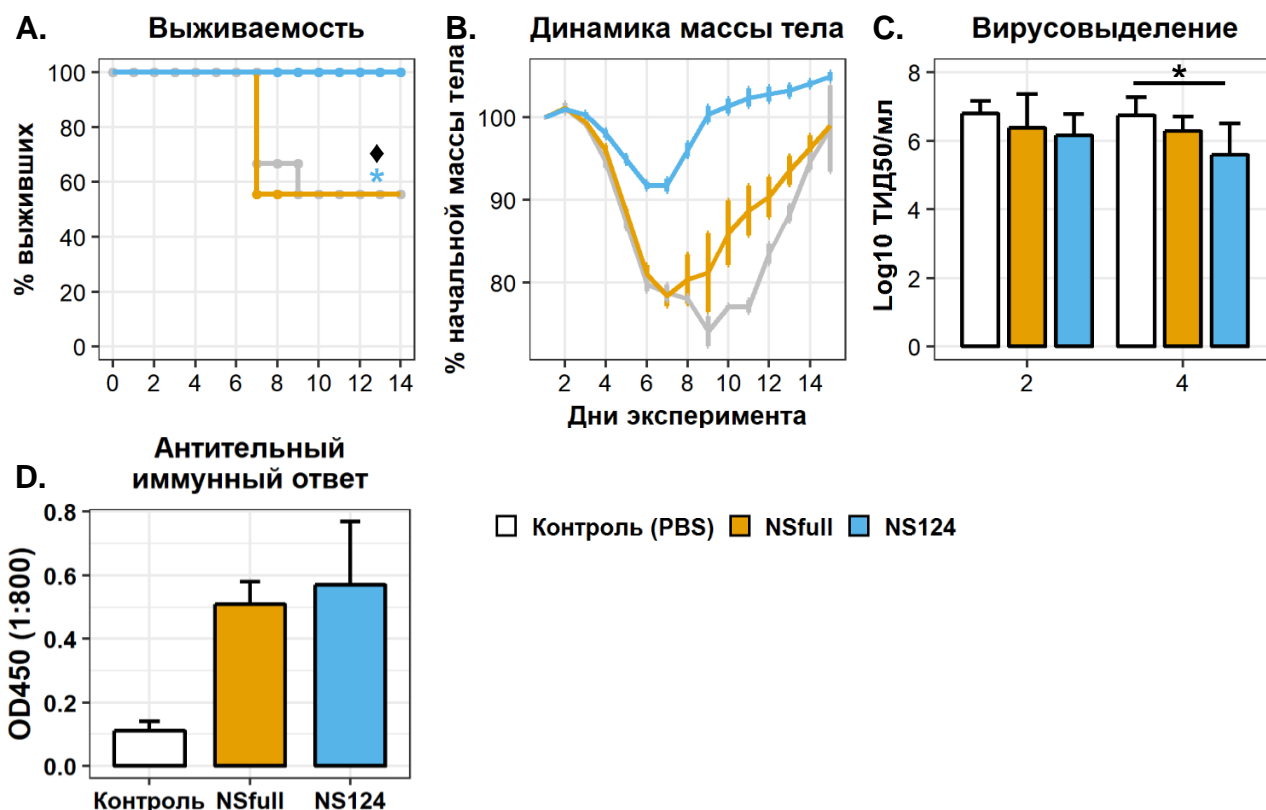


Рисунок 6. А-В. Динамика летальности и изменения массы тела мышей линии C57Black/6, интраназально иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), после заражения вирусом A/Aichi/2/68. Сравнение кривых выживаемости выполнено методом Кокса (*: p<0.05, сравнение с

контролем; ♦: $p < 0.05$, сравнение групп NSfull и NS124; $n = 6$ во всех группах). С. Уровень репликации вируса A/Aichi/2/68 в легких мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34 (*: $p < 0.05$, критерий Тьюки). D. Общий титр вирус-специфичных IgG (ИФА) на сроке 30 д.п.и. Указана средняя оптическая плотность (OD_{450}) образца при разведении сыворотки 1:800 (Mean \pm SD, $n = 10$).

Анализ выживаемости, динамики массы тела и вирусовыделения. Как показано на рис. 6D, интраназальная иммунизация вирусами гриппа A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34 в дозе 6 log ТИД₅₀/мышь и 2.5 log ТИД₅₀/мышь, соответственно, приводила к формированию эквивалентного уровня антительного иммунного ответа. Однако, после заражения штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2), только в группе NS124 не наблюдали гибели экспериментальных животных, тогда как в контроле и в группе NSfull летальность составила 40%. Заражение гетерологичным штаммом приводило к умеренному снижению массы тела мышей в группе NS124 (до 8% от исходных значений). В то же время, мыши, перенесшие инфекцию, вызванную введением 2.5 log ТИД₅₀ вируса A/PR/8/34, а также не иммунизированные животные теряли до 25% исходной массы тела.

Через 48 часов после заражения у иммунизированных и контрольных животных титр вируса в гомогенатах легких составлял 6.16 – 6.79 log ТИД₅₀/мл. Наименьшие значения были получены в группе NS124, однако достоверных различий между тремя группами на данном сроке выявлено не было. На 4-й день после заражения были обнаружены статистически значимые различия между контролем и группой NS124 ($p = 0.03$). Для группы NSfull были характерны промежуточные значения вирусной нагрузки (рис.6B). Таким образом, иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 существенно снижала тяжесть заболевания, способствовала выживанию зараженных животных и ускоряла клиренс вируса. Для выявления факторов перекрестной защиты был оценен уровень врожденного и адаптивного иммунного ответа при заражении гетерологичным вирусом.

Анализ врожденного иммунного ответа. Заражение вирусом A/Aichi/2/68 сопровождалось увеличением доли интерстициальных макрофагов и нейтрофилов в легких мышей через 4 дня после заражения (рис.7A). У контрольных животных клеточная инфильтрация легких была существенно выше, чем у иммунизированных мышей. На 4-й день после заражения доля интерстициальных макрофагов в контроле составила 26.91 ± 0.98 % от общего числа CD45⁺ клеток. В то же время у мышей из групп NSfull и NS124 данный показатель был почти в 2 раза ниже: 15.73 ± 1.28 и 14.30 ± 2.18 соответственно (Рис.7A). Сходная динамика была показана для нейтрофилов: на 4-й день после заражения отмечалось 3-х кратное увеличение относительного содержания клеток данной популяции в легких контрольных животных. У иммунизированных мышей прирост относительного содержания нейтрофилов носил менее выраженный характер. При этом, в группе NS124 на сроке 4 д.п.и. уровень нейтрофилов был ниже, чем в группе NSfull ($p = 0.03$).

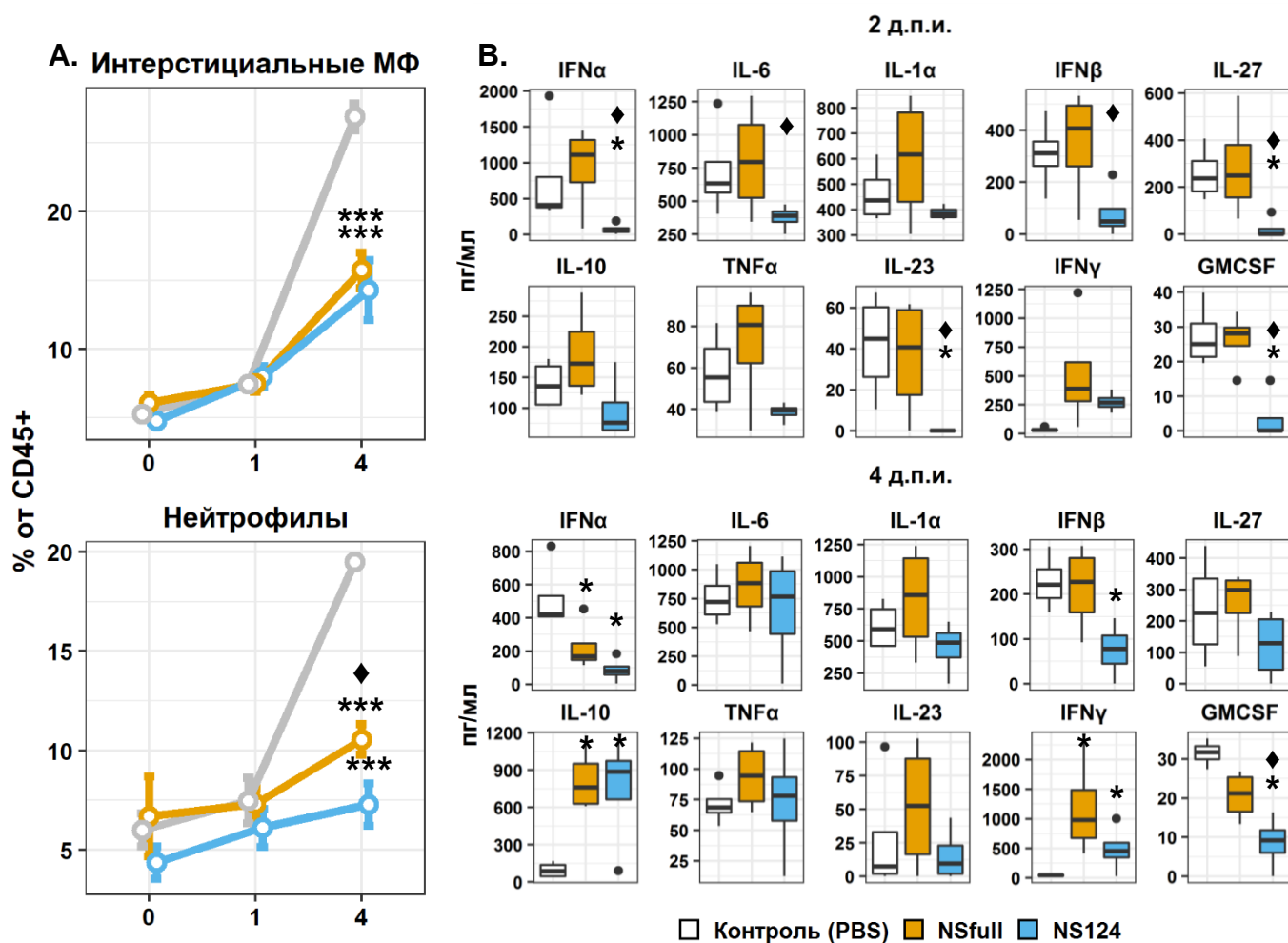


Рисунок 7. **А.** Динамика относительного состава различных популяций клеток врожденного иммунитета в легких мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), на разных сроках после заражения вирусом A/Aichi/2/68. На графиках представлены значения доли интерстициальных макрофагов и нейтрофилов от общего числа CD45+ Т-лимфоцитов (Mean \pm SEM, n = 4). **Б.** Концентрация цитокинов в гомогенатах легочной ткани мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), через 2 и 4 д.п.и (Mean \pm SEM, n = 4). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ◆ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (критерий Тьюки).

Нейтрофилы и макрофаги – основные индукторы иммунопатологии, приводящей к развитию пневмонии при гриппе (Narasaraju et al. 2011). Согласно полученным данным, иммунизация вирусом с укороченным белком NS1, в отличие от заражения штаммом с полноразмерным белком NS1, ограничивала нейтрофильную инфильтрацию легких, что, по-видимому, вносило вклад в обеспечение перекрестной защиты.

Уменьшение уровня нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации легких в группе NS124 после гетерологичного заражения сопровождалось снижением концентрации ряда провоспалительных цитокинов. Концентрация IFN α в группе NS124 была в 12 раз ниже, чем в группе NSfull (p = 0.02). Кроме того, достоверные

различия между группами NS124 и NSfull через 2 д.п.и. были получены по уровню IL-6 ($p = 0.05$), IFN β ($p = 0.03$), IL-23 ($p = 0.05$) и GM-CSF ($p = 0.006$). Через 4 д.п.и. в группе NS124 отмечалось небольшое увеличение концентрации указанных факторов, в результате чего, различия с группой NSfull приобретали менее выраженный характер. Как в группе NSfull, так и в группе NS124 отмечался существенный прирост концентрации IFN γ по сравнению с контролем. Наиболее выраженные различия были получены через 4 д.п.и. ($p = 0.01$; $p = 0.05$, соответственно) (рис. 7B).

Таким образом, несмотря на отсутствие достоверных различий по уровню вирусной нагрузки в группах NSfull и NS124 (рис.6C) после заражения вирусом A/Aichi/2/68, интенсивность провоспалительного цитокинового ответа у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, была существенно ниже, чем у мышей, перенесших заражение вирусом с полноразмерным белком NS1.

Анализ адаптивного Т-клеточного ответа после заражения штаммом A/Aichi/2/68 показал, что мыши, иммунизированные вирусом с укороченным белком NS1, имели более высокий уровень CD8⁺ эффекторных Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины в ответ на стимуляцию пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄, по сравнению с группой животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34 (рис.8).

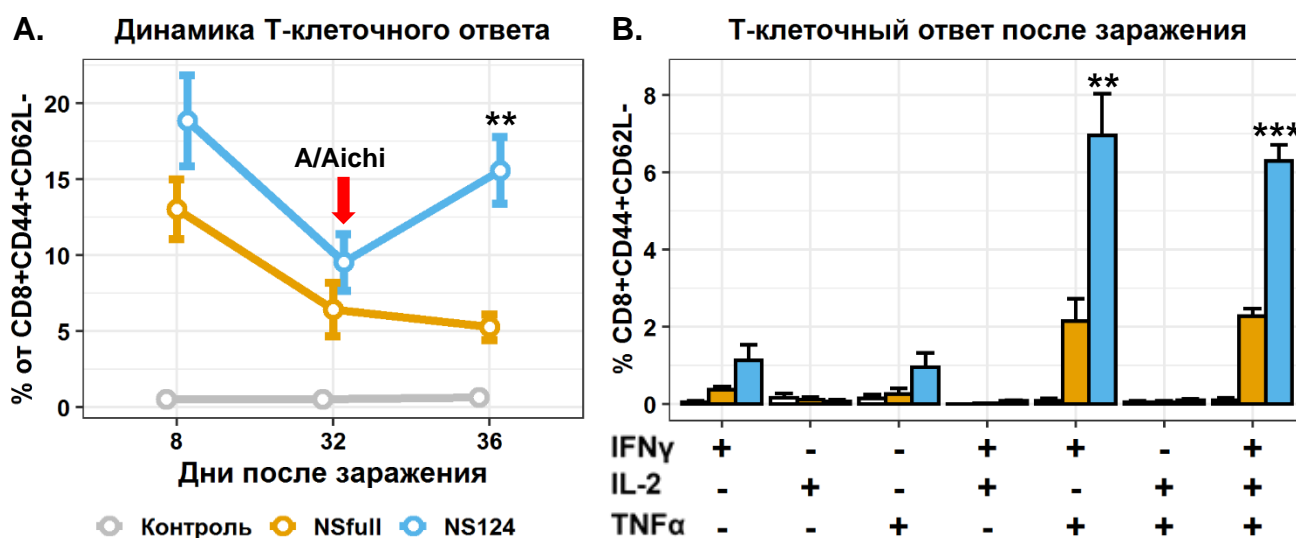


Рисунок 8. **А.** Динамика относительного содержания антиген-специфичных цитокин-продуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов на разных сроках после иммунизации. **Б.** Уровень иммунного ответа на пептид NP₃₆₆₋₃₇₄ CD8⁺ Т-лимфоцитов легких у мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), с последующим заражением штаммом A/Aichi/2/68. На столбчатых диаграммах представлены средние значения (Mean \pm SE, $n = 4$) доли различных популяций цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа CD8⁺CD44⁺CD62L Т-клеток (различия между группами NSfull и NS124: **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, критерий Тьюки).

Различия между группами NS124 и NSfull через 4 дня после контрольного заражения носили гораздо более выраженный характер, чем до заражения. Число антиген-специфичных клеток, сформировавшихся через 8 дней после иммунизации штаммами A/PR/8/34 или A/PR/8/34-NS124, снижалось приблизительно в 2 раза к 32-му дню после иммунизации (рис. 8А). После заражения штаммом A/Aichi/2/68 в группе NS124 происходило усиление Т-клеточного иммунного ответа. Число антиген-специфичных Т-лимфоцитов в группе NS124 принимало значения, близкие к полученным на 8-й день после иммунизации ($15.57 \pm 2.20\%$). В то же время, в группе NSfull доля цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов не изменялась. Основными участниками цитокинового ответа выступили полифункциональные Т-лимфоциты ($IFN\gamma^+IL2^-TNF\alpha^+$ и $IFN\gamma^+IL2^+TNF\alpha^+$). По относительному содержанию клеток данных популяций между группами NSfull и NS124 наблюдали статистически значимые различия ($p = 0.004$; $p = 0.00003$).

Таким образом, оба вируса индуцировали в легких сопоставимый уровень Т-клеточного иммунного ответа, интенсивность которого со временем снижалась. Однако, антиген-специфичные $CD8^+$ Т-лимфоциты, сформированные в ответ на иммунизацию штаммом с укороченным белком NS1, обладали повышенной способностью к реактивации при гетерологичном заражении.

Оценка уровня Т-регуляторных лимфоцитов. На сроке 4 д.п.и. у иммунизированных животных отмечали значительный прирост уровня регуляторного цитокина IL-10 по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о повышенной активности Т-регуляторных лимфоцитов (T-reg) в группах NS124 и NSfull. Анализ относительного содержания Т-регуляторных клеток в легких мышей через 4 дня после заражения штаммом A/Aichi/2/68 показал существенное увеличение доли $FOXP3^+Helios^+$ T-reg у животных из групп NSfull и NS124 по сравнению с контролем ($p = 0.007$; 0.001 , соответственно, Рис.9).

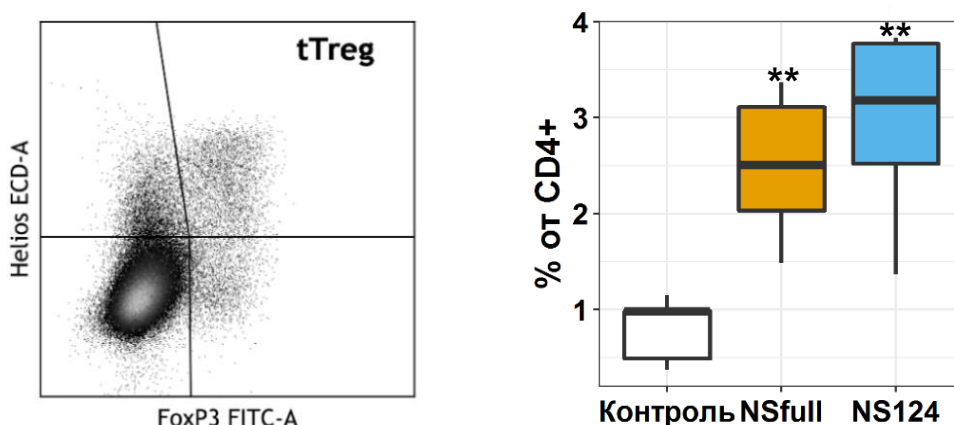


Рисунок 9. Уровень Т-регуляторных клеток в легких мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124), после заражения вирусом A/Aichi/2/68. Знаком * отмечены достоверные различия между экспериментальными группами и контролем (**: $p < 0.01$; критерий Тьюки).

В группе NS124 относительное содержание T-reg было в среднем выше, чем в группе NSfull, однако статистически значимых различий между группами выявлено не было. Согласно литературным данным (Elkord et al, 2015), FOXP3⁺Helios⁺ T - регуляторные клетки характеризуются наиболее выраженной иммуносупрессорной активностью по сравнению с другими популяциями регуляторных лимфоцитов. Не исключено, что вирус гриппа с укороченным белком NS1 индуцировал формирование более активных регуляторных T-клеток, обеспечивших снижение уровня нейтрофильной инфильтрации и нормализацию провоспалительного цитокинового фона при гетерологичной инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению механизмов индукции кросс-протективной защиты при гриппозной инфекции вирусом «дикого» типа или иммунизации аттенуированным штаммом с модифицированным геном NS. На мышинной модели был проведен сравнительный анализ врожденного, а также адаптивного T- и B-клеточного иммунного ответа на вирус гриппа A/PR8/34 (H1N1) с полноразмерным белком NS1 или с укороченным до 124 а.к. белком NS1 (A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, соответственно). Изучалась возможность усиления иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа A/PR8/34 путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1, а также возможность индукции гетерологичной защиты при интраперитонеальной и интраназальной иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124.

Было показано, что интраназальное заражение мышей вирулентным штаммом A/PR8/34 (H1N1) с полноразмерным белком NS1 в дозе, вызывающей 36% летальность, индуцировала у выживших животных 100% гетерологичную защиту (по летальности) не только от вируса гриппа подтипа H3N2 (A/Aichi/2/68), но и от вируса B/Malaysia/06/04. Иммунизация вирусом A/PR8/34 (H1N1) с укороченным белком NS1 обеспечивала столь же эффективную защиту от указанных гетерологичных штаммов, несмотря на то, что данный вирус имел аттенуированный фенотип и характеризовался сниженным на 3.5 log ТИД₅₀ уровнем репликации в легких по сравнению с вирулентным аналогом.

Для изучения иммунологических механизмов наблюдаемой перекрестной защиты, было проведено сравнение иммуногенности вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в условиях равной антигенной нагрузки при интраперитонеальном введении. Укорочение белка NS1 приводило к усиленной стимуляции системы врожденного иммунного ответа, что сопровождалось дифференцировкой повышенного числа антиген-специфичных T-лимфоцитов и формированием более высокого уровня вирус-специфичных IgG в группе NS124 по сравнению с группой NSfull. Тем не менее, системного антительного и T-клеточного специфичного иммунитета, сформированного в результате интраперитонеальной иммунизации, оказалось недостаточно для обеспечения полноценной перекрестной защиты.

Изучение реакций врожденного и адаптивного иммунитета в легочной ткани у интраназально иммунизированных животных после заражения штаммом

A/Aichi/2/68 (H3N2) показало, что для обеспечения эффективной перекрестной защиты требуется активность как эффекторных, так и регуляторных компонентов иммунной системы, обеспечивающих, с одной стороны, элиминацию патогена, с другой стороны – снижение нейтрофильной инфильтрации и уровня провоспалительного цитокинового ответа в легких.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Результаты, полученные в рамках проведенного диссертационного исследования, расширяют существующие представления о механизмах индукции перекрестного иммунитета при гриппозной инфекции и вакцинации аттенуированным штаммом, а также ставят ряд новых вопросов, очерчивающих перспективу дальнейших исследований в данной области. В свете полученных данных о формировании гетерологичной защиты от вирусов гриппа В в результате мукозальной иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124 представляется необходимым проведение дальнейших исследований, направленных на выявление медиаторов наблюдаемой протекции, изучение вклада Т-регуляторных лимфоцитов и клеток врожденного иммунитета в формирование перекрестной защиты, а также оценку продолжительности обнаруженных эффектов.

ВЫВОДЫ

1. У мышей, перенесших тяжелую гриппозную инфекцию, вызванную вирусом A/PR/8/34 (H1N1) формируется перекрестная защита, предотвращающая летальность при заражении вирусами гриппа А (H3N2) и В. Равноценный эффект достигается при интраназальной иммунизации аттенуированным вирусом A/PR/8/34-NS124 (H1N1) с удаленным эффекторным доменом белка NS1.
2. При интраперитонеальной иммунизации мышей вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в условиях равной антигенной нагрузки, вирус с укороченным белком NS1 стимулирует (i) более высокую продукцию цитокинов IFN β , IL-27, TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70, MCP1, IL-10 и костимулирующего фактора CD86; (ii) усиленный CD8⁺ Т-клеточный ответ к эпитопам белков вируса гриппа NP₃₆₆₋₃₇₄ (p = 0.013), NP₁₉₆₋₂₁₀ (p = 0.05), NS₁₁₀₈₋₁₂₄ (p = 0.015) и HA₄₇₄₋₄₈₃ (p = 0.03) и (iii) повышенную продукцию вирус специфических IgG антител (p < 0.0001).
3. Интраперитонеальная иммунизация вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, несмотря на формирование выраженного Т-клеточного и антительного ответов, не приводит к развитию гетерологичной защиты.
4. Интраназальная иммунизация мышей вирусом A/PR/8/34-NS124 (H1N1) не предотвращает заражение гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2), однако приводит к уменьшению вирусной нагрузки (p = 0.03), снижению уровня продукции провоспалительных цитокинов и ограничению макрофагальной и нейтрофильной инфильтрации легочной ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Васильев К. А., Юхнева М. А., Шурыгина А.-П. С., Стукова М. А., Егоров А. Ю. Усиление иммуногенности вируса гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. *Microbiology Independent Research journal*. 2018; 5(1): 36-47.
2. Vasilyev KA, Shurygina A-PS, Stukova MA, Egorov AY. Enhanced CD8+ T-cell response in mice immunized with NS1-truncated influenza virus. *Microbiology Independent Research journal*. 2020; 7(1): 24-33.

Тезисы:

1. Shurygina A.-P., **Vasilyev K.**, Zabolotnykh N., Vinogradova T., Romanovskaya-Romanko E., Buzitskaya Zh., Sansyzbay A., Khairullin B., Stukova M. Mucosal influenza vectored tuberculosis vaccine enhances priming of innate and adaptive T-cell immunity to Mycobacterium tuberculosis // International conference “Trends in Influenza Research” September 18-20, 2017. – Saint-Petersburg. – Abstract book, –p. 106-107
2. **Vasilyev K.**, Shurygina A-P., Yukhneva M., Romanovskaya-Romanko E., Stukova M., Egorov A. Innate immune response to influenza A virus with truncated NS1 protein in mice // International conference “12th Vaccine Congress” 16-19 September, 2018. – Budapest – Abstract book, P2.02
3. **Vasilev K.**, Stukova M., Egorov A. Mucosal immunization with the influenza A virus encoding truncated NS1 protein protects mice from heterologous challenge // International conference “Options X for the Control of Influenza” 28 August – 1 September, 2019. – Singapore – Abstract book, –p. 381

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

LD₅₀ – 50% летальная доза

MDCK – Madin–Darby canine kidney

NS124 – вирус гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий укороченный до 124 а.к. белок NS1

NSfull – вирус гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий полноразмерный белок NS1

а.к. - аминокислота

АПК – антиген-презентирующие клетки

T-reg – T-регуляторные лимфоциты

РКЭ – Развивающиеся куриные эмбрионы

ТИД₅₀ – 50% тканевая инфекционная доза

ИФА – Иммуноферментный анализ

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.б.н. Егорову Андрею Юрьевичу за предложенную интересную тему диссертации, консультативную помощь при планировании и проведении экспериментов, доброжелательное и внимательное отношение на всех этапах работы.

Автор благодарит заведующую лабораторией векторных вакцин ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» к.м.н. Стукову Марину Анатольевну, а также сотрудников лаборатории: к.б.н. Сергееву Марию Валерьевну, к.б.н. Романовскую-Романько Екатерину Андреевну, к.б.н. Бузитскую Жанну Валерьевну, Пулькину Анастасию Александровну за практическую и консультативную помощь, оказанную в ходе выполнения диссертационного исследования. Отдельную благодарность автор выражает к.м.н. Шурыгиной Анне-Полине Сергеевне за всестороннюю помощь и моральную поддержку.

Автор благодарит рецензентов д.б.н. Кривицкую Веру Зорьевну и д.б.н. Головкина Алексея Сергеевича за внимательное прочтение работы и ценные замечания.