

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Васильев Кирилл Александрович

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

03.02.02 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Егоров Андрей Юрьевич

Санкт-Петербург

2020

Оглавление

1. Введение	4
2. Обзор литературы	9
2.1. Вирус гриппа: структурно-функциональная организация вириона, цикл репродукции.....	9
2.2. Врожденный иммунный ответ на вирус гриппа	13
2.3. Адаптивный иммунный ответ на вирус гриппа	23
2.4. Белок NS1 как многофункциональный фактор избегания иммунного ответа.....	33
2.5. Современные подходы к вакцинопрофилактике гриппа.....	35
2.6. Подходы к созданию универсальной вакцины от гриппа	38
3. Материалы и методы	53
4. Результаты	57
4.1. Изучение патогенности, репродуктивной активности и кросс-протективных свойств вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124	57
4.1.1. Продукция цитокинов воспаления в респираторном тракте мышей в ответ на заражение штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124.....	58
4.1.2. Интраназальная иммунизация штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 вызывает перекрестную защиту от вирусов A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04.....	60
4.2. Изучение врожденного иммунного ответа на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации	62
4.2.1. Вирус A/PR/8/34-NS124 характеризуется повышенной цитокиногенностью, по сравнению с A/PR/8/34 при интраперитонеальной иммунизации	63
4.2.2. Оптимизация метода выявления основных популяций клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей	64
4.2.3. Динамика относительного состава клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124.....	66
4.2.4. Иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 приводит к усилению экспрессии ко-стимуляторного фактора CD86.....	68
4.3. Оценка адаптивного иммунного ответа на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации.....	70
4.3.1. Оптимизация метода оценки иммунного ответа на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации.....	70
4.3.2. Иммунный ответ на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации имеет дозозависимый характер.....	72
4.3.3. Эпитопы вируса A/PR/8/34-NS124 обладают повышенной иммуногенностью при интраперитонеальной иммунизации	73
4.3.4. Полифункциональные CD8 ⁺ Т-лимфоциты мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34-NS124, обладают повышенной экспрессией IFN γ	79
4.3.5. Различия в уровне иммунного ответа на антигенные детерминанты гриппа частично сохраняются через 21 день после иммунизации вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124.....	81
4.3.6. Гуморальный иммунный ответ на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации	83

4.4. Изучение гетерологичной защиты при интраперитонеальной штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124	84
4.5. Изучение механизмов формирования перекрестной защиты при интраназальной иммунизации штаммами A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34.....	86
4.5.2. Гуморальный иммунный ответ на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраназальной иммунизации	89
4.5.3. Интраназальная иммунизация штаммом A/PR/8/34-NS124 предотвращает летальность и снижает патологию при заражении вирусом A/Aichi/2/68	90
4.5.4. Интраназальная иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 снижает уровень цитокинового ответа на заражение штаммом A/Aichi/2/68	91
4.5.5. Снижение инфильтрации легких при заражении A/Aichi/2/68 после иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124	93
4.5.6. Мыши, иммунизированные штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, обладают повышенным содержанием Т-регуляторных клеток в легких.....	96
4.5.7. Мыши, иммунизированные штаммом A/PR/8/34-NS124, характеризуются усилением адаптивного иммунного ответа при заражении вирусом A/Aichi/2/68.....	98
5. Обсуждение	100
Список сокращений.....	114
Список литературы	116

1. Введение

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 [1]. Эффективность профилактической вакцинации у лиц в возрасте 18-65 лет составляет 59-75%. В то же время у лиц младшего и пожилого возраста, а также у людей с хроническими заболеваниями, данный показатель обычно находится ниже 60%. [2–6]. Для формирования протективного поствакцинального иммунного ответа требуется совпадение антигенной структуры компонентов вакцины и циркулирующих штаммов вируса гриппа. Данное обстоятельство, в условиях постоянного антигенного дрейфа вирусов, делает необходимым ежегодный пере выпуск вакцины и ревакцинацию населения. Нередко выпуск сезонных вакцин сопровождается ошибками прогнозирования циркулирующих штаммов вируса гриппа, что приводит к резкому снижению эффективности вакцинации. При появлении пандемических штаммов, таких как A/California/7/2009 (H1N1pdm09), сезонные вакцины оказываются неэффективными. Кроме того, известен ряд случаев заражения человека вирусами птичьего гриппа подтипов H5N1, H7N9, H9N2, H6N1, H7N3 и H10N8. Некоторые из них, в частности H5N1 и H7N9, представляют повышенную опасность, поскольку вызывают тяжелые заболевания, приводящие к гибели 50% инфицированных людей [7,8]. Изложенные обстоятельства указывают на необходимость создания вакцин, способных индуцировать кросс-протективный иммунный ответ против вирусов гриппа различных серотипов и дрейфовых вариантов вируса внутри одного подтипа [9–11].

Одним из перспективных подходов 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 [12]. При этом, иммуногенность вирусных белков не является постоянной характеристикой, но изменяется в зависимости от доступности соответствующих эпитопов для презентации в составе МНС-I/II, дозы антигена и цитокинового микроокружения [13]. Кроме того, на иммуногенность оказывает влияние вариабильность антигенных детерминант, а также конкуренция Т-лимфоцитов различной специфичности за доступ к соответствующим комплексам пептид-МНС [14,15].

Вирусы гриппа обладают механизмами подавления иммунного ответа организма-хозяина. Данная способность обусловлена, преимущественно, активностью белка NS1. Удаление данного белка приводит к неспособности вирусов размножаться в интерферон-компетентных системах, таких как клетки линии MDCK или куриные эмбрионы, однако не влияет на репродуктивную активность в клетках линии Vero, характеризующихся дефицитом α - и β -IFN [16,17]. В настоящее время известно, что белок NS1 играет роль антагониста интерферонового сигнального пути, взаимодействуя с различными факторами врожденного иммунитета. У вирусов с укороченным белком NS1 снижена способность к репликации в респираторном тракте животных. Тем не менее, данные вирусы вызывают развитие полноценного врожденного и адаптивного противовирусного иммунного ответа, приводящего к формированию антител к поверхностным антигенам вируса, а также антигенспецифичных CD4⁺- и CD8⁺-Т-лимфоцитов в легких и лимфоузлах, дренирующих респираторный тракт [18,19]. Можно предположить, что подавление иммуносупрессорной функции белка NS1 приведет к усилению иммуногенности консервативных антигенных детерминант вируса гриппа и позволит расширить спектр штаммов, распознающихся 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 [16,17]. 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 [20–25] и вируса гриппа В [26,27] с делетированным или укороченным белком NS1. В ходе клинических исследований 1-2 фазы была показана безопасность и иммуногенность живых интраназальных сезонных и пандемических вакцин на основе вируса гриппа с удаленной рамкой считывания белка NS1 [28,29]. Высокая иммуногенность и самоадьювантные свойства вирусов с модифицированным геном NS делают их эффективным инструментом для создания векторных вакцин мукозального применения, обеспечивающих доставку в организм генетического материала патогенов, не родственных вирусу гриппа [30].

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 применялись 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.

2. Обзор литературы

2.1. Вирус гриппа: структурно-функциональная организация вириона, цикл репродукции

Семейство *Orthomyxoviridae* включает четыре типа вирусов гриппа: А, В, С и D. Вирусы гриппа А и В вызывают острые респираторные заболевания у человека. По оценкам ВОЗ, число инфицированных ежегодно достигает 1 миллиарда, включая 3-5 миллионов случаев тяжелых заболеваний и 300 000–500 000 случаев со смертельным исходом [1]. Симптомы гриппа варьируют от сравнительно легких (кашель, боль в горле, повышение температуры, мышечная и головная боль), до чрезвычайно тяжелых (сосудистый коллапс, отёк мозга, геморрагический синдром), часто приводящих к летальному исходу. До 95% случаев гибели от гриппа обусловлено развитием вторичных бактериальных пневмоний [1].

Организация генома и структура вириона

(-)РНК-геном вирусов гриппа А содержит 8 сегментов, которые кодируют до 17 полипептидов (Рис.1). Каждый сегмент содержит информацию об одном или двух коровых белках и альтернативных сплайс-вариантах. Наличие последних различается от штамма к штамму.

Первый генетический сегмент кодирует компонент полимеразного комплекса PB2 [31] и белок PB2-S1, который встречается только у некоторых штаммов. PB2 взаимодействует с белком PA, распознает кэп на 5'-конце клеточной пре-мРНК. Функция PB2-S1 пока не установлена [32]. В состав РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса гриппа входят также белки PB1 и PA, которые экспрессируются с геномных сегментов 2 и 3.

Второй сегмент кодирует белок PB1 и его укороченные формы - PB1-N40 и PB1-F2. PB1 катализирует синтез вирусных РНК, а PB1-N40 взаимодействует с клеточными РНК-полимеразами и регулирует экспрессию вирусных генов [33]. Белок PB1-F2 регулирует функции PB1, активирует митохондриальный путь индукции апоптоза, усиливает макрофагальную и нейтрофильную инфильтрацию, способствует развитию вторичных бактериальных осложнений [34,35].

Третий геномный сегмент дает начало белкам PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X. PA взаимодействует с PB1, отщепляет кэп от 5'-конца клеточной м-РНК, благодаря эндонуклеазной активности [36]. Функции молекул PA-N155 и PA-N182 слабо изучены. Они не принимают участия в репликации генома, но, вероятно, регулируют жизненный цикл вируса. Фактор патогенности PA-X подавляет ответ клетки на вирусную инфекцию [37].

Геномные сегменты 4, 5 и 6 кодируют по одному белку: HA, NP и NA. Гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) входят в состав оболочки вириона и обеспечивают, соответственно, проникновение вируса в клетку и расщепление сиаловых кислот в процессе высвобождения

новых вирусных частиц [38]. Нуклеопротеин (NP) отвечает за упаковку вирусной РНК, участвует в транскрипции и репликации генома [39,40].

Седьмой сегмент кодирует белок M1, а также альтернативную сплайс-форму – трансмембранный белок M2. Структурный белок M1 обеспечивает прикрепление рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса к внутренней стороне вирусной мембраны. Кроме того, M1 взаимодействует одновременно с NP и NS2 и участвует в экспорте RNP из ядра [41,42]. Белок M2 играет роль ионного канала, который снижает pH внутренней среды вириона, что необходимо для высвобождения вирусного генома [43,44]. Некоторые штаммы кодируют белок M42, функционально схожий с M2, но отличающийся структурой эктодомена [45].

Восьмой сегмент вирусного генома содержит информацию о двух неструктурных белках, формирующихся в результате альтернативного сплайсинга: NS1 и NS2. Основная функция белка NS1 - подавление экспрессии интерферонов (более подробно функции данного белка рассмотрены в разделе 2.4) [17]. Белок ядерного экспорта NS2 отвечает за перемещение вирусных РНК из ядра в цитоплазму [42]. Сравнительно недавно был обнаружен третий сплайс-вариант, экспрессирующийся с восьмого геномного сегмента: NS3, функционально схожий с белком NS1 [46].

Вирионы вируса гриппа А имеют сферическую или нитевидную форму. В последнем случае их длина может достигать 10 мкм. Диаметр сферических вирионов составляет 60-100 нм [47,48]. Морфология вирусной частицы зависит от организации цитоскелета зараженной клетки. Поляризованные эпителиоциты дают начало нитевидным вирионам, а неполяризованные фибробласты – сферическим [49]. Разрушение актинового цитоскелета блокирует формирование нитевидных, но не сферических вирусных частиц [50].

Внутри вириона содержится по одной копии каждого геномного сегмента, ассоциированного с компонентами полимеразного комплекса (PB2, PB1 и PA) и множеством копий белка NP. Также в составе вириона в небольших количествах присутствуют белки NS1 и NS2 [51]

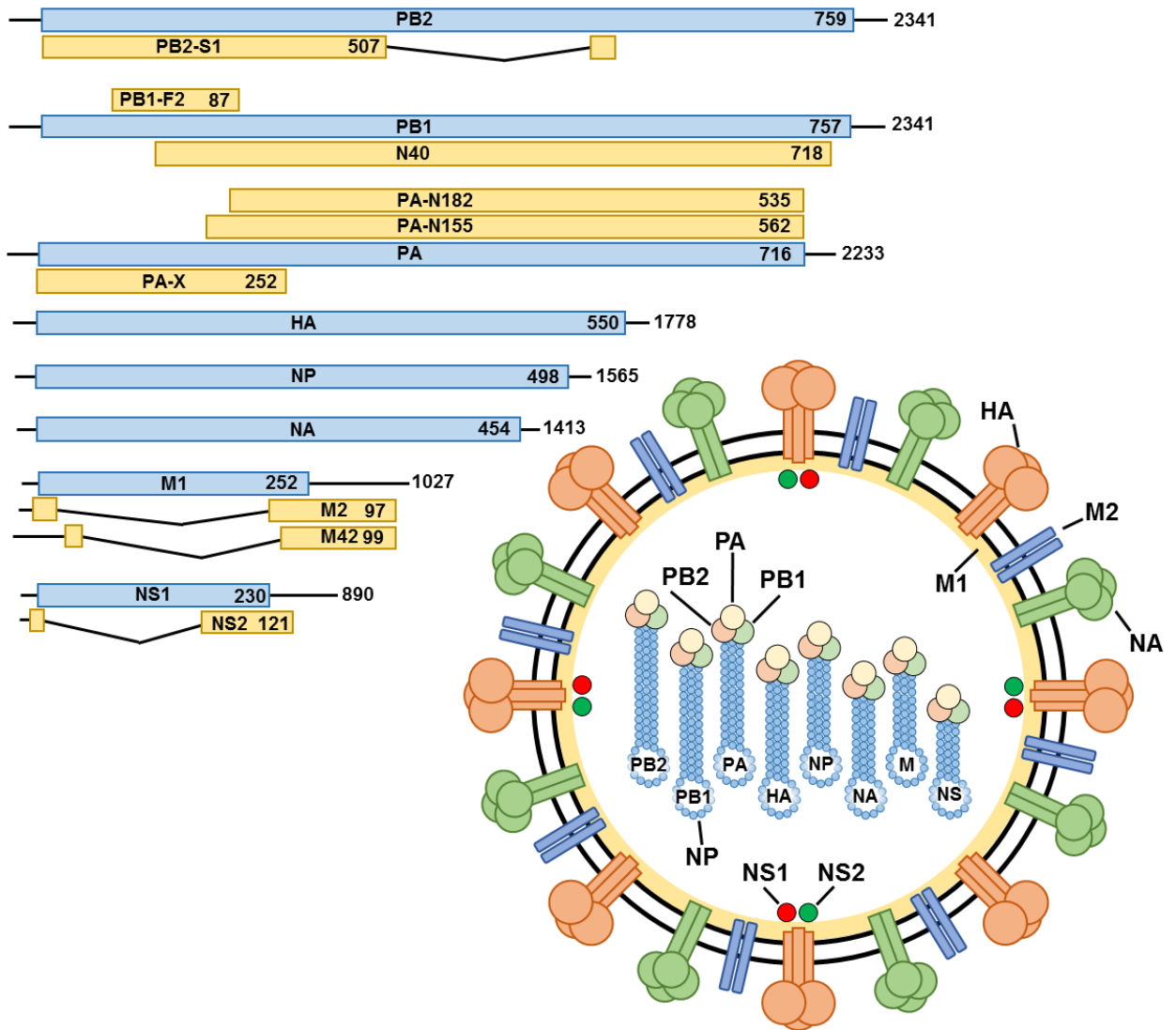


Рисунок 1. Структура генома вируса гриппа А и организация вириона. Представлена схема вирусного генома с указанием длин РНК-сегментов (в н.п.) и длин соответствующих белковых продуктов (в а.к.). Схематическое изображение вириона отражает локализацию вирусных белков.

Жизненный цикл вируса гриппа

Жизненный цикл вируса начинается с прикрепления к сиаловым кислотам на поверхности клетки организма-хозяина. На основании типа связи между моносахаридом и остатком N-ацетилнейраминовой кислоты выделяют два вида сиаловых кислот, с которыми может взаимодействовать вирус: $\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$. Оба вида рецепторов широко распространены в тканях млекопитающих и птиц [52,53], но в респираторном тракте человека доминируют $\alpha 2,6$ -сиаловые кислоты [54]. Взаимодействие с рецептором реализуется за счет гемагглютинаина (НА) и приводит к запуску рецептор-опосредованного эндоцитоза и интернализации вириона [55]. Активация гемагглютинаина происходит под воздействием клеточных протеаз, которые расщепляют его на субъединицы НА1 и НА2. Штаммы вируса гриппа различаются по чувствительности к протеазам организма-хозяина, что обуславливает тканевой тропизм вирусов,

а также их патогенность. Например, НА нейротропного вируса A/WSN/33 (H1N1) расщепляется под действием плазима, который экспрессируется в нервной ткани [56]. Активации НА большинства штаммов вируса гриппа человека и птиц способствует трипсин [57]. Сравнение 16 подтипов НА продемонстрировало существенные различия между штаммами по степени чувствительности к TMPRSS2 (трансмембранная сериновая протеаза 2), HAT (трипсиноподобная протеаза респираторного тракта человека) и трипсину поджелудочной железы [58].

Защелчение внутренней среды эндосомы индуцирует конформационные изменения в НА, приводящие к высвобождению пептида слияния и его внедрению в мембрану с последующим слиянием вирусной и клеточной оболочки [59]. Кроме того, снижение pH активирует транспорт протонов внутрь вириона через белок M2. Защелчение среды внутри вириона ослабляет взаимодействия между M1 и RNP и делает возможным перемещение вирусного генома в клеточное ядро в ассоциации с импортинами, которые распознают сигналы ядерной локализации в составе NP [41]. После того, как вирусные геномные сегменты преодолевают ядерную оболочку, начинается их транскрипция. РНК-полимераза вируса гриппа не обладает метилтрансферазной активностью и не способна модифицировать крайний 5'-нуклеотид с образованием кэпа [60]. Это обстоятельство преодолевается за счет использования в качестве праймеров для инициации транскрипции кэпированных олигонуклеотидов, отщепленных от клеточных мРНК [61]. Многократное прочтение поли-U-участка на конце каждого геномного сегмента приводит к полиаденилированию 3'-конца вирусных пре-мРНК [62].

Вирусная мРНК может подвергаться альтернативному сплайсингу при участии клеточных механизмов [63]. В зависимости от фазы жизненного цикла вируса, один и тот же геномный сегмент может давать начало как сплайсированной так и несплайсированной мРНК [64]. В частности, белок ранней фазы NS1, экспрессируется с несплайсированного транскрипта, но на поздних стадиях жизненного цикла пре-мРНК NS1 подвергается сплайсингу и дает начало белку NS2. Существуют свидетельства того, что белок NS1 участвует в регуляции процессинга собственной пре-мРНК, координируя различные этапы инфекции [65].

Репликация вирусного генома иницируется сразу после проникновения вирусных рибонуклеопротеиновых комплексов в ядро, одновременно с запуском транскрипции ранних генов. На первом этапе репликации субъединица полимеразного комплекса PB1 запускает синтез (+)РНК-интермедиата с 3'-конца каждого геномного сегмента [66]. Репликация вирусного генома не требует наличия праймера и не сопровождается полиаденилированием образовавшихся молекул. (+)РНК интермедиат содержит на обоих концах некодирующие последовательности, которые используются в качестве промоторов для синтеза геномной РНК [67]. Поскольку транскрипцию и репликацию генома осуществляет вирусный полимеразный комплекс, для корректного тайминга жизненного цикла вируса и поддержания нужного соотношения (+)РНК-

интермедиатов, мРНК и геномной РНК, необходима тонкая регуляция каждого этапа инфекционного процесса. Показано, что белки полимеразного комплекса и нуклеопротеин поддерживают стабильность (+)РНК, уровень которой особенно важен для переключения между этапами жизненного цикла [68].

Экспорт новообразованных вирусных RNP из ядра в цитоплазму обеспечивают вирусные белки M1 и NS2 [69], а также клеточный фактор CRM1. M1 играет роль связующего звена между RNP и NS2, который, в свою очередь, взаимодействует с CRM1 и нуклеопоринами [70,71]. Участие CRM1 в ядерном экспорте вирусных геномных сегментов было показано при помощи блокатора ядерного транспорта лептомицина В [72]. После выхода из ядра вирусные RNP используют Rab-11-зависимую систему цитоплазматического транспорта для перемещения к клеточной мембране, где происходит сборка и отпочковывание вирионов [73].

В оболочке вируса представлены белки HA, NA и M2, которые синтезируются на мембран-ассоциированных рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума (шЭПР) [74]. Гликозилирование HA и NA осуществляется в аппарате Гольджи. Оттуда белки поступают к цитоплазматической мембране и аккумулируются в области липидных рафтов, в периферических областях которых концентрируется также белок M2 [75,76]. Белок M1 стабилизирует вирион, образуя мост между RNP и белками оболочки HA и NA [77].

Вирус гриппа имеет сегментированный геном и нуждается в регуляторных механизмах, обеспечивающих включение только одной копии каждого сегмента в состав вириона. Упаковка генома регулируется специальными последовательностями на конце каждой цепи РНК. Эти последовательности располагаются между концевыми некодирующими участками и центральным кодирующим регионом каждого геномного сегмента [78]. В состав вириона, помимо факторов, стабилизирующих структуру вирусной частицы, входит небольшое количество белка NS1, который долгое время считался неструктурным, и некоторые клеточные белки [45]. Отпочковывание вириона обеспечивают белки M2 [76] и Rab-11 [48]. После того, как нейраминидаза (NA) расщепляет сиаловые кислоты гликокаликса, вирионы отделяются от клетки, и инфекционный цикл повторяется [38].

2.2. Врожденный иммунный ответ на вирус гриппа

2.2.1. Респираторный эпителий: распознавание вируса и активация защитных реакций

После преодоления мукозального барьера, вирус гриппа заражает эпителиоциты. У большинства инфицированных индивидов репликация вируса протекает в верхних дыхательных путях, однако в тяжелых случаях патоген проникает и в нижние отделы респираторной системы. Клетки респираторного эпителия распознают вирус при помощи паттерн-распознающих рецепторов (PRR). Молекулы RIG-I, NLR, TLR3 и TLR7/8 взаимодействуют с рибонуклеиновыми кислотами и обеспечивают распознавание РНК-содержащих вирусов, в том числе вируса гриппа

[79,80]. Рецепторы TLR3 и TLR7/8 располагаются в эндосомах и активируются в ответ на взаимодействие с двуцепочечной или одноцепочечной РНК, соответственно. TLR3 играет важную роль в индукции противогриппозного иммунного ответа [81,82]. Показано, что интраназальное введение лиганда TLR3 (поли-И:С) защищает мышей от летальной дозы вируса гриппа [83]. Кроме того, у мышей, нокаутированных по гену *TLR3*, цитотоксическая активность CD8⁺ Т-лимфоцитов ниже, чем у животных дикого типа [84]. Активированные TLR взаимодействуют с адаптерными молекулами MyD88 или TRIF. Это приводит к запуску сигнальных каскадов, завершающихся транслокацией в ядро транскрипционных факторов IRF3/7 и NF-κB, которые индуцируют экспрессию IFN I [85].

РНК-рецептор RIG-I обеспечивает распознавание нуклеиновых кислот вируса гриппа в цитозоле. В норме экспрессия RIG-I находится на низком уровне, однако на фоне инфекции или под воздействием IFN I продукция данного фактора значительно усиливается [86]. Данный белок обладает РНК-геликазной активностью и содержит CARD-домен, обеспечивающий привлечение каспаз, которые запускают апоптоз в инфицированных клетках. Активация RIG-I приводит к фосфорилированию и перемещению в ядро факторов IRF3/7 и NF-κB, индуцирующих транскрипцию IFN I [86].

NOD-подобные рецепторы (NLR) NLRP3, NLRC2 и NLRX1 [87] активируются при взаимодействии с вирусной РНК [88,89], а также под действием белка M2, который вызывает нарушение ионного баланса в транс-сети аппарата Гольджи, продукцию активных форм кислорода и высвобождение катепсина В из лизосом [90,91]. Данные процессы приводят к образованию инфламмосомы, ключевым компонентом которой является NLRP3. Инфламмосома превращает прокаспазу-1 в активную форму, которая активирует цитокины IL-1β и IL-18, каспазы и протеазы [92]. NLRC2 (NOD2) распознает одноцепочечную РНК и, наряду с TLR3,7/8 и RIG-I, индуцирует экспрессию IFN I [93,94].

Важную роль в активации ранних этапов врожденного иммунного ответа играют молекулярные факторы, ассоциированные с тканевым повреждением (DAMP). К таким факторам относятся белки HMGB1, S100, мочевая кислота, АТФ и др. [95,96]. Распознавание DAMP приводит к активации сигнальных белков MyD88, NF-κB, MAPK, IRF3, запускающих экспрессию провоспалительных цитокинов [97].

2.2.2. Ранний цитокиновый ответ

IFN I

После распознавания PAMPs и DAMPs респираторные эпителиальные клетки секретируют цитокины и хемокины, привлекающие и активирующие клетки врожденного иммунитета. Большинство клеток организма млекопитающих в ответ на стимуляцию PRR продуцирует интерфероны I типа. Данное семейство включает 13 гомологичных подтипов IFNα,

один подтип $IFN\beta$ и еще 6 слабо изученных подтипов (ϵ , τ , κ , ω , δ , ζ) [98]. Интерфероны взаимодействуют с компонентами $IFNAR1$ и $IFNAR2$ гетеродимерных трансмембранных рецепторов, расположенных на поверхности клеток. Цитоплазматическая часть рецепторов ассоциирована с тирозиновыми киназами $JAK1$ и $TYK2$. Активация данных киназ приводит к фосфорилированию белков $STAT1$ и $STAT2$, которые димеризуются и транслоцируются в ядро. В ядре $STAT1/2$ и фактор $IRF9$ формируют комплекс $ISGF3$, активирующий транскрипцию интерферон-зависимых генов (ISG) [99]. Из нескольких сотен ISG наиболее изучены $MX1$, PKR , OAS , $IFITM$, виперин и тетерин [100]. Данные молекулы вступают в непосредственное взаимодействие с вирусными компонентами внутри зараженной клетки, препятствуют проникновению, репликации и сборке вирионов. Так, продукты гена Mx у человека (MxA , MxB) взаимодействуют с нуклеопротеином вируса гриппа, нарушая процесс репликации [101]. Протеинкиназа R (PKR) активируется в результате взаимодействия со вторичной структурой РНК на 5'-конце вирусного генома [102] и снижает трансляционную активность клетки за счет фосфорилирования $eIF2\alpha$ [103]. Белок OAS , действуя совместно с РНКазой L обеспечивает распознавание и деградацию вирусной РНК [104]. Виперин и тетерин ограничивают распространение инфекции, препятствуя отпочковыванию новых вирионов от клеточной поверхности [105,106]. $IFITM$ (интерферон-индуцируемый трансмембранный белок) препятствует проникновению вирионов в клетку [107], нарушая процесс слияния вирусной и эндосомальной мембраны [106].

Интерфероны I типа индуцируют развитие антивирусного статуса клеток, а также обладают рядом иммуномодулирующих функций. На ранних этапах инфекции под воздействием $IFN I$ происходит активация, дифференцировка и созревание клеток врожденного иммунитета, повышение уровня экспрессии $MHCI/II$ [108], костимуляторных молекул $CD40$, $CD80$, $CD83$, $CD86$, продукция хемокинов $CXCL9$ и $CXCL10$, усиление экспрессии хемокиновых рецепторов $CCR5$ и $CCR7$ [109,110]. $IFN I$ стимулирует $GM-CSF$ -опосредованную дифференцировку макрофагов в дендритные клетки, миграцию АПК в регионарные лимфоузлы [111]. Совокупное действие указанных факторов способствует активации T -лимфоцитов во вторичных лимфоидных органах [112,113]. Под воздействием $IFN I$ наиболее интенсивно дифференцируются $CD8^+$ цитотоксические T -лимфоциты и $CD4^+$ T -хелперы I типа ($Th1$). Это связано с тем, что $IFN\alpha/\beta$ задерживают закисление эндосом и переориентируют клетки на $MHCI$ -зависимую кросс-презентацию антигенов [114,115]. $IFN I$ способствует синтезу $IFN\gamma$ дендритными и NK -клетками [116], стимулируя $Th-1$ -поляризацию иммунного ответа. Также интерфероны усиливают экспрессию $IL-7$, играющего важную роль в дифференцировке тимоцитов и формировании клеток памяти [117].

Действие IFN I может сопровождаться рядом негативных побочных эффектов, особенно при затяжном характере заболевания. Хроническая инфекция, сопровождающаяся постоянной продукцией IFN I, способствует синтезу противовоспалительных факторов IL-10 и PDL1, что приводит к иммуносупрессии. При острой инфекции интерфероны нередко вызывают иммунопатологию. IFN α/β усиливает экспрессию проапоптотических рецепторов (TRAIL-рецептор, DR5) на эпителиальных клетках, что способствует повреждению легочной ткани [118]. Установлено, что мыши с нарушенной экспрессией интерфероновых рецепторов лучше переносят острую гриппозную инфекцию, что выражается в снижении патологии в легких и более высокой выживаемости, чем у животных дикого типа [119].

IFN III

IFN III продуцируются, преимущественно, в легочном эпителии [120]. К данному семейству цитокинов относятся IL-29, IL-28A, IL-28B, называемые также IFN λ 1-3 [98]. Действие IFN III имеет менее выраженные побочные эффекты по сравнению с IFN I [121]. Показано, что экспрессия данной группы цитокинов предшествует синтезу IFN I и сдерживает распространение вируса в верхних респираторных отделах на ранних стадиях инфекции. Мыши, не экспрессирующие IFN- λ характеризуются повышенным вирусовыделением [122].

IL-1 β и IL-18

После того, как рецепторы семейства NLR распознают вирусные компоненты, формируется инфламасома, преобразующая предшественник IL-1 β в активную форму. IL-1 β стимулирует продукцию других цитокинов и хемокинов эпителиальными клетками легких и привлекает клетки врожденного иммунитета [123]. Действие данного цитокина может приводить к развитию иммунопатологии [124]. При помощи ингибиторов NLRP3 было показано, что продукция IL-1 β на ранних стадиях иммунного ответа способствует быстрой элиминации патогена, однако на поздних стадиях инфекции данный цитокин индуцирует слишком сильную воспалительную реакцию, которая приводит к гибели экспериментальных животных [125]. Иммунный гомеостаз в легочной ткани поддерживается при помощи противовоспалительных факторов IL-1RA и sIL-1RII, которые инактивируют IL-1 β [126].

IL-18 тоже активируется после сборки инфламасомы. Под воздействием IL-18, NK-клетки и CD8⁺-цитотоксические Т-лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины [127]. В ответ на сочетанное действие IFN I и IL-18 продуцируется IFN γ , способствующий элиминации патогена [128]. IL-18 участвует в регуляции иммунного ответа. Плазмацитоидные дендритные клетки человека экспрессируют рецептор IL-18R α 1 после контакта с вирусом гриппа. В ответ на блокировку данного рецептора усиливается синтез IFN α [129]. Гиперпродукция IL-18 вызывает иммунопатологию [130].

TNF α

TNF α продуцируют эпителиоциты респираторной системы, дендритные клетки, хелперные и цитотоксические Т-лимфоциты. Данный цитокин может оказывать как провоспалительное (стимуляция продукции цитокинов, усиление клеточной пролиферации, запуск некроза), так и противовоспалительное действие (снижение синтеза медиаторов воспаления, подавление фагоцитоза, индукция апоптоза) [131,132]. TNF α несущественно влияет на репродуктивную активность вируса гриппа, однако чрезвычайно важен для предотвращения вторичных бактериальных осложнений, часто сопровождающих гриппозную инфекцию. Гиперпродукция TNF α оказывает негативное влияние на состояние организма. Он является главным участником «цитокинового шторма» и приводит к серьезной иммунопатологии в легких человека и экспериментальных животных [133]. Мыши, не экспрессирующие рецептор TNFR1 переносят заражение штаммом H5N1 значительно лучше, чем животные дикого типа [134]. Показано также, что подавление экспрессии TNF α на фоне инфекции вирусом A/X31 (H3N2) снижает потерю веса и улучшает состояние зараженных животных [135].

IL-6

Уровень IL-6 положительно коррелирует с тяжестью симптомов гриппозной инфекции [136], однако подавление экспрессии данного цитокина не улучшает выживаемость экспериментальных животных [137]. Напротив, продукция IL-6 необходима для выживания при заражении сублетальными дозами вируса гриппа. Отсутствие IL-6 в таких случаях ведет к усилению легочной патологии, увеличению вирусовыделения и значительному сокращению числа нейтрофилов в легочной ткани. IL-6-опосредованный сигналинг важен для дифференцировки CD4⁺-фолликулярных Т-хелперов, В-лимфоцитов, активации антительного ответа [138]. IL-6 совмещает про- и противовоспалительные функции. Он способствует дифференцировке макрофагов, однако ограничивает формирование дендритных клеток. Подавляет активность NF- κ B и экспрессию CCR7, но повышает уровень растворимых рецепторов TNF α [139]. Ингибирует экспрессию CXCL1, CXCL8 и CX3CL1, но способствует синтезу CXCL5, CXCL6, CCL2 и CCL8, а также регулирует уровень адгезионных молекул CD62L, ICAM-1 и VCAM-1 на поверхности лейкоцитов

TGF β

TGF β интенсивно экспрессируется в респираторном эпителии на ранних стадиях инфекции [140]. Гиперпродукция данного цитокина снижает воспаление, однако препятствует элиминации патогена [141]. Вирус гриппа использует регуляторный потенциал TGF β для подавления иммунного ответа организма-хозяина: белок NA активирует предшественник TGF β , что приводит к подавлению экспрессии IFN I и усилению толерантности организма к вирусу [142]. Снижение уровня TGF β приводит к развитию иммунопатологии, потери веса,

интенсификации воспалительных процессов в респираторной системе [140]. Мыши с нарушенной экспрессией TGF β лучше справляются с гриппозной инфекцией. Макрофаги в дыхательной системе таких животных постоянно находятся в активированном состоянии и быстрее реагируют на проникновение патогена [143].

Прочие факторы раннего иммунного ответа

Хемокины CXCL2 и CCL2 (MCP-1) привлекают моноциты, макрофаги, нейтрофилы и базофилы в очаг инфекции. Как и многие другие медиаторы воспаления, CXCL2 и CCL2 могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на организм. Выживаемость мышей, не экспрессирующих рецептор CCR2, была выше, чем выживаемость животных дикого типа [144], несмотря на замедленную элиминацию патогена [145].

Заслуживает внимания также IL-33. Экспрессия данного цитокина активируется в ответ на тканевое повреждение. IL-33 стимулирует продукцию амфирегулина Т-регуляторными клетками, что способствует репарации легочной ткани [146].

Респираторный эпителий активируется на самых ранних этапах вирусной инфекции в результате распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов вируса гриппа. Происходит усиление продукции факторов воспаления и запуск внутриклеточных защитных механизмов, препятствующих репликации вируса. В ответ на повышение в межклеточном матриксе концентрации цитокинов, клетки врожденного иммунитета интенсивно мигрируют в очаг воспаления, элиминируют патоген и вовлекают в иммунный ответ компоненты адаптивного иммунитета.

2.2.3. Клеточный врожденный иммунный ответ

Нейтрофилы

Нейтрофилы и резидентные макрофаги составляют первую линию противовирусной защиты. На мышинной модели было показано, что нейтрофилы обеспечивают контроль над распространением инфекции и клиренс вируса [147]. Данные клетки активно фагоцитируют вирусные частицы, однако, в отличие от макрофагов, не способны поддерживать репликацию вируса гриппа [148]. Нейтрофилы интенсивно мигрируют в очаг инфекции на ранних стадиях заражения. За ними следует небольшое число Т-лимфоцитов, которые активируются и пролиферируют *in situ* в ответ на антигены, презентруемые миелоидными клетками [149]. Кроме того, нейтрофилы стимулируют пролиферацию некоторых неспецифических Т-лимфоцитов. Побочная активация Т-клеток имеет важное значение для контроля инфекции на ранних стадиях заболевания [150]. Нейтрофилы привлекают Т-лимфоциты при помощи CXCL12. Данный хемокин синтезируют также эпителиальные клетки легких, однако при экзоцитозе он накапливается в непосредственной близости от эпителиоцитов, в то время как нейтрофилы

повышают концентрацию CXCL12 в соединительной ткани. В результате формируются хемокиновые следы, направляющие миграцию лимфоцитов [151].

На фоне воспаления нейтрофилы обнаруживаются в лимфоузлах и селезенке [152]. Они проникают в периферические органы иммунной системы через кровеносные или лимфатические сосуды при помощи рецепторов MАС-1 и CXCR4 [152,153]. Нейтрофилы мышей осуществляют МНС-I-зависимую презентацию вирусных антигенов, а также экспрессируют костимуляторные молекулы CD80 и CD86 [154,155]. Относительно презентации интернализованных антигенов через МНС-II существуют противоречивые сведения: согласно данным Hufford et al., 2012 [155], нейтрофилы не экспрессируют МНС-II, что, тем не менее, не исключает возможности кросс-презентации фагоцитированных антигенов через МНС-I. Другие исследования показали, что после инкубации с Т-лимфоцитами *in vitro*, нейтрофилы экспрессируют МНС-II на низком уровне и приобретают способность активировать CD4⁺ Т-клетки [156].

НК-клетки

В отличие от Т-лимфоцитов, НК-клетки не нуждаются в предварительной селекции для распознавания вирусных антигенов. Рецепторы NKp46 и NKG2D взаимодействуют с НА вируса гриппа на мембранах зараженных эпителиоцитов, после чего НК-лимфоциты секретируют перфорины и гранзим В, который индуцирует апоптоз в зараженных клетках [157]. Часть НК-клеток постоянно присутствует в легочной ткани, однако на фоне инфекции их популяция пополняется НК-клетками крови. В результате у человека при гриппе снижается число периферических CD56⁺-лимфоцитов [158,159].

Роль НК клеток не ограничивается выполнением киллерной функции. Они вносят значительный вклад в активацию и регуляцию адаптивного иммунитета. НК-клетки продуцируют IL-10, а также цитокины, вызывающие дифференцировку Т-хелперов второго типа. Исследования последних лет позволили выявить ранее неизвестную способность НК-клеток к формированию иммунологической памяти. Впервые это свойство было описано на модели цитомегаловирусной инфекции, однако схожие процессы осуществляются и при гриппе. Кроме того, данные лимфоциты способствуют регенерации тканей [160].

Существует также ряд свидетельств негативного влияния НК-клеток на течение гриппозной инфекции. Установлено, что выживаемость мышей, инфицированных высокой дозой вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34, повышается при снижении числа НК-клеток. В настоящее время считается, что роль данной популяции в развитии иммунного ответа зависит от дозы антигена [161].

Выделяют также популяцию НКТ-лимфоцитов, обладающую сходством как с НК-клетками, так и с Т-лимфоцитами. НКТ-клетки экспрессируют TCR, который взаимодействует не с МНС, а с молекулами CD1d. Данные гликопротеины экспрессируются на поверхности АПК

и презентуют Т-лимфоцитам липидные антигены бактериального происхождения. У мышей NKT-клетки снижают вирусную нагрузку и сопряженную с инфекцией иммунопатологию за счет продукции $IFN\gamma$ и IL-22 [162].

Макрофаги и моноциты

Макрофаги легких подразделяются на три группы на основании локализации в ткани и экспрессии маркеров CD11b и CD11c. Альвеолярные макрофаги обнаруживаются в воздухоносных путях (bronхи, бронхиолы, альвеолы) и имеют фенотип $CD11c^{high}CD11b^{-}$. Интерстициальные макрофаги ($CD11c^{+/-}CD11b^{+}$) находятся в соединительной ткани. Эксудативные макрофаги ($CD11c^{low}CD11b^{high}$) мигрируют в легкие во время воспалительных реакций. Для того чтобы отличить макрофаги от дендритных клеток используют дополнительные фенотипические маркеры, например CD64 и F4/80.

Альвеолярные макрофаги представляют собой наиболее многочисленную популяцию клеток врожденного иммунитета в воздухоносных отделах легких. В норме данные клетки продуцируют регуляторные цитокины IL-10, TGF β , а также оксид азота II (NO) [146], подавляя активность других резидентных клеток врожденного иммунитета. Альвеолярные макрофаги ингибируют антиген-презентирующую активность дендритных клеток *in vitro* [146,163]. Мыши со сниженным числом альвеолярных макрофагов имеют предрасположенность к развитию иммунопатологии [164].

Активация макрофагов в результате контакта с патогеном и действия цитокинов сопровождается дифференцировкой по M1 или M2 направлению. M1-макрофаги продуцируют провоспалительные молекулы TNF- α , IL-1 β , IL-12 и iNOS, экспрессируют поверхностные активационные маркеры MHC-II, CD80, CD86 и CCR2. M2-макрофаги экспрессируют, преимущественно, противовоспалительные факторы, такие как IL-10, IL-1Ra, аргиназа 1, FIZZ и YM1/2. На поверхности M2-макрофагов в ответ на действие IL-4 и IL-13 повышается уровень маннозных рецепторов MR и CD206, дектина-1 и CD200R [165]. Переключение между M1 и M2-типом дифференцировки обеспечивают, соответственно, транскрипционные факторы STAT1, STAT3/STAT6, SOCS2 и SOCS3 [166]. Подразделение макрофагов на M1 и M2 весьма условно. Включение в анализ дополнительных маркеров позволяет выявить гораздо большее число направлений дифференцировки. Тем не менее, в настоящее время обозначение «M1» закрепилось за провоспалительными популяциями макрофагов, а «M2» - за противовоспалительными. Маркеры MHC II, CD80 и CD86 характерны для M1-макрофагов. M2-макрофаги выявляют по наличию молекул CD206, CD163, CD204. Недавно был предложен удобный способ разделения M1 и M2-макрофагов на основании экспрессии CD38 и Egr2, соответственно [167,168].

На фоне гриппозной инфекции происходит M1-дифференцировка макрофагов. Усиливается продукция цитокинов IFN I, IL-6, GM-CSF, TNF α , RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3),

MIP-1 β (CCL4), MCP (CCL2) и IP-10 (CXCL10) [169]. Макрофаги осуществляют фагоцитоз апоптотических клеток организма-хозяина, ограничивая распространение вируса [147]. Кроме того, они привлекают в очаг воспаления моноциты, дифференцирующиеся в дендритные клетки моноцитарного происхождения (moDC) и макрофаги [170,171]. moDC экспрессируют Ly6C, CD64, Mac-1 и CD209 [172,173]. Мигрирующие макрофаги на более поздних стадиях инфекции приобретают фенотип и регуляторные функции альвеолярных макрофагов, способствуя, таким образом, поддержанию иммунного гомеостаза легочной ткани. Максимальное число макрофагов обнаруживается в легких через 3 дня после инфекции, что совпадает с пиком вирусной репликации [172,173]. Удаление альвеолярных макрофагов до инфекции или в течение 3-х дней после ее начала приводит к неконтролируемой репликации вируса и значительному утяжелению заболевания [174]. Более того, сокращение числа альвеолярных макрофагов препятствует формированию вирус-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов, а также приводит к уменьшению титра антител на поздних стадиях инфекции [175].

Не смотря на очевидную протективную роль, которую макрофаги играют в иммунной защите против вирусов гриппа, их действие может оказаться негативным для организма-хозяина из-за гиперпродукции TNF α и NOS2, которая приводит к развитию иммунопатологии [176].

Дендритные клетки

Дендритные клетки на высоком уровне экспрессируют TLR3,7/8, RIG-I, NLR и прочие паттерн-распознающие рецепторы. В результате взаимодействия с патогеном данные клетки активируются и продуцируют провоспалительные цитокины IL-6, IL-12, TNF- α , IL-8, IP-10, RANTES, MIP-1 β , IFN α и IFN β [177]. Наиболее важная роль дендритных клеток – презентация антигенов. Данный процесс обеспечивает связь между компонентами врожденного и адаптивного иммунитета, запускает клональную экспансию Т-лимфоцитов специфичных к вирусу гриппа. Дендритные клетки гетерогенны по своему составу, фенотипу, происхождению, локализации и выполняемым функциям. Выделяют классические (кДК, cDC), плазмацитоидные дендритные клетки (пДК, pDC) и ДК моноцитарного происхождения (моДК, moDC). Эти популяции, в свою очередь, иногда дробятся на субпопуляции.

Плазмацитоидные ДК представляют собой минорную популяцию дендритных клеток. Они имеют общее происхождение с классическими ДК, но отличаются от последних особенностями жизненного цикла. Для пДК характерна экспрессия В-лимфоцитарного антигена B220, а также низкий уровень MHC-II и CD11c. После распознавания патогена, пДК интенсивно продуцируют IFN I типа и приобретают способность к презентации вирусных эпитопов в составе MHC-I [178]. Для пДК, в отличие от других популяций ДК, не характерна MHC-I-зависимая кросс-презентация интернализированных антигенов, поэтому они индуцируют CD8⁺ Т-клеточный ответ на вирусные белки, имеющие внутриклеточную локализацию. пДК аккумулируются,

преимущественно, в крови и лимфоидной ткани, однако присутствуют и в легочном интерстиции. В процессе вирусной инфекции резидентные пДК регулируют активность эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Отсутствие данных взаимодействий ведет к возникновению в легких недостатка эффекторных Т-клеток, что приводит к утяжелению заболевания и повышению смертности [179].

Классические дендритные клетки наиболее эффективно распознают тканевые повреждения и презентуют чужеродные антигены Т-лимфоцитам в составе МНС. кДК располагаются, преимущественно, в нелимфоидных тканях, а также в маргинальной зоне селезенки [180]. Субпопуляции кДК выделяют по наличию маркеров CD11b и CD103. В легких CD103⁺CD11b⁻ кДК располагаются в непосредственной близости от респираторных эпителиоцитов, тогда как CD103⁻CD11b⁺-клетки чаще встречаются под *lamina propria*. CD103⁺ кДК и CD11b⁺ кДК экспрессируют различные TLR и хемокиновые рецепторы. В частности, для CD103⁺ кДК характерно наличие TLR3, а для CD11b⁺ кДК – TLR7 [181]. При помощи рекомбинантного вируса гриппа, кодирующего зеленый флуоресцентный белок (GFP) в составе гена *NS* было показано, что CD103⁺ кДК и CD11b⁺ кДК различаются по миграционному потенциалу и способности к активации клеток адаптивного иммунитета. Через 48ч после иммунизации 8.5% CD103⁺ кДК медиастинальных лимфоузлов были позитивны по GFP, а среди CD11b⁺ кДК только 0.5% содержало флуоресцентный белок [182]. По мнению авторов исследования, эти результаты свидетельствуют о более интенсивной миграции CD103⁺ кДК в лимфоузлы, хотя могут указывать и на различия в перmissивности разных популяций ДК для вируса гриппа. Перемещение ДК можно отследить при помощи флуоресцентных красителей [183–185]. На фоне инфекции миграция клеток из легких в лимфоузлы интенсифицируется и достигает максимальных значений через 18ч после заражения. Повышенная миграционная активность сохраняется в течение 5-7 суток. За проникновение ДК в лимфоузлы отвечает хемокиновый рецептор CCR7 [186]. В лимфоузле CD103⁺CD11b⁻ кДК взаимодействуют с наивными CD8⁺ Т-лимфоцитами, вызывают их активацию и дифференцировку в эффекторные CTL [182,187]. кДК фагоцитируют инфицированные клетки, вступившие в процесс апоптоза и кросс-презентируют вирусные пептиды в составе МНС-I [181,188]. CD11b⁺CD103⁻ кДК, мигрируют в лимфоузлы на пике развития инфекции и обеспечивают формирование Т-клеток памяти [189]. Совместно с нейтрофилами и макрофагами, респираторные ДК в очаге инфекции способствуют выживанию эффекторных Т-лимфоцитов за счет презентации антигенов и продукции IL-15 [190]. Установлено, что CD103⁺CD11b⁻ кДК и CD11b⁺CD103⁻ кДК эффективно активируют CD4⁺ Т-лимфоциты в лимфоузлах [187].

CD8⁺ ДК составляют примерно 20-40% классических ДК лимфоузлов и селезенки. Данные клетки, как правило, не экспрессируют CD11b и другие макрофагальные маркеры, однако имеют

высокий уровень Flt3 [191]. CD8⁺ ДК наиболее эффективно презентируют антигены микробного происхождения [192,193] CD8⁺ Т-лимфоцитам. CD8⁺ ДК экспрессируют больше генов, связанных с МНС-I-зависимой презентацией антигена, чем CD11b⁺ ДК, а также являются основным источником IL-12. Вместе с CD103⁺ ДК они образуют единственную популяцию гемопоэтических клеток, имеющих хемокиновый рецептор XCR1. Лиганд данного рецептора (XCL1) продуцируют CD8⁺ Т-лимфоциты после антигенной стимуляции [178].

Гриппозная инфекция вызывает увеличение числа дендритных клеток моноцитарного происхождения (моДК) в очаге воспаления. Установлено, что моДК на поздних стадиях активации CD8⁺ Т-лимфоцитов переориентируют специфичность CTL-ответа с PA на NP. Нарушение миграции моноцитов в очаг инфекции и снижение числа моДК приводят к ослаблению устойчивости организма к вторичному заражению. Дендритные клетки моноцитарного происхождения и плазмацитоидные ДК активируют Th1-иммунный ответ за счет продукции IL-12 [194], однако по сравнению с классическими ДК, они обладают сниженной способностью к индукции эффекторных Т-лимфоцитов [187,195].

Существует два механизма проникновения антигена в дендритную клетку: за счет инфицирования вирусом и за счет фагоцитоза зараженных мертвых и отмирающих клеток. Проникновение вируса вызывает активацию и созревание ДК, в результате чего они приобретают способность стимулировать Т-лимфоциты [196–198]. Показано, что примерно 5-10% дендритных клеток, мигрирующих в лимфоузлы из легких во время инфекции заражены вирусом гриппа и содержат белки NS1 и NP [199]. Интернализировать вирус гриппа способны и классические и плазмацитоидные ДК, однако только кДК пермиссивны для патогена.

Несмотря на то, что вирус гриппа подавляет МНС-I-зависимую кросс-презентацию фагоцитированных антигенов, данный способ активации клеток адаптивного иммунитета более эффективен, чем прямая презентация синтезированных клеткой вирусных пептидов в составе МНС-I. Выявлена зависимость между дозой вируса и цитокин-продуцирующей способностью ДК: слабая вирусная нагрузка способствует эффективной стимуляции CD8-Т-лимфоцитов, тогда как высокие дозы вируса приводят к нарушению активации CD8-Т-клеток в результате усиления продукции противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGFβ дендритными клетками [200,201].

2.3. Адаптивный иммунный ответ на вирус гриппа

2.3.1. Т-клеточный иммунный ответ

В ответ на взаимодействие с дендритными клетками и распознавание антигенов вируса гриппа происходит активация и пролиферация Т-клеток. Т-лимфоциты усиливают экспрессию маркеров CD11a, CD25, NKG2a, CD44, утрачивают молекулу хоуминга CD62L [202] и мигрируют в очаг воспаления. Проникновение в легочную ткань опосредуется взаимодействием интегрина CD11a на лимфоцитах с адгезионной молекулой ICAM-1 на эндотелии сосудов [203].

ISAM-1 конститутивно экспрессируется во многих органах, поэтому на фоне инфекции число эффекторных Т-лимфоцитов увеличивается не только в очаге воспаления, но и в здоровых тканях [203]. Привлечение Т-клеток в легкие стимулирует IL-15 [204], а также хемокины CCL17 и CCL22, взаимодействующие с рецептором CCR4, экспрессия которого на лимфоцитах усиливается на фоне стимуляции [205].

Клеточная цитотоксичность

Увеличение числа эффекторных Т-лимфоцитов в легких приводит к быстрой элиминации патогена. Цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$ и $CD4^+$) активируют апоптоз в зараженных эпителиоцитах, в то время как Т-хелперы ($CD4^+$) продуцируют медиаторы воспаления, которые сдерживают репликацию патогена, и стимулируют В-клеточный иммунный ответ [206,207]. Цитолиз активируется после контакта TCR Т-лимфоцита с комплексом МНС-антиген на поверхности зараженной клетки. Образуется т.н. иммунологический синапс, включающий комплекс адгезионных молекул, которые создают надежный контакт между лимфоцитом и клеткой-мишенью. Иммунологический синапс препятствует диффузии цитотоксических молекул в межклеточное пространство и предотвращает повреждение соседних клеток [208,209]. Существует два основных механизма цитотоксичности: (1) формирование поры в мембране клетки-мишени при помощи белков-перфоринов с последующим проникновением в цитоплазму сериновых протеаз, активирующих каспазы или (2) активация рецепторов семейства TNF, в результате взаимодействия Fas/FasL и TRAIL/TRAIL-DR. Оба механизма приводят к запуску апоптоза в клетке-мишени [210].

Цитотоксические $CD8^+$ Т-лимфоциты являются ключевым фактором защиты организма при гриппе. Адоптивный перенос CTL, специфичных к вирусу гриппа, наивным мышам-реципиентам приводит к уменьшению титра вируса в легких, сокращению времени элиминации патогена, ускорению выздоровления и снижению смертности при заражении гриппом [211–213]. Мыши с нарушенной экспрессией $\beta 2$ -М, не способные к осуществлению полноценной МНС-I-зависимой презентации антигена характеризуются повышенной летальностью и более тяжелым течением инфекции по сравнению с мышами дикого типа [214].

За последние годы было накоплено множество свидетельств участия цитотоксических $CD4^+$ Т-лимфоцитов в адаптивном иммунном ответе на вирус гриппа [207,215–217]. Установлено, что $CD4^+$ CTL в легких экспрессируют перфорины и гранзим В. Пик цитотоксического ответа как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-лимфоцитов приходится на 8-10 сутки после заражения [207,215]. В отличие от $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих гранзим В в лимфоузлах, $CD4^+$ CTL проявляют цитотоксические функции только в легочной ткани [215]. Дифференцировка цитотоксических лимфоцитов обоих типов зависит от IL-2 и интерферонов I типа [216,218]. Под действием IFN- α

CD4⁺ Т-клетки усиливают экспрессию перфоринов и гранзима В *in vitro*, а также интенсифицируют цитотоксическую активность в отношении клеток-мишеней [207,219].

Цитокиновый ответ

Т-лимфоциты, в особенности Т-хелперы, продуцируют большое количество цитокинов и хемокинов после проникновения в очаг инфекции. Растворимые молекулы сдерживают распространение патогена, а также регулируют иммунный ответ, препятствуя развитию иммунопатологии. Наиболее важную роль в ответе на вирус гриппа играют IFN γ , IL-2, TNF α , IL-10 и TGF β . Некоторые из перечисленных цитокинов, экспрессирующиеся на ранних стадиях иммунного ответа (TNF α , TGF β) были рассмотрены в разделе, посвященном факторам врожденного иммунитета. Ниже речь пойдет о медиаторах воспаления, действие которых наиболее ярко проявляется на более поздних этапах противовирусной защиты.

IL-2

IL-2 – ключевой цитокин, регулирующий функции и направление дифференцировки Т-клеток. В основном данный фактор продуцируют сами Т-лимфоциты, однако экспрессия IL-2 характерна также для дендритных, тучных и NKT-клеток [220]. Рецептор IL-2 состоит из трех независимых субъединиц: CD25 (IL-2Ra) экспрессируется на поверхности Т-лимфоцитов в результате их активации и проявляет наибольшее сродство к IL-2; CD122 (IL-2Rb) взаимодействует как с IL-2, так и с IL-15; CD132 – третья субъединица рецептора – распознает также цитокины IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 и IL-21 [221]. Димеризация цитоплазматических доменов CD122 и CD132 приводит к фосфорилированию белков STAT5 и PI3K, которые запускают клеточную пролиферацию и активируют экспрессию CD25 [222]. В результате аффинность рецептора к IL-2 значительно возрастает [223]. Т-лимфоциты, которые интенсивно экспрессируют CD25, под воздействием высоких доз IL-2 приобретают эффекторный фенотип и проявляют признаки терминальной дифференцировки. Они приобретают повышенную предрасположенность к апоптозу и усиливают экспрессию транскрипционных факторов Blimp-1 и T-bet. Клетки с низким уровнем CD25 экспрессируют маркер центральных клеток памяти CD62L и антиапоптотический транскрипционный фактор Bcl-6 [224,225].

IFN γ

IFN γ – наиболее важный цитокин противовирусного Т-клеточного ответа. Данный фактор продуцируют CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоциты [226]. IFN γ активирует макрофаги, усиливает экспрессию МНС, регулирует смену изотипа антител, обеспечивает хемотаксис лейкоцитов [227,228]. Несмотря на то, что дефекты синтеза IFN γ не препятствуют элиминации патогена, данный цитокин вносит значительный вклад в обеспечение защиты от инфекции, действуя совместно с другими факторами врожденного и адаптивного иммунитета. В частности, мыши с нарушенной экспрессией NO-синтазы нуждаются в IFN γ для избавления от вируса [229]. IFN γ

индуцирует продукцию NO, а также запускает ряд сигнальных каскадов, которые активируют внутриклеточные противовирусные молекулы, такие как PKR [230]. IFN γ индуцирует адаптивный иммунный ответ Th1-типа. Под воздействием IFN γ усиливается презентация антигенов через МНС-I/II (включая кросс-презентацию), активируется экспрессия IL-12, повышается уровень коstimуляторных молекул CD80 на поверхности АПК [231]. IFN γ вызывает M1-дифференцировку макрофагов и одновременно подавляет альтернативный (M2) путь активации [232,233]. M1 макрофаги продуцируют провоспалительные цитокины IL-12, TNF- α и IL-1 β , а также активные формы кислорода [233]. Действие IFN γ всегда зависит от цитокинового микроокружения в очаге воспаления. Как и интерфероны первого типа, IFN γ может проявлять противовоспалительные функции за счет усиления экспрессии PD-L1, а также способствовать дифференцировке моноцитов в миелоидные супрессорные клетки [234]. Гиперпродукция IFN γ вызывает иммунопатологию, которая сопровождается тканевыми повреждениями, и снижает резистентность организма ко вторичным бактериальным инфекциям [235].

После проникновения в инфицированные легкие, эффекторные Т-лимфоциты дифференцируются под воздействием цитокинов в межклеточном пространстве. Показано, что часть лимфоцитов, которые интенсивно продуцировали IFN γ в лимфоузлах, после миграции в легкие и взаимодействия с антигеном снижает синтез данного цитокина и экспрессирует IL-10 в результате активации регуляторных механизмов, предотвращающих развитие иммунопатологии [236].

IL-10

Все типы Т-лимфоцитов продуцируют IL-10, однако основным источником данного цитокина являются Т-регуляторные клетки. IL-10 снижает экспрессию МНС, ингибирует синтез медиаторов воспаления, сдерживает пролиферацию клеток [237]. Блокировка рецепторов IL-10 (IL-10R) на фоне гриппозной инфекции приводит к развитию иммунопатологии [238]. С другой стороны, мыши дефектные по IL-10 быстрее элиминируют патоген и продуцируют больше антител, специфичных к вирусу гриппа, по сравнению с животными дикого типа [239].

Таким образом, для обеспечения эффективной защиты от гриппа, иммунная система задействует механизмы саморегуляции, с одной стороны, предотвращающие иммунопатологию, а с другой стороны – обеспечивающие необходимый уровень иммунного ответа. Поддержанию этого баланса способствует функциональная лабильность Т-лимфоцитов.

IL-7, IL-15 и дифференцировка Т-клеток памяти

В результате первичной инфекции, часть Т-лимфоцитов дифференцируется в клетки памяти, способные к быстрой активации при повторном контакте с тем же инфекционным агентом. Дифференцировка клеток памяти осуществляется под воздействием цитокинов IL-7 и IL-15. CD127, α -цепь рецептора IL-7, экспрессируется на наивных Т-лимфоцитах, однако

утрачивается в результате активации. На поздних стадиях первичного иммунного ответа некоторые Т-лимфоциты реэкспрессируют данную молекулу и дифференцируются в долгоживущие клетки памяти [240,241]. Для поддержания данной популяции необходим IL-15. Показано, что в отсутствие IL-15 число Т-лимфоцитов памяти существенно сокращается [242].

Т-клетки памяти гетерогенны по своему составу, но все экспрессируют молекулу CD44. По наличию маркеров CD62L и CCR7 выделяют популяции эффекторных (CD62L⁻/CCR7⁻CD44⁺) и центральных (CD62L⁺/CCR7⁺CD44⁻) клеток памяти [243,244]. После гриппозной инфекции, вирус-специфические эффекторные клетки памяти концентрируются в периферических тканях, тогда как центральные клетки памяти преобладают в лимфоузлах. При этом, обе популяции обнаруживаются в селезенке [245].

Резидентные Т-клетки памяти

Отдельного рассмотрения в контексте гриппозной инфекции заслуживают резидентные легочные Т-лимфоциты памяти (T_{rm}). Данные клетки полифункциональны, активно экспрессируют перфорин и обладают высоким пролиферативным потенциалом. Считается, что именно T_{rm} отвечают за перекрестную защиту от гетерологичных штаммов вируса гриппа [246,247]. У мышей легочные T_{rm} имеют общие фенотипические маркеры (CD69 и CD103) с резидентными популяциями клеток памяти в других тканях [246,247]. В то же время, T_{rm} легких отличаются низкой продолжительностью жизненного цикла и повышенной предрасположенностью к апоптозу, что связано с интенсивной экспрессией каспаз 3/7, сниженной продукцией Vc1-2 и слабым мембранным потенциалом митохондрий [248]. Некоторое время после инфекции пул легочных T_{rm} пополняется за счет миграции циркулирующих эффекторных CD69⁻CD103⁻ Т-лимфоцитов, однако, в последствии, данные клетки теряют способность дифференцироваться в T_{rm}, что, в комбинации с присущим данной популяции высоким уровнем апоптоза, приводит к постепенному снижению числа T_{rm} в легких после контакта с вирусом [248]. Не исключено, что необходимость в наличии T_{rm} снижается по мере восстановления легочного эпителия после повреждений, вызванных предшествующей инфекцией [249]. Сокращение числа T_{rm} в легких достигается за счет специфического цитокинового микроокружения [250] и, возможно, позволяет предотвратить иммунопатологию, которую может спровоцировать, например, гиперпродукция TNF α и IFN γ [251,252].

Полифункциональные Т-лимфоциты

Т-лимфоциты, участвующие в защите от гриппа, гетерогенны по своему составу и выполняемым функциям даже в пределах традиционно выделяемых популяций (Th1/2/9/17, T_{CL}). Метод многоцветной проточной цитометрии позволяет исследовать разнообразие Т-лимфоцитов и выявлять Т-клеточные корреляты протекции, вносящие наибольший вклад в обеспечение элиминации патогена и защиту от повторного инфицирования.

Долгое время основным критерием оценки антигенспецифичного Т-клеточного иммунного ответа была доля Т-лимфоцитов, продуцирующих $IFN\gamma$ в ответ на антигенную стимуляцию. Однако измерение только одного параметра не дает возможности отразить весь функциональный потенциал Т-клеток. Согласно данным многочисленных исследований последних лет [223-227], одновременная оценка внутриклеточной продукции цитокинов $IFN\gamma$, $IL-2$ и $TNF\alpha$ гораздо более информативна.

Впервые внимание к полифункциональным Т-лимфоцитам привлекли исследования ВИЧ-инфицированных индивидов с пониженным уровнем вируса в плазме крови. Показано, что у таких пациентов высок процент $CD4^+$ Т-лимфоцитов, одновременно продуцирующих два и более цитокина. И наоборот, у лиц с высокой вирусной нагрузкой основную долю эффекторных Т-клеток составляют лимфоциты, продуцирующие только $IFN\gamma$ [253,254]. В дальнейшем было показано, что $IFN\gamma^+TNF\alpha^+$ Т-клетки более эффективно элиминируют патоген при заражении *Leishmania major* и *Mycobacterium tuberculosis*, чем Т-лимфоциты, экспрессирующие только один из указанных цитокинов [255–257]. Оценка уровня $IL-2$ также важна, хотя данный цитокин не обладает прямым противовирусным или антибактериальным действием. Тем не менее, $IL-2$ активирует пролиферацию Т-клеток, что приводит к усилению иммунного ответа [258].

Полифункциональные $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$ -Т-лимфоциты имеют более высокие значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI) $IFN\gamma$, $IL-2$ и $TNF\alpha$, чем Т-клетки, продуцирующие только один или два цитокина одновременно. Возможно, это объясняет их протективное действие, которое было показано в исследованиях поствакцинального иммунного ответа на *L. major* и *M. bovis* [256]. Аналогичные результаты были получены при изучении $CD4^+$ Т-клеточного ответа у пациентов, инфицированных ВИЧ, ЦМВ, вирусом гриппа или иммунизированных при помощи вируса коровьей оспы [253]. В данном исследовании также было показано, что полифункциональные Т-клетки имеют более высокий уровень экспрессии молекулы $CD40L$, что делает их эффективными костимуляторами В- и $CD8^+$ Т-клеточного ответа [253].

Полифункциональные Т-лимфоциты отличает высокая продолжительность жизненного цикла. Известно, что монофункциональные Т-клетки, представленные, в основном, $IFN\gamma^+IL-2^-TNF\alpha^-$ Т-лимфоцитами находятся на финальной стадии дифференцировки и имеют повышенную предрасположенность к апоптозу [253,256]. В то же время, полифункциональные Т-клетки, образовавшиеся в результате вакцинации, присутствуют в циркуляции более одного года [257]. Показано также, что содержание вирус-специфичных полифункциональных $CD8^+$ Т-лимфоцитов у лиц с острой инфекцией вируса Западного Нила, Эпштейн-Барр или цитомегаловируса не зависит от возраста. У пожилых пациентов (>60 лет) отмечалось увеличение числа $CD57^+$ и снижение содержания $CD28^+$ Т-лимфоцитов, однако число Т-клеток, продуцирующих $IFN\gamma$,

TNF α , IL2, гранзим В и перфорин в различных комбинациях оставалось на уровне более молодых лиц (<40 лет, 41-59 лет) [259].

Роль полифункциональных Т-лимфоцитов в обеспечении защиты от гриппа до сих пор остается слабоизученной. Тем не менее, ряд исследований показывает, что данные клетки вовлечены в обеспечение поствакцинального иммунитета к вирусу гриппа. В частности, повторная вакцинация одной и той же гриппозной вакциной в течение 5 лет приводила к увеличению пула полифункциональных Т-лимфоцитов, в особенности IFN γ ⁺TNF α ⁺CD4⁺-Т-клеток. Уровень иммунного ответа на консервативные внутриклеточные вирусные эпитопы возрастал после 3-4 повторных вакцинаций. При этом, преобладающей популяцией антигенспецифичных CD4⁺ Т-клеток становились двойные продуценты IFN γ ⁺TNF α ⁺, в то время как число IL-2⁺ Т-лимфоцитов сокращалось [260].

Таким образом, существующие литературные данные позволяют рассматривать полифункциональные Т-лимфоциты как важные корреляты протекции. Справедливым представляется предположение о том, что наиболее эффективными будут те вакцины, которые приводят к формированию высокого уровня полифункциональных Т-лимфоцитов, выполняющих эффекторные функции и дифференцирующихся в клетки памяти [256,261]. В связи с этим важно понимать механизмы, обуславливающие образование полифункциональных Т-клеток в организме.

Адьюванты - агонисты TLR7/8 усиливают дифференцировку Т-лимфоцитов, способных одновременно продуцировать несколько цитокинов [262]. Формированию полифункциональных Т-лимфоцитов способствует активация дендритных клеток, которые экспрессируют указанные PRR [262–264]. Существенный вклад в раскрытие механизмов формирования полифункциональных Т-клеток внесло исследование, проведенное на мышах с нарушенной экспрессией RIG-I [265]. Мыши с фенотипом RIG-I^{-/-} характеризовались замедленной активацией дендритных клеток, пониженным уровнем презентации антигена и малой интенсивностью CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточного ответа на вирус гриппа по сравнению с животными дикого типа. Более того, нарушение экспрессии RIG-I приводило к значительному сокращению доли полифункциональных Т-лимфоцитов и снижению уровня защиты от гетерологичных штаммов. При этом, указанные эффекты нивелировались воздействием экзогенного IFN I на RIG-I^{-/-} ДК, которые в ответ усиливали экспрессию CD86 и МНС-II, что частично восстанавливало их функции и вело к образованию большего числа полифункциональных антигенспецифичных Т-лимфоцитов [265].

2.3.2. Гуморальный иммунный ответ

Т-лимфоциты не способны предотвратить заражение организма вирусом гриппа, поскольку для инициации Т-клеточного иммунного ответа требуется контакт с инфицированной

клеткой. В-клеточное звено иммунитета обеспечивает продукцию нейтрализующих антител, которые способны полностью защитить организм от инфекции. Предшественники антителосекретирующих плазматических клеток локализуются, преимущественно, в герминативных центрах лимфатических узлов и селезенки. Там же происходит соматическая гипермутация, и повышение аффинности антител [266,267].

Системный гуморальный иммунный ответ

Белки оболочки вириона HA и NA - основные мишени гуморального иммунного ответа. Большая часть HA-специфичных антител взаимодействует с эпитопами глобулярного домена и обеспечивает полноценную защиту от соответствующего штамма. Протекция была показана в исследованиях с парентеральным и интраназальным введением антител к HA экспериментальным животным [268,269].

На ранних этапах первичного ответа на вирус гриппа В1-лимфоциты продуцируют большое количество низкоспецифичных IgM. Предполагается, что для активации синтеза данных антител не требуется взаимодействие антигена с В-клеточным рецептором (BCR) [270]. Праймирование наивных В-лимфоцитов осуществляется в лимфоузлах и MALT, куда мигрируют антигенпрезентирующие клетки из респираторного тракта [271,272]. Методом ELISpot показано, что частота грипп-специфичных В-лимфоцитов в периферической крови человека через 7-10 дней после возникновения симптомов заражения достигает 1000 антителосекретирующих клеток (ASC) на 1 млн PBMC [273]. После элиминации патогена большая часть ASC погибает путем апоптоза, однако часть популяции дифференцируется в долгоживущие плазматические клетки [274]. Направление дифференцировки определяется профилем транскрипционных факторов, которые экспрессируют В-лимфоциты в момент активации, а также цитокиновым микроокружением. Так, экспрессия Blimp-1 приводит к формированию короткоживущих ASC, которые обеспечивают быстрое увеличение титра вирус-специфических антител, однако не претерпевают соматической гипермутации и усиления аффинности. Переключение изотипа антител и генетическая реаранжировка осуществляется под воздействием сигналов со стороны фолликулярных Т-хелперов (Tfh), распознающих антигены, презентруемые В-лимфоцитами в составе MHC-II. Tfh экспрессируют активационную молекулу CD40L, а также цитокины IL-4, IFN- γ и TGF- β , регулирующие указанные процессы. Межклеточные взаимодействия с Т-лимфоцитами опосредуются молекулами ICOS/ICOSL, PD-1/PD-L1, CD28/B7 и SLAM/SAP. Данные взаимодействия приводят к усилению экспрессии транскрипционного фактора Bcl-6 и цитокина IL-21, которые способствуют выживанию В-клеток, соматической гипермутации и повышению аффинности антител [275,276]. Так происходит дифференцировка долгоживущих популяций антителосекретирующих клеток и В-лимфоцитов памяти. Последние генерируют эффективный гуморальный иммунный ответ при вторичном взаимодействии с вирусом гриппа.

При этом, часть В-лимфоцитов памяти вновь подвергается соматической гипермутации, что способствует дополнительному увеличению аффинности антител при повторном контакте с патогеном. Человек неоднократно сталкивается в течение жизни с вирусами, передающимися воздушно-капельным путем, что делает В-клетки памяти важнейшими участниками защиты от респираторных вирусных инфекций. Последовательные взаимодействия с близкородственными инфекционными агентами приводят к увеличению титра нейтрализующих антител [277].

В последние годы широко обсуждается концепция антигенного импринтинга, согласно которой результат первого иммунного ответа на некоторый патоген влияет на характер последующих взаимодействий организма с близкородственными инфекционными агентами. В частности, в результате первичного иммунного ответа на вирус гриппа формируется широкий спектр антител, распознающих множество консервативных и неконсервативных антигенных детерминант вируса. В том числе, образуются антитела, взаимодействующие с высококонсервативными эпитопами каталитического центра нейраминидазы, рецептор-связывающего и стволового домена НА. При повторном контакте с вирусом гриппа сначала активируются и пролиферируют В-клетки памяти, и только потом образуются новые антитело-секретирующие клетки. В результате увеличивается титр антител к эпитопам, которые одинаковы у вирусов, вызвавших первичную и вторичную инфекцию [278]. Репертуар антител, формирующийся при последующих контактах с гетерологичными вирусами, постепенно сужается, поскольку доминирующие позиции занимают антитела к легкодоступным эпитопам. При взаимодействии с близкородственными вирусами, сформировавшимися в результате антигенного дрейфа, нарастает доля антител к неконсервативным эпитопам головки гемагглютинина. При контакте с неродственными штаммами, образовавшимися в ходе антигенного сдвига, увеличивается относительное содержание антител к консервативным участкам поверхностных белков. С одной стороны, этот процесс способствует формированию кросс-протективного ответа, защищающего организм от гетерологичных штаммов [279–281], однако в случае кардинального изменения антигенной структуры вируса в результате генетического сдвига или возникновения мутаций в консервативных областях вирусного генома, антигенный импринтинг может иметь негативные последствия для организма-хозяина. Примером может служить сниженная резистентность к современным штаммам вируса гриппа среди лиц, родившихся в 1970г, когда в циркуляции преобладали вирусы подтипа H3N2. В то же время, индивиды 1945 года рождения, контактировавшие преимущественно со штаммами подтипа H1N1, имеют повышенную устойчивость к современным вирусам гриппа [282]. Иммунизация индивидов 1970 г.р. при помощи сезонной или пандемической вакцины (H1N1) приводит к образованию антител, нейтрализующих штаммы подтипа H7N9 [283].

Локальный В-клеточный ответ

В-клеточный иммунный ответ, реализующийся в участках проникновения вируса в организм столь же важен для защиты от гриппа, как и системная продукция антител. В легочной ткани здоровых мышей, содержащихся в стерильных условиях, большая часть лимфоцитов сосредоточена в кровеносных сосудах, а не в паренхиме [284]. После проникновения патогена, лимфоциты мигрируют в соединительную ткань легкого под воздействием IL-1 α и других цитокинов воспаления [285] и образуют индуцибельные бронхоассоциированные лимфоидные скопления (iBALT). Данные скопления располагаются, преимущественно, в области венул с высоким эндотелием [286,287]. iBALT обеспечивают развитие локального В-клеточного ответа, а также поддерживают персистенцию в соответствующем участке ткани плазматических клеток и В-лимфоцитов памяти в течение продолжительного периода после инфекции [288]. Герминативные центры, формирующиеся в iBALT сходны с герминативными центрами лимфоузлов и селезенки. Они содержат фолликулярные дендритные клетки и фолликулярные Т-хелперы [287].

В результате соматической гипермутации в iBALT происходит формирование В-лимфоцитов, специфичных, преимущественно, к консервативным участкам вируса гриппа. Согласно данным, опубликованным в статье Adachi et al [289], около половины HA-специфичных В-лимфоцитов легочной ткани распознают консервативные участки стволовой области гемагглютинина, тогда как в селезенке доля таких кросс-реактивных В-клеток составляет всего 5% [289]. В качестве основных факторов локального иммунного ответа в легких выступают IgA. Данные молекулы имеют олигомерную или мономерную конфигурацию. Олигомерные формы (димеры и тетрамеры) ассоциированы с секреторным компонентом (SC). Мономерные IgA не связаны с SC и обеспечивают менее надежную защиту слизистых от вирусов [290–294]. Показано, что мыши, не способные к синтезу антител данного изотипа хуже переносят заболевание, чем животные дикого типа [295]. Кроме того, адаптивный перенос IgA от вакцинированных животных защищает наивных мышей от гриппа [296].

Антителозависимая клеточная цитотоксичность

Нейтрализующие антитела способны обеспечить полноценную защиту от гриппозной инфекции, предотвращая проникновение вируса в клетку. Как правило, такие антитела штамм-специфичны и не обеспечивают защиты от дрейф- и шифт-вариантов вируса гриппа. Важную роль в обеспечении перекрестной защиты играет антителозависимая цитотоксичность (ADCC). Данный процесс реализуется при взаимодействии Fc-участков антител класса IgG с соответствующими рецепторами на поверхности иммуноцитов [297–299]. Fc γ -рецепторы (Fc γ Rs) подразделяются на несколько типов (Fc γ RIA, II, III, IIIA и др.), каждый из которых обладает уникальными структурно-функциональными характеристиками. Помимо ADCC, они

обеспечивают клеточную активацию, фагоцитоз, экспрессию и высвобождение провоспалительных цитокинов и хемокинов, способствуют поляризации Т-клеточного ответа. НК-клетки, моноциты и макрофаги экспрессируют на своей поверхности рецепторы Fc γ RIIIa, распознающие Fc-участки IgG, которые, в свою очередь, взаимодействуют с вирусными компонентами, экспонированными на мембранах зараженных клеток [300,301]. Перекрестное взаимодействие молекул Fc γ RIIIa приводит к фосфорилированию цитоплазматических ITAM-доменов, что влечет за собой активацию Ca²⁺-зависимого сигнального каскада, завершающегося дегрануляцией с высвобождением цитотоксических молекул, а также противовирусных цитокинов (IFN γ , TNF α) и хемокинов [302–304]. Клеточную цитотоксичность активируют, преимущественно, белки NA и HA, которые в большом количестве представлены на мембранах зараженных клеток. Кроме того, ADCC могут индуцировать белки NP и M2e, гораздо более консервативные, чем гемагглютинин и нейраминидаза. NP и M2e также встречаются на поверхности клеток, зараженных вирусом гриппа [305]. Протективная функция NP-специфичных антител была показана в экспериментах на мышах [306,307]. Использование механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности, нацеленной на высококонсервативные антигены, может иметь важное значение для разработки универсальной вакцины от гриппа.

2.4. Белок NS1 как многофункциональный фактор избегания иммунного ответа

Иммунная система млекопитающих представляет собой совокупность структур и механизмов, реагирующих на проникновение патогена и формирующих защитные реакции в соответствии с биологическими особенностями того или иного инфекционного агента. Способность к саморегуляции и функциональная лабильность позволяет иммунной системе поддерживать баланс между противовирусной активностью и иммунопатологией. Цитокиновый и хемокиновый сигналинг обеспечивает своевременную активацию факторов иммунной защиты. Иммунологическая память позволяет предотвратить заболевание при повторном контакте с патогеном, вызвавшем первичную инфекцию. Тем не менее, вирус гриппа приобрел ряд механизмов, позволяющих ему избегать действия иммунной системы организма-хозяина. Одним из таких иммуносупрессорных факторов является неструктурный белок NS1.

Белок NS1 у большинства штаммов состоит из 230 аминокислот, которые образуют два основных структурных домена, соединенных подвижным линкерным участком [308]. N-концевой РНК-связывающий домен (1-73 aa) представлен гомодимером, образованным шестью α -спиральными участками (по три на каждую субъединицу). Данные участки содержат сигналы ядерной локализации. С-терминальный эффекторный домен (80-230 aa) включает три α -спиральных региона и семь β -листов. Полноразмерные белки NS1, а также изолированные РНК-связывающие домены данных молекул способны к образованию гомодимеров [309,310].

NS1 активно экспрессируется с 8-ого сегмента вирусного генома на протяжении всего жизненного цикла вируса гриппа. Пре-мРНК, содержащая последовательность NS1, может подвергаться сплайсингу и давать начало белку ядерного экспорта (NEP, NS2). NS1 претерпевает посттрансляционные модификации, такие как фосфорилирование (Thr215, Ser42, Ser48) и SUMOилирование (Lys70, Lys219) [311,312]. Присоединение SUMO1 к определенным аминокислотным остаткам, по-видимому, необходимо для обеспечения функциональной активности NS1, хотя и не отражается на стабильности и клеточной локализации белка [311].

NS1 обнаруживается как в цитоплазматическом, так и в ядерном компартменте инфицированной клетки. Перемещение в ядро обусловлено взаимодействием с α -импортином, распознающим сигналы ядерной локализации в РНК-связывающем домене. В то же время, сигналы ядерного экспорта, содержащиеся в эффекторном домене, обеспечивают постоянное присутствие некоторого количества NS1 в цитоплазме [313,314]. Соотношение цитоплазматического и ядерного содержания NS1 варьирует в широких пределах в зависимости от штамма, типа зараженных клеток и стадии жизненного цикла вируса [315,316].

Основной вклад белка NS1 в патогенез гриппа заключается в подавлении врожденного иммунного ответа за счет ингибирования системы интерферона I/III. Этим, однако, действие белка NS1 на цитокиновую систему организма-хозяина не исчерпывается. Эффекторный домен NS1 способен угнетать синтез TNF α , IL-6, CCL3, MIP-1 α , препятствовать активации каспазы-1, что приводит к ингибированию апоптоза в инфицированных клетках, нарушению функционирования инфламмосомы и препятствует созреванию IL-1 β и IL-18 [317].

Вирусы, экспрессирующие укороченные формы белка NS1 плохо реплицируются в интерферон-компетентных системах, однако эффективно пролиферируют в культуре клеток Vero, которые не продуцируют IFN- α/β [17]. У мышей с нарушенной экспрессией ключевого участника IFN-сигналинга STAT1 вирус гриппа с укороченным белком NS1 вызывает летальную инфекцию [16].

NS1 взаимодействует с большим числом клеточных белков и РНК, приводя к ингибированию защитных реакций как на посттранскрипционном, так и на посттрансляционном уровне. Внутриклеточные партнеры NS1 могут быть условно разделены на 4 группы. К первой группе относятся ядерные белки, участвующие в созревании и экспорте клеточных мРНК: CPSF30, PABPII, NXF1/TAP, нуклеолин и другие. Белок CPSF30, входящий в состав крупного молекулярного комплекса CPSF отвечает за полиаденилирование клеточных пре-мРНК [318,319]. Взаимодействуя с CPSF30, NS1 препятствует ассоциации комплекса с пре-мРНК и, таким образом, блокирует процессинг [320,321]. Ко второй группе относятся цитоплазматические белки, участвующие в трансляции и транспорте мРНК: eIF4GI, PABPI. Третья группа включает факторы противовирусной защиты: RIG-I, TRIM-25, PKR, PACT, PI3K

и другие. С NS1 взаимодействуют многие клеточные dsРНК-связывающие белки [322]. Последнюю группу партнеров NS1 составляют вирусные и клеточные РНК. Данные о межмолекулярных взаимодействиях, в которых принимает участие белок NS1 были получены, преимущественно, методом ко-иммунопреципитации. Было показано, что NS1 связывается с RIG-I, а также с некоторыми регуляторами активности данного белка – убиквитин-лигазой TRIM25 и RIPLET [323–326]. За счет РНК-связывающей активности NS1 взаимодействует с малыми ядерными РНК U6 и Ubatas, вовлеченными в процесс сплайсинга. Также NS1 образует комплексы с полиаденилированными мРНК, с геномными РНК вируса, dsРНК, вирусными мРНК [327–330]. Идентифицировано два консервативных РНК-мотива, обеспечивающих сильное взаимодействие с NS1 *in vitro* [330]. Мотив AGCAAAAG находится на 5'-концах вирусных антигеномных РНК. Второй мотив, UGAUUGAAG, характерен для 3' UTR мРНК NS1. Поскольку обе последовательности специфичны для вирусной +РНК, можно предположить, что помимо своей основной функции, связанной с подавлением IFN-сигналинга, NS1 регулирует вирусную репликацию и экспрессию генов. Кроме того, благодаря dsРНК-связывающей активности NS1 препятствует активации рецепторов RIG-I и TLR3 [81].

NS1 напрямую взаимодействует с клеточными защитными факторами, экспрессирующимися в ответ на действие IFN [331,332]. В частности, NS1 конкурирует с белком OAS за взаимодействие с dsРНК [333], а также индуцирует конформационные изменения в PKR, приводящие к аутоингибированию данной молекулы [334]. Кроме того, NS1 усиливает трансляцию ряда вирусных мРНК [335] за счет взаимодействия с eIF4G1 и привлечения данных молекул к 5'UTR вирусных транскриптов [336].

Помимо непосредственного угнетения факторов врожденного иммунитета, NS1 оказывает косвенное негативное влияние на адаптивный иммунный ответ. Вирус гриппа угнетает продукцию провоспалительных цитокинов TNF α , IL-6, IL-12, IL-8, RANTES, MIP1 β дендритными клетками. Кроме того, иммуносупрессорное действие NS1 приводит к снижению экспрессии молекул, отвечающих за презентацию антигена (MHC-II, CD86) [337]. Рассмотренные свойства белка NS1 открывают перспективы для конструирования живых аттенуированных гриппозных вакцин и векторов, с модифицированным геномным фрагментом NS.

2.5. Современные подходы к вакцинопрофилактике гриппа

В настоящее время для профилактики гриппа применяют два вида вакцин: инактивированные и живые. Инактивированные вакцины подразделяются на цельновирионные, расщепленные и субъединичные. Данные вакцины представляют собой, соответственно, целые инактивированные вирионы, расщепленные вирионы или очищенные отдельные белки вирусов гриппа различных подтипов. Вакцины содержат компоненты штаммов вируса гриппа,

циркулирующих в текущем эпидемическом сезоне, требуют ежегодного перевыпуска и вызывают, преимущественно, гуморальный иммунный ответ, обеспечивающий протекцию только от тех вирусов, которые входят в состав препарата. Трехвалентные инактивированные вакцины в настоящее время содержат компоненты вирусов H1N1, H3N2 и гриппа В. Также одобрена для клинического применения тетравалентная вакцина, содержащая две линии вируса гриппа В [338].

Живые гриппозные вакцины (ЖГВ) содержат реассортантные штаммы вирусов гриппа, гемагглютинин и нейраминидаза которых соответствует актуальным для данного эпидсезона, а остальные белки наследуются от холодоадаптированного «донора аттенуации» [339]. В качестве доноров аттенуации в настоящее время используются штаммы A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) и A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) [340]. Кроме того, на различных стадиях доклинических и клинических испытаний находятся вакцины на основе альтернативных доноров аттенуации, таких как A/17/California/66/395 (H2N2), A/Hong Kong/1/68/162/35 (H3N2), A/Slovenia/2903/2015 (H1N1) и другие [341,342]. ЖГВ, благодаря интраназальному введению и способности к ограниченной пролиферации в верхних дыхательных путях стимулируют не только системный, но и локальный иммунный ответ [343–345]. Вакцинация ЖГВ сопровождается активной выработкой IgA в верхних отделах респираторного тракта. Данные антитела эффективно нейтрализуют вирусные частицы, препятствуя распространению инфекции в нижние отделы дыхательной системы, а также предотвращают вирусовыделение, снижая тем самым вероятность заболевания непривитых индивидов и способствуя формированию коллективного иммунитета [346]. Кроме того, поствакцинальный иммунный ответ на ЖГВ в большей степени, по сравнению с инактивированными вакцинами, затрагивает Т-клеточное звено иммунной системы [347,348], что, в совокупности со способностью к индукции IgA на слизистых оболочках повышает устойчивость организма к гетерологичным штаммам вируса гриппа.

Инактивированные гриппозные вакцины наиболее широко применяются для вакцинации населения, несмотря на то что эффективность таких препаратов варьирует в широких пределах, в зависимости от выбора штаммов для производства вакцины. На поствакцинальный иммунный ответ влияет возраст, иммунологический статус и состояние здоровья вакцинируемого. У здоровых взрослых (<65 лет) индивидов эффективность вакцинации может достигать 70-90% при адекватном выборе штамма, в то время как у лиц младшего и пожилого возраста, а также у людей, имеющих хронические заболевания, данный показатель обычно находится ниже 60% [3,4]. В эпидемическом сезоне 2017-2018 гг. общая эффективность вакцин от гриппа А и В составила 40%. При этом протекция от вирусов подтипа H1N1 достигала 65%, тогда как риск заболевания штаммом подтипа H3N2 или вирусом гриппа В составил 25 и 49% соответственно [2]. Все

существующие вакцины от гриппа имеют крайне низкую эффективность у пожилых людей и грудных детей [3–7].

Узкая специфичность поствакцинального иммунитета, индуцируемого сезонными вакцинами, приводит к необходимости ежегодного перевыпуска данных препаратов с учетом изменений антигенной структуры вирусов гриппа. Более того, действие сезонных вакцин может препятствовать формированию кросс-протективного иммунитета, защищающего организм от пандемических штаммов. Данное обстоятельство может негативно отразиться на течении заболевания у привитых индивидов, в особенности у детей. При появлении пандемических штаммов, поверхностные антигены которых значительно отличаются от вошедших в состав вакцины, организм не в состоянии своевременно предотвратить репликацию вируса, что приводит к тяжелому течению заболевания и повышению смертности [349,350]. В частности, вакцинация против вируса гриппа A/H3N2 снижала уровень гетеросубтипического иммунного ответа на высокопатогенный штамм A/H5N1. Слабая резистентность к A/H5N1 была связана с пониженным содержанием вирус-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов у людей, подвергавшихся ежегодной вакцинации [351]. Влияние вакцинации на протекание последующего инфекционного процесса изучалось также в экспериментах на животных. Мыши C57BL/6J получали две дозы субъединичной вакцины внутримышечно с интервалом в 4 недели. Спустя месяц животных заражали сублетальной дозой штамма A/Hong Kong/2/1968. Вакцинированные мыши не проявляли клинических симптомов заболевания, тогда как невакцинированные животные теряли вес с 3 по 7 день после вакцинации, однако впоследствии выздоравливали. После заражения вирусом A/H5N1 невакцинированные животные проявляли умеренные признаки заболевания в течение 7 дней, после чего выздоравливали. Напротив, у вакцинированных мышей развивалась инфекция, сопровождавшаяся критической потерей массы тела к 6-8 дню после заражения [351], что свидетельствует о формировании иммунопатологии.

Исследование взаимосвязи между ежегодной вакцинацией и заболеваемостью вирусом рН1N1 в весенне-летний период 2009 г. в Канаде показало, что вакцинация на 56% снижала вероятность инфицирования сезонным штаммом вируса гриппа, однако приводила к статистически-значимому увеличению вероятности заражения вирусом рН1N1 [352]. Полученную взаимосвязь можно объяснить отсутствием у вакцинированных индивидов нейтрализующего иммунитета к внутренним консервативным белкам вируса гриппа. Трехвалентная инактивированная вакцина содержит только антигены HA и NA, иммунитет к которым защищает от сезонных штаммов, но не предотвращает заражения вирусами, которые возникли в результате антигенного дрейфа и антигенного сдвига. Не исключено также, что ненейтрализующие антитела, индуцированные вакциной, облегчают проникновение

пандемических вирусов в клетки путем Fc-зависимого фагоцитоза. Данный процесс был продемонстрирован в экспериментах *in vitro* [353–356].

Сезонная вакцинация успешно предотвращает заболевание при совпадении антигенной структуры вакцинных штаммов и циркулирующих вирусов, однако положительный эффект такой вакцинации компенсируется утяжелением инфекционного процесса и повышением летальности при заражении шифт-вариантами вируса гриппа, к которым у организма нет иммунитета. В связи с этим, особую актуальность приобретают исследования, направленные на увеличение кросс-протективности существующих гриппозных вакцин, а также на разработку универсальной вакцины, которая обеспечит защиту от широкого спектра штаммов вируса гриппа, формирующихся в результате антигенного дрейфа и антигенного сдвига.

2.6. Подходы к созданию универсальной вакцины от гриппа

Высокая вариабельность вируса гриппа затрудняет создание универсальной вакцины, применение которой позволило бы избавиться от необходимости ежегодной ревакцинации. Большинство разрабатываемых в настоящее время подходов связано с индукцией антительного ответа к консервативным участкам белков вируса гриппа, входящих в состав оболочки вириона.

Индукция кросс-протективного гуморального иммунитета

Долгое время исследования, направленные на создание универсальной гриппозной вакцины были сосредоточены вокруг высококонсервативной стволовой области гемагглютинина. Эпитопы данного домена НА в меньшей степени подвержены селективному давлению со стороны иммунной системы организма-хозяина из-за труднодоступности для антител и В-клеточных рецепторов. Это обуславливает низкие темпы эволюции антигенных детерминант стволовой области, но также и менее высокую иммуногенность, по сравнению с эпитопами головки НА. Антитела к участкам стволового домена в норме составляют лишь незначительную часть от общего количества иммуноглобулинов сыворотки крови [357,358]. Было отмечено, что у ряда индивидов, после перенесения инфекции, вызванной пандемическим штаммом H1N1, а также после иммунизации соответствующей вакциной, доля антител к стволовому региону НА существенно возрастает [279,359–361]. Была выдвинута гипотеза, согласно которой в организме присутствует незначительное число В-клеток памяти, распознающих консервативные стволовые эпитопы. Взаимодействие с гетерологичным штаммом вызывает селективную экспансию данных клеток, в результате чего увеличивается титр антител к стволовой области НА. Эта гипотеза легла в основу схемы вакцинации химерными молекулами гемагглютинина, которые содержат головки НА от вирусов гриппа птиц, к которым у людей нет иммунитета, и стволовые области НА от циркулирующих в настоящее время штаммов вируса гриппа человека. Возможно создание сплит-вакцин и живых аттенуированных вакцин, содержащих химерные молекулы НА. Иммунизация данными вакцинами приводит к

развитию кросс-протективного антительного иммунного ответа, защищающего мышей и хорьков от гетерологичных штаммов, в том числе и от вируса гриппа В [362,363].

Другой перспективный подход к усилению иммуногенности стволовой области гемагглютинина – использование вирусов и вирусоподобных частиц, содержащих молекулы НА, лишённые головки, что облегчает доступность консервативных В-клеточных эпитопов для ВСР. Основная трудность, сопряжённая с данным подходом, заключается в обеспечении правильного фолдинга остатков гемагглютинина. Эффективность таких вакцин продемонстрирована на мышинной и хорьковой модели [364–367], хотя существуют также свидетельства негативного влияния вакцин, содержащих видоизменённые молекулы гемагглютинина на течение инфекции. Показано, что антитела к стволочному домену НА облегчают проникновение вируса в клетку путем FcγR-опосредованного эндоцитоза, утяжеляя симптомы заболевания у свиней [368,369].

Развитие вычислительной техники и расширение арсенала биоинформатических методов позволяет создавать искусственные молекулы гемагглютинина, содержащие консенсусные последовательности НА всех штаммов отдельно взятого подтипа вируса гриппа. Конструкции на основе искусственных НА вызывают кросс-протективный антительный иммунный ответ. Данный подход получил сокращённое наименование COBRA (Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen). Было экспериментально показано, что COBRA H5 НА способен индуцировать кросс-реактивный антительный иммунный ответ против широкого спектра штаммов подтипа H5N1 [370]. Иммунизация мышей вирусоподобными частицами, содержащими COBRA H1 НА вызывает иммунитет к пандемическому штамму H1N1 и приводит к формированию кросс-реактивных антител, демонстрирующих активность в РТГА против панели из 17 вирусов подтипа H1N1 [371].

Предлагаются способы индукции кросс-протективного иммунного ответа при помощи смеси пептидов, соответствующих консервативным антигенным детерминантам вирусов гриппа. Короткие белковые молекулы имеют крайне низкую иммуногенность, что приводит к необходимости использования адъювантов или белков-носителей и затрудняет разработку пептидных вакцин. Тем не менее, в клинических исследованиях был показан бустирующий эффект пептидной иммунизации при сочетанном использовании с сезонной противогриппозной вакциной [372]. Установлено также, что инактивированная гриппозная вакцина может выступать в роли адъюванта для смеси пептидов и индуцировать формирование эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Для проявления адъювантного эффекта необходима колокализация пептида и вакцины при иммунизации, однако физические взаимодействия между компонентами вводимого препарата не имеют принципиального значения [373].

Поскольку для гемагглютинина характерны высокие темпы эволюции и значительная вариабельность, перспективным может оказаться использование в качестве мишеней

поствакцинального иммунного ответа более консервативных белков вируса гриппа, входящих в состав оболочки вириона. В качестве кандидатов на роль универсальной вакцины рассматриваются препараты на основе белка M2e – эктодомена матриксного белка M2. Из-за малых размеров и плохой доступности для В-клеточных рецепторов, M2e проявляет слабые иммуногенные свойства в естественных условиях. Только у 33–44% обследованных выявляются антитела к M2e [374,375]. Отмечено, что у лиц старших возрастных групп данные антитела обнаруживаются чаще [375]. Это свидетельствует о необходимости нескольких контактов с вирусом для обеспечения детектируемого уровня M2e-специфичного иммунного ответа.

В качестве вакцины предлагается использовать домен M2e, ассоциированный с носителем, в роли которого могут выступать вирусоподобные частицы или агонисты TLR-рецепторов. Были предложены двуслойные белковые наночастицы, содержащие M2e и стволовую область гемагглютинаина. Мыши, иммунизированные такими конструкциями, приобретали иммунитет к вирусам H1N1, H3N2, H5N1 и H7N9 [376]. Антитела к M2e имеют низкую нейтрализующую активность, однако обеспечивают протекцию за счет FcγR-опосредованных механизмов, в частности за счет антитело-зависимого фагоцитоза вирусных частиц.

Нейраминидаза также может оказаться перспективным индуктором перекрестного иммунного ответа, несмотря на высокую вариабельность. Известно, что антитела к нейраминидазе вносят вклад в обеспечение защиты от гриппа. Титр антител к данному белку коррелирует с уровнем протекции и в настоящее время данный показатель признан в качестве независимого критерия, позволяющего предсказать уровень защищенности организма от различных клинических проявлений гриппозной инфекции [377,378]. Иммунный ответ на NA обеспечивает перекрестную защиту от гетерологичных штаммов вируса гриппа. Например, антитела, взаимодействующие с NA вируса A/Brisbane/59/2007 (H1N1) подавляют репликацию вирусов A/California/7/2009 (A/H1N1pdm09) и A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) [379].

Таким образом, на сегодняшний день существует большое разнообразие подходов к индукции кросс-протективного гуморального иммунного ответа на вирус гриппа. Помимо очевидных плюсов создания универсальной вакцины, обеспечивающей перекрестную антительную защиту, существует также ряд негативных сторон использования только В-клеточного звена иммунной системы в качестве медиатора протекции. Индукция широкого спектра кросс-реактивных иммуноглобулинов таит в себе опасность возникновения антитело-зависимого усиления инфекционного процесса, когда антитела, не обладающие нейтрализующей активностью, облегчают проникновение вируса в клетки за счет FcγR-зависимого эндоцитоза. Формирование иммунного ответа к ограниченному набору антигенных детерминант вируса гриппа не исключает появления эскейп-мутантов, к которым у организма не будет иммунитета,

что может привести к большому числу тяжелых заболеваний. Примером могут служить рассмотренные случаи повышенной уязвимости к пандемическим штаммам H1N1 среди лиц, получавших сезонную противогриппозную вакцину [349]. В этой связи, гораздо более перспективными представляются разработки универсальной гриппозной вакцины на основе живых аттенуированных вирусов гриппа или вирусных векторов, не родственных вирусу гриппа, но экспрессирующих консервативные эпитопы данного патогена. Такие вакцины индуцируют формирование не только В-, но и Т-клеточного иммунного ответа.

Индукция кросс-протективного Т-клеточного иммунитета

Перекрестная защита от гетерологичных штаммов вируса гриппа во многом обусловлена развитием Т-клеточного иммунного ответа [380]. Т-лимфоциты распознают линейные (8-24 а.к.) эпитопы внутриклеточных антигенов вируса гриппа [381,382]. Эти белки более консервативны у разных штаммов и могут индуцировать кросс-протективный иммунный ответ [381–383]. На хорьковой модели было показано, что среди кросс-реактивных CD8⁺ Т-лимфоцитов, сформировавшихся в результате перенесенной инфекции, значительная часть специфична к антигенным детерминантам белков М1, NS2 и PA. Многие CD4⁺ Т-лимфоциты, распознающие эпитопы HA и NA, также являются кросс-реактивными. При этом, многие CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоциты распознают консервативные участки белка NP [12], более 90% последовательности которого идентично у штаммов вируса гриппа первой и второй филогенетической группы [384,385]. Анализ Т-клеточных эпитопов, представленных в базе данных IEDB (<http://www.iedb.org>) показал, что наибольшее число консервативных антигенных детерминант приходится на внутриклеточные белки вируса гриппа М1, NP и PB1 [386]. При этом, не все указанные эпитопы индуцируют кросс-протективный иммунный ответ. Изучение иммунного ответа на перекрывающиеся пептиды, полностью покрывающие белки NP и М1 показало, что снижение тяжести заболевания в большей степени коррелирует с уровнем иммунного ответа на полноразмерные белки, а не на отдельные эпитопы [387]. В целом, внутренние белки вируса гриппа менее подвержены действию естественного отбора, в результате чего Т-клеточный иммунный ответ имеет большой потенциал для формирования перекрестной защиты от гетерологичных штаммов.

Существует большое количество свидетельств ключевой роли Т-лимфоцитов в обеспечении кросс-протекции, полученных как в экспериментах на животных [388–394], так и при изучении иммунного ответа на вирус гриппа у человека [395–398]. Основными медиаторами перекрестной защиты считаются CD8⁺ Т-лимфоциты [399], однако в последнее время большое внимание уделяется роли CD4⁺ Т-клеток в иммунном ответе на вирус гриппа и, в частности, в обеспечении кросс-протекции. Несмотря на то, что данные клетки не способны самостоятельно ограничивать распространение инфекции, они активируют CD8⁺ Т-лимфоциты и В-клетки, что

делает их важными участниками противовирусного иммунного ответа [400,401]. Адоптивный перенос CD4⁺ Т-лимфоцитов защищает мышей от гриппа даже при отсутствии CD8⁺ Т-лимфоцитов [402]. Известно, что CD4⁺ Т-клетки формируют мощный иммунный ответ на иммунодоминантные эпитопы белков М и NP [387,398]. У рН1N1-серонегативных индивидов уровень кросс-реактивных CD8⁺IFN γ ⁺IL-2⁻ Т-клеток, распознающих высококонсервативные эпитопы белков PB1, M1 и NP обратно коррелировал с тяжестью симптомов заболевания при заражении пандемическим штаммом [397]. Дальнейший анализ позволил определить в качестве коррелятов протекции CD45RA⁺CCR7⁻ субпопуляцию эффекторных клеток памяти [403]. В другом исследовании было показано, что повышенное содержание IFN γ ⁺ NP-специфичных Т-лимфоцитов способствует сокращению периода вирусовыделения [404]. Кроме того, в условиях контролируемой инфекции у добровольцев была выявлена обратная корреляция между тяжестью инфекции и уровнем CD4⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к внутриклеточным белкам вируса гриппа [387].

Современные инактивированные гриппозные вакцины, обеспечивающие формирование грипп-специфичных антител и CD4⁺ Т-лимфоцитов, являются слабыми индукторами CD8⁺ Т-клеточного ответа. Живые гриппозные вакцины способны к ограниченной репликации в организме и, за счет этого, демонстрируют повышенную иммуногенность в отношении цитотоксических Т-лимфоцитов, действие которых не предотвращает инфекцию, однако существенно облегчает течение заболевания [12]. Необходимо учитывать, что поствакцинальный иммунитет различается у представителей разных возрастных групп. В клиническом исследовании у взрослых добровольцев, вакцинированных ИГВ или ЖГВ, отмечался незначительный прирост грипп-специфичных CD8⁺IFN γ ⁺Т-лимфоцитов (<0.1% на 28 д.п.и. по сравнению со значениями до вакцинации, n=20) [405], тогда как у детей в возрасте 5-9 лет уровень ответа на ЖГВ был несколько выше (<0.5% на 28 д.п.и.). При этом, Т-клеточного ответа на ИГВ у детей вовсе не отмечалось. В другом клиническом исследовании была оценена эффективность прайм-буст стратегии вакцинации с использованием трехвалентной инактивированной и живой вакцины от гриппа в различных комбинациях (ИГВ/ИГВ, ИГВ/ЖГВ, ЖГВ/ИГВ, ЖГВ/ЖГВ). Было показано, что у детей (1-3 года), получивших хотя бы одну дозу ЖГВ повышается уровень CD8⁺ Т-клеток, продуцирующих IFN γ и пролиферирующих в ответ на стимуляцию *in vitro* через 60 дней после иммунизации [390]. Адьюванты существенно усиливают Т-клеточный ответ на инактивированную вакцину [406]. Т-лимфоциты, сформированные после вакцинации ЖГВ, обладают значительным кросс-протективным потенциалом. Около 70% индивидов, задействованных в исследовании, приобретали кросс-реактивные Т-лимфоциты, способные распознавать эпитопы вирусов, с которыми испытуемый ранее не контактировал. Иммунный ответ был направлен преимущественно на внутриклеточные консервативные

вирусные белки M1, NP и PB1 [407]. При этом, иммунитет, индуцируемый живой гриппозной вакциной не способен обеспечить достаточного уровня гетеросубтипической защиты [408], что обуславливает необходимость дальнейших исследований, направленных на разработку универсальной вакцины от гриппа.

Современные подходы к созданию универсальной гриппозной вакцины весьма разнообразны. Разрабатываются вакцины, основанные на комбинации пептидов, соответствующих эпитопам белков HA и NP [409], векторные вакцины, экспрессирующие NP, M1 и другие белки вируса гриппа [410,411], ДНК- и РНК-вакцины, содержащие гены HA, NP, M2, NA, [412] а также белковые конструкции, содержащие до 6 антигенов [413,414].

Векторные вакцины от гриппа могут быть получены на основе как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов. Были предложены подходы, предполагающие использование аденовирусов, герпесвирусов, бакуловирусов, осповирусов [415–418], парамиксовирусов, флавивирусов, ретровирусов, коронавирусов, альфавирусов, буньявирусов и рабдовирусов [419–421]. Использование РНК-вирусов в качестве векторов дает определенные преимущества. Такие конструкции не способны к встраиванию в геном клетки организма-хозяина. Кроме того, жизненный цикл большинства РНК-вирусов протекает в цитоплазме и не требует транслокации в ядро, что обеспечивает более раннее начало активности вектора. Тем не менее, наибольшее распространение в настоящее время получили векторы на основе ДНК-содержащих вирусов, позволяющие получить мощный и продолжительный кросс-протективный иммунный ответ, задействующий В- и Т-клеточное звено иммунной системы.

Вакцинация при помощи интраназального введения аденовирусного вектора, экспрессирующего белки M2 и NP защищала мышей линии BALB/c от высокопатогенных штаммов вируса гриппа H1N1, H3N2 и H5N1. Протективное действие вакцины продолжалось, по крайней мере, 10 месяцев после иммунизации [422]. В аналогичном исследовании, интраназальное введение аденовирусного вектора, экспрессирующего белок NP штамма A/PR/8/34 (H1N1) обеспечивало гетеросубтипическую защиту от вирусов A/Philippines/2/82 (H3N2) и A/VN/1203/04 (H5N1) [423]. В качестве перспективных вакцинных кандидатов рассматриваются векторы на основе вируса осповакцины. Наибольшие успехи в данной области связаны с вакцинным штаммом MVA/HA1/C13L/NP (вирус осповакцины, экспрессирующий HA от A/California/04/09 (H1N1) и NP от A/VN/1203/04 (H5N1)) [424,425]. Мыши, иммунизированные при помощи данного вектора приобретали иммунитет к штаммам A/VN/1203/04 (H5N1), A/Norway/3487–2/09 (H1N1) и A/PR/8/34(H1N1), а также были частично защищены от вируса A/Aichi/68 (H3N2). Сочетанное использование аденовирусных и осповирусных векторов дает дополнительные преимущества. Прайм-буст вакцинация при помощи аденовирусного вектора, экспрессирующего белки M1 и NP с последующим введением вектора MVA-NP-M1

обеспечивала более надежную защиту от гетерологичных штаммов вируса гриппа, чем вакцинация с использованием только одного из указанных векторов [410].

Клинические испытания модифицированного вируса осповакцины Ankara (MVA)-NP+M1, экспрессирующего белки NP и M1 штамма H3N2 A/Panama/2007/99 показали, что данный вектор индуцирует умеренный прирост (~0.5%) CD8⁺IFN- γ ⁺Т-лимфоцитов у взрослых и пожилых добровольцев [426,427]. Кроме того, MVA-NP+M1 вызывает защиту от гетерологичного штамма A/Wisconsin/67/2005 [428]. В экспериментах на мышах было установлено, что векторные вакцины обеспечивают более эффективную защиту от гриппа у животных старших возрастных групп, по сравнению с инактивированными вакцинами [365,376,429,430].

В настоящее время существует ряд подходов, позволяющих индуцировать Т-клеточный иммунитет при помощи комбинаций пептидов или рекомбинантных белков. Например, вакцина Flu-v, включающая иммуногенные пептиды от вирусов гриппа А и В вызвала 4-х кратный прирост числа грипп-специфичных IFN γ ⁺ Т-лимфоцитов, полученных от привитых индивидов в рамках первой фазы клинических испытаний [431,432]. При этом, указанная вакцина не вызвала статистически-значимого облегчения симптомов заболевания при экспериментальном заражении вирусом A/H3N2/Wisconsin/67/2005 [432]. Другой вакцинный кандидат – Мультимер-001 – рекомбинантный белок, содержащий консервативные эпитопы вирусных молекул NP, M1 и HA индуцировал Т-клеточный иммунный ответ у людей и прошел I и II фазы клинических испытаний [433]. Аналогичные результаты получены для вакцинного кандидата FP-0.01, представляющего собой конструкцию, содержащую белки NP, M1, PB1 и PB2, заякоренные на фторуглеродном основании [434].

Еще одним инструментом для создания универсальной вакцины от гриппа являются ДНК-плазмиды. Они безопасны, обеспечивают быструю реализацию генетической информации, индуцируют как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ [435–438]. Стоит отметить, что у людей данные вакцины демонстрируют слабую иммуногенность, что приводит к необходимости использовать адъюванты. В рамках клинических испытаний было показано, что внутримышечная иммунизация моновалентной ДНК-вакциной, кодирующей H5 HA или трехвалентной ДНК-вакциной, кодирующей белки HA, NP и M в присутствии адъюванта приводила к индукции гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у ~70% добровольцев [439]. Недавно были разработаны вакцины на основе самореплицирующихся или нереплицирующихся РНК. В экспериментах на мышах и хорьках была показана способность РНК-вакцин, кодирующих HA, NP и NA, индуцировать CD4⁺ Т-клеточный иммунный ответ после однократной интрадермальной или внутривенной иммунизации [440,441].

Для эффективной вакцинопрофилактики гриппа необходима разработка способов индукции локального иммунитета в легких. Как уже отмечалось в разделе, посвященном роли Т-лимфоцитов в иммунном ответе на вирус гриппа, в легочной ткани после взаимодействия с патогеном формируется популяция резидентных Т-клеток памяти, обеспечивающих надежную, но недолговременную защиту от повторного заражения [442,443]. Локальный поствакцинальный Т-клеточный иммунный ответ также характеризуется низкой продолжительностью. Т_{гм}-лимфоциты легких, сформированные после вакцинации практически полностью исчезают через 7 месяцев после введения антигена [444,445]. Однако, резидентные Т-клетки памяти в верхних отделах респираторного тракта гораздо более стабильны. Согласно данным, опубликованным в статье Pizzolla et al., Т_{гм} в носовых ходах сохраняются как минимум в течение 120 дней после заражения рекомбинантным вирусом гриппа, экспрессирующим эпитоп овальбумина (Х31-OVA). В легочной ткани содержание Т_{гм} за это время сокращается приблизительно в 2 раза. Т_{гм} предотвращают распространение инфекции из верхних дыхательных путей в легкие, существенно облегчая симптомы заболевания [446]. Для индукции локального Т-клеточного ответа используется интраназальная иммунизация набором пептидов, белков или дендритных клеток, презентующих антигены вируса гриппа [249,447–449]. Кроме того, для индукции легочных Т_{гм} используются аттенуированные живые вирусы и белки вируса гриппа, ассоциированные с моноклональными антителами, стимулирующими захват данных комплексов дендритными клетками [442,443]. Помимо индукции резидентных Т-клеток памяти, интраназальная иммунизация способствует формированию грипп-специфичных секреторных IgA в респираторном тракте.

Вакцинация, помимо прямого действия, связанного с индукцией адаптивного иммунного ответа на антигенные детерминанты патогена, может оказывать определенное косвенное влияние на иммунную систему. Гетерологичные эффекты вакцинации интенсивно изучаются в настоящее время и могут иметь важное значение для разработки универсальной вакцины от гриппа.

Неспецифические эффекты вакцинации. Память врожденного иммунитета

В недавнем исследовании изучалось воздействие инактивированного штамма *Lactobacillus casei* DK128 (DK128) на развитие последующего инфекционного процесса, вызванного вирусом гриппа. Предварительное интраназальное введение DK128 существенно снижало тяжесть заболевания при заражении штаммами A/Philippines/82 (H3N2), A/California/2009 (H1N1) и A/Indonesia/05/2005 (rgH5N1). Уровень протекции положительно коррелировал с содержанием альвеолярных макрофагов в легких иммунизированных животных. Введение DK128 вызывало более раннее начало синтеза вирус-специфичных антител. Отмечалось сокращение титра вируса в легких, а также снижение уровня цитокинов воспаления и клеток врожденного иммунитета к 7 дню после заражения. Мыши, защищенные в результате

иммунизации штаммом DK128 от первичной вирусной инфекции, формировали в последствии кросс-протективный иммунитет к гетерологичным штаммам вируса гриппа. Ключевую роль в обеспечении защиты после иммунизации DK128 играли В- и CD4-Т-лимфоциты [450]. Предполагается, что в основе наблюдаемого противовирусного эффекта, индуцируемого *Lactobacillus casei* лежит преактивация клеток врожденного иммунитета, что позволяет им раньше и интенсивнее реагировать на вирусную инфекцию. Явление, при котором ответ клеток врожденного иммунитета на вторичный стимул модулируется предыдущим взаимодействием с таким же или неродственным патогеном получило название памяти врожденного иммунитета. Это один из важнейших гетерологичных эффектов вакцинации.

Память врожденного иммунитета впервые была обнаружена у NK-клеток. Было показано, что в течение нескольких месяцев после заражения MCMV в лимфоидных и нелимфоидных органах мышей присутствуют NK-клетки, несущие рецепторы KLRA8. На фоне вторичной инфекции данные клетки активируются и пролиферируют, после чего продуцируют цитокины воспаления, индуцируя таким образом иммунный ответ [451]. В рассмотренном примере реакции NK-клеток напоминают процессы клональной экспансии, осуществляемые Т-лимфоцитами, однако память врожденного иммунитета может и не иметь прямых аналогий с реакциями адаптивной иммунной системы. Установлено, что память врожденного иммунитета обусловлена эпигенетическими изменениями, происходящими в клетке после контакта с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами. Происходит ремоделирование хроматина, изменение профиля метилирования гистонов, что приводит к активации экспрессии провоспалительных молекул. В результате происходит усиление резистентности организма к инфекционным агентам, с которыми он ранее не контактировал. Так, β -глюканы грибов могут индуцировать гетерологичную защиту против *Staphylococcus aureus* [452,453], пептидогликан, входящий в состав мурамилдипептида индуцирует защиту от паразита *T. Gondii*, CpG олигонуклеотиды – против *E. Coli*, флагеллин – против *Streptococcus pneumoniae* и ротавируса [454–457]. БЦЖ индуцирует Т- и В-независимую протекцию от *Candida albicans* и *Schistosoma mansoni* [458,459]. Латентная гамма-герпесвирусная инфекция защищает мышей от бактериальных патогенов, таких как *Listeria monocytogenes* и *Yersinia pestis* [460]. Установлено, что ключевым фактором протекции является продукция IFN γ и системная активация макрофагов.

Роль памяти врожденного иммунитета в формировании поствакцинального иммунного ответа на вирус гриппа изучена слабо, однако есть все основания предполагать, что данное явление вносит вклад в обеспечение иммунной защиты от гетерологичных штаммов вируса гриппа и других патогенов. В клинических исследованиях было показано, что через 14 и 28 дней после иммунизации инактивированной гриппозной вакциной РВМС участников исследования отвечают на *in vitro*-стимуляцию LPS, *M. tuberculosis*, *C. albicans* и *S. aureus* повышенной

продукцией цитокинов воспаления $TNF\alpha$ и $IL-6$ и снижением синтеза $IL-1\beta$, $IFN\gamma$, и $IL-10$ по сравнению с ответом на аналогичную стимуляцию до вакцинации [461]. В другом исследовании было установлено, что инактивированная гриппозная вакцина способствует увеличению доли $TNF\alpha^+$ и $IL-6^+$ моноцитов в крови молодых (21-30 лет) волонтеров, тогда как у представителей старших возрастных групп (>65 лет) вакцинация вызывает усиление продукции $IL-10$ [462]. У людей, привитых инактивированной вакциной от гриппа, отмечалось усиление цитотоксических свойств НК-клеток [463]. Кроме того, было показано участие данной популяции в гетерологичном иммунном ответе на вирус A/California/7/2009 в течение 4-х недель после вакцинации сезонной трехвалентной инактивированной вакциной [464]. На фоне иммунизации живой аттенуированной вакциной происходило увеличение доли НК-клеток, экспрессирующих активационные маркеры $NKp46$ и $2B4$ [465].

Помимо памяти врожденного иммунитета, существенный вклад в формирование неспецифических последствий вакцинации вносят т.н. «клетки-свидетели». Продукция провоспалительных цитокинов в ответ на распознавание патогена клетками врожденного иммунитета может индуцировать поликлональную активацию Т- и В-лимфоцитов. В частности, $IL-15$ и $IL-18$, синтезируемые в ходе воспалительной реакции могут реактивировать $CD8^+$ Т-клетки памяти, не специфичные к патогену, вызвавшему иммунный ответ [466].

Иногда гетерологичные эффекты вакцинации могут оказывать негативное воздействие на организм. Например, был зарегистрирован ряд случаев возникновения нарколепсии у детей, иммунизированных вакциной против гриппа, содержащей адъювант AS03 [467]. Считается, что данный эффект является следствием молекулярной мимикрии: нуклеопротеин вируса гриппа, входящий в состав вакцины имеет эпитопы, последовательность которых совпадает с участками человеческого рецептора $OX2R$, экспрессирующегося в нейронах [468]. Явление молекулярной мимикрии может также объяснить наличие в крови взрослых индивидов клеток памяти, специфичных к антигенам, с которыми организм ранее не контактировал (например, белки HIV, CMV) [469].

Изучение памяти врожденного иммунитета расширяет представление о вакцинации как о способе индукции специфического иммунного ответа против конкретного инфекционного агента. Использование неспецифических эффектов вакцинации, обусловленных эпигенетическими изменениями в клетках врожденной иммунной системы в ответ на активацию паттерн-распознающих рецепторов, может дать возможность индуцировать устойчивый иммунитет к целым классам патогенов и облегчить создание универсальных вакцин от быстро эволюционирующих вирусов.

Генетический полиморфизм вируса гриппа и организма-хозяина как препятствие на пути к созданию универсальной вакцины

Вирус гриппа характеризуется постоянной антигенной изменчивостью, которой способствуют две ключевые структурно-функциональные особенности организации генома. Сегментированность вирусной геномной РНК допускает реассортационную изменчивость, в результате которой появляются вирусы, унаследовавшие генетический материал от разных родительских штаммов, что случается при одновременном инфицировании одного организма несколькими штаммами вируса гриппа. Реассортация – основная причина возникновения пандемических вирусов [470]. Вторая особенность – отсутствие корректирующей активности у вирусной РНК-полимеразы, что приводит к возникновению множества мутаций в процессе репликации генома. Нуклеотидные замены в генах, кодирующих белки НА и NA, дают вирусу возможность избегать действия антител, выработанных организмом в ответ на предыдущую инфекцию или вакцинацию. Внутриклеточные белки вируса гриппа характеризуются менее высокими темпами эволюции. Нуклеопротеин – наиболее консервативный антиген вируса гриппа, что, по всей видимости, отражает важность поддержания стабильной структуры данного белка для формирования жизнеспособных вирусных частиц. Тем не менее, NP подвергается селективному давлению, что приводит к возникновению эскейп-мутантов, позволяющих вирусу гриппа избегать действия Т-клеток памяти [471–474]. Мутации возникают в участках, которые обеспечивают взаимодействие пептида с МНС организма-хозяина, что снижает эффективность презентации соответствующего антигена [474–476]. Кроме того, аминокислотные замены происходят в области контакта пептида с Т-клеточным рецептором, что препятствует распознаванию эпитопа Т-лимфоцитами [477,478]. В экспериментах на мышах было показано, что формирование эскейп-мутантов весьма часто происходит на ранних стадиях инфекции [474]. Предотвратить формирование эскейп-мутантов может упреждающая иммунизация вакцинами, содержащими наиболее вероятные варианты эпитопов, которые могут сформироваться в ходе инфекционного цикла вируса [477].

Перспективная мишень универсальных вакцин от гриппа – консервативный стволочной домен НА – характеризуется повышенной стабильностью из-за слабого селективного давления со стороны иммунной системы, а также ввиду важности поддержания существующей структуры данного белка для его эффективного функционирования [471,479]. Попытки получить эскейп-мутанты, имеющие аминокислотные замены в стволочной области НА, дают противоречивые результаты [479,480]. Однако в последнее время появляется все больше свидетельств того, что возникновение данных мутантов вполне возможно. В частности, были обнаружены аминокислотные замены, позволяющие вирусам подтипа Н7 избегать распознавания кросс-реактивными антителами человека [280]. Кроме того, селекция, осуществленная *in vitro*, при

помощи антител, специфичных к стволочному домену позволила получить варианты штамма A/Perth/16/2009, резистентные к действию указанных антител. Полученные вирусы характеризовались сниженной пролиферативной активностью и повышенной чувствительностью к Тамифлю, но, тем не менее, успешно размножались в клеточных культурах [481].

Следует отметить, что мутации в одном эпитопе как правило не приводят к потере иммуногенности всего белка. Например, пандемический штамм H1N1 2009г обладал новой последовательностью NP₄₁₈₋₄₂₆, которая не распознавалась грипп-специфичными Т-клетками, сформированными до контакта с данным вирусом [384]. Однако пул эпитопов белка NP указанного штамма успешно рестимулировал Т-клеточный иммунный ответ у 97% обследованных [482].

На формирование перекрестного Т-клеточного иммунного ответа существенно влияет полиморфизм молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), которые у человека кодируются генами HLA-I (HLA-A, -B, и -C) и HLA-II (HLA-DR, -DQ, и -DP). Данные молекулы различаются по способности к взаимодействию с вирусными эпитопами. Профиль экспрессируемых HLA определяет иерархию иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа для каждого индивида [483]. Показано, что определенные комбинации аллелей HLA-I могут рассматриваться в качестве коррелятов перекрестной защиты от гриппа. В частности, установлено, что аллели HLA-I A*02:01, A*03:01, B*57:01, B*18:01 и B*08:01 способствуют эффективной презентации эпитопов консервативных вирусных белков NP и M1 [484]. С точки зрения популяционной генетики, дрейф генов, приводящий к увеличению частоты данной комбинации, может способствовать усилению резистентности популяции к гриппу и более эффективной защите от новых штаммов, сформировавшихся в результате мутаций и реассортаций. Следует отметить, что профиль HLA передается по наследству и существенно варьирует между различными этническими группами [484]. Кроме того, важно учитывать, что помимо комбинаций HLA-аллелей, усиливающих защиту от гриппа, существуют гаплотипы, повышающие восприимчивость организма к инфекции. Например, HLA-I аллели A*01:01, A*24:02, A*68:01 и B*15:01 наиболее эффективно взаимодействуют с уникальными эпитопами белков NP и M1 вирусов подтипа H7N9. В результате, при заражении данными штаммами, организму требуется сформировать новые CD8⁺ CTL, поскольку уже существующие грипп-специфичные Т-лимфоциты не способны распознавать указанные эпитопы, при условии, что индивид ранее не контактировал с вирусами H7N9. Данный процесс занимает длительное время и у лиц, экспрессирующих указанные варианты HLA чаще развиваются серьезные заболевания, чем у индивидов, имеющих кросс-специфичные CD8⁺ Т-клетки памяти [484]. Другой пример – слабое взаимодействие HLA-A*24 и A*68:01 с консервативными эпитопами пандемического

штамма H1N1. Наличие данных аллелей коррелировало с низким уровнем Т-клеточного ответа у пациентов, инфицированных вирусом рН1N1, приводило к усилению инфекционного процесса и повышенной летальности [485].

Таким образом, при разработке универсальной гриппозной вакцины необходимо учитывать генетический полиморфизм не только патогена, но и организма-хозяина. Даже самые консервативные антигены белков вируса гриппа со временем могут подвергаться эволюционной изменчивости, что приводит к возникновению новых патогенных штаммов, к которым у организма нет иммунитета. Кроме того, консервативные эпитопы белков вируса гриппа, вызывающие сильный иммунный ответ у отдельных индивидов, могут быть неиммуногенны для лиц с другим профилем HLA-генов.

Не исключено, что наиболее короткий путь к формированию кросс-протективного поствакцинального иммунного ответа пролегает не через обнаружение отдельных высококонсервативных эпитопов, а через расширение спектра антигенных детерминант вируса гриппа, распознающихся иммунной системой. Универсальная вакцина от гриппа должна индуцировать иммунный ответ на как можно большее число консервативных вирусных эпитопов, что позволит преодолеть антигенную изменчивость, а также низкую иммуногенность некоторых антигенных детерминант, обусловленную слабым взаимодействием с молекулами МНС. Можно предположить, что наиболее эффективно решить данную задачу позволит использование в качестве вакцины аттенуированных вирусов гриппа, не вызывающих заболевания, но характеризующихся более высокой иммуногенностью, по сравнению с лицензированными живыми гриппозными вакцинами. Одним из перспективных подходов к созданию высокоиммуногенных штаммов живой гриппозной вакцины является конструирование вирусов с поврежденной иммуносупрессорной функцией белка NS1 [15-18].

Живые вакцины на основе вирусов гриппа с модифицированным белком NS1

Вирусы гриппа с укороченным белком NS1 слабо реплицируются в интерферон-компетентных системах, однако индуцируют мощный иммунный ответ со стороны клеток врожденного иммунитета, сопровождающийся интенсивной продукцией провоспалительных цитокинов и активацией антигенпрезентирующих клеток [16,17,486]. Указанные свойства делают штаммы с удаленной или модифицированной рамкой считывания гена *NS* перспективными кандидатами на роль живой аттенуированной вакцины от гриппа. К настоящему моменту опубликован ряд работ, показывающих, что иммунизация подобными штаммами вызывает защиту от гриппозной инфекции у хорьков [19], макак [487], лошадей [488], свиней [22,489] и домашних птиц [490]. В исследованиях, проведенных на мышах, установлено, что вирусы, содержащие мутантный ген NS1, кодирующий белок с нарушенной РНК-связывающей функцией, не способны к репликации в легких, однако, вызывают развитие противовирусного

иммунного ответа Th1-типа. Иммунизация приводила к формированию высоких титров грипп-специфичных антител IgA и IgG2 (при сниженном уровне IgG1-антител) и стимулировала продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и IFN α/β . При заражении вирусом гриппа дикого типа у вакцинированных мышей не наблюдалось снижения массы тела и каких-либо других признаков заболевания. В данном исследовании также было установлено, что вирусы с укороченным белком NS1, содержащим только 125 а.к. исходной последовательности сохраняют способность к ограниченной репликации в мышечных легких. Иммунный ответ на данный штамм, как и ответ на вирус дикого типа, сопровождается повышением титра сывороточных IgG1 при сниженном уровне IgA [18]. В дальнейшем было проведено более подробное изучение различий в иммунном ответе, формирующемся при заражении вирусами с NS1-последовательностями разной длины. Было показано, что для вирусов, содержащих 73 а.к. исходной NS1-последовательности характерен наиболее интенсивный рост в мышечных легких, в то время как штаммы, содержащие 113 и 126 а.к. размножались менее интенсивно. Вне зависимости от длины NS1, иммунизация мышей модифицированными вирусами сопровождалась формированием пула CD8⁺-Т-клеток памяти, способных ко вторичному иммунному ответу после рестимуляции штаммом дикого типа [486].

Живая интраназальная вакцина, содержащая вирус с отсутствующим белком NS1, успешно прошла I и II фазы клинических испытаний, в которых было продемонстрировано, что однократная иммунизация в дозировке 7 log₁₀[fТИД₅₀]/чел является безопасной, не вызывает серьезных побочных эффектов и приводит к формированию высоких титров грипп-специфичных антител, уровень которых сопоставим с формирующимся при иммунизации холодоадаптированной живой аттенуированной вакциной [28,29]. При этом, вакцинация вирусом A/NC/20/99-like Δ NS1-H1N1 вызывала формирование кросс-реактивных антител, взаимодействовавших с гетерологичными штаммами A/Solomon Islands/3/06 и A/Brisbane/59/07 [461]. Формирование перекрестной защиты от вируса A/Indonesia/5/05 H5N1 в результате вакцинации штаммом вируса гриппа A/Vietnam/1203/04 H5N1 с отсутствующим белком NS1 было продемонстрировано в исследованиях на приматах [23]. Два года ранее было показано, что вакцинация штаммом H3N2 A/SW/TX/4199-2/98 NS1 Δ 126 полностью защищает иммунизированных свиней от соответствующего вируса дикого типа и приводит к значительному снижению тяжести заболевания у животных, инфицированных гетерологичным штаммом A/SW/IA/00239/2004 H1N1 [22]. Аналогичные результаты получены Kappes et al. в 2012 году. Кроме того, установлено, что вакцинация вирусами гриппа B/Yamagata/88 с различными модификациями NS1 защищает мышей от штамма B/Lee/40, при чем 100%-ная выживаемость была показана для групп, иммунизированных вирусами B/Yamagata/88 Δ NS1, -NS1 Δ 80 и -

NS1 Δ 110, тогда как отсутствие снижения массы тела после инфицирования было продемонстрировано только для групп -NS1 Δ 80 и -NS1 Δ 110 [26].

Высокая иммуногенность и сниженная репродуктивная активность вирусов гриппа с укороченным белком NS1 открывает широкие возможности для создания векторных вакцин путем внедрения в состав гена *NS* фрагментов генома патогенных организмов, не родственных вирусу гриппа. Показано, в частности, что иммунизация штаммом, экспрессирующим белок ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* в составе NS1, приводит к формированию протективного ESAT-6-специфичного иммунного ответа Th1-типа у мышей [10]. Векторы, экспрессирующие флуоресцентные молекулы под промотором белка NS1 могут стать удобными инструментами для изучения биологических свойств вируса гриппа и оценки активности противовирусных препаратов.

Для разработки универсальной вакцины наиболее важное значение имеют самоадьювантные свойства вирусов гриппа с укороченным белком NS1. Не вызывает сомнений, что способность данных штаммов индуцировать продукцию интерферона и других провоспалительных цитокинов оказывает непосредственное влияние на эффективность презентации вирусных пептидов в составе комплексов МНС-I и -II, и, как следствие, на формирование вирусоспецифических эффекторных Т-лимфоцитов и клеток памяти. Известно, что иммунный ответ на вирус гриппа, сформированный в результате вакцинации или после перенесения инфекции направлен на ограниченное число иммунодоминантных эпитопов [491], которые могут со временем видоизменяться под воздействием селективного давления со стороны иммунной системы и утрачивать иммуногенность. Как уже отмечалось в предыдущем разделе, мутации могут затрагивать даже наиболее консервативные антигенные детерминанты вируса, что приводит к формированию штаммов, ускользающих от гетерологичного иммунитета. Не исключено, что в результате вакцинации штаммами с укороченным белком NS1 осуществляется более эффективная презентация антигенов вируса гриппа, что в свою очередь, приводит к формированию пула Т-клеток памяти более широкого спектра действия, чем после вакцинации отдельными белками вируса гриппа или вирусами с интактным *NS*-геном. Усиление иммуногенности субдоминантных эпитопов, вовлечение в иммунный ответ наибольшего числа клонов Т- и В-лимфоцитов, а также задействование полезных неспецифических эффектов вакцинации даст возможность индуцировать перекрестный иммунитет, защищающий организм от широкого спектра штаммов вируса гриппа и позволит приблизиться к созданию универсальной гриппозной вакцины.

3. Материалы и методы

3.1. Объекты исследования

Клеточные культуры. В работе использовали культуру клеток почки собаки (MDCK, Madin–Darby canine kidney). Клетки поддерживались культивированием в среде DMEM (Invitrogen) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика-антимикотика (Gibco). Также была использована культура клеток Vero, адаптированная к росту в бессывороточной среде OptiPro (Invitrogen) с добавлением 4 mM L- глутамина (Invitrogen). Культуры клеток были получены из коллекции клеток ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России.

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). Вирусы были 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 и B/Malaysia/06/04, полученные из коллекции штаммов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава РФ.

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 были использованы, самки мышей линии Balb/c в возрасте 6-8 недель, а также самки мышей линии C57/Black-6 в возрасте 6-8 недель (Питомник лабораторных животных «Столбовая», Московская область).

3.2. Вирусологические методы

Определение инфекционной активности вирусов. Инфекционную активность исследуемых штаммов оценивали методом предельных разведений на культуре клеток Vero среде OptiPRO SFM (Invitrogen) с добавлением 2% L- глутамина (Invitrogen) и трипсина в концентрации 5мкг/мл (Sigma-Aldrich). Для определения 50%-ной тканевой инфекционной дозы (ТИД₅₀) использовали 96-луночные культуральные планшеты (Nunc). В лунки вносили по 100 мкл приготовленных разведений вирусосодержащего материала, после чего планшеты инкубировали 5 суток при температуре 34°C и 5% CO₂. 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 [492] и выражали в \log_{10} ТИД₅₀/мл.

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. Забор легких осуществляли на 2-й и 4-й дни после заражения. Для этого мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации, после чего извлекали легкие. Органы гомогенизировали с помощью прибора Tissue Lyser II (Qiagen, Германия) при 30 Гц в течение 6 мин. Определение репродуктивной активности штаммов в легких проводили титрованием гомогенатов тканей в культуре клеток MDCK методом предельных разведений.

3.3. Иммунологические методы

Иммунизация животных. Для оценки иммуногенности штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 мышей линий C57/Black/6 или Balb/c (самки) иммунизировали интраперитонеально в объеме 500 мкл или интраназально в объеме 30 мкл суспензией вируса с известным титром в натрий-фосфатном буфере (PBS, Биолот). Животные контрольной группы получали PBS в эквивалентном объеме.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Наличие антигемагглютинирующих антител в образцах сывороток крови определяли с использованием 0,5% куриных эритроцитов. Сыворотки от иммунизированных животных обрабатывали RDE в течение 18 ч при 37°C. Реакцию останавливали при помощи инкубирования проб при 57 °C в течение 30 мин. После этого сыворотки дополнительно обрабатывали равным объемом 0,5% куриных эритроцитов. При постановке реакции использовали 96-луночные панели для иммунологических реакций («Медполимер»), в которых готовили двукратные разведения обработанной сыворотки в объеме 25мкл на PBS. К раститрованной сыворотке добавляли 25 мкл вирусного антигена в стандартной дозе 4 гемагглютинирующие единицы и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 50 мкл взвеси 0,5% куриных эритроцитов и инкубировали при 4°C в течение часа до оседания эритроцитов в контрольных лунках. Титр антигемагглютинирующих антител выражали как величину, равную Log_2 наибольшего разведения сыворотки, при котором наблюдалось торможение агглютинации.

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 1Н H₂SO₄. Измерение оптической плотности (при длине волны 450нм) и расчет титра антител проводили, используя программное обеспечение MARS Data Analysis Software (BMG Labtech).

Анализ продукции цитокинов. Концентрацию цитокинов в перитонеальных смывах определяли мультиплекс системы LEGENDplex (Biolegend), согласно инструкции производителя. Для забора перитонеальных смывов мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации через 12 ч после иммунизации и при помощи шприца вводили в брюшную полость 1 мл холодного PBS. Через 5 мин перитонеальные смывы отбирали и переносили в пробирки. Образцы центрифугировали в течение 10 мин при 500g и температуре 4°C на центрифуге Eppendorf 5810R (ротор-бакет А-4-81), после чего супернатанты использовали для определения концентрации цитокинов

3.4. Проточная цитометрия

Окраска клеток врожденного иммунитета в перитонеальных смывах. Для анализа динамики популяций клеток врожденного иммунитета перитонеальные смывы получали через 12 и 24 ч после иммунизации. Для окрашивания флуорохром-конъюгированными антителами использовали 10⁶ клеток в 100 мкл. Для выявления популяций клеток врожденного иммунитета 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).

Окраска клеток врожденного иммунитета в гомогенатах легочной ткани. Забор органов для оценки параметров иммунного ответа осуществляли через 24, 48, 72 или 96 ч после инфицирования животных, в зависимости от условий эксперимента. После перфузии правого предсердия 10 мл холодного фосфатного буфера (DPBS), у животных производили забор органов. Далее предварительно обработанные ферментами легкие (45 мин, 37°C раствор коллагеназы (Sigma) 0,5 мг/мл и ДНКазы I (Sigma) 10 мкг/мл) подвергали механической диссоциации с помощью гомогенизатора Tissue Lyser II, после чего, гомогенаты тканей пропускали через 70 мкм клеточный фильтр (BD). Клетки однократно отмывали в DPBS, содержащем 5% фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 1% раствора пенициллина/стрептомицина (Gibco). Лизис эритроцитов осуществляли АСК буфером (0,15 М NH₄Cl, 10 мМ NaHCO₃, 1 мМ Na₂EDTA), с последующей отмывкой клеток в культуральной среде RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco), 1% раствора

пенициллина/стрептомицина (Gibco). После подсчета, клетки рассеивали в 96-луночные планшеты с V-образным дном (Nunc) с плотностью $1 \cdot 10^6$ клеток/луночка и осуществляли окраску поверхностных маркеров. Для изучения популяций врожденного иммунитета в легких использовалась такая же панель антител, как и при анализе клеточных популяций перитонеальной полости.

Окраска T-регуляторных клеток. При анализе T-регуляторных лимфоцитов в легких использовали следующую панель антител: CD45-BV421(Biolegend), CD4-PerCP-Cy5.5(BD Biosciences), CD8-PE-Cy7 (Biolegend), Helios-PE/Dazzle и FoxP3-Alexa 488 (Biolegend). Окрашивание по FoxP3 проводили с использованием коммерческого набора eBioscience, согласно инструкции производителя.

Выявления T-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 A/PR/8/34. Для стимуляции использовали пептиды NP₃₆₆₋₃₇₄, NP₁₆₁₋₁₇₅, NP₁₉₆₋₂₁₀, HA₄₇₄₋₄₈₃, HA₃₂₃₋₃₃₇, NA₄₂₇₋₄₃₃ и NS₁₀₈₋₁₂₄. Клетки инкубировали со специфическим стимулятором в течение 6 ч в присутствии блокатора клеточного транспорта брэфельдина А (Biolegend) 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) согласно инструкциям производителя. Для дискриминации популяций живых и мертвых клеток использовали маркер жизнеспособности Zombie Aqua (Biolegend). Для блокирования неспецифического связывания антител использовался реагент True Stain, содержащий антитела к CD16/CD32 (Biolegend). Сбор данных осуществляли на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Результаты анализировали в программе Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter).

3.5. 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-теста Стьюдента или теста Манна-Уитни. Для сравнения нескольких групп между собой использовали критерий Тьюки.

4. Результаты

4.1. Изучение патогенности, репродуктивной активности и кросс-протективных свойств вирусов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124

Для сравнения патогенности штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, а также для оценки их способности индуцировать кросс-протективный иммунный ответ в легочной ткани, мышей линии Balb/c заражали вирусом A/PR/8/34-NS124 в дозе 5 и 6 log[ТИД₅₀]/мышь (группы NS124 (5log), NS124 (6log)) или штаммом A/PR/8/34 в дозе 3, 4 и 6 log[ТИД₅₀]/мышь (группы NSfull (3log), NSfull (4log), NSfull (6log)). Контрольная группа получала PBS в соответствующем объеме (30 мкл/мышь). Патогенность штаммов оценивали на основании динамики массы тела и летальности в течении 14 дней после заражения. Уровень вирусовыделения измеряли у животных, зараженных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log[ТИД₅₀]/мышь через 2 и 4 дня после введения вируса. Также был изучен уровень провоспалительного цитокинового ответа на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при заражении в дозе 6 log[ТИД₅₀]/мышь. Через 30 дней после первичного заражения, выжившие животные из каждой группы были разделены на три группы, каждая из которых была заражена вирусом A/PR/8/34 (H1N1) дикого типа или гетерологичными штаммами A/Aichi/2/68 (H3N2) или B/Malaysia/06/04 в дозе 10 LD₅₀. Уровень протекции от гомологичного и гетерологичных штаммов оценивали на основании динамики массы тела и летальности в течении 14 дней после контрольного заражения.

Вирусы гриппа с полноразмерным и укороченным белком NS1 демонстрировали существенные различия по уровню патогенности и репродуктивной активности в легких. Штамм A/PR/8/34-NS124 в дозе 5 log[ТИД₅₀]/мышь не вызывал снижения массы тела у иммунизированных мышей. Введение мышам 6 log[ТИД₅₀] указанного штамма приводило к умеренному снижению веса в период с 5 по 10 день после заражения. Наиболее выраженные различия с контрольной группой были отмечены на 8 день, когда, в среднем, масса тела экспериментальных животных составляла 92% от исходных значений. Аналогичная доза вируса A/PR/8/34 вызывала 100% гибель животных к 7-ому дню после заражения. Введение мышам штамма A/PR/8/34 в дозе 3 и 4 log[ТИД₅₀]/мышь также приводило к выраженной потере веса и гибели животных в период с 6 по 10 день эксперимента. Летальность составила 36% и 67% при заражающей дозе 3 и 4 log[ТИД₅₀]/мышь соответственно (Рис.2).

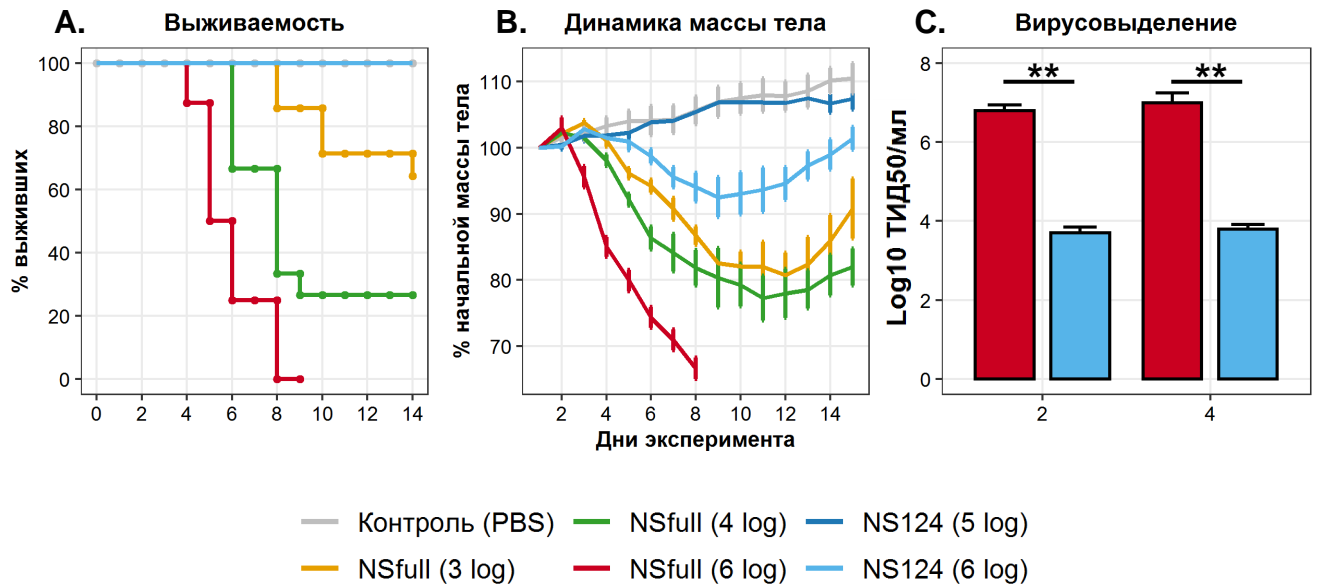


Рисунок 2. Динамика летальности и массы тела мышей, зараженных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). Репликативная активность вирусов в легких. **А.** Кривые Каплана-Мейера, отражающие долю выживших животных на различных сроках после введения вируса. **Б.** Динамика массы тела. Представлен % массы тела животных в группе относительно исходных значений (Mean±SEM). **С.** Уровень репликации вирусов в легких мышей, зараженных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log[ТИД₅₀]/мышь. **: p<0.01, t-критерий Стьюдента

Репродуктивную активность вирусов A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34 в легких мышей оценивали на 2 и 4 день после заражения путем титрования гомогенатов тканей, полученных от инфицированных животных, на культуре клеток MDCK. Титр вируса A/PR/8/34 на 4 день составил 7.00 ± 0.54 log[ТИД₅₀]/мл, тогда как титр штамма A/PR/8/34-NS124 был равен 3.80 ± 1.20 log[ТИД₅₀]/мл (p = 0.003). Полученные результаты доказывают, что использованный в настоящей работе штамм вируса гриппа с укороченным до 124 а.к. белком NS1 имел аттенуированный фенотип по сравнению с аналогичным штаммом с полноразмерным белком NS1.

4.1.1. Продукция цитокинов воспаления в респираторном тракте мышей в ответ на заражение штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124

Важную роль в патогенезе гриппозной инфекции играют цитокины воспаления, синтез которых осуществляется на ранних стадиях после заражения. Интерфероны I типа, IL-1α/β, IL-6, TNFα и другие провоспалительные факторы обеспечивают активацию механизмов противовирусной защиты, однако характеризуются рядом побочных эффектов. Показано, что

продолжительное воздействие высоких доз провоспалительных цитокинов приводит к развитию иммунопатологии (см. обзор литературы, 2.2.2.).

Для сравнения цитокиногенного потенциала штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в респираторном тракте, мышам интраназально вводили 30 мкл вирусосодержащей суспензии ($6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$). Через 1 и 3 дня после заражения анализировали концентрацию основных цитокинов воспаления в гомогенатах легочной ткани. Параллельно учитывали уровень вирусной нагрузки путем титрования гомогенатов на культуре клеток MDCK. Результаты проведенного анализа представлены на рис. 3.

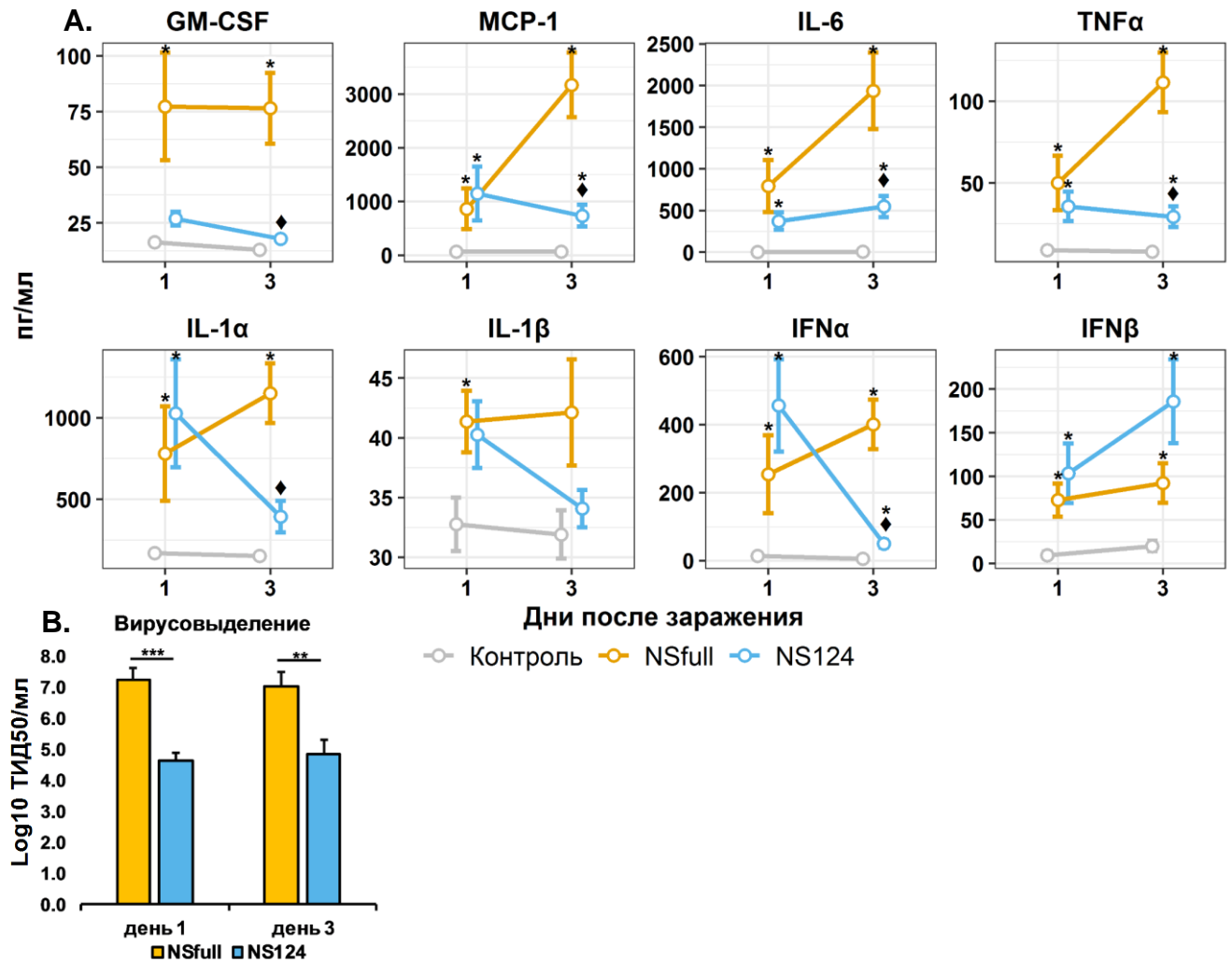


Рисунок 3. А. Концентрация провоспалительных цитокинов в гомогенатах легочной ткани мышей, зараженных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). Символ * означает наличие достоверных различий между экспериментальными группами и контролем. Символ ♦: различия между группами NSfull и NS124 (♦*; $p < 0.05$, критерий Тьюки, $n = 4$). Б. Уровень репликации вирусов в легочной ткани зараженных мышей (Mean \pm SE; **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента, $n = 4$).

Согласно полученным результатам, через 1 день после начала эксперимента у мышей, зараженных вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, отсутствовали статистически-достоверные различия по уровню изучаемых цитокинов воспаления (Рис. 3А). Наиболее высокие значения концентрации в обеих группах были получены для MCP-1, IL-6, IL-1 α и IFN α . При этом, уровень вирусывыделения в группе NSfull был на 2.6 log[ТИД₅₀] выше, чем в группе NS124. Учитывая столь значительные различия в вирусной нагрузке при отсутствии достоверных различий по концентрации цитокинов в легочной ткани, можно заключить, что вирус A/PR/8/34-NS124 обладал повышенной, по сравнению с вирусом A/PR/8/34, цитокиногенной активностью на ранних стадиях инфекции. Через 3 дня после введения вируса, в группе NSfull отмечалось усиление продукции фактора хемотаксиса моноцитов MCP-1, а также цитокинов IL-6, TNF α , IL-1 α и IFN α . В группе NS124 концентрация данных факторов, наоборот, снижалась (за исключением IL-6, уровень которого незначительно возрастал). Можно утверждать, что заражение мышей штаммом A/PR/8/34-NS124 вызывает непродолжительное, но выраженное увеличение продукции цитокинов воспаления с последующей нормализацией цитокинового фона. В то же время, штамм A/PR/8/34 индуцирует замедленную, но более длительную продукцию цитокинов, что способствует развитию иммунопатологии и объясняет высокую летальность у экспериментальных животных, зараженных данным штаммом.

4.1.2. Интраназальная иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 вызывает перекрестную защиту от вирусов A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04

Для оценки способности штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 индуцировать перекрестную защиту, мыши были инфицированы гетерологичными штаммами A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04 или гомологичным вирусом A/PR/8/34 в дозе 10LD₅₀ через 30 дней после иммунизации. Перенесение инфекции, вызванной введением штамма A/PR/8/34 в дозе 3 log[ТИД₅₀]/мышь, приводило к формированию полноценной перекрестной защиты от вирусов A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04. Аналогичные результаты были получены при интраназальной иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log[ТИД₅₀] (Рис. 4).

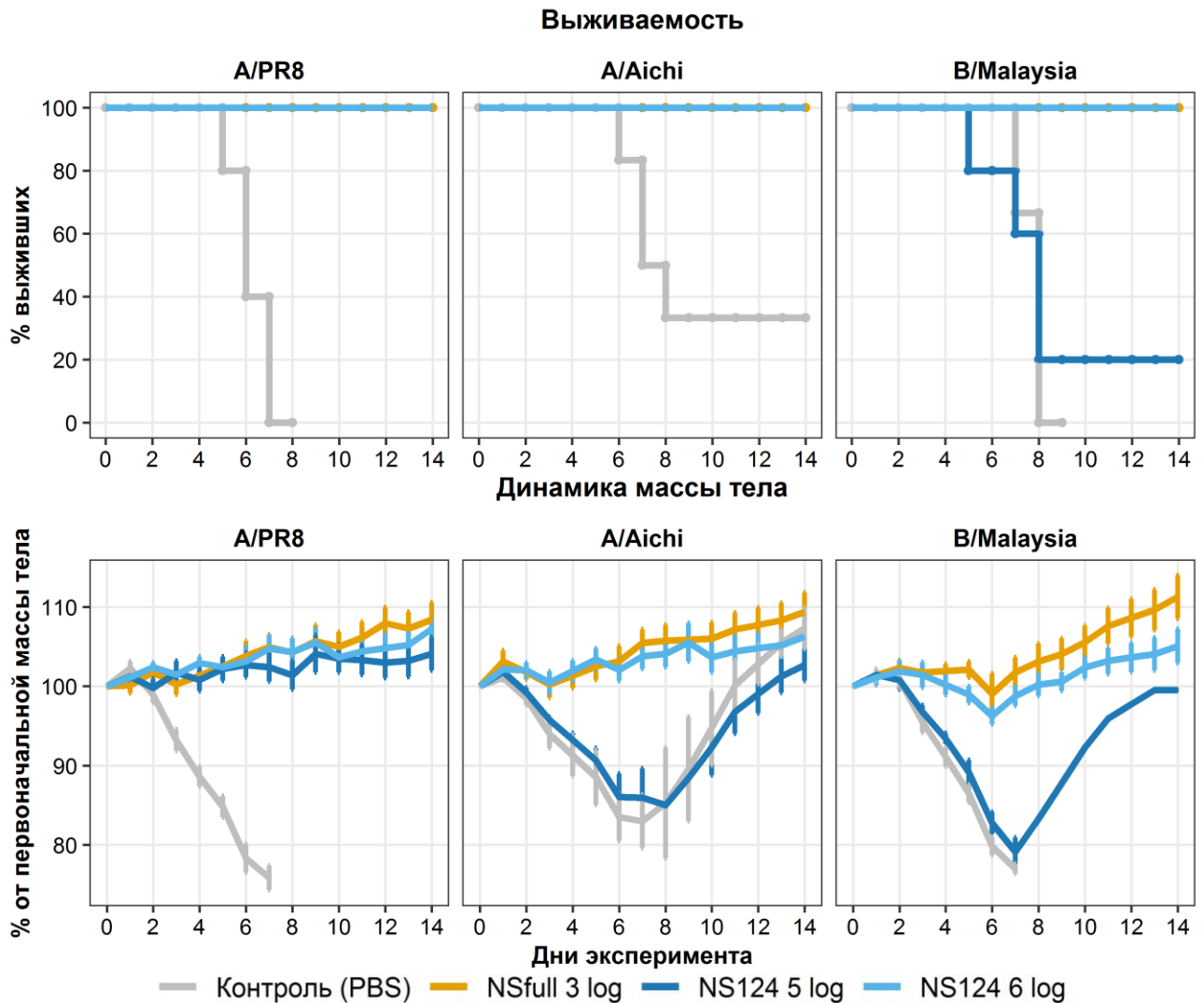


Рисунок 4. Динамика летальности и изменения массы тела мышей, интраназально иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) после гетерологичного челленджа. **А.** Кривые Каплана-Майера, отражающие долю выживших животных на различных сроках после введения вируса. **В.** Динамика массы тела (Mean \pm SE, n = 7 во всех группах).

У животных, получавших 5 log[ТИД₅₀] вируса A/PR/8/34-NS124, отмечалась потеря массы тела при гетерологичном челлендже. При этом, летальность в группе NS124 (5 log) была показана только при заражении вирусом гриппа В, что может свидетельствовать о формировании некоторого уровня гетеросубтипической защиты. В группе NS124 (6 log) и NSfull (3 log) к 6 дню после заражения штаммом B/Malaysia/06/04 происходило лишь незначительное (1-3%) снижение массы тела, а затем наблюдался стабильный набор веса до окончания периода наблюдения.

На основании полученных данных можно утверждать, что интраназальная иммунизация штаммом A/PR/8/34-NS124 дозе 6 log[ТИД₅₀], приводила к формированию гетеросубтипической и гетеротипической защиты от вирусов гриппа A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04. Уровень

протекции в результате иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124 был сопоставим с формирующимся при перенесении инфекции, вызванной вирусом A/PR/8/34, приводившей к гибели 36% зараженных животных. Полученные результаты позволяют предположить, что укорочение белка NS1 способствовало усилению иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа, в результате чего, аттенуированный штамм A/PR/8/34-NS124 вызывал столь же выраженный кросс-протективный иммунный ответ, как и патогенный штамм A/PR/8/34. Для проверки данной гипотезы необходимо сравнить штаммы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в условиях равной антигенной нагрузки, что недостижимо при интраназальной иммунизации, учитывая выраженные различия в репродуктивной активности данных штаммов в респираторном тракте. Для эффективного сравнения иммуногенности двух вирусов в настоящей работе была использована интраперитонеальная иммунизация. Согласно литературным данным, вирусы гриппа не размножаются в перитонеальной полости мышей [493], однако сохраняют способность индуцировать выраженный гуморальный и клеточный иммунный ответ [18]. Эти данные подтверждают целесообразность использования интраперитонеальной иммунизации для изучения влияния подавления функции белка NS1 на иммуногенность антигенных детерминант вируса гриппа.

4.2. Изучение врожденного иммунного ответа на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации

Для изучения продукции цитокинов и динамики популяционного состава клеток врожденного иммунитета перитонеальной полости, мыши линии C57/Black-6 были интраперитонеально иммунизированы штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе 7 log[ТИД₅₀]/мышь. Контрольная группа получала PBS в соответствующем объеме (500 мкл/мышь). Забор перитонеальных смывов осуществлялся через 12 и 24 ч после иммунизации (Рис.5).



Рисунок 5. Схема экспериментов к разделу 4.2.

4.2.1. Вирус A/PR/8/34-NS124 характеризуется повышенной цитокиногенностью, по сравнению с A/PR/8/34 при интраперитонеальной иммунизации

Цитокины воспаления, такие как IFN I типа, TNF α , IL1, IL6 и др. продуцируются в ответ на взаимодействие вируса гриппа с PRR зараженных клеток на самых ранних этапах инфекции и оказывают влияние на все стадии противовирусного иммунного ответа. Анализ концентрации цитокинов воспаления в перитонеальных смывах мышей через 12 ч после введения исследуемых вирусов показал, что для штамма A/PR/8/34-NS124 характерна более высокая цитокиногенная активность по сравнению с вирусом A/PR/8/34 (Рис.6).

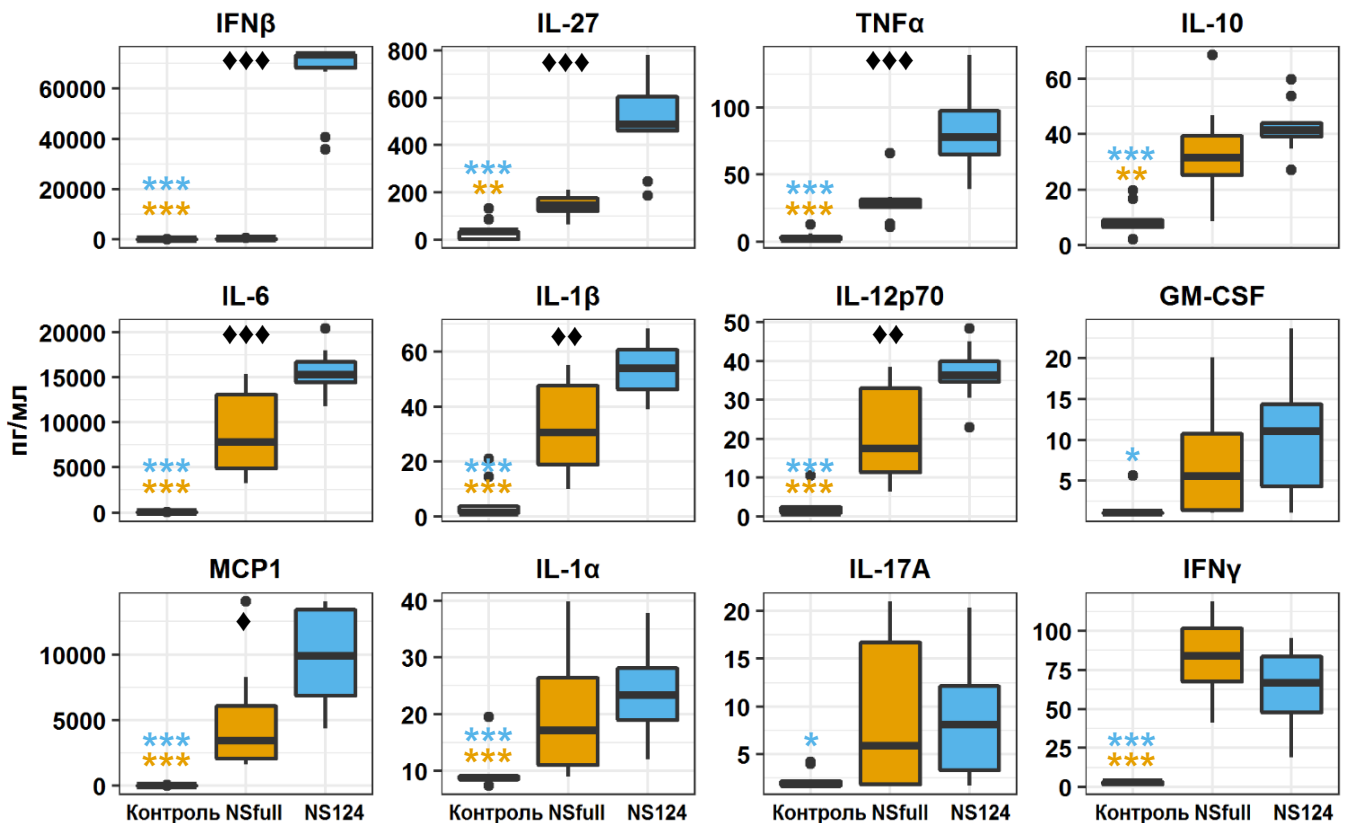


Рисунок 6. Концентрация цитокинов в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). Символ * означает наличие достоверных различий между экспериментальными группами и контролем. Символом ◆ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, критерий Тьюки, $n = 5$).

Наиболее выраженные различия были показаны для IFN β , продукция которого у мышей из группы NS124 была почти в 300 раз выше, чем у животных из группы NSfull (65635.7 ± 14650.3 пг/мл и 223.6 ± 140.3 пг/мл соответственно). Кроме того, существенные различия между двумя экспериментальными группами были получены по уровню IL27: концентрация данного цитокина в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных вирусом с укороченным белком NS1,

была в 4 раза выше, чем в группе NSfull (508.6 ± 193.5 пг/мл и 125.2 ± 64.6 пг/мл соответственно). На фоне иммунизации в обеих группах значительно возрастала продукция IL6 и хемокина MCP1 (CCL2), при этом у животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124, данные показатели были, в среднем, в 1.8 (IL6) и 2.0 (MCP1) раза выше, чем у мышей, получавших штамм A/PR/8/34. Аналогичные различия (в 1.5-2 раза) между группами были получены по уровню цитокинов TNF α , IL2p70, IL1 β и GM-CSF. Продукция IFN γ также увеличивалась в обеих экспериментальных группах, однако для мышей, иммунизированных вирусом A/PR/8/34, были получены более высокие значения концентрации данного цитокина (NSfull: 82.2 ± 26.7 пг/мл, NS124: 62.3 ± 27.0 пг/мл). Стоит отметить, что уровень регуляторного фактора IL-10 также был выше в группе NS124. Продукция IL-10 обычно ассоциирована с иммуносупрессорной активностью, однако на данном этапе иммунного ответа увеличение концентрации IL-10 не приводило к подавлению секреции провоспалительных цитокинов.

Цитокины воспаления взаимодействуют с соответствующими рецепторами на поверхности клеток врожденного иммунитета, регулируя их активность. При помощи проточной цитометрии через 12 и 24ч после введения вирусов анализировалась динамика популяционного состава клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124. Кроме того, оценивался уровень экспрессии активационного маркера CD86.

4.2.2. Оптимизация метода выявления основных популяций клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей

Набор маркеров CD45, MHCII, CD11c, CD11b, CD24, CD64, Ly6G изначально был предложен для идентификации основных популяций клеток врожденного иммунитета в легких [494,495] и других органах мышей (тонкий кишечник, сердце, почки, печень, периферические органы иммунной системы и др.) [477]. В данной работе этот подход был использован для анализа клеточного состава перитонеальных смывов, полученных от иммунизированных мышей. Была подобрана панель флуорохром-конъюгированных антител, позволяющая дифференцировать макрофаги (CD45⁺MHCII⁺CD64⁺CD11c/CD11b⁺), дендритные клетки (CD45⁺MHCII⁺CD64⁻CD24⁺ CD11c/CD11b⁺), моноциты (CD45⁺MHCII⁻CD64⁺CD11c/CD11b⁺), нейтрофилы (SSC^{hi}CD45⁺ Ly6G⁺), а также отдельные субпопуляции дендритных клеток (по уровню экспрессии маркеров CD11b и CD103) (Рис.7)

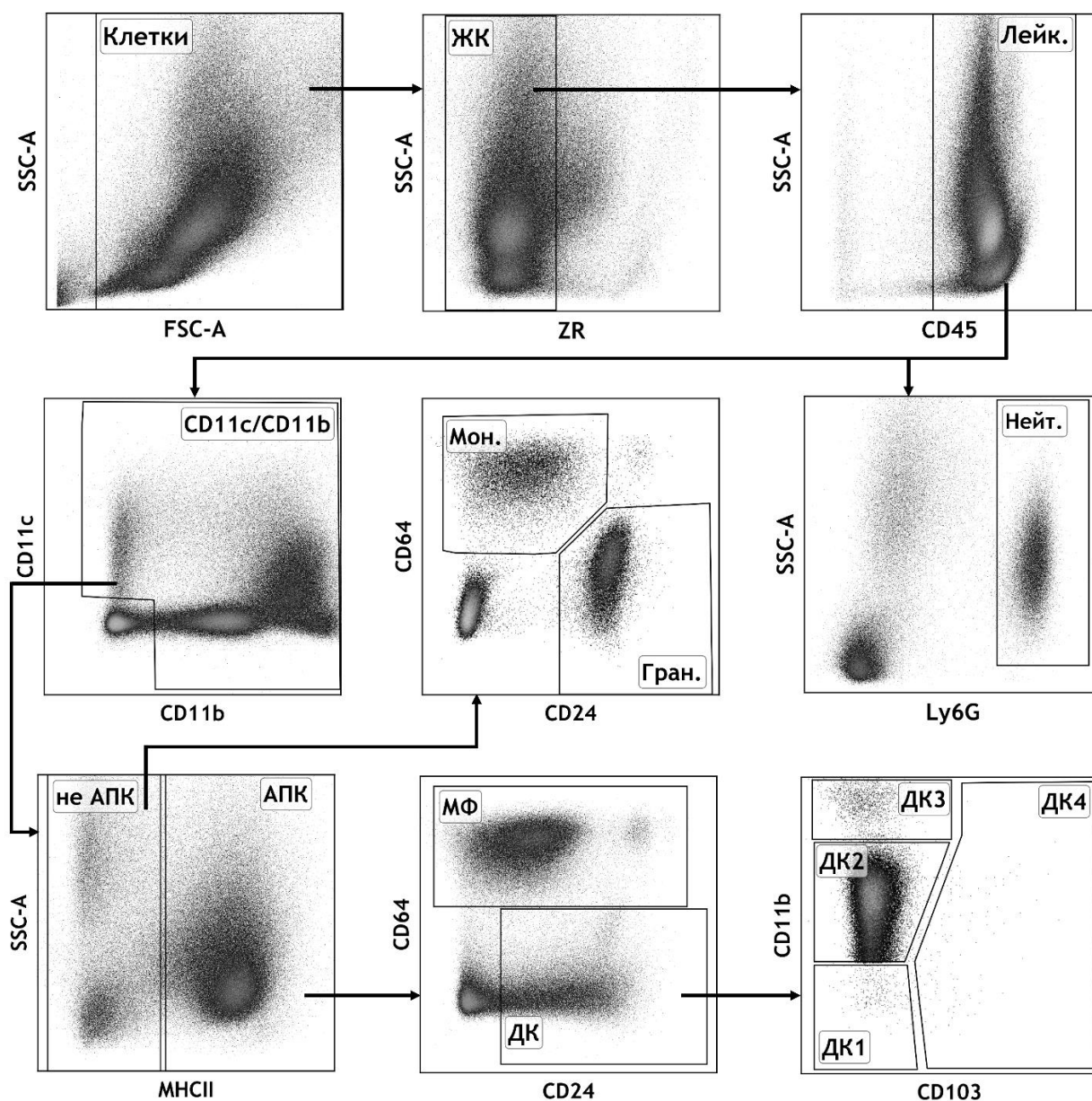


Рисунок 7. Тактика гейтирования при идентификации основных клеточных популяций перитонеальных смывов. После отсеечения дублетов по FSC-A/FSC-H (не показано на рисунке) и выделения популяции живых одиночных клеток на основании характеристик светорассеяния (FSC-A/SSC-A) и связывания красителя Zombie Red иммуноциты гейтировали по наличию маркера CD45. Условные обозначения: ЖК – живые клетки; Лейк. – лейкоциты; АПК – антигенпрезентирующие клетки ($CD45^+CD11c/CD11b^+MHCII^+$); Мон. – моноциты ($CD45^+CD11c/CD11b^+MHCII^-CD64^+CD24^-$); Гран. – гранулоциты (нейтрофилы и эозинофилы, $CD45^+CD11c/CD11b^+MHCII^-CD64^-CD24^+$); Нейт. – нейтрофилы ($SSC^{hi}CD45^+Ly6G^+$); МФ – макрофаги ($CD45^+MHCII^+CD64^+CD11c/CD11b^+$); ДК1 – $CD11b^-$ дендритные клетки ($CD45^+CD11c^+CD11b^-MHCII^+CD64^-CD24^+$); ДК2 – $CD11b^{int}$ ДК ($CD45^+CD11c^{+/-}CD11b^{int}MHCII^+CD64^-CD24^+$); ДК3 – $CD11b^{hi}$ ДК ($CD45^+CD11c^{+/-}CD11b^{hi}MHCII^+CD64^-CD24^+$); ДК4 – $CD103^+$ ДК ($CD45^+CD11c/CD11b^+CD103^+MHCII^+CD64^-CD24^+$).

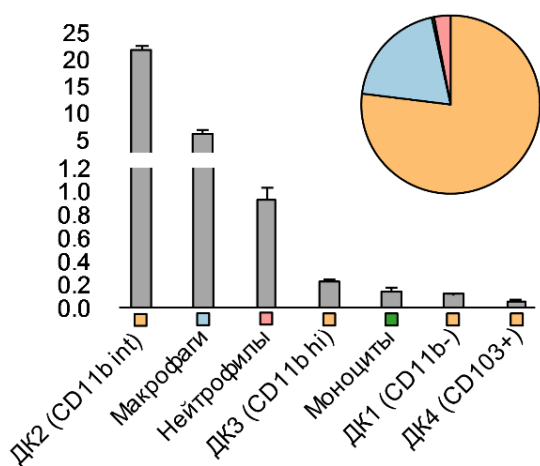


Рисунок 8. Относительное содержание клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей. Указан % изучаемых популяций от общего числа CD45⁺ клеток (Mean ± SD, n = 5)

Относительное содержание указанных популяций у интактных животных представлено на рис.8. В клеточном составе перитонеальных смывов преобладала популяция CD45⁺МНСII⁺CD64⁻CD24⁺CD11c⁻CD11b⁺, характеризующаяся промежуточным уровнем экспрессии маркера CD11b. Предположительно, данная популяция образована, в основном, дендритными клетками, о чем свидетельствует высокий уровень экспрессии маркеров МНСII и CD24 при отсутствии маркера CD64, характерного для макрофагов и моноцитов. Остальные популяции ДК у интактных животных составляли незначительную долю ($0.41 \pm 0.05\%$) от общего числа CD45⁺ клеток перитонеальной полости.

4.2.3. Динамика относительного состава клеток врожденного иммунитета в перитонеальной полости мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124

Результаты оценки относительного состава основных популяций клеток врожденного иммунитета на разных сроках после иммунизации представлены на рис. 9. Через 12 ч после введения вируса A/PR/8/34, доля моноцитов и нейтрофилов в перитонеальных смывах значительно возрастала по сравнению с контролем: 2.74 ± 2.48 и $17.65 \pm 11.32\%$ соответственно (в контроле: 0.14 ± 0.10 и $0.93 \pm 0.24\%$). В группе, иммунизированной штаммом A/PR/8/34-NS124, миграция указанных популяций носила замедленный характер. Достоверные различия с контролем отмечались только через 24ч после иммунизации ($p = 0.02$, $p = 0.0007$). При этом, уровень нейтрофилов в группе NS124 по-прежнему оставался сниженным по сравнению с NSfull. Относительный состав макрофагов через 12 ч претерпевал выраженные изменения в обеих экспериментальных группах: был отмечен достоверный прирост содержания указанных клеток по сравнению с контролем в группе NSfull ($p = 0.01$) и NS124 ($p = 0.05$).

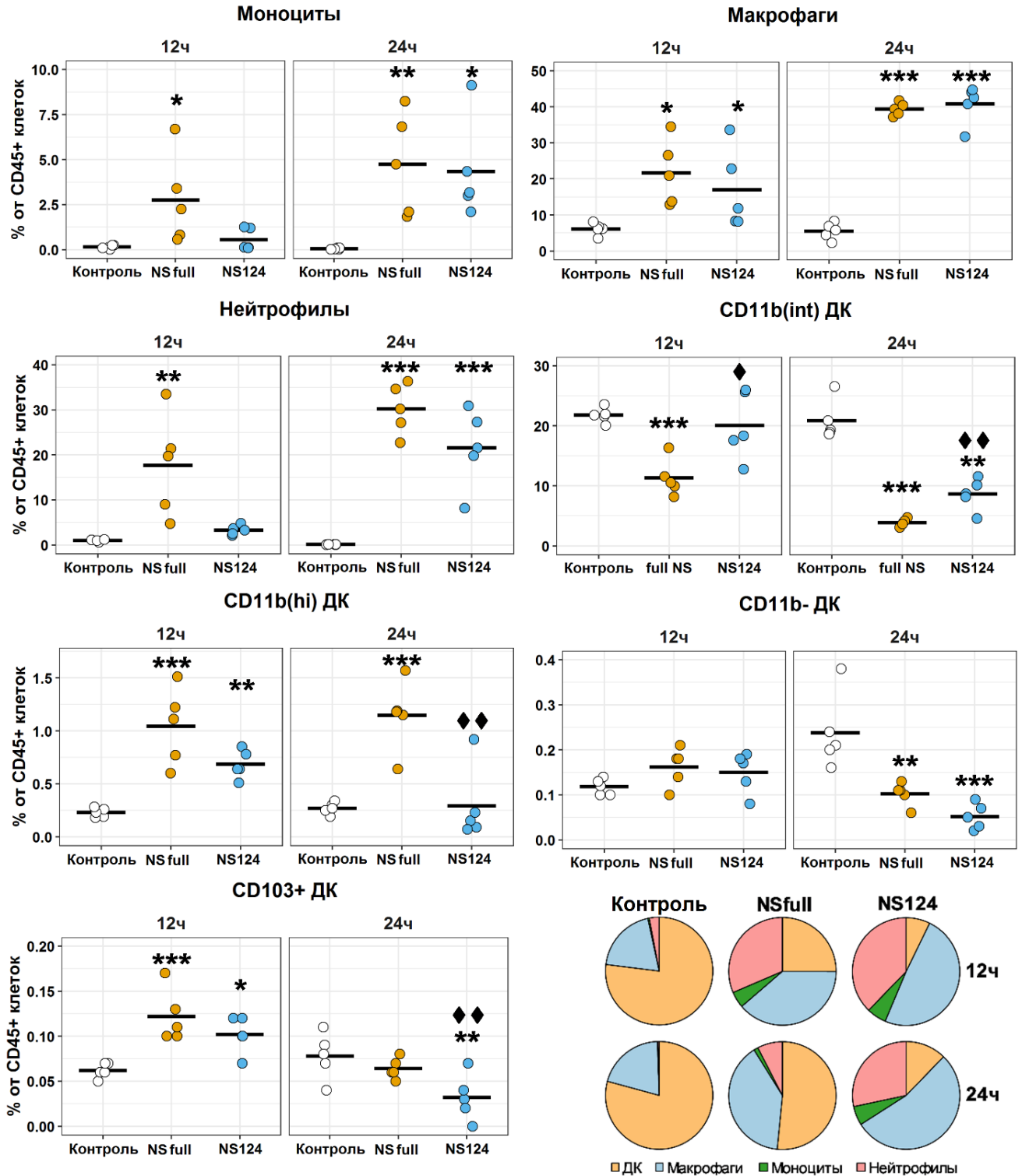


Рисунок 9. Относительный состав основных популяций клеток врожденного иммунитета. Точками отмечены индивидуальные показатели % исследуемых популяций от общего числа живых CD45⁺-клеток. Также представлены средние значения по группам (n=5). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ◆ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки).

Согласно данным, представленным на рис. 7, использованный в работе набор маркеров позволил разделить популяцию дендритных клеток ($CD45^+ CD11c/CD11b^+ MHCII^+ CD64^+ CD24^+$) на 4 субпопуляции на основании уровня экспрессии маркеров CD11b и CD103. Наибольшую долю от общего числа дендритных клеток в перитонеальной полости составляли дендритные клетки, характеризующиеся промежуточным уровнем экспрессии CD11b ($CD11b^{int}$ ДК).

Через 12 ч после введения вирусов в группе NSfull отмечалось достоверное сокращение доли $CD11b^{int}$ ДК по сравнению с контролем ($p = 0.0009$). В то же время, в группе NS124 на данном сроке не было выявлено значимых изменений относительного содержания указанной популяции. Через 24 ч в обеих группах отмечалось достоверное снижение уровня $CD11b^{int}$ ДК ($p = 0.00002$, $p = 0.00003$), однако в группе NS124 изменения носили менее выраженный характер.

Минорные популяции дендритных клеток, включающие $CD11b^{hi}$ ДК, $CD11b^+$ ДК и $CD103^+$ ДК, демонстрировали иную реакцию на введение вируса: через 12 ч после иммунизации происходило увеличение относительного содержания указанных популяций, причем в случае с $CD11b^{hi}$ ДК и $CD103^+$ ДК различия с контролем были статистически-достоверны (NSfull: $p = 0.0001$, $p = 0.0007$; NS124: $p = 0.01$, $p = 0.007$). Через 24 ч после иммунизации в группе NS124 происходило сокращение доли всех исследуемых популяций дендритных клеток относительно общего числа $CD45^+$ клеток брюшной полости. В то же время, в группе NSfull относительное содержание $CD11b^{hi}$ ДК оставалось на повышенном относительно контроля уровне, а доля $CD103^+$ ДК снижалась только до уровня контрольной группы. В группе NS124 процент $CD103^+$ ДК оказывался существенно ниже, чем в контроле. Таким образом, при иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124 на сроке 24 ч отмечались достоверное снижение относительного содержания $CD11b^{hi}$ ДК и $CD103^+$ ДК ($p = 0.004$, $p = 0.02$, соответственно).

4.2.4. Иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 приводит к усилению экспрессии ко-стимуляторного фактора CD86

Анализ экспрессии маркера CD86 широко применяется для изучения активации клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Известно, что повышение экспрессии данной молекулы сопряжено с созреванием АПК и активацией процесса презентации антигенов [496,497].

Результаты анализа медианной интенсивности флуоресценции (MFI) CD86 на АПК ($CD45^+ MHCII^+$) на сроках 12 и 24 ч после иммунизации представлены на рис.10. Уровень экспрессии CD86 значительно возрастал через 12 ч после иммунизации. Достоверные различия с контролем были отмечены в обеих экспериментальных группах, причем показатели MFI, полученные на данном сроке имели близкие значения в группах NSfull и NS124. На сроке 24 ч

после иммунизации, в группе NS124 исследуемый показатель возрастал еще сильнее, обнаруживая статистически значимые различия не только с контрольной группой, но и с группой NSfull ($p = 0.00003$ при сравнении с контролем; $p = 0.006$ при сравнении с NSfull). Различия между изучаемыми группами носили долговременный характер: через 8 дней после иммунизации уровень экспрессии CD86 на клетках перитонеальных смывов в группе NSfull и NS124 был выше, чем в контрольной группе ($p = 0.00004$). Между животными, иммунизированными штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, на сроке 8 д.п.и. также наблюдались статистически-значимые различия ($p = 0.002$).

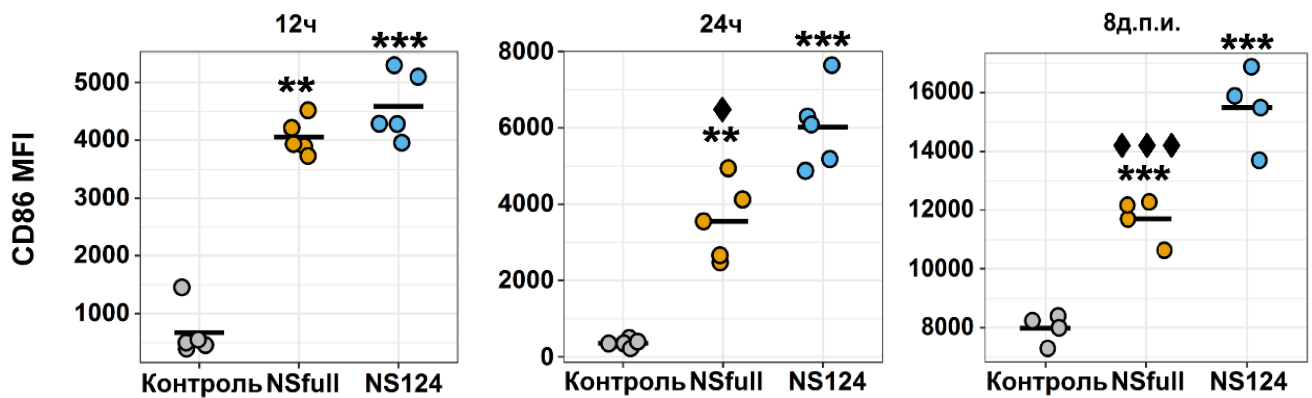


Рисунок 10. Уровень экспрессии молекулы CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПК) перитонеальной полости мышей. Представлены медианные значения интенсивности флуоресценции (MFI) маркера CD86 по каждому животному. Также представлены средние значения по группам ($n=5$). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ◆ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, критерий Тьюки).

На основании полученных данных можно заключить, что укорочение белка NS1 приводит к повышению способности вируса гриппа стимулировать систему врожденного иммунитета, что выражается в более интенсивной продукции провоспалительных цитокинов и в усиленной экспрессии ко-стимуляторного маркера CD86, повышенный уровень которого сохраняется на АПК вплоть до 8 дня после интраперитонеальной иммунизации. Можно предположить, что усиление антигенпрезентирующей активности клеток врожденного иммунитета приводит к более выраженному адаптивному иммунному ответу на антигенные детерминанты вируса гриппа с укороченным белком NS1, по сравнению с вирусом дикого типа.

4.3. Оценка адаптивного иммунного ответа на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации

Для оценки влияния укорочения белка NS1 на иммуногенность антигенных детерминант вируса гриппа, мыши линии C57/Black-6 были иммунизированы внутривентриально штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе 7 log[ТИД₅₀]/мышь. Контрольная группа получала PBS в соответствующем объеме (500 мкл/мышь). Забор селезенок осуществляли через 8 и 21 день после иммунизации (Рис. 11).

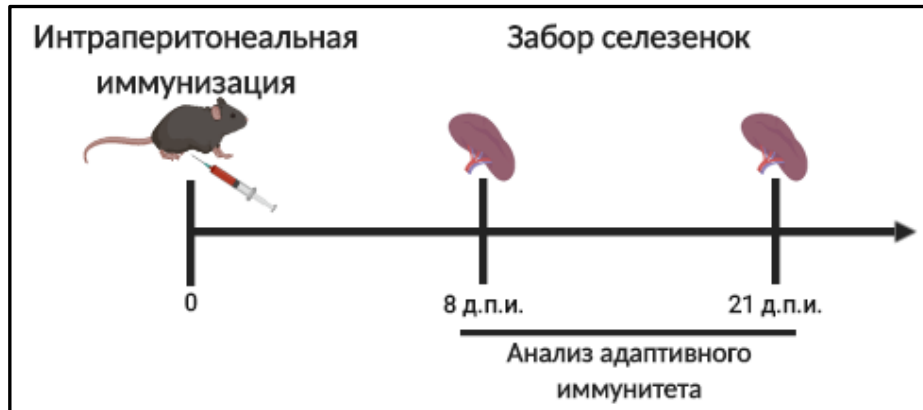


Рисунок 11. Схема экспериментов к разделу 4.3.

4.3.1. Оптимизация метода оценки иммунного ответа на вирусы гриппа A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации

Оценку адаптивного иммунного ответа на изучаемые штаммы вируса гриппа проводили при помощи измерения уровня экспрессии цитокинов $IFN\gamma$, $IL2$ и $TNF\alpha$ в ответ на специфическую стимуляцию пептидами, которые соответствовали антигенным детерминантам различных белков вируса гриппа. В работе был изучен иммунный ответ на несколько эпитопов нуклеопротеина ($NP_{366-374}$, $NP_{161-175}$, $NP_{196-210}$). Данный белок имеет наиболее консервативную структуру среди антигенов вируса гриппа. Предполагается, что иммунный ответ на эпитопы NP вносит существенный вклад в формирование перекрестной защиты от неродственных штаммов. Также анализировался Т-клеточный ответ на консервативные эпитопы поверхностных белков ($HA_{474-483}$, $HA_{323-337}$, $NA_{427-433}$) и на эпитоп неструктурного белка $NS1_{108-124}$.

Для выявления основных популяций клеток адаптивного иммунитета в селезенке была использована панель флуоресцентно-меченных антител к поверхностным маркерам $CD4$, $CD8$, $CD44$, $CD62L$. Данный набор позволяет идентифицировать популяции наивных ($CD44^-CD62L^+$) и эффекторных ($CD44^+CD62L^-$) Т-лимфоцитов, а также центральные клетки памяти ($CD44^+CD62L^+$). При помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов $IFN\gamma$, $IL2$ и $TNF\alpha$ выявляли популяции монофункциональных ($IFN\gamma^+IL2^-TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^-IL2^+TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^-IL2^-TNF\alpha^+$) и полифункциональных ($IFN\gamma^+IL2^+TNF\alpha^-$, $IFN\gamma^+IL2^-TNF\alpha^+$, $IFN\gamma^-IL2^+TNF\alpha^+$, $IFN\gamma^+IL2^+TNF\alpha^+$)

CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, секретирующих 1, 2 или 3 цитокина в различных комбинациях. На рис. 12 представлена тактика гейтирования для выявления указанных популяций в селезенке.

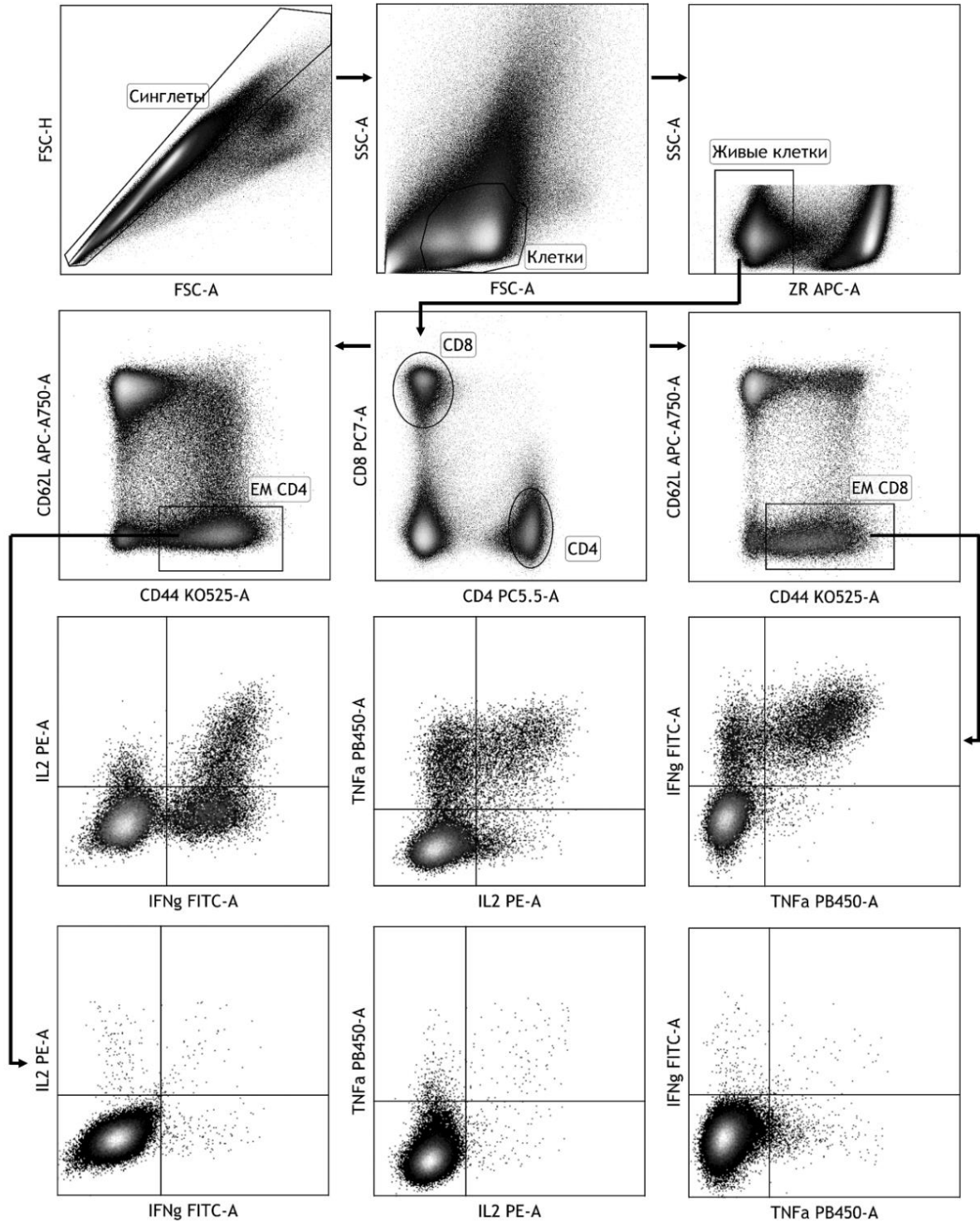


Рисунок 12. Схема последовательного гейтирования при оценке антигенспецифичных Т-лимфоцитов. На основании характеристик прямого и бокового светорассеивания (FSC/SSC) и флуоресценции Zombie Red из анализа исключали нежизнеспособные клетки. Популяцию живых клеток разделяли на две основные субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы (CD4⁺) и

цитотоксические Т-клетки ($CD8^+$). По наличию маркеров $CD44$ и $CD62L$ выделяли субпопуляции центральных (СМ) и эффекторных (ЕМ) Т-клеток памяти. Популяция эффекторных Т-клеток памяти в дальнейшем характеризовалась по способности к внутриклеточной продукции цитокинов ($IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL2$).

4.3.2. Иммунный ответ на вирусы гриппа А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации имеет дозозависимый характер

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы, мышам линии C57/Black-6 интраперитонеально вводили вирусы гриппа А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124 в дозе 2, 4, 6 и 7 $\log[ТИД_{50}]/мышь$. Антигенспецифичный цитокиновый ответ спленоцитов на иммунодоминантный эпитоп $NP_{366-374}$ оценивали через 8 дней после иммунизации. Результаты проведенного анализа представлены на рис. 13.

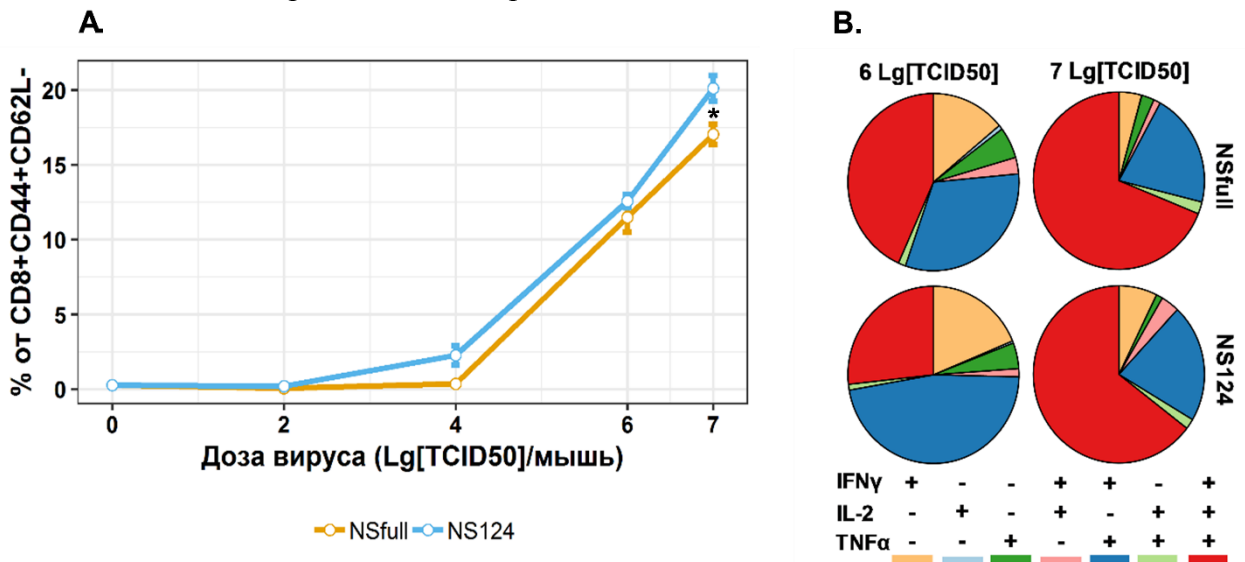


Рисунок 13. Продукция цитокинов $IFN\gamma$, $IL2$ и $TNF\alpha$ $CD8^+$ Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных вирусами А/PR/8/34 (NSfull) и А/PR/8/34-NS124 (NS124) в различных дозах. А. На графиках представлены средние значения ($Mean \pm SE$, $n = 4$) совокупной доли цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа эффекторных $CD8^+$ Т-клеток ($CD8^+CD44^+CD62L^-$). **Б.** На круговых диаграммах представлено относительное содержание популяций, продуцирующих 1, 2 или 3 цитокина одновременно в общем пуле цитокинпродуцирующих эффекторных $CD8^+$ Т-лимфоцитов. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента).

У мышей, иммунизированных штаммом А/PR/8/34-NS124 формирование антигенспецифичных $CD8^+$ Т-клеток ($2.26 \pm 0.62\%$ от общего числа $CD8^+$ Тем) происходило в ответ на введение вируса в дозе 4 $\log[ТИД_{50}]$, тогда как штамм А/PR/8/34 в данной дозе был неиммуногенен. Наиболее выраженный иммунный ответ наблюдался при введении исследуемых

штаммов в дозе $7 \log[\text{ТИД}_{50}]$ (NSfull: 17.04 ± 0.69 ; NS124: 20.11 ± 0.86). Усиление продукции цитокинов в ответ на стимуляцию было характерно только для популяции эффекторных CD8^+ Т-лимфоцитов ($\text{CD44}^+\text{CD62L}^-$). CD4 Т-клетки, а также лимфоциты центральной памяти обеих популяций не отвечали на рестимуляцию пептидом. Поскольку между группами, иммунизированными вирусом с полноразмерным и укороченным белком NS1 в дозе $7 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$, наблюдалась статистически-достоверная разница по уровню цитокинового ответа ($p = 0.02$), указанная доза была выбрана для дальнейших экспериментов. Обращает на себя внимание также разница в относительном содержании полифункциональных CD8^+ Т-клеток ($\text{IFN}\gamma^+\text{IL-2}^+\text{TNF}\alpha^+$), формирующихся в ответ на иммунизацию в дозе 6 и $7 \log[\text{ТИД}_{50}]$. Как показано на круговых диаграммах на рис. 13В., повышение дозы приводило к увеличению доли тройных продуцентов в общем числе цитокинпродуцирующих Т-лимфоцитов. Указанные изменения были характерны для обоих штаммов.

4.3.3. Эпитопы вируса A/PR/8/34-NS124 обладают повышенной иммуногенностью при интраперитонеальной иммунизации

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 осуществлялся при помощи базы данных IEDB (www.iedb.org). При выборе эпитопов для включения в исследование учитывались данные по их консервативности среди различных штаммов гриппа, а также их способность взаимодействовать с молекулами МНС мышей линии C57/Black-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 использовались последовательности, представленные в базе данных Influenza Research Database. В скобках представлено отношение числа последовательностей, содержащих

указанный эпитоп к общему числу проанализированных последовательностей. Данные об иммуногенности эпитопов были получены из литературных источников, в которых приводится сопоставление иммунного ответа на различные антигенные детерминанты вируса гриппа [384,471,478,491,498,499]. Использованный в настоящей работе набор пептидов позволяет оценить влияние модификации белка NS1 на иммуногенность иммунодоминантных и субдоминантных антигенных детерминант вируса гриппа, входящих в состав внутренних (NP, NS1) и поверхностных (HA, NA) белков и различающихся по степени консервативности.

На рис. 14 представлены результаты анализа относительного содержания цитокинпродуцирующих клеток среди эффекторных ($CD44^+CD62L^-$) $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов через 8 дней после интраперитонеальной иммунизации. Согласно полученным данным, иммунизация вирусом с укороченным белком NS1 приводила к усилению иммунного ответа $CD8^+$ Т-клеток на иммунодоминантный эпитоп нуклеопротеина NP₃₆₆₋₃₇₄, а также на низкоиммуногенные эпитопы белков NP, HA, NA и NS1. Наиболее выраженные различия между группами NSfull и NS124 были получены при рестимуляции пептидами NP₃₆₆₋₃₇₄ ($p = 0.013$), HA₄₇₄₋₄₈₃ ($p = 0.03$), NP₁₉₆₋₂₁₀ ($p = 0.05$) и NS1₁₀₈₋₁₂₄ ($p = 0.015$). В остальных случаях уровень цитокинового ответа в группе NS124 также был выше, чем в группе NSfull, однако статистически-значимые различия выявлены не были.

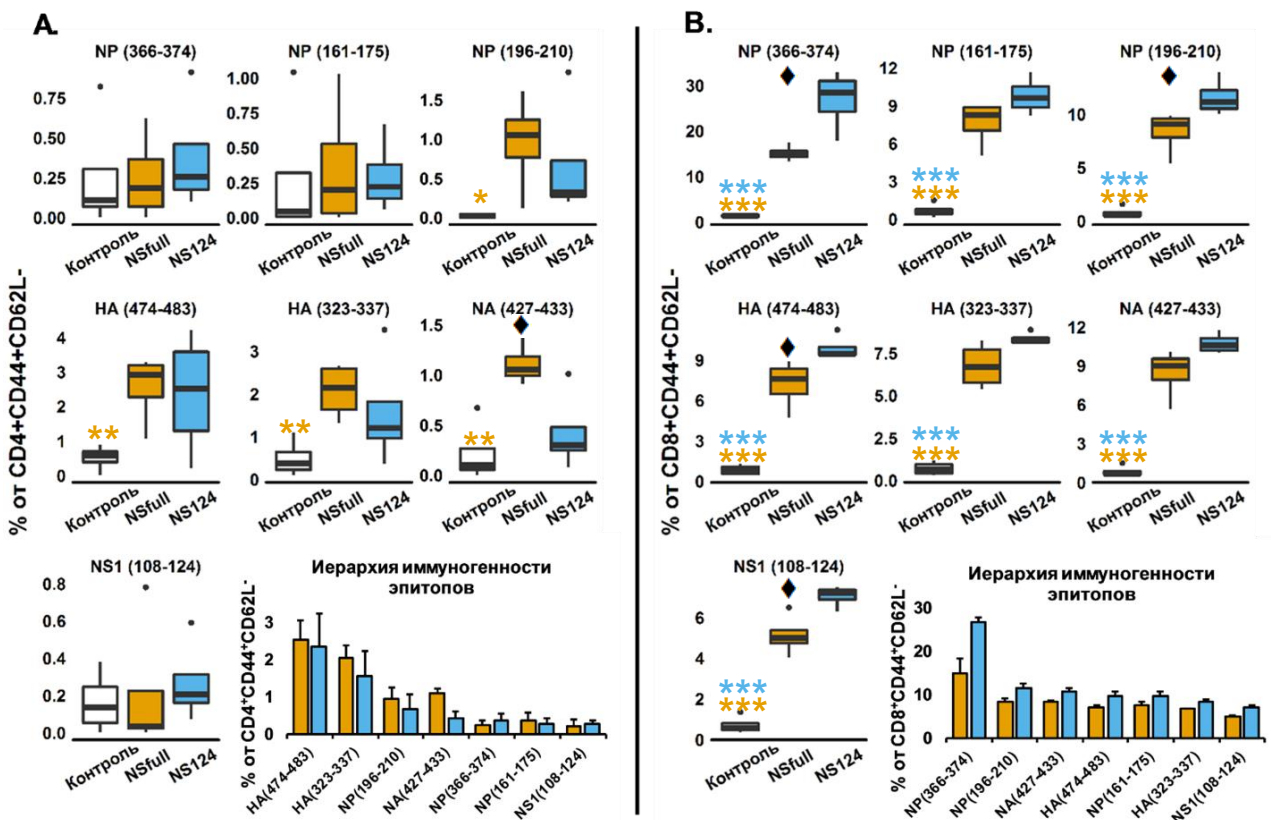


Рисунок 14. Продукция цитокинов IFN γ , IL2 и TNF α $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) в ответ на стимуляцию пептидами. На графиках представлены значения совокупной доли цитокин-

продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа эффекторных CD4⁺ (А.) и CD8⁺ (В.) Т-клеток (CD4/8⁺CD44⁺CD62L). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ♦ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки).

В отличие от CD8⁺ Т-лимфоцитов, CD4⁺ Т-клетки демонстрировали менее выраженный ответ на эпитопы вируса гриппа после интраперитонеальной иммунизации (Рис. 14А). Доля антигенспецифичных эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов у животных, иммунизированных штаммом А/PR/8/34-NS124, составила 0.5-2%, тогда как в группе NSfull данный показатель находился в пределах 1-3%. Достоверные различия с контролем в группе NSfull были зарегистрированы после рестимуляции пептидами NP₁₉₆₋₂₁₀ (p = 0.02), HA₄₇₄₋₄₈₃ (p = 0.009), HA₃₂₃₋₃₃₇ (p = 0.006) и NA₄₂₇₋₄₃₃ (p = 0.003). У мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, не было выявлено статистически-значимого увеличения продукции цитокинов в ответ на рестимуляцию по сравнению с контрольной группой. В целом, ответ CD4⁺ Т-лимфоцитов у животных из группы NSfull носил более выраженный характер, чем в группе NS124, однако достоверные различия были выявлены только при стимуляции пептидом NA₄₂₇₋₄₃₃ (p = 0.02).

Графики, представленные в нижней части рис. 14А и В иллюстрируют иерархию иммуногенности изучаемых эпитопов. Полученные данные позволяют заключить, что уровень иммунного ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов на иммунодоминантный эпитоп NP₃₆₆₋₃₇₄ в 2-3 раза превышал уровень ответа на другие исследуемые антигенные детерминанты. Между образцами, стимулированными пептидами NP₁₆₁₋₁₇₅, NP₁₉₆₋₂₁₀, HA₄₇₄₋₄₈₃, HA₃₂₃₋₃₃₇, NA₄₂₇₋₄₃₃ и NS1₁₀₈₋₁₂₄ не было выявлено статистически-значимых различий по числу цитокинпродуцирующих клеток как в группе NSfull, так и в группе NS124. Наиболее иммуногенными для CD4⁺ Т-лимфоцитов оказались эпитопы HA₄₇₄₋₄₈₃ и HA₃₂₃₋₃₃₇. Иммунный ответ на другие эпитопы носил слабовыраженный характер.

Важную роль в обеспечении противовирусного иммунного ответа играют полифункциональные Т-лимфоциты, одновременно продуцирующие два и более цитокина (IFN γ , IL2 и TNF α) в различных комбинациях. Известно, что полифункциональные Т-клетки секретируют больше провоспалительных факторов, чем монофункциональные Т-лимфоциты [256]. Кроме того, именно полифункциональные Т-клетки служат источником для формирования долгоживущих клеток памяти [259,500]. Использование многоцветной проточной цитометрии позволяет количественно оценить вклад различных популяций цитокинсекретирующих Т-клеток в иммунный ответ на различные антигенные детерминанты вируса гриппа. Результаты оценки

относительного содержания различных цитокинпродуцирующих популяций представлены на рис. 15.

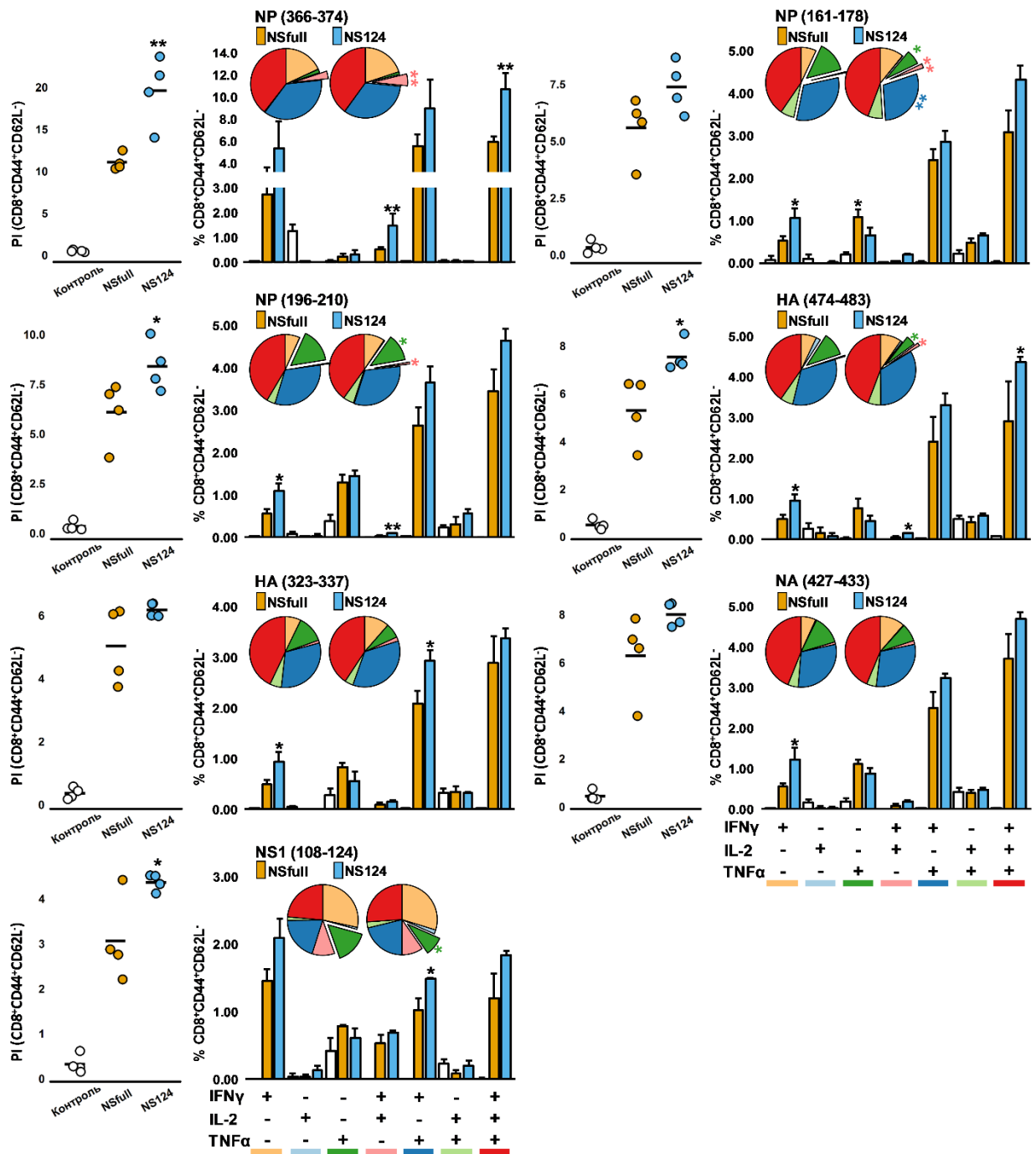


Рисунок 15. Популяционный состав цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). На столбчатых диаграммах представлены средние значения (Mean \pm SE, n = 4) доли различных популяций цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от 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 цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Отдельными точками приведены

индивидуальные значения индекса полифункциональности (PI). Также представлены средние значения PI для каждой группы. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента).

Столбчатые диаграммы на рис. 15 отражают долю отдельных популяций цитокинпродуцирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов от общего числа CD8⁺CD44⁺CD62L⁻ Т-клеток. На круговых диаграммах представлено относительное содержание каждой популяции в общем пуле цитокинсекретирующих Т-лимфоцитов. Также на рис. 15 приведены значения индекса полифункциональности (PI). Данный показатель, предложенный в работе Larsen et al. [501], отражает общий уровень функциональной активности Т-лимфоцитов и рассчитывается по формуле:

$$PI = \sum_{i=1}^n F_i \left(\frac{i}{n}\right)^q$$

Где n – число анализируемых функций (в данном случае $n = 3$, т.к. оценивается продукция 3-х цитокинов: IFN γ , IL-2 и TNF α), F – доля (%) клеток, выполняющих i функций. Коэффициент q в настоящей работе принимался равным 1 (в работе Larsen et al., предлагается выбирать коэффициент q исходя из представлений о биологической значимости полифункциональных клеток. Повышение q приводит к увеличению относительного «веса» полифункциональных популяций. Поскольку роль полифункциональных Т-лимфоцитов в иммунном ответе на вирус гриппа остается малоизученной, в настоящем исследовании принимался наиболее консервативный вариант расчета PI).

Среди антигенспецифичных эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов преобладают популяции двойных (IFN γ ⁺IL-2⁻TNF α ⁺) и тройных (IFN γ ⁺IL-2⁺TNF α ⁺) продуцентов. В ответе на слабоиммуногенные пептиды также принимали участие монофункциональные Т-лимфоциты, продуцирующие IFN γ и TNF α . Различия между группами NSfull и NS124 были обусловлены, преимущественно, более высоким уровнем IFN γ ⁺IL-2⁻TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ у животных, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1. Достоверные различия были отмечены при стимуляции пептидами NP₃₆₆₋₃₇₄ ($p = 0.0008$), HA₄₇₄₋₄₈₃ ($p = 0.03$), HA₃₂₃₋₃₃₇ ($p = 0.04$) и NS1₁₀₈₋₁₂₄ ($p = 0.04$). Кроме того, в группе NS124 в большем объеме была представлена минорная популяция IFN γ ⁺IL-2⁺TNF α ⁻, которая практически отсутствовала у животных, иммунизированных вирусом дикого типа при рестимуляции пептидами NP₁₆₁₋₁₇₈, NP₁₉₆₋₂₁₀, HA₄₇₄₋₄₈₃ и NA₄₂₇₋₄₃₃. Таким образом, CD8⁺-Т-клеточный иммунный ответ на вирус A/PR/8/34-NS124 характеризовался не только более интенсивной продукцией цитокинов, но также повышенной полифункциональностью антигенспецифичных Т-клеток и более широким спектром популяций, участвующих в иммунном ответе.

Цитокиновый ответ $CD4^+$ Т-лимфоцитов характеризовался преобладанием монофункциональных $IFN\gamma^+IL-2^-TNF\alpha^-$ Т-клеток. Достоверные различия между группами NSfull и NS124 по уровню данной популяции были выявлены при стимуляции пептидом $NA_{427-433}$ ($p = 0.01$). Несмотря на то, что уровень иммунного ответа $CD4^+$ Тем в группе NS124 был, в среднем, ниже, чем в группе NSfull, только у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным геном NS, были выявлены полифункциональные $IFN\gamma^+IL-2^+TNF\alpha^+$ $CD4^+$ Т-лимфоциты (Рис. 16, стимуляция $NP_{196-210}$).

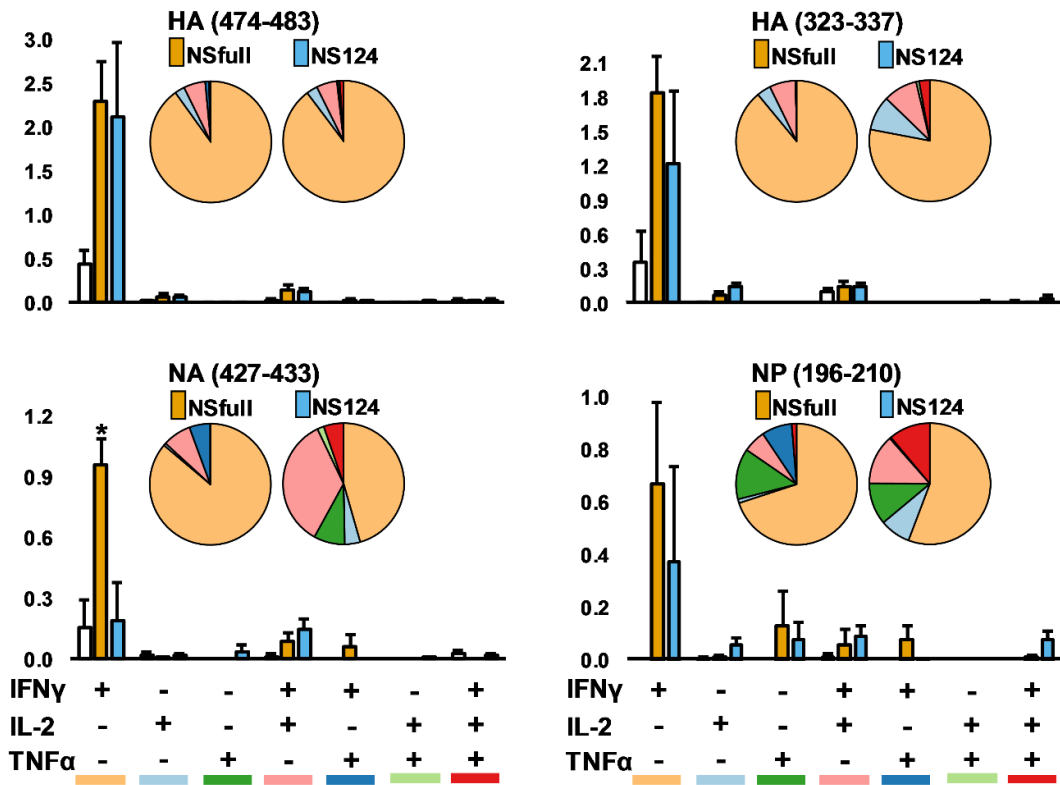


Рисунок 16. Популяционный состав цитокинпродуцирующих эффекторных $CD4^+$ Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). На столбчатых диаграммах представлены средние значения ($Mean \pm SE$, $n = 4$) доли различных популяций цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа эффекторных $CD4^+$ Т-клеток ($CD4^+CD44^+CD62L$). На круговых диаграммах представлено относительное содержание популяций, продуцирующих 1, 2 или 3 цитокина одновременно в общем пуле цитокинпродуцирующих эффекторных $CD4^+$ Т-лимфоцитов. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента).

4.3.4. Полифункциональные CD8⁺ Т-лимфоциты мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34-NS124, обладают повышенной экспрессией IFN γ

IFN γ – один из наиболее важных противовирусных цитокинов. Уровень экспрессии IFN γ в ответ на специфическую стимуляцию долгое время рассматривался в качестве основного коррелята протекции. В настоящее время все больше внимания в литературе уделяется роли полифункциональных Т-лимфоцитов в защите от вирусных и бактериальных инфекций [255,256,502,503]. Известно, что полифункциональные клетки, экспрессирующие одновременно несколько цитокинов характеризуются повышенной интенсивностью синтеза данных молекул, по сравнению с монофункциональными лимфоцитами. Уровень цитокинпродуцирующей активности клеток оценивают при помощи измерения медианной (MedFI) или средней (MFI) интенсивности флуоресценции анализируемой популяции, а также при помощи расчета интегрального показателя iMFI, представляющего собой произведение MFI данной популяции на ее численность (%) (метод предложен в работе Darrah et al., [256]). В настоящем исследовании анализируется уровень экспрессии IFN γ в популяциях IFN γ^+ IL2⁻TNF α^+ и IFN γ^+ IL2⁺TNF α^+ CD8⁺ Тem, которые играют ведущую роль в формировании иммунного ответа на специфическую стимуляцию у мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124.

Данные, представленные на рис. 17 позволяют заключить, что полифункциональные популяции антигенспецифичных клеток (IFN γ^+ IL2⁻TNF α^+ и IFN γ^+ IL2⁺TNF α^+), сформированные в ответ на иммунизацию штаммом A/PR/8/34-NS124, продуцируют больше IFN γ , чем аналогичные популяции у мышей, получавших вирус A/PR/8/34. Наиболее выраженные различия по показателю MFI IFN γ в популяциях IFN γ^+ IL2⁺TNF α^+ и IFN γ^+ IL2⁻TNF α^+ между группами NSfull и NS124 были выявлены при стимуляции пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄ ($p \ll 0.0001$ для обеих популяций). Кроме того, для группы NS124 были получены более высокие значения iMFI IFN γ ($p = 0.00003$, $p = 0.02$).

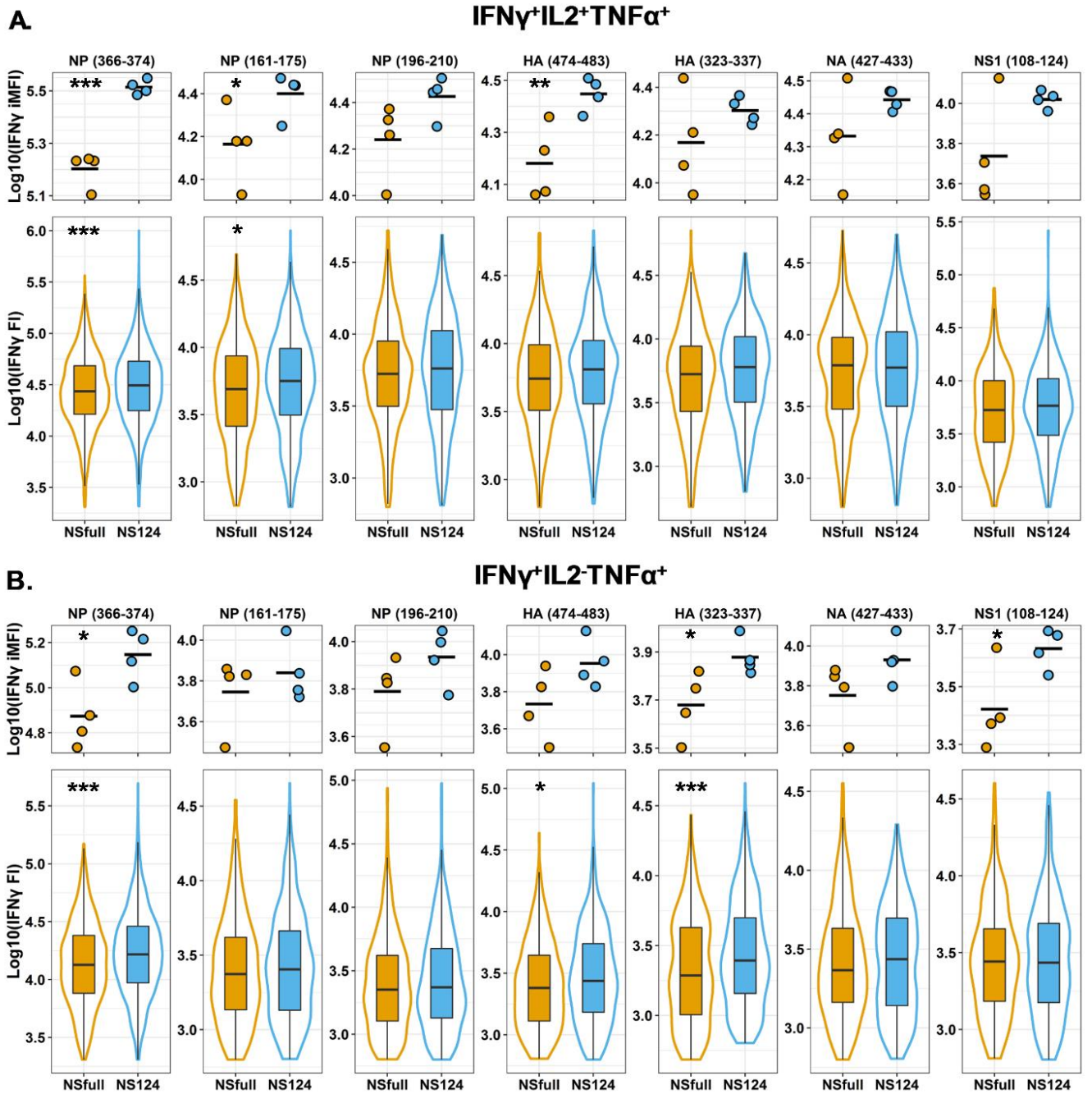


Рис. 17. Уровень экспрессии молекулы IFN γ полифункциональными CD8⁺ Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). В верхней части рисунков **A** и **B** представлены интегральные медианные значения интенсивности флуоресценции (iMFI) IFN γ по каждому животному. Также представлены средние значения по группам (n=4). В нижней части рисунка показано распределение Т-лимфоцитов экспериментальных животных по уровню флуоресценции IFN γ . Представлены объединенные значения по каждой группе. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

Выявленные различия указанных показателей у животных, иммунизированных штаммом с укороченным и полноразмерным белком NS1, свидетельствуют о качественных различиях в иммунном ответе на изучаемые штаммы. Можно заключить, что вирус гриппа A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальном введении не только стимулирует образование большего числа антигенспецифичных CD8⁺ Т-лимфоцитов, чем вирус A/PR/8/34, но и усиливает цитокинпродуцирующую активность полифункциональных Т-клеток, что приводит к формированию более высоких значений MFI и iMFI IFN γ в популяциях IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ в группе NS124, по сравнению с NSfull. Следует отметить, что не все способы стимуляции приводили к формированию достоверных различий между группами NSfull и NS124, однако, в среднем, стимуляция пептидами NP₃₆₆₋₃₇₄, NP₁₆₁₋₁₇₅, NP₁₉₆₋₂₁₀, HA₄₇₄₋₄₈₃, HA₃₂₃₋₃₃₇, NA₄₂₇₋₄₃₃ и NS1₁₀₈₋₁₂₄ вызывала более выраженную продукцию IFN γ полифункциональными клетками животных из группы NS124, по сравнению с группой NSfull. Таким образом, различия в иммуногенности изучаемых штаммов не зависели от того, на какой эпитоп формировался иммунный ответ.

4.3.5. Различия в уровне иммунного ответа на антигенные детерминанты вируса гриппа частично сохраняются через 21 день после иммунизации вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124

Согласно литературным данным, пик CD8⁺ Т-клеточного ответа приходится на 8-10 сутки после иммунизации [220]. Со временем число антигенспецифичных клеток сокращается. Кроме того, уменьшается число антигенных детерминант, способных вызывать реактивацию иммунного ответа [504]. Для оценки изменений цитокинпродуцирующей активности Т-лимфоцитов, спленоциты мышей, получавших 7 log[ТИД₅₀] штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, были простимулированы пептидами через 21 день после иммунизации. Результаты анализа Т-клеточного иммунного ответа, представлены на рис. 18. Через 21 д.п.и. только два пептида (NP₃₆₆₋₃₇₄ и NA₄₂₇₋₄₃₃) вызывали продукцию цитокинов у CD8⁺ Т-лимфоцитов. При этом, были получены статистически-значимые различия между группами NSfull и NS124 ($p = 0.003$, $p = 0.01$). Иммунный ответ CD4⁺ Т-лимфоцитов имел слабовыраженный характер в обеих группах. Доля антигенспецифичных клеток, в среднем, составляла не более 0.5% от общего числа CD4⁺CD44⁺CD62L⁻ лимфоцитов. Для большинства образцов не было обнаружено статистически-значимых различий между экспериментальными группами и контролем. Различия между группами NSfull и NS124 были выявлены только при стимуляции пептидом HA₄₇₄₋₄₈₃, при чем уровень иммунного ответа в группе NSfull был выше, чем у мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34-NS124 ($p = 0.03$).

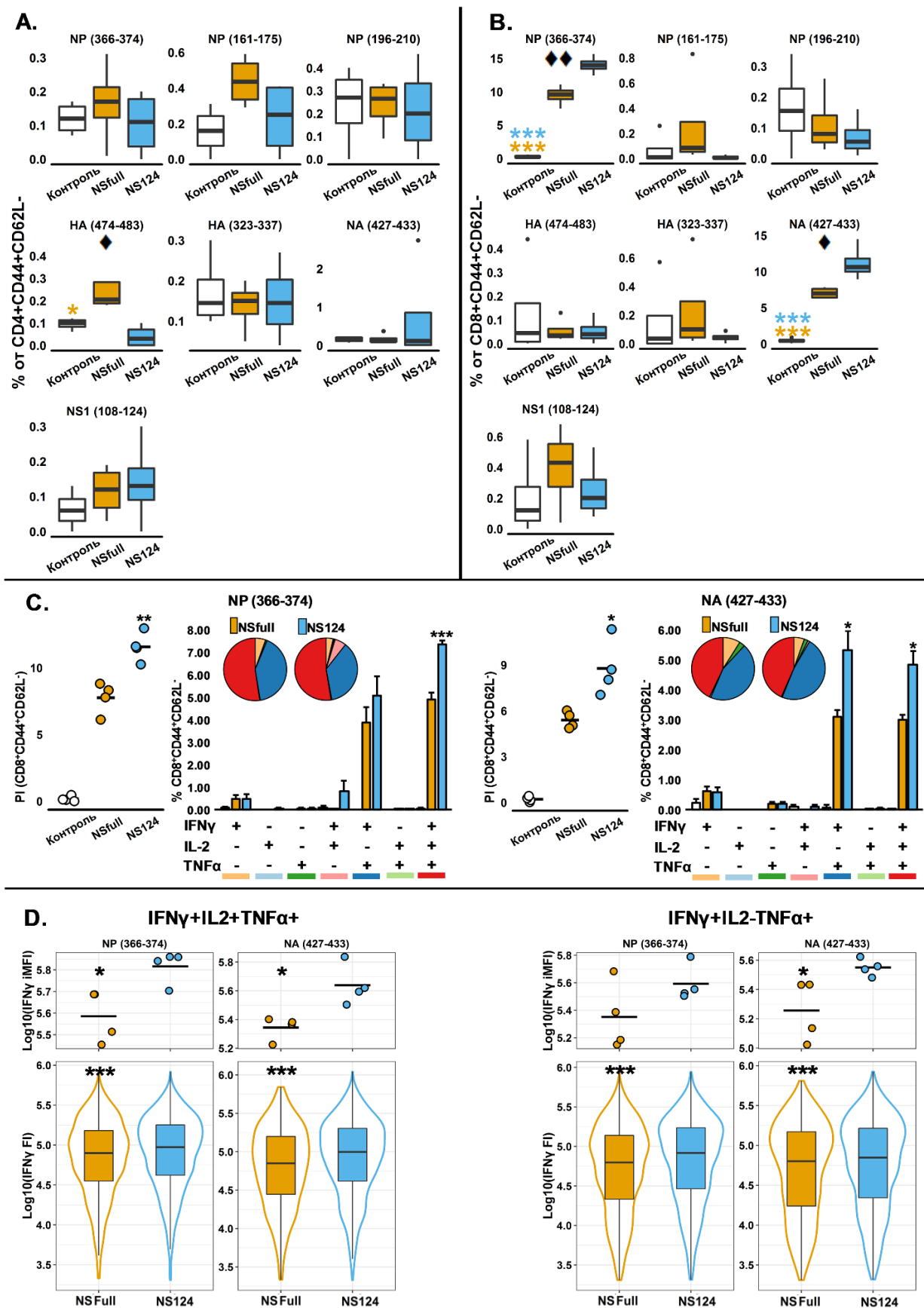


Рисунок 18. Т-клеточный иммунный ответ у мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) через 21 день после иммунизации. А., В. На графиках представлены значения совокупной доли цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от

общего числа эффекторных CD4⁺ (A.) и CD8⁺ (B.) Т-клеток (CD4/8⁺CD44⁺CD62L⁻). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ♦ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки). С. На столбчатых диаграммах представлены средние значения (Mean ± SE, n = 4) 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 цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Отдельными точками приведены индивидуальные значения индекса полифункциональности (PI). Также представлены средние значения PI для каждой группы. D. В верхней части рисунков представлены интегральные медианные значения интенсивности флуоресценции (iMFI) IFN γ по каждому животному. Также представлены средние значения по группам (n=4). В нижней части рисунка показано распределение Т-лимфоцитов экспериментальных животных по уровню флуоресценции IFN γ . Представлены объединенные значения по каждой группе. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

Анализ соотношения различных популяций цитокинпродуцирующих клеток позволяет заключить, что на поздних сроках после иммунизации усиливается вклад полифункциональных Т-лимфоцитов (IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺) в формирование цитокинового ответа. Обнаружены статистически-значимые различия между группами NSfull и NS124 по относительному содержанию IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ Т-клеток после стимуляции пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄ (p = 0.0003), а также по уровню IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к эпитопу NA₄₂₇₋₄₃₃ (p = 0.02, p = 0.01). В обоих случаях индекс полифункциональности (PI) в группе NS124 был выше, чем в группе NSfull (p = 0.003, p = 0.01).

Через 21 день после иммунизации сохраняются различия по уровню экспрессии IFN γ полифункциональными Т-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию. IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ CD8⁺ Т-лимфоциты мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34-NS124, продуцируют больше IFN γ , чем аналогичные популяции клеток у животных, получавших вирус дикого типа, о чем свидетельствуют различия в MFI указанного цитокина (Рис. 18).

4.3.6. Гуморальный иммунный ответ на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 при интраперитонеальной иммунизации

Для изучения гуморального иммунного ответа на вирусы A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 мыши линии Balb/c были интраперитонеально иммунизированы указанными штаммами в дозе 6

log[ТИД₅₀]/мышь. Забор сывороток осуществляли через 7, 14 и 21 день после иммунизации. Титр антител к вирусу гриппа А/PR/8/34 оценивали в РТГА и при помощи иммуноферментного анализа. Результаты представлены на рис. 19.

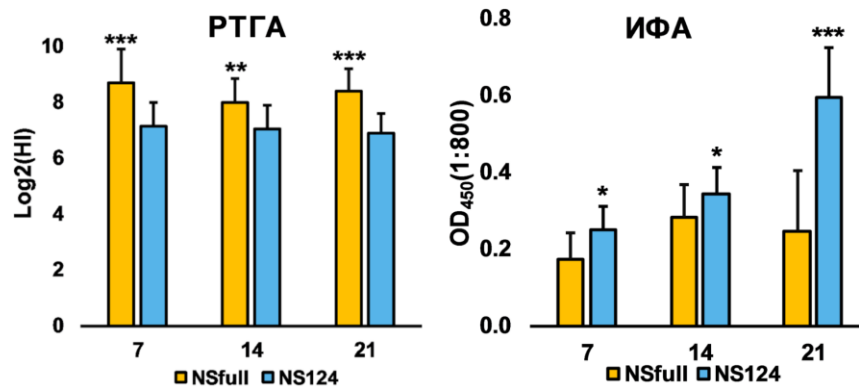


Рисунок 19. Антительный иммунный ответ на вирусы гриппа А/PR/8/34 (NSfull) и А/PR/8/34-NS124 (NS124) при интраперитонеальной иммунизации. Титр гемагглютинирующих антител к вирусу А/PR8 измерялся в реакции РТГА (Mean ± SD, n = 20). Общий титр IgG оценивали при помощи ИФА. На графике с результатами ИФА указана средняя оптическая плотность образца при разведении сыворотки 1:800 (Mean ± SD, n = 20). Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

Уже через 7 дней после иммунизации титр гемагглютинирующих антител в сыворотке иммунизированных животных достигал значений $8.67 \pm 1.23 \text{ Log}_2(\text{HI})$ в группе NSfull и $7.16 \pm 0.86 \text{ Log}_2(\text{HI})$ в группе NS124. В дальнейшем, значительных изменений указанных показателей не происходило. На протяжении всего рассматриваемого периода титр антител в РТГА у животных, иммунизированных вирусом гриппа с полноразмерным геном NS, был выше, чем у мышей из группы NS124 ($p = 0.0001$, $p = 0.002$, $p = 0.000001$). При этом, общий титр иммуноглобулинов класса G, определенный при помощи ИФА на всех анализируемых сроках был выше в группе NS124 ($p = 0.01$, $p = 0.05$, $p = 0.00001$). Кроме того, у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, отмечался значительный прирост уровня IgG к 21 дню после иммунизации, тогда как в группе NSfull общее количество антител увеличивалось на 14 день, но на более позднем сроке дальнейшего прироста не наблюдалось.

4.4. Изучение гетерологичной защиты при интраперитонеальной штаммами А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124

Для изучения влияния интраперитонеальной иммунизации на формирование гетерологичной защиты, мыши линии Balb/c были иммунизированы вирусами А/PR/8/34 и

A/PR8/ NS124 в дозе $6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$. Контрольные животные получали равный объем (500 мкл) PBS. На основании полученных данных (Рис. 21) можно заключить, что внутрибрюшинная иммунизация вирусами гриппа с полноразмерным и укороченным белком NS1 приводила к формированию полноценной защиты от повторного инфицирования вирусом A/PR8 дикого типа (H1N1), однако не вызывала защиты от гетерологичных штаммов A/Aichi/2/68 (H3N2) и B/Malaysia/06/04. Динамика массы тела у животных из групп NS124 и NSfull не отличалась от таковой у неиммунизированных мышей при заражении гетерологичными штаммами. Оба вируса вызывали 100% летальность в контрольной группе и у животных, иммунизированных штаммом A/PR/8/34. 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.

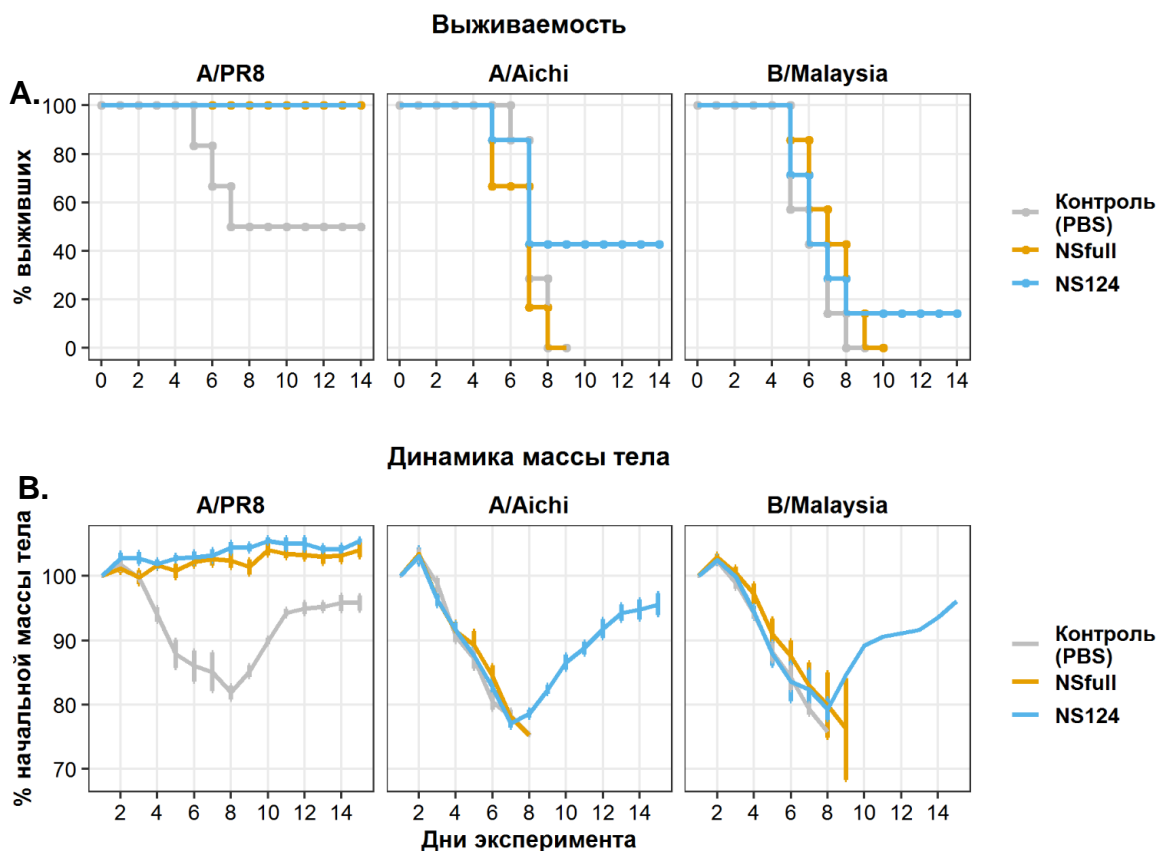


Рисунок 21. Динамика летальности и изменения массы тела мышей, интраперитонеально иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) после гетерологичного челленджа. Животные были иммунизированы интраперитонеально, в дозе $6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$. Объем при введении составил 500 мкл/мышь. Через 30 дней животные были заражены вирусами A/Aichi/2/68 или B/Malaysia/06/04 или A/PR/8/34. **А.** Кривые Каплана-Майера, отражающие долю выживших животных на различных сроках после введения вируса. **Б.** Динамика массы тела. (Mean \pm SEM, n=7).

На основании полученных данных можно заключить, что укорочение белка NS1 позволяет усилить иммуногенность антигенных детерминант вируса гриппа, однако системного адаптивного иммунитета оказывается недостаточно для обеспечения эффективной перекрестной защиты. По-видимому, для формирования такой защиты необходимо наличие локального иммунитета в зоне контакта с вирусом, что может обеспечить только интраназальная иммунизация или перенесенная инфекция.

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

Для выявления иммунологических механизмов перекрестной защиты после интраназальной иммунизации, мыши линии C57/Black-6 были интраназально иммунизированы штаммами A/PR/8/34-NS124 и A/PR/8/34. Иммунизирующая доза для штамма A/PR/8/34-NS124 составила $6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$. Для заражения мышей вирусом A/PR/8/34 была выбрана доза $2.5 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$, поскольку более высокая дозировка вызывала частичную гибель экспериментальных животных. Иммунный ответ оценивали в легких и селезенке через 8 и 32 дня после иммунизации при помощи панели флуоресцентно-меченных антител, охарактеризованной в разделе 4.3.1. Через 32 дня после иммунизации вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 мыши были заражены гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе $10\text{LD}_{50}/\text{мышь}$. Для изучения механизмов перекрестной защиты анализировалась динамика относительного состава клеток врожденного иммунитета в легких зараженных животных до введения вируса, а также через 24ч и 4 дня после заражения. Кроме того, через 4 дня после инфицирования определялся уровень антигенспецифичного Т-клеточного ответа, а также относительное содержание Т-регуляторных клеток в легких. Вирусную нагрузку на 2 и 4 день после заражения оценивали при помощи титрования гомогенатов легких на культуре клеток MDCK. В течение 14 дней после введения вируса регистрировали массу тела зараженных животных и учитывали летальность (Рис. 22).

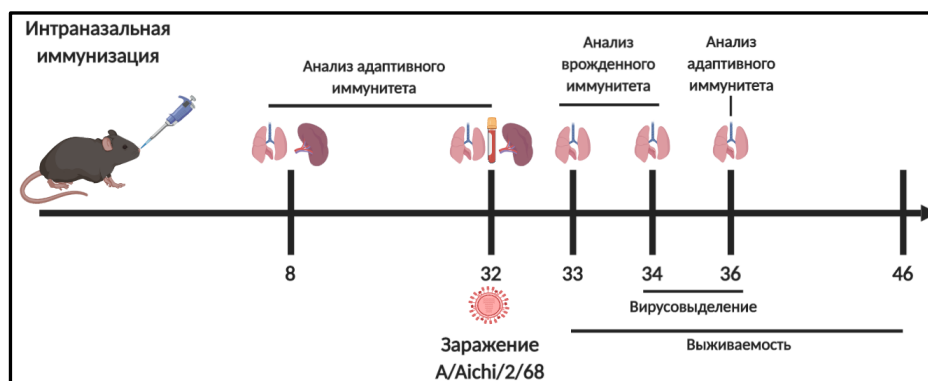


Рисунок 22. Схема экспериментов к разделу 4.5.

4.5.1. Интраназальная иммунизация приводит к формированию более выраженного иммунного ответа на вирус A/PR/8/34-NS124 по сравнению с A/PR/8/34

Уровень антигенспецифичного иммунного ответа оценивался при помощи внутриклеточного окрашивания цитокинов IFN γ , IL-2 и TNF α флуоресцентно-мечеными антителами после стимуляции клеток пептидом, соответствующим высокоиммуногенному эпитопу нуклеопротеина вируса гриппа A/PR/8/34 (NP₃₆₆₋₃₇₄). Учитывалась общая доля цитокинпродуцирующих клеток в популяции эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов (Tem), а также процент популяций, экспрессирующих один, два или три цитокина одновременно от общего числа CD8⁺ Tem (Рис. 23, столбчатые диаграммы) и от общего числа цитокинпродуцирующих клеток (Рис. 23, круговые диаграммы).

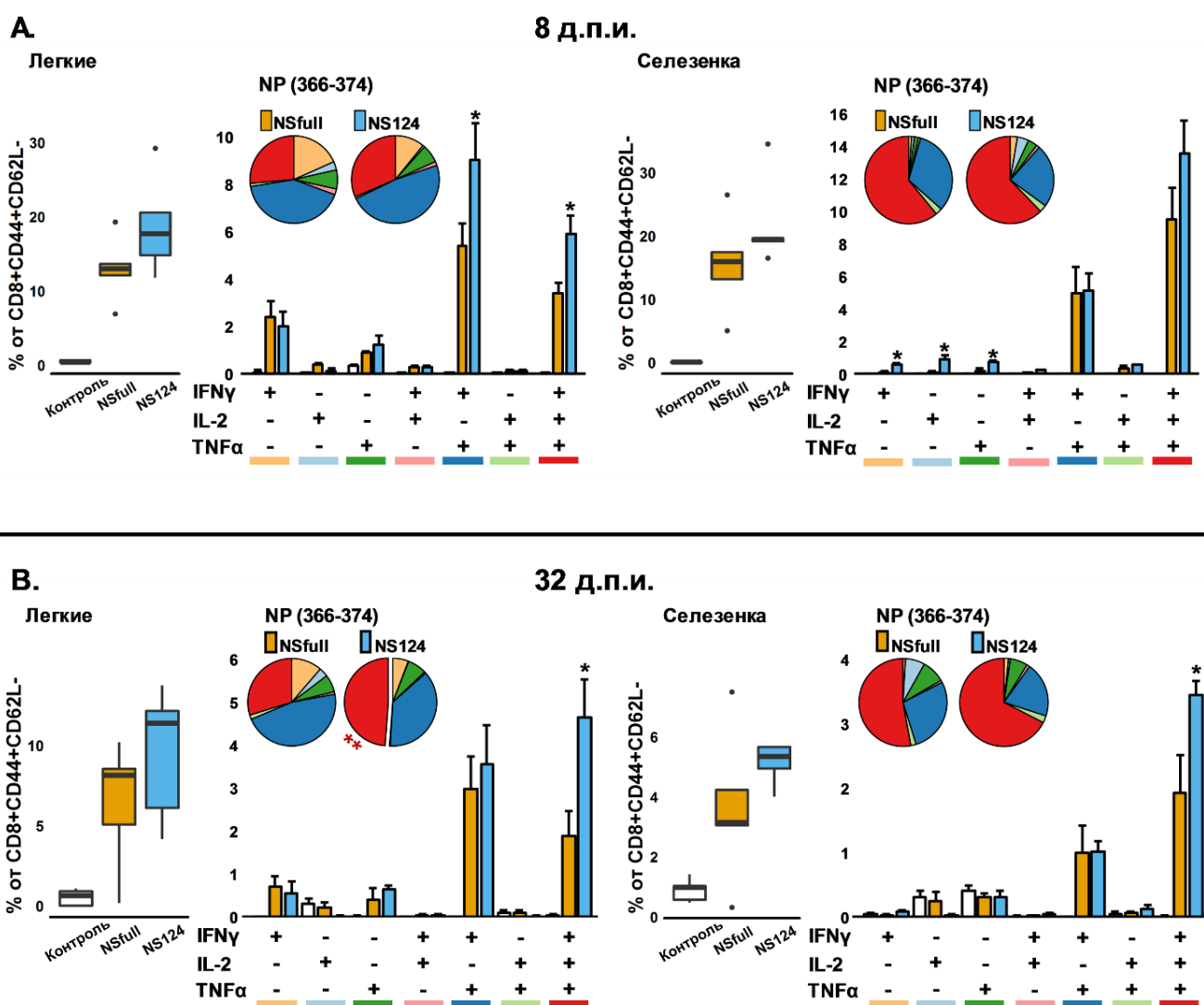


Рисунок 23. Популяционный состав цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124). Графики отражают уровень иммунного ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов легких и селезенки через 8 и 32 дня после иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124. На столбчатых диаграммах представлены средние значения (Mean \pm SE, n = 4) 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 цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Отдельными точками приведены индивидуальные значения индекса полифункциональности (PI). Также представлены средние значения PI для каждой группы. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

Как в легких, так и в селезенках иммунизированных животных через 8 дней после введения вирусов формировался выраженный CD8⁺ Т-клеточный иммунный ответ на эпитоп NP₃₆₆₋₃₇₄. В составе цитокинпродуцирующих клеток доминирующее положение занимали популяции, одновременно экспрессирующие IFN γ и TNF α , а также полифункциональные клетки (IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺). Интраназальная иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 приводила к формированию более выраженного иммунного ответа, по сравнению со штаммом A/PR/8/34, хотя различия между группами были меньше, чем после интраперитонеальной иммунизации. В частности, отсутствовали статистически-значимые различия по общему числу цитокинпродуцирующих клеток, однако, у животных из группы NS124 в легких отмечалось повышенное, по сравнению с группой NSfull содержание популяций IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ (p = 0.05) и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ Tem (p = 0.02). При этом, доля Т-лимфоцитов, продуцирующих один цитокин (IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁻, IFN γ ⁻IL2⁺TNF α ⁻, IFN γ ⁻IL2⁻TNF α ⁺) была одинакова в обеих группах. В то же время, в селезенках иммунизированных животных формировались сходные уровни полифункциональных Т-клеток, тогда как доли монопродуцентов достоверно различались: в группе NS124 доля Т-лимфоцитов, секретирующих один цитокин (IFN γ , IL2 или TNF α) была выше, чем в группе NSfull (p = 0.01; 0.03; 0.02). В целом, различия между группами по интенсивности иммунного ответа носили более выраженный характер в легочной ткани, чем в селезенке. При этом общее число Т-лимфоцитов было примерно одинаково в обоих органах как у животных из группы NSfull (13.01 ± 4.42% в легких, 15.62 ± 7.73% в селезенке), так и в группе NS124 (18.83 ± 6.67% в легких, 21.87 ± 7.20% в селезенке). Также следует отметить преобладание в селезенке полифункциональных Т-клеток (IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺), на долю которых приходилось более 60% всех антигенспецифичных Т-лимфоцитов. В легких доминирующее положение занимали лимфоциты с фенотипом IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ (42% в группе NSfull, 48% в группе NS124) и, в целом, разнообразие антигенспецифичных популяций было выше, чем в селезенке (см. круговые диаграммы на рис. 23А).

Через 32 дня после иммунизации отмечалось существенное снижение уровня антигенспецифичного Т-клеточного иммунного ответа в обеих группах как в легких, так и в

селезенке (Рис. 23В). Число цитокинпродуцирующих Т-клеток в обеих группах сокращалось почти в 2 раза и составляло в группе NSfull $6.43 \pm 3.95\%$ в легких, $3.65 \pm 2.59\%$ в селезенке, а в группе NS124 $9.51 \pm 4.13\%$ в легких и $5.12 \pm 0.70\%$ в селезенке. При этом различия между группами NSfull и NS124 сохранялись: мыши, иммунизированные штаммом с укороченным белком NS1, обладали повышенным уровнем полифункциональных Т-лимфоцитов в обоих органах ($p = 0.03$; 0.04). Кроме того, в группе NS124 отмечалось увеличение доли $IFN\gamma^+IL2^+TNF\alpha^+$ среди антигенспецифичных Т-лимфоцитов в легких по сравнению с группой NSfull ($p = 0.007$).

4.5.2. Гуморальный иммунный ответ на вирусы А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124 при интраназальной иммунизации

Для оценки гуморального ответа на сроке 32 после иммунизации штаммами А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124 у мышей был осуществлен забор крови. Оценка уровня гемагглютинирующих антител в сыворотке производили при помощи РТГА. Общий уровень IgG измеряли при помощи ИФА. Полученные результаты представлены на рис. 24.

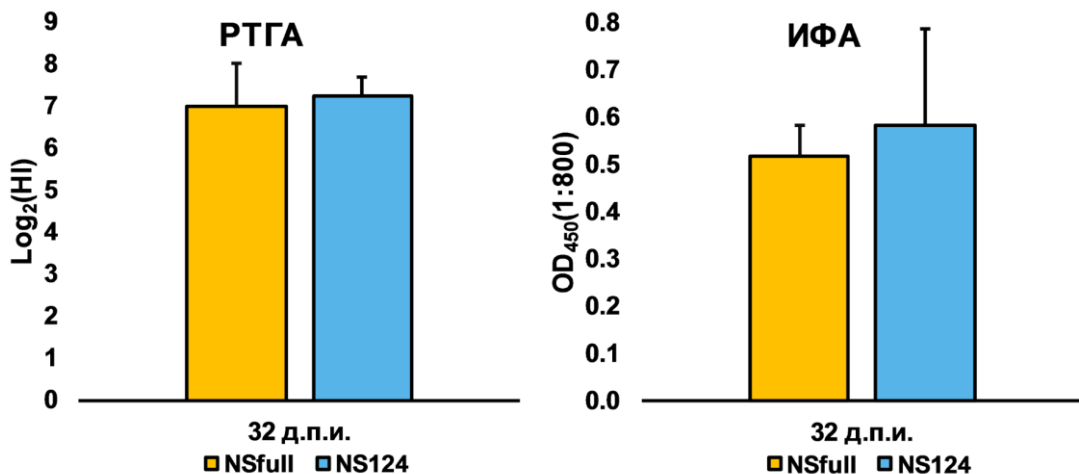


Рисунок 24. Антительный иммунный ответ на вирусы гриппа А/PR/8/34 (NSfull) и А/PR/8/34-NS124 (NS124) при интраназальной иммунизации. Титр гемагглютинирующих антител к вирусу А/PR8 измерялся в реакции РТГА (Mean \pm SD, $n = 10$). Общий титр IgG оценивали при помощи ИФА. На графике с результатами ИФА указана средняя оптическая плотность образца при разведении сыворотки 1:800 (Mean \pm SD, $n = 10$).

Как показано на рис. 24, интраназальная иммунизация мышей линии C57/Black-6 вирусами А/PR/8/34 и А/PR/8/34-NS124 в дозе 2.5 и 6 \log [ТИД₅₀], соответственно, индуцировала приблизительно одинаковый уровень антительного иммунного ответа в обеих группах. Достоверных различий между группами NSfull и NS124 не было выявлено ни по титру гемагглютинирующих антител, ни по общему уровню IgG.

4.5.3. Интраназальная иммунизация штаммом A/PR/8/34-NS124 предотвращает летальность и снижает патологию при заражении вирусом A/Aichi/2/68

Интраназальная иммунизация мышей линии C57/Black-6 вирусом гриппа с укороченным белком NS1 в дозе $6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$ приводила к существенному сокращению потери массы тела при заражении штаммом A/Aichi/2/68. Животные, перенесшие инфекцию, вызванную введением $2.5 \log[\text{ТИД}_{50}]$ вируса дикого типа, а также не иммунизированные животные характеризовались выраженной потерей веса до 80-75% от исходных значений. В обеих группах летальность составила 40%. При этом, что выжившие животные из группы NSfull быстрее восстанавливали массу тела, по сравнению с контрольной группой (Рис. 25).

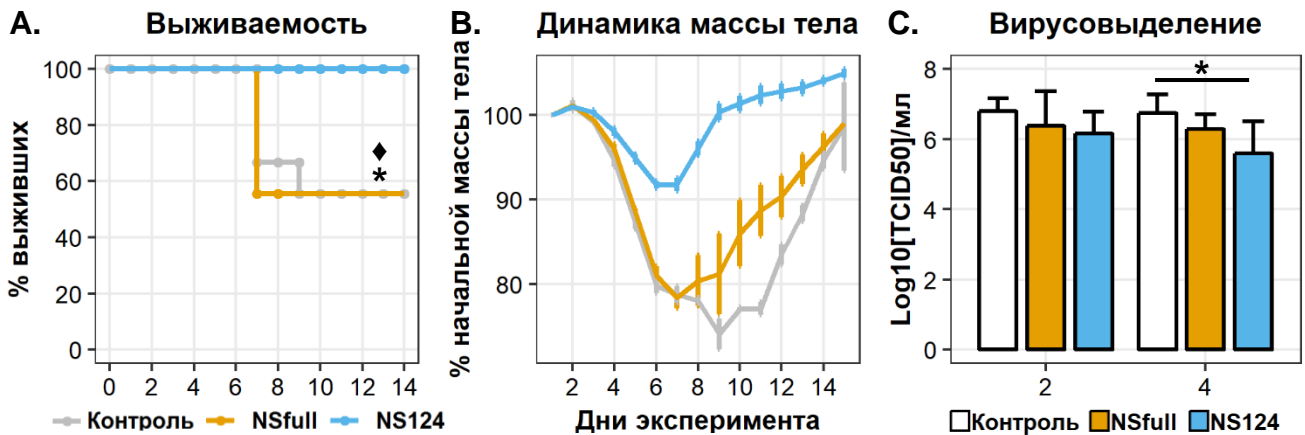


Рисунок 25. Динамика летальности и изменения массы тела мышей, интраназально иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) после гетерологичного челленджа. Показаны процентные доли средней массы тела животных в группе относительно исходного значения массы тела (Mean \pm SEM). Кривые Каплана-Мейера, отражают долю выживших животных на различных сроках после введения вируса. Число животных: $n=5$ во всех группах. Вирусовыделение анализировалось путем титрования гомогенатов легочной ткани на культуре клеток MDCK. Гистограммы отражают средний уровень вирусной нагрузки в экспериментальных группах. ($\log_{10} [\text{ТИД}_{50}]/\text{мл} \pm \text{SD}$, $n = 5$). ***: $p < 0.001$, t-критерий Стьюдента

Анализ вирусывыделения показал, что через 2 дня после заражения у иммунизированных и не иммунизированных животных титр вируса в гомогенатах легких составлял $6.16 - 6.79 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мл}$. Наименьшие значения были получены для группы NS124, однако достоверных различий между тремя группами на данном сроке выявлено не было. Через 4 дня после заражения были выявлены статистически-значимые различия между контролем и группой NS124 ($p = 0.03$). Для группы NSfull были характерны промежуточные значения вирусной нагрузки ($6.29 \pm 0.98 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мл}$) (Рис. 25).

Таким образом, иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 не позволяла предотвратить заражение гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68, однако существенно снижала тяжесть заболевания и способствовала выживанию зараженных животных. Полученные результаты могут быть объяснены формированием в легких животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124 специфического микроокружения, приводящего к снижению иммунопатологии при заражении гетерологичным штаммом. Для проверки данной гипотезы в гомогенатах легочной ткани иммунизированных мышей была измерена концентрация цитокинов воспаления через 2 и 4 дня после заражения вирусом A/Aichi/2/68, а также оценена динамика относительного содержания клеток врожденного иммунитета.

4.5.4. Интраназальная иммунизация вирусом A/PR/8/34-NS124 снижает уровень цитокинового ответа на заражение штаммом A/Aichi/2/68

Через 2 и 4 дня после гетерологичного заражения в группе NS124 было отмечено существенное снижение концентрации ряда провоспалительных цитокинов, а также повышение уровня регуляторного фактора IL-10. Основные различия между группами, получавшими вирус с укороченным или полноразмерным белком NS1, были связаны с уровнем IFN I типа. В частности, концентрация IFN α в группе NS124 была в 12 раз ниже, чем в группе NSfull ($p = 0.02$). Кроме того, достоверные различия между группой 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 ($p = 0.006$) (Рис. 26). 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. ($p = 0.01$, 0.05 , соответственно), что свидетельствует о развитии у животных из данных групп адаптивного иммунного ответа типа Th-1. При этом, общий уровень IFN γ в группе NSfull был выше, чем в группе NS124 (различия не достоверны), что, однако, не приводило к снижению вирусовыделения в группе NSfull (Рис. 25). На сроке 4 д.п.и. у иммунизированных животных из обеих групп отмечался значительный прирост уровня регуляторного цитокина IL-10 по сравнению с контролем, что может свидетельствовать о более высокой активности T-регуляторных лимфоцитов в группах NS124 и NSfull по сравнению с контролем.

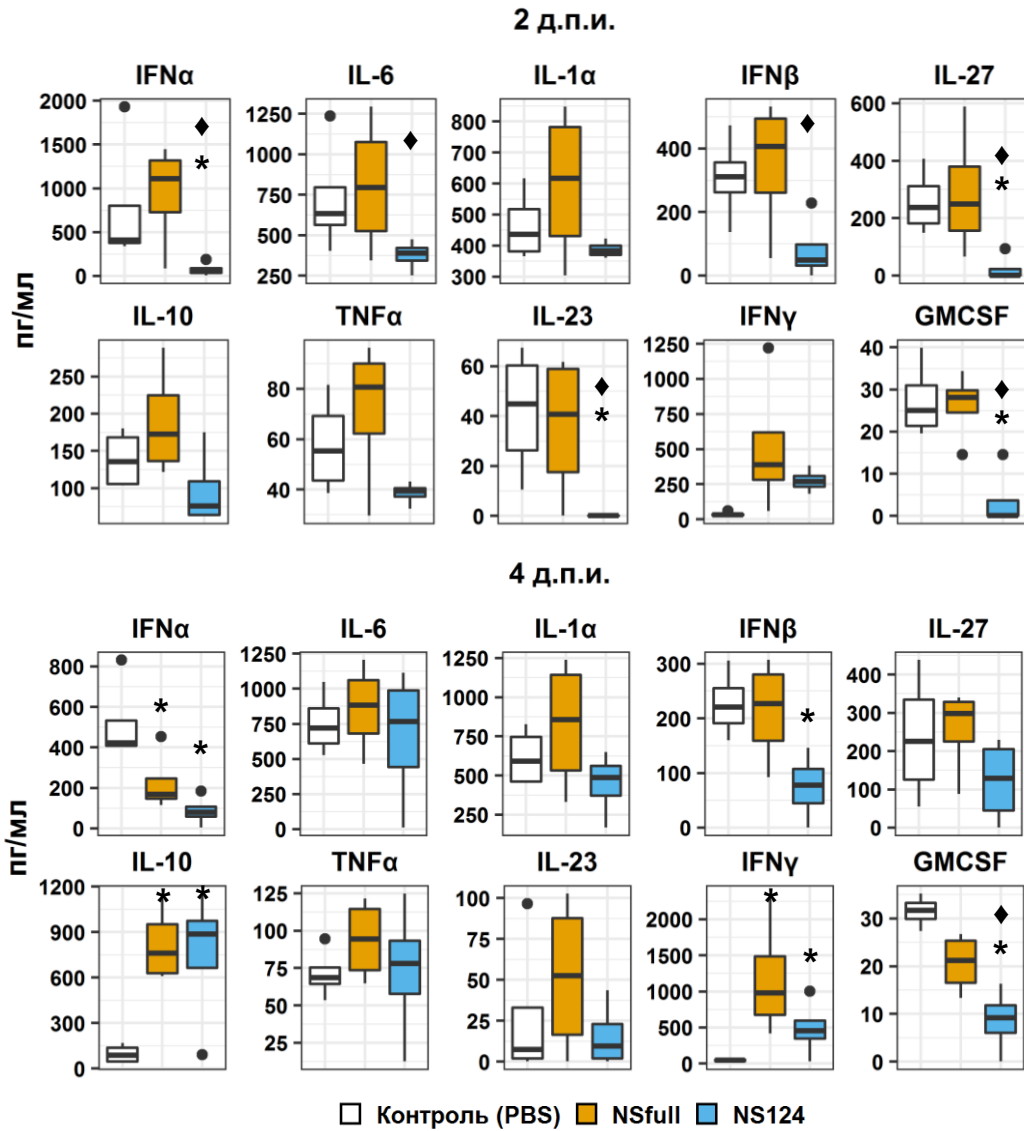


Рисунок 26. Концентрация цитокинов в гомогенатах легочной ткани мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) через 2 и 4 дня после заражения вирусом A/Aichi/2/68. Представлены средние значения концентрации исследуемых цитокинов, а также стандартная ошибка среднего (Mean \pm SEM, n = 4). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ♦ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки).

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что в группе NSfull, несмотря на наличие антигенспецифических Т-лимфоцитов, сохраняется повышенный уровень экспрессии цитокинов острой фазы врожденного иммунного ответа, в то время, как у животных из группы NS124 реализуется, преимущественно, адаптивный иммунный ответ типа Th1. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что выживаемость животных из группы NS124 после заражения гетерологичным штаммом обуславливается снижением

иммунопатологии. Пониженный уровень факторов MCP-1 и GM-CSF в группе NS124 по сравнению с контролем и с группой NSfull позволяет ожидать уменьшение инфильтрации легких у мышей из данной группы клетками врожденного иммунитета, такими как нейтрофилы и макрофаги.

4.5.5. Снижение инфильтрации легких при заражении A/Aichi/2/68 после иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124

Для выявления основных клеток врожденного иммунитета в легких была использована панель флуоресцентно-меченных антител к маркерам CD45, MHCII, CD11b, CD11c, CD24, CD64 и Ly6G. Данная панель позволила идентифицировать альвеолярные макрофаги, интерстициальные макрофаги, моноциты, нейтрофилы и две популяции дендритных клеток (CD11b⁻ и CD11b⁺). Описание тактики гейтирования с указанием фенотипа изучаемых популяций приведено на рис. 27.

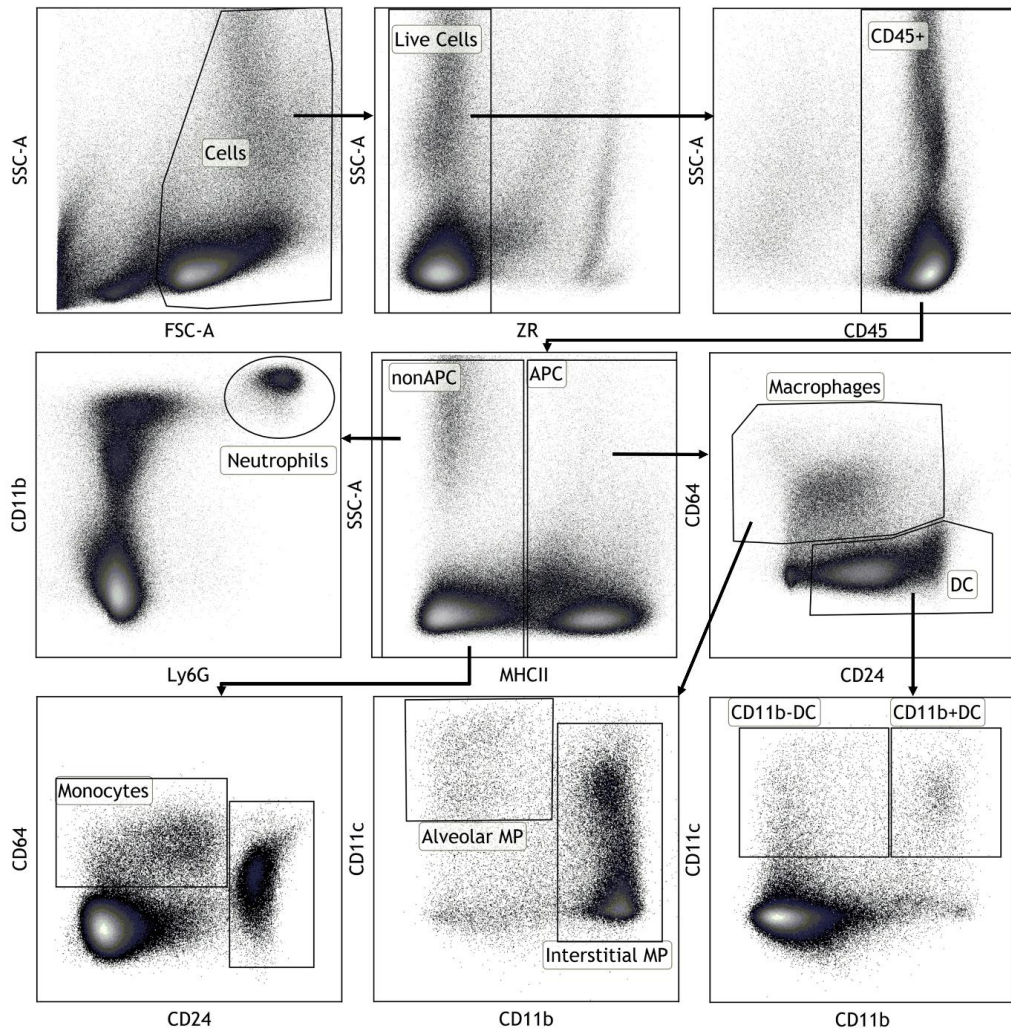


Рисунок 27. Схема последовательного гейтирования при оценке основных клеточных популяций врожденного иммунитета в легких. После отсеивания дублетов по FSC-A/FSC-H (не показано на рисунке) и выделения популяции живых одиночных клеток на основании

характеристик светорассеяния (FSC-A/SSC-A -Cells) и связывания красителя Zombie Red (Live cells) иммуноциты гейтировали по наличию маркера CD45 (CD45⁺). При дальнейшем анализе выделяли следующие клеточные популяции: нейтрофилы - SSC^{hi}CD45⁺Ly6G⁺ (Neutrophils); моноциты - МНСII⁻CD64⁺CD24⁺ (Monocytes); Альвеолярные макрофаги - МНСII⁺CD64⁺CD11c⁺CD11b⁻ (Alveolar MP); Интерстициальные макрофаги - МНСII⁺CD64⁺CD11b⁺CD11c^{+/-} (Interstitial MP); ДК1 – CD45⁺CD11c⁺CD11b⁻МНСII⁺CD64⁻CD24⁺ (CD11b⁻ DC) и ДК2 – CD45⁺CD11c⁺CD11b⁺МНСII⁺CD64⁻CD24⁺ (CD11b⁺ DC). Прочие условные обозначения: nonAPC - не АПК; APC - АПК; DC -ДК; MP- макрофаги.

Сравнение относительного состава клеток врожденного иммунитета у экспериментальных животных через 32 дня после иммунизации (до заражения вирусом A/Aichi/2/68) показало, что у мышей, иммунизированных штаммом гриппа с укороченным белком NS1, сохраняется повышенный уровень альвеолярных макрофагов в легочной ткани. В контрольной группе и у животных, иммунизированных штаммом с полноразмерным NS-геном, указанная популяция составляла 0.86 ± 0.09 и $1.03 \pm 0.07\%$ от общего числа CD45⁺ клеток, соответственно. В то же время, в группе NS124 доля данной популяции через 32 дня после введения вируса оказалась равной $1.55 \pm 0.23\%$. Через 24ч после заражения вирусом A/Aichi/2/68 в группе NS124 происходило статистически-значимое увеличение относительного содержания альвеолярных макрофагов по сравнению с контролем ($p = 0.0006$) и с группой NSfull ($p = 0.0045$), однако через 4 дня рассматриваемый показатель принимал значения, близкие к исходным ($1.21 \pm 0.10\%$). Аналогичная динамика была характерна для популяции CD11b⁻ дендритных клеток: через 24ч после заражения в группе NS124 отмечался достоверный прирост относительного содержания данных клеток по сравнению с контролем ($p = 0.0006$) и с группой NSfull ($p = 0.013$), однако через 4 дня доля CD11b⁻ ДК принимала исходные значения. При этом, на позднем сроке также были выявлены различия с контрольной группой, в которой происходило снижение относительного содержания указанной популяции ($p = 0.007$) (Рис. 28).

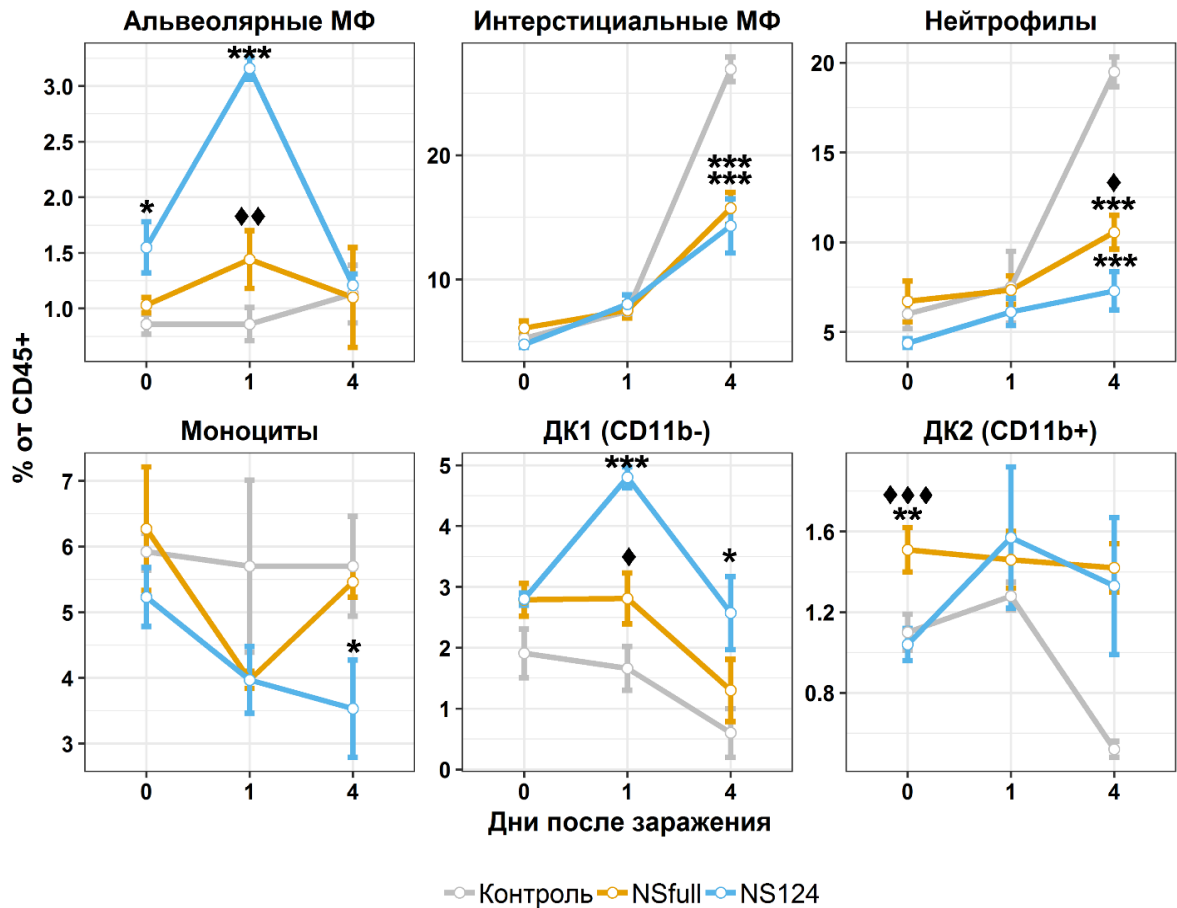


Рисунок 28. Динамика относительного состава основных популяций врожденного иммунитета в легких мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) на разных сроках после заражения вирусом A/Aichi/2/68. На графиках представлены значения доли различных популяций врожденного иммунитета от общего числа CD45⁺ Т-лимфоцитов (Mean ± SEM, n = 4). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой. Символом ♦ отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Тьюки).

Интраназальное введение вируса гриппа A/Aichi/2/68 сопровождалось существенным увеличением доли интерстициальных макрофагов и нейтрофилов в легких через 4 дня после заражения. У животных, которые не были предварительно иммунизированы штаммами A/PR/8/34 или A/PR/8/34-NS124 реакция на заражение носила гораздо более выраженный характер, чем у иммунизированных мышей. Доля интерстициальных макрофагов у животных из контрольной группы на 4 день после заражения 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. 28).

Сходная динамика была показана для нейтрофилов: на 4 день после заражения отмечалось 3-х кратное увеличение относительного содержания клеток данной популяции в легких животных из контрольной группы по сравнению со значениями, полученными до заражения ($6.01 \pm 1.86\%$ через 32 дня после иммунизации; $19.49 \pm 0.53\%$ после заражения, $p << 0.0001$). У животных из групп NSfull и NS124 также был выявлен небольшой прирост числа нейтрофилов, однако достоверных различий между значениями, полученными на 4 день после заражения и исходными значениями в данных группах отмечено не было.

Известно, что нейтрофилы и макрофаги – основные индукторы иммунопатологии, приводящей к развитию пневмонии при гриппе [505]. Согласно полученным данным, вакцинация вирусом с укороченным белком NS1 позволяет предотвратить развитие иммунопатологии при заражении гетерологичным штаммом.

В целом, на основании полученных данных можно заключить, что у животных из группы NS124 реализовался, выраженный $CD8^+$ Т-клеточный иммунный ответ на гетерологичное заражение. В группе NSfull адаптивный иммунный ответ характеризовался меньшей интенсивностью. Кроме того, несмотря на наличие антигенспецифичных Т-лимфоцитов, в группе NSfull сохранялся повышенный уровень экспрессии цитокинов острой фазы врожденного иммунного ответа.

4.5.6. Мыши, иммунизированные штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, обладают повышенным содержанием Т-регуляторных клеток в легких

Т-регуляторные клетки играют важнейшую роль в предотвращении нежелательных последствий иммунного ответа. На основании экспрессии транскрипционных факторов Helios и FOXP3 выделяют популяции периферических Т-реггов ($pTreg, FOXP3^+Helios^-$) и Т-регуляторных лимфоцитов тимического происхождения ($tTreg, FOXP3^+Helios^+$). Тактика гейтирования, использованная для анализа указанных популяций и результаты исследования представлены на рис. 29.

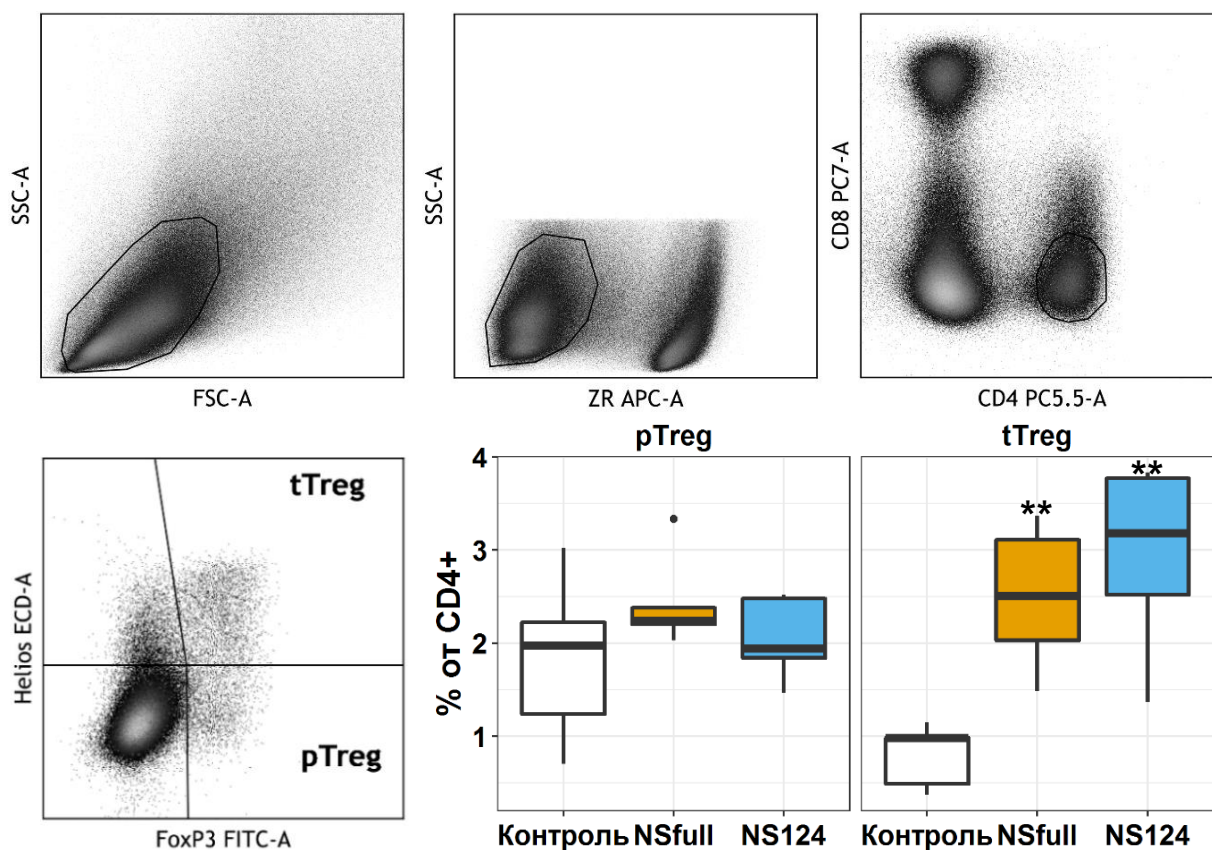


Рисунок 29. Схема последовательного гейтирования при оценке Т-регуляторных клеток в легких мышей. После отсеивания дублетов по FSC-A/FSC-H (не показано на рисунке) и выделения популяции живых одиночных клеток на основании характеристик светорассеяния (FSC-A/SSC-A - гейт Клетки). На основе флуоресценции по Zombie Red из анализа исключены нежизнеспособные клетки. Популяция живых Т-лимфоцитов разделена на две основные субпопуляции Т-хелперов ($CD4^+$) и цитотоксических Т-клеток ($CD8^+$). Относительное количество (%) тимических Т-регуляторных клеток определяли в субпопуляции Т-хелперов как популяцию, одновременно положительную по FoxP3 (Alexa 488) и Helios (ECD) (tTreg), популяцию периферических Т-регуляторных клеток определяли как положительную по FoxP3 (Alexa 488) и отрицательную по Helios (ECD) (pTreg). На графиках представлены результаты сравнения относительного содержания популяций тимических и периферически Т-регуляторных клеток в исследуемых группах. Знаком * отмечены достоверные различия между экспериментальными группами и контролем (**: $p < 0.01$; критерий Тьюки).

Анализ относительного содержания Т-регуляторных клеток в легких мышей через 4 дня после заражения штаммом A/Aichi/2/68 показал существенное увеличение доли tTreg у животных из групп NSfull и NS124 по сравнению с контролем ($p = 0.007$; 0.001 , соответственно). При этом уровень периферических Т-регов на данном сроке был примерно одинаков во всех трех группах.

Согласно литературным данным [506], FOXP3⁺Helios⁺ T-реги характеризуются наиболее выраженной иммуносупрессорной активностью. Не исключено, что T-регуляторные лимфоциты могут вносить существенный вклад в наблюдаемые различия в уровне нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации легких у иммунизированных и не иммунизированных животных через 4 дня после вторичного заражения. Активностью T-регуляторных лимфоцитов может быть также объяснено снижение уровня провоспалительных цитокинов в группе NS124. При этом, несмотря на сходный уровень регуляторных T-клеток и наличие антигенспецифичных T-лимфоцитов как в группе NS124, так и в группе NSfull, только у животных, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, отмечалась 100% выживаемость при заражении вирусом A/Aichi/2/68. С одной стороны, это может быть связано с формированием более выраженного антигенспецифичного T-клеточного иммунного ответа в группе NS124. С другой стороны, полученные результаты могут быть объяснены повышенной активностью T-reg, индуцированных вирусом A/PR/8/34-NS124. Косвенным подтверждением данной гипотезы является повышенная иммуногенность данного вируса в отношении эффекторных T-лимфоцитов.

4.5.7. Мыши, иммунизированные штаммом A/PR/8/34-NS124, характеризуются усилением адаптивного иммунного ответа при заражении вирусом A/Aichi/2/68

Через 4 дня после заражения иммунизированных животных гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 был оценен уровень цитокинового ответа лимфоцитов легких на стимуляцию пептидом NP₃₆₆₋₃₇₄. Согласно данным, представленным на рис. 30, животные, иммунизированные вирусом с укороченным белком NS1, характеризовались более высоким уровнем цитокинпродуцирующих CD8⁺ эффекторных T-лимфоцитов по сравнению с группой, иммунизированной штаммом дикого типа. Следует отметить, что различия между группами NS124 и NSfull через 4 дня после заражения штаммом A/Aichi/2/68 носили гораздо более выраженный характер, чем до заражения. График, иллюстрирующий динамику адаптивного иммунного ответа на пептид NP₃₆₆₋₃₇₄, позволяет заключить, что число антигенспецифичных 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 дню после иммунизации. Заражение гетерологичным штаммом A/Aichi/2/68 приводило к тому, что в группе NS124 уровень T-клеточного иммунного ответа усиливался, принимая значения, близкие к тем, которые были получены на 8 день после иммунизации ($15.57 \pm 2.20\%$), в то время как в группе NSfull доля цитокинпродуцирующих T-лимфоцитов не изменялась.

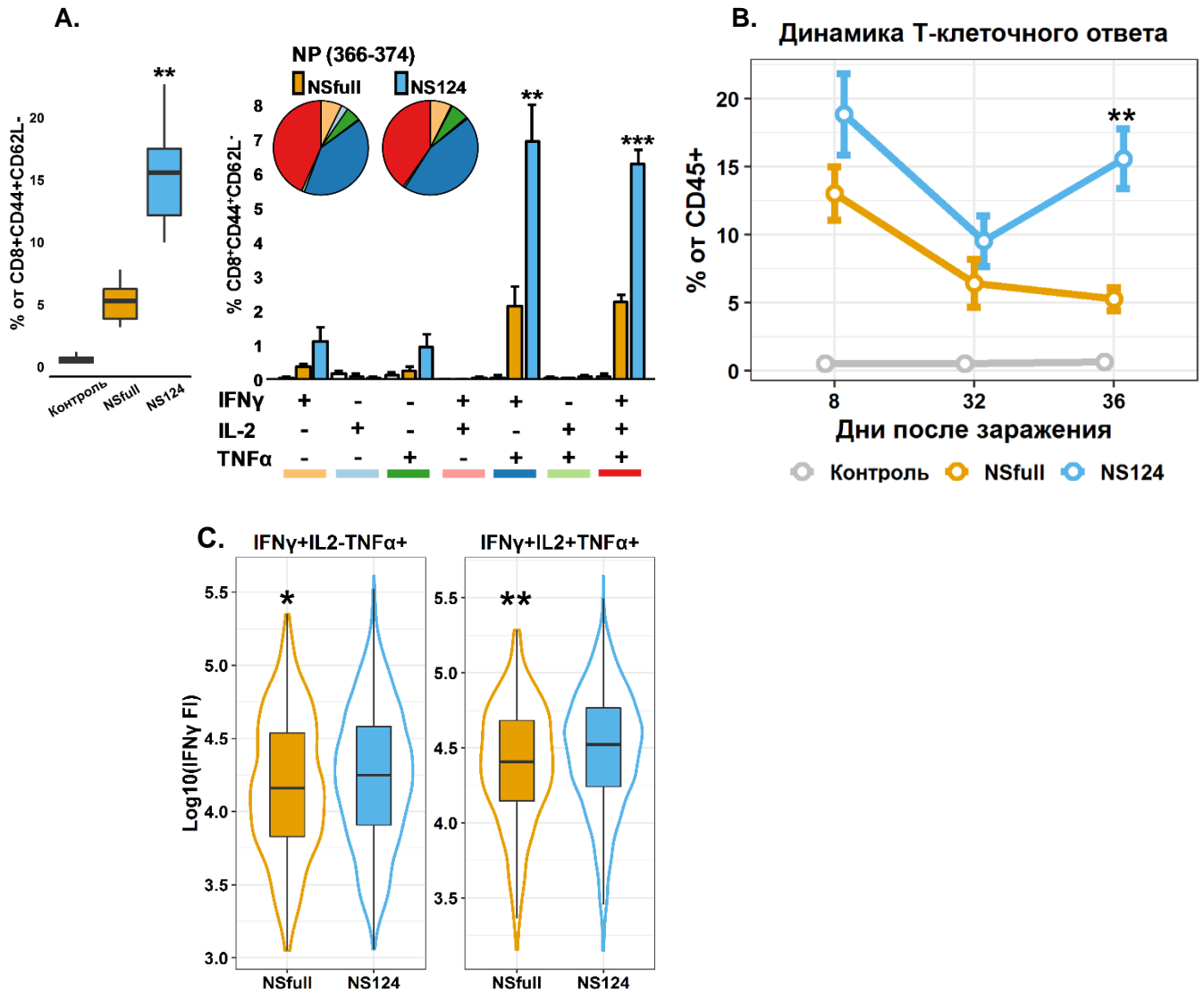


Рисунок 30. Популяционный состав цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вирусами A/PR/8/34 (NSfull) и A/PR/8/34-NS124 (NS124) через 4 дня после заражения вирусом A/Aichi/2/68. А. Графики отражают уровень иммунного ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов легких и селезенки через 32 дня после иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 с последующим заражением штаммом A/Aichi/2/68. На столбчатых диаграммах представлены средние значения (Mean ± SE, n = 4) 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 цитокинпродуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, критерий Тьюки. Результаты сравнения с контролем не показаны на рисунке). **В.** Динамика относительного содержания антигенспецифичных цитокин-продуцирующих эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов на разных

сроках после иммунизации. С. Показано распределение Т-лимфоцитов экспериментальных животных по уровню флуоресценции $IFN\gamma$. Представлены объединенные значения по каждой группе. Символом * отмечены достоверные различия между группами NSfull и NS124 (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, t-критерий Стьюдента).

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 наблюдались статистически-значимые различия ($p = 0.004$; 0.00003). При этом, доля монопродукторов $IFN\gamma^+IL2^-TNF\alpha^-$ и $IFN\gamma^-IL2^-TNF\alpha^+$ в группе NS124 также была выше, чем в группе NSfull, хотя достоверных различий выявлено не было. В целом, соотношение цитокинпродуцирующих популяций у экспериментальных животных соответствовало полученному на сроке 8 дней после иммунизации. Также следует отметить, что в группе NS124 отмечалось увеличение не только процентного содержания цитокинпродуцирующих клеток, но и уровня экспрессии $IFN\gamma$ в популяциях полифункциональных Т-лимфоцитов. Указанные различия иллюстрирует рис. 30.С, на котором изображено распределение $IFN\gamma^+IL2^-TNF\alpha^-$ и $IFN\gamma^-IL2^-TNF\alpha^+$ Т-клеток по значениям флуоресценции $IFN\gamma$ для указанных популяций в группах NSfull и NS124.

5. Обсуждение

Современные гриппозные вакцины представляют собой мультикомпонентные препараты, состав которых должен каждый год корректироваться в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Инактивированные вакцины, подразделяющиеся на цельновирсионные, расщепленные и субъединичные, индуцируют, преимущественно, гуморальный иммунный ответ, в следствие чего эффективная вакцинация возможна только при совпадении структуры поверхностных антигенов циркулирующих штаммов гриппа и штаммов, входящих в состав препарата. Живые гриппозные вакцины, благодаря мукозальному применению и способности к ограниченной пролиферации в верхних дыхательных путях вызывают формирование системного и локального иммунитета к вирусу гриппа, затрагивающего как В-, так и Т-клеточное звено иммунной системы. При этом, все существующие живые гриппозные вакцины обладают полноценным молекулярным механизмом подавления иммунного ответа организма-хозяина. Не исключено, что активность полноразмерного белка NS1, входящего в состав ЖГВ препятствует формированию иммунного ответа на слабоиммуногенные консервативные антигенные детерминанты вируса и не дает возможности вакцинному штамму индуцировать перекрестную защиту от широкого спектра штаммов гриппа. В настоящем исследовании изучалась возможность усиления иммуногенности антигенных детерминант вируса гриппа А/PR8/34 путем

подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. Для этого на мышинной модели был проведен сравнительный анализ врожденного, а также адаптивного Т- и В-клеточного иммунного ответа на вирус гриппа с укороченным до 124 а.к. белком NS1 и на аналогичный штамм с полноразмерным белком NS1. На первом этапе работы была изучена патогенность и репликативная активность штаммов A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в мышинных легких. Затем был оценен врожденный и системный адаптивный иммунный ответ на указанные штаммы при интраперитонеальной иммунизации, позволившей скомпенсировать различия в пролиферативном потенциале изучаемых вирусов. Была изучена возможность индукции гетеросубтипической и гетеротипической перекрестной защиты от вирусов A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04 при интраперитонеальной и интраназальной иммунизации. Были изучены локальные реакции врожденного и адаптивного иммунитета у иммунизированных животных после гетерологичного челленджа вирусом A/Aichi/2/68.

Результаты, полученные на первом этапе работы, согласуются с литературными данными о различиях в репродуктивной активности штаммов с укороченным и полноразмерным белком NS1 в интерферон-компетентных системах, таких как респираторный тракт мышей [16,17]. Вирус A/PR/8/34-NS124 имел частично аттенуированный фенотип: данный штамм вызывал менее интенсивную потерю массы тела у зараженных животных, по сравнению с вирусом дикого типа. Вирус A/PR/8/34 характеризовался высокой патогенностью и вызывал гибель экспериментальных животных при заражении в дозе $3 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$. Уровень репликации A/PR/8/34-NS124 в легких мышей был, приблизительно, в 1500 раз ниже, чем у штамма A/PR/8/34 при заражении в дозе $6 \log[\text{ТИД}_{50}]/\text{мышь}$ (см. рис 2). В то же время, интраназальное введение штаммов вируса гриппа с укороченным и полноразмерным белком NS1 индуцировало сходный уровень цитокинового ответа в легочной ткани через 24 ч после иммунизации, несмотря на значительную разницу в вирусной нагрузке (Рис. 3).

Было показано, что инфекция патогенным штаммом с полноразмерным белком NS1 в дозе, вызывающей 36% летальность, индуцировала у выживших животных защиту не только от гетеросубтипического штамма A/Aichi/2/68, но и от гетеротипического вируса B/Malaysia/06/04. В тоже время, иммунизация вирусом с укороченным белком NS1 обеспечивала столь же эффективную защиту от указанных гетерологичных штаммов, несмотря на то что вирус A/PR/8/34-NS124 имел аттенуированный фенотип и характеризовался сниженным по сравнению с патогенным штаммом уровнем репликации. Таким образом, вирус с укороченным белком NS1 показал преимущество по способности к индукции перекрестной защиты перед аналогичным штаммом с полноразмерным белком NS1, поскольку вызывал аналогичный уровень протекции, не приводя, при этом, к выраженной патологии.

Для эффективного сравнения иммуногенности штаммов с выраженными различиями в репродуктивной активности была использована интраперитонеальная иммунизация. Анализ продукции цитокинов воспаления в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, показал, что укорочение белка NS1 приводит к подавлению иммуносупрессорной активности вируса гриппа, что сопровождается значительным повышением продукции IFN β , IL6, TNF α , IL12p70, IL27, MCP1, IL-10 и IL1 β в ответ на иммунизацию (Рис. 6). Полученные данные свидетельствуют о дозозависимом характере цитокинового ответа на вирус гриппа, а также о более высокой иммуногенности штамма с укороченным белком NS1.

Наиболее выраженные различия между вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 были связаны с продукцией IFN β , которая подавляется за счет взаимодействия белка NS1 с внутриклеточным паттерн-распознающим рецептором RIG-I и другими компонентами сигнального пути, активирующего экспрессию IFN I типа [507,508]. Поскольку продукция IFN α/β начинается на самых ранних этапах врожденного противовирусного иммунного ответа и влечет за собой активацию экспрессии множества IFN-индуцируемых генов (ISG), наблюдаемая в данной работе повышенная продукция интерлейкинов и хемокинов после иммунизации вирусом A/PR/8/34-NS124 является, вероятно, следствием высокой интерферогенности данного штамма. Действие IFN I типа оказывает влияние на все звенья иммунитета и может повлечь за собой как положительные, так и отрицательные последствия для организма. С одной стороны, IFN α/β выступают в роли мощных стимуляторов созревания, дифференцировки и миграции профессиональных АПК. Показано, что под действием IFN I происходит усиление экспрессии МНСI/II и костимуляторных молекул CD40, CD80, CD83, CD86 [108]. Данные факторы являются связующим звеном между системами врожденного и адаптивного иммунитета. Взаимодействие наивных Т-лимфоцитов с IFN α/β -стимулированными АПК индуцирует поляризацию иммунного ответа по Th1-типу. Под воздействием IFN I интенсивно дифференцируются CD8⁺ цитотоксические Т-лимфоциты [114,115]. В целом, эффект от IFN I типа зависит от продолжительности воздействия и концентрации данных цитокинов в очаге инфекции. Кратковременное повышение концентрации IFN I на начальных этапах инфекции активирует иммунную систему, способствует элиминации патогена и формированию адаптивного иммунного ответа [111,113–115]. С другой стороны, длительное воздействие IFN I может привести к иммуносупрессии за счет активации синтеза противовоспалительных факторов IL-10 и PDL1. Кроме того, интерфероны нередко обуславливают развитие иммунопатологии при острых вирусных инфекциях, а также являются одной из причин вторичных бактериальных осложнений при гриппе [509,510], поскольку угнетают продукцию IL-17 и дифференцировку Th17-лимфоцитов [510–512]. В настоящей работе было показано, что внутрибрюшинное

введение исследуемых штаммов вызывает незначительное увеличение концентрации IL-17A в перитонеальных смывах по сравнению с контролем. При этом, несмотря на ярко выраженные различия между группами NSfull и NS124 по продукции IFN β , различий по уровню IL-17A выявлено не было. Поскольку вирусы гриппа с укороченным белком NS1 обладают ограниченной способностью к пролиферации в легочной ткани, иммунизация такими штаммами не приводит к хроническому усилению продукции IFN I в респираторном тракте, формированию иммунопатологии или иммуносупрессии. Как показано на рис. 3, интраназальное введение вируса A/PR/8/34-NS124 приводит к выраженной продукции IFN I и других провоспалительных цитокинов только на ранних сроках после иммунизации, после чего происходит снижение интенсивности цитокинового ответа. Напротив, в группе NSfull концентрация провоспалительных факторов с течением времени нарастает, что приводит к развитию иммунопатологии и может повлечь гибель животного, а также ослабить резистентность к бактериальным патогенам. Тем не менее, вопрос о влиянии иммунизации вирусами с укороченным белком NS1 на развитие бактериальных инфекций респираторной системы требует отдельного изучения.

Заслуживают внимания также более выраженная способность штамма A/PR/8/34-NS124 стимулировать продукцию IL-27 по сравнению с вирусом дикого типа (Рис. 6). IL-27 играет весьма неоднозначную роль в противовирусном иммунном ответе. С одной стороны, данный цитокин предотвращает развитие иммунопатологии: воздействие IL-27 препятствует чрезмерной инфильтрации легких нейтрофилами, а также регулирует ответ Th1 и Th17-лимфоцитов за счет непосредственного влияния на данные клетки, а также за счет усиления продукции IL-10 и дифференцировки популяции CD8⁺ Т-лимфоцитов, выполняющих регуляторную функцию. Показано, что введение IL-27 на пике развития инфекции существенно облегчает симптомы заболевания, снижает инфильтрацию легких и увеличивает выживаемость без существенного влияния на вирусовыделение [513]. С другой стороны, показано участие IL-27 в патогенезе вторичных бактериальных осложнений при гриппе. Мыши, не экспрессирующие рецептор IL-27 обладали повышенной устойчивостью к заражению *Streptococcus pneumoniae* после гриппозной инфекции. У таких животных отмечалось увеличение доли $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17A, что способствовало усилению активности нейтрофилов на раннем этапе бактериальной инфекции. При этом, введение IL-27 подавляло дифференцировку $\gamma\delta$ Т-клеток и снижало продукцию IL-17A [512]. Следует подчеркнуть, что все исследования, демонстрирующие ключевую роль IFN I типа и IL-27 в развитии вторичных бактериальных осложнений, были проведены на животных, перенесших естественную инфекцию, вызванную штаммами вируса гриппа с полноразмерным геном NS. Изучения вторичных бактериальных инфекций у животных, иммунизированных штаммами с нарушенной функцией белка NS1, не проводилось.

Исследования в данной области представляют большой интерес, поскольку для живой гриппозной вакцины FluMist была показана способность к индукции существенных изменений в структуре микробиома верхних дыхательных путей у человека. Изменения были ассоциированы с усилением экспрессии IFN-стимулированных генов и приводили к существенному увеличению доли таксонов *Staphylococcus* и *Bacteroides* в составе микробного сообщества носовых секретов [514]. С учетом высокого интерфероногенного потенциала вирусов с укороченным белком NS1, изучение влияния данных штаммов на состав микробиоты организма-хозяина имеет важное значение для оценки перспектив их клинического применения в качестве живых аттенуированных вакцин.

Регуляторная функция IL-27 может объяснять усиление продукции IL-10, наблюдаемое в группе NS124 по сравнению с NSfull (Рис. 6). Показано, что IL-27 совместно с IL-2 стимулирует экспрессию IL-10 цитотоксическими Т-лимфоцитами за счет активации Blimp-1-зависимого сигнального пути [515]. Если предположить, что сходный характер цитокинового ответа имеет место и при внутрилегочном заражении, гиперпродукция IL-27 в группе NS124 по сравнению с NSfull может объяснить отсутствие летальной иммунопатологии у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, несмотря на существенное повышение концентрации цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6, действие которых может оказывать негативное влияние на организм при респираторных инфекциях [123,133,136].

Анализ динамики относительного состава популяций врожденного иммунитета на фоне интраперитонеальной иммунизации показал, что внутрибрюшинное введение вирусов вызывает активную миграцию в брюшную полость моноцитов, макрофагов и нейтрофилов. Согласно литературным данным, именно эти клетки обеспечивают первую линию иммунной защиты при гриппе [516]. Резидентные макрофаги осуществляют фагоцитоз инфицированных клеток организма-хозяина, ограничивая распространение вируса [517]. Кроме того, они привлекают в очаг воспаления моноциты, дифференцирующиеся в макрофаги и дендритные клетки моноцитарного происхождения [518]. Нейтрофилы также принимают активное участие в фагоцитозе вирусных частиц и апоптотических клеток в очаге инфекции [519]. Помимо этого, им принадлежит важная роль в привлечении цитотоксических Т-лимфоцитов: согласно данным, полученным в работе Lim et al. [151], при перемещении нейтрофилы оставляют за собой хемокиновый след, содержащий преимущественно CXCL12, который направляет миграцию Т-клеток. Известно, что у мышей нейтрофилы осуществляют MHCII-зависимую презентацию вирусных антигенов, а также экспрессируют костимуляторные молекулы CD80 и CD86 [520].

Несмотря на то, что штамм A/PR/8/34-NS124 вызывал повышенную продукцию цитокинов, увеличение доли моноцитов, макрофагов и нейтрофилов в перитонеальных смывах происходило быстрее в ответ на иммунизацию штаммом с полноразмерным белком NS1 с

последующим выравниванием показателей. Известно, что IFN I типа способны оказывать как активирующее, так и ингибирующее влияние на клетки иммунной системы в зависимости от концентрации и продолжительности воздействия [521]. Кроме того, помимо провоспалительных факторов, концентрация которых оценивалась в данной работе, IFN α/β индуцируют экспрессию ряда противовоспалительных цитокинов, а также некоторых генов, отвечающих за индукцию апоптоза. Не исключено, что гиперпродукция IFN β , наблюдавшаяся после введения мышам вируса A/PR/8/34-NS124, вызвала подавление миграции нейтрофилов и моноцитов в перитонеальную полость. Данный эффект может быть связан со способностью IFN I типа ингибировать экспрессию хемокинов CXCL1 и CXCL2 [522]. Кроме того, ингибирующее воздействие на миграцию нейтрофилов оказывает IL-27, концентрация которого в перитонеальных смывах у мышей из группы NS124 была существенно выше, чем у животных, иммунизированных штаммом с полноразмерным белком NS1.

В работе анализировалась динамика относительного состава различных субпопуляций дендритных клеток. Данные иммуноциты гетерогенны по своему составу, происхождению, локализации и выполняемым функциям. Согласно литературным данным, CD11b⁺ и CD103⁺ ДК мигрируют во вторичные органы иммунной системы в процессе развития иммунного ответа. Пик интенсивности миграции достигается через 18 ч после заражения. После CCR7-зависимого проникновения в периферические органы иммунной системы, дендритные клетки осуществляют презентацию антигена наивным CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам [181,182,186–188].

Использованная панель флуорохром-конъюгированных антител позволила идентифицировать четыре субпопуляции дендритных клеток на основании экспрессии маркеров CD11b и CD103. Анализ динамики CD11b^{hi} ДК, CD11b⁻ ДК и CD103⁺ ДК позволяет предположить, что через 24 ч после иммунизации происходит выход дендритных клеток из зоны введения вируса. При этом в группе NS124 отмечалось более выраженное сокращение содержания ДК, что может являться признаком их усиленной миграции в периферические лимфоузлы для осуществления презентации антигена наивным Т-лимфоцитам [183,523]. Для проверки данного утверждения необходимы дополнительные исследования, позволяющие отследить трафик клеток врожденного иммунитета в периферические лимфоидные органы. Тем не менее, большое количество литературных данных, свидетельствующих об активирующем воздействии IFN I типа на миграцию АПК подтверждает это предположение [111–113]. Помимо интерферонов важную роль в активации дендритных клеток и поляризации иммунного ответа по Th1-направлению играет IL-12, уровень которого в группе NS124 также был существенно выше, чем в группе NSfull [524].

Для оценки антигенпрезентирующей активности клеток врожденного иммунитета был проанализирован уровень экспрессии молекулы CD86 на поверхности профессиональных АПК

(клетки, конститутивно экспрессирующие МНСII). Анализ экспрессии CD86 широко применяется для изучения активации клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Известно, что повышение экспрессии данного маркера сопряжено с созреванием АПК и презентацией антигенов [496,497]. Показано, что через 24 ч после иммунизации экспрессия CD86 у мышей из группы NS124, была достоверно выше, чем в группе NSfull. По-видимому, данный эффект связан с отсутствием иммуносупрессорной активности у модифицированного белка NS1, что позволяет АПК животных, иммунизированных вирусом A/PR/8/34-NS124, поддерживать экспрессию CD86 на высоком уровне, в то время как у мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34, исследуемый показатель снижался через 24 ч после введения вируса. Заслуживает внимания тот факт, что усиление экспрессии CD86 на АПК перитонеальной полости иммунизированных животных носило долговременный характер. Даже через 8 дней после введения вирусов уровень экспрессии исследуемого маркера в обеих экспериментальных группах был выше, чем в контроле. При этом между группами NSfull и NS124 также наблюдались достоверные различия.

Данные о сохранении повышенного уровня экспрессии активационного маркера CD86 на поверхности антигенпрезентирующих клеток в течение длительного времени после введения вируса представляют интерес в контексте имеющихся в литературе сведений о важной роли памяти врожденного иммунитета в обеспечении перекрестной защиты. Известно, что многие популяции клеток врожденного иммунитета, в особенности макрофаги и NK-клетки, претерпевают ряд эпигенетических изменений в ходе воспалительных реакций. Ремоделирование хроматина и изменение профиля метилирования гистонов позволяет данным клеткам осуществлять более интенсивную продукцию цитокинов воспаления при взаимодействии с инфекционными агентами, с которыми организм ранее не контактировал. В результате, совокупность реакций, получившая в литературе название Trained innate immunity (ТИ), или память врожденного иммунитета, позволяет усилить неспецифическую резистентность организма [451–460,525]. Влияние вакцинации на формирование памяти врожденного иммунитета в настоящее время слабо изучено. Интерес исследователей данного вопроса сосредоточен, преимущественно, на изучении ТИ, формирующегося после иммунизации вакциной БЦЖ [458–460,526,527]. Роль памяти врожденного иммунитета в формировании поствакцинального иммунного ответа на вирус гриппа практически не исследована. Также пока не опубликовано ни одной работы, посвященной изучению влияния иммунизации вирусами гриппа с нарушенной функцией белка NS1 на формирование ТИ.

Проведенный анализ факторов врожденного иммунитета позволяет утверждать, что укорочение белка NS1 до 124 а.к. способствует более эффективной презентации вирусных антигенов за счет усиления продукции провоспалительных цитокинов, интенсификации

миграции дендритных клеток, а также повышения уровня экспрессии костимуляторного фактора CD86, что, в совокупности, приводит к более выраженной стимуляции адаптивного иммунного ответа у мышей, иммунизированных штаммом A/PR/8/34-NS124.

Изучение Т-клеточного иммунного ответа на различные антигенные детерминанты вируса гриппа продемонстрировало высокую иммуногенность штамма с укороченным белком NS1. При интраперитонеальной иммунизации, позволяющей обеспечить равную антигенную нагрузку, вирус гриппа A/PR/8/34-NS124 вызывал формирование повышенного числа антигенспецифичных эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению со штаммом с полноразмерным белком NS1. Наиболее выраженные различия между группами были выявлены по относительному содержанию полифункциональных Т-лимфоцитов, имеющих фенотип CD8⁺IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁺ и CD8⁺IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺. Данное обстоятельство заслуживает особого внимания, поскольку, согласно обширным литературным данным, именно антигенспецифичные полифункциональные Т-клетки играют ключевую роль в обеспечении защиты от повторной инфекции. Полифункциональные Т-лимфоциты обладают высокой продолжительностью жизненного цикла. В отличие от монофункциональных Т-клеток, представленных, в основном, IFN γ ⁺IL2⁻TNF α ⁻ Т-лимфоцитами, полифункциональные Т-клетки присутствуют в циркуляции более одного года и служат источником для формирования долгоживущих клеток памяти [500]. При повторных вакцинациях той же вакциной их относительное содержание возрастает [260]. Показано также, что полифункциональные Т-лимфоциты вносят значительный вклад в формирование иммунного ответа на консервативные эпитопы белков вируса гриппа [260].

Полученные в настоящей работе данные о повышенном уровне полифункциональных Т-лимфоцитов, формирующемся в ответ на иммунизацию штаммом A/PR/8/34-NS124 по сравнению с вирусом дикого типа, хорошо согласуются с существующими представлениями о процессе дифференцировки данных популяций. Показано, что ключевую роль в формировании полифункциональных Т-лимфоцитов играют дендритные клетки, активированные в результате взаимодействия с агонистами сигнальных путей TLR7/8 и RIG-I. Известно, что мыши с нарушенной экспрессией RIG-I характеризуются формированием пониженного числа полифункциональных Т-клеток в ответ на иммунизацию и ослабленной защитой от гетерологичных штаммов вируса гриппа. При этом, введение таким животным IFN I типа приводило к усилению экспрессии CD86 и MHCII на RIG-I^{-/-} ДК и частично восстанавливало процесс дифференцировки полифункциональных Т-лимфоцитов [265]. Учитывая, что белок NS1 является мощным антагонистом IFN-сигналинга и осуществляет свою иммуносупрессорную функцию, в том числе, за счет непосредственного взаимодействия с RIG-I, наблюдаемые в настоящей работе различия в относительном содержании полифункциональных Т-лимфоцитов между группами NSfull и NS124 получают очевидное объяснение. Таким образом, на основании

полученных данных можно утверждать, что подавление иммуносупрессорной функции белка NS1 приводит к усилению иммуногенности Т-клеточных антигенных детерминант вируса гриппа.

Анализ результатов оценки гуморального иммунитета к вирусам A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 не позволяет сделать однозначных выводов о влиянии модификации белка NS1 на способность вирусов гриппа стимулировать В-клеточный иммунный ответ. С одной стороны, было показано, что укорочение гена NS1 негативно сказывается на продукции гемагглютинирующих антител. Оба штамма вызывали выраженный гуморальный иммунный ответ уже на седьмой день после интраперитонеальной иммунизации, однако титр грипп-специфичных антител в РТГА был выше в группе NSfull. С другой стороны, общий уровень IgG, специфичных к вирусу гриппа был выше у мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1. Кроме того, в группе NS124, в отличие от NSfull отмечался существенный прирост общего содержания IgG к 21 дню после иммунизации (Рис. 19). Не вызывает сомнений, что гиперпродукция IFN I типа, наблюдаемая на ранних стадиях иммунного ответа на штамм A/PR/8/34-NS124, а также более выраженная способность вируса гриппа с укороченным белком NS1 вызывать Th1-поляризацию иммунного ответа оказывают влияние на В-клеточное звено иммунной системы. Не исключено, что повышенная иммуногенность вирусов с модифицированным NS-геном приводит к расширению спектра антигенных детерминант, на которые вырабатываются антитела. В результате, общий уровень гуморального иммунного ответа возрастает, однако относительное содержание гемагглютинирующих антител в общем пуле иммуноглобулинов падает, что и объясняет наблюдаемые различия. Для проверки данной гипотезы необходимы дальнейшие исследования с использованием отдельных В-клеточных эпитопов.

Анализ литературных данных, посвященных роли IFN в регуляции В-клеточного иммунного ответа выявил противоречивость существующих взглядов на данную проблему. С одной стороны, существует большое число работ, указывающих на стимулирующую функцию IFN-I в отношении В-клеточного иммунитета. Согласно данным Braun et al., IFN- α/β снижают порог индукции В-клеток, тем самым способствуя формированию антительного ответа [528]. Также было показано, что мыши с нарушенной экспрессией рецепторов IFN-I демонстрируют сниженную продукцию антител [529]. Известно, что IFN-I обеспечивают усиление первичного антительного ответа на растворимые белки, стимулируя выработку всех подклассов IgG и индуцируя формирование долгоживущих В-лимфоцитов памяти [530]. Положительное влияние IFN-I на В-клеточный иммунный ответ было показано и в других работах [531–533]. Тем не менее, существуют свидетельства и негативного влияния IFN I на формирование В-клеточного иммунитета. В частности, в недавних исследованиях было показано, что выраженная экспрессия

IFN I в ответ на заражение LCMV подавляла антигензависимую дифференцировку В-лимфоцитов за счет воздействия на дендритные клетки и CD4⁺ Т-лимфоциты. Установлено также, что в подавлении В-клеточного ответа важную роль играла IFN-зависимая продукция IL-10 и TGFβ. Кроме того, в исследовании Sammicheli et al [534] было установлено, что введение мышам LCMV сопровождалось привлечением в лимфоузлы, дренирующие область контакта с вирусом, IFN-активированных воспалительных моноцитов, экспрессирующих рецептор MCP-1 (CCR2). Длительное взаимодействие данных клеток с LCMV-специфичными В-лимфоцитами приводило к подавлению продукции антител [535]. В настоящей работе отмечалась гиперпродукция IFN-I в ответ на введение штамма A/PR/8/34-NS124, а также более выраженное усиление секреции IL-10 и MCP-1 в группе NS124 по сравнению с NSfull, что, принимая во внимание данные Moseman et al. [534], может приводить к подавлению В-клеточного иммунитета. Не исключено, что различия по уровню гуморального иммунного ответа на вирусы с укороченным и полноразмерным белком NS1 будут сильно зависеть от иммунизирующей дозы. Данный вопрос требует дополнительных исследований.

Для оценки влияния интраперитонеальной иммунизации штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 на формирование перекрестной защиты от гетерологичных штаммов вируса гриппа мыши были заражены вирусами A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04 через 32 дня после иммунизации. Полученные данные позволяют заключить, что несмотря на формирование выраженного Т- и В- клеточного ответа после интраперитонеального введения вирусов и наличие цитотоксических CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к высококонсервативным эпитопам белков вируса гриппа, присутствующим как в составе антигенов штамма A/PR8, так и в составе белков вирусов, использованных для гетерологичного челленджа, формирования перекрестной защиты не происходит. С другой стороны, интраназальная иммунизация мышей вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 в дозе, соответственно, 3 и 6 log[ТИД₅₀]/мышь позволила полностью предотвратить заболевание при заражении штаммами A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04. Полученные результаты подчеркивают важность формирования локального иммунитета для обеспечения гетеросубтипической и гетеротипической защиты и свидетельствуют в пользу применения мукозальной вакцинации для профилактики гриппозной инфекции.

В настоящее время опубликовано множество исследований, демонстрирующих важность резидентных клеток врожденного и адаптивного иммунитета для обеспечения защиты от гриппа [246–248]. Необходимо отметить, что для предотвращения заболевания необходимо не только наличие антигенспецифичных Т-лимфоцитов и антител, но и соблюдение баланса про- и противовоспалительных факторов иммунного ответа. Гиперпродукция цитокинов воспаления и массивная инфильтрация легких воспалительными моноцитами, макрофагами и нейтрофилами оказывают более разрушительное воздействие на легочную ткань, чем

пролиферация вируса. Об этом свидетельствуют результаты экспериментов, в которых было показано, что мыши с нарушенной экспрессией рецепторов IFN I легче переносят острую гриппозную инфекцию, что выражается в снижении патологии в легких и более высокой выживаемости, чем у животных дикого типа [119]. Также было установлено, что мыши, не экспрессирующие рецептор TNFR1 переносят заражение штаммом H5N1 значительно лучше, чем животные дикого типа [134]. Подавление экспрессии TNF α на фоне инфекции вирусом A/X31 (H3N2) снижало потерю веса и улучшало состояние зараженных животных [135]. Клеточные реакции адаптивного иммунитета также могут вызывать негативные последствия для организма. Показано, что адоптивный перенос CD8⁺ Т-лимфоцитов, специфичных к гемагглютинуину вируса гриппа в легкие трансгенных мышей, конститутивно экспрессирующих HA на поверхности эпителиоцитов приводил к неконтролируемому повреждению легочной ткани и гибели животных [536]. Предотвращение иммунопатологии осуществляется за счет механизмов иммунного гомеостаза, которые на определенном этапе инфекции переключают иммунный ответ с провоспалительного на противовоспалительный. Основными участниками регуляторных реакций являются цитокины IL-10 и TGF β , которые продуцируются Т-регуляторными CD4⁺ -лимфоцитами, а также некоторыми популяциями CD8⁺ Т-клеток. Можно утверждать, что для обеспечения эффективной защиты от гриппозной инфекции необходимо формирование специфического микроокружения в области контакта с патогеном. Данное микроокружение должно сочетать в себе наличие антигенспецифичных Т-клеток и антител, обеспечивающих элиминацию патогена, а также регуляторных компонентов, препятствующих развитию иммунопатологии.

Данные, полученные в настоящей работе позволяют заключить, что мукозальная иммунизация вирусами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124, в отличие от интраперитонеальной, может обеспечить формирование в легочной ткани специфического микроокружения, препятствующего развитию заболевания при заражении гетерологичными штаммами A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04. Следует подчеркнуть, что мукозальная иммунизация не предотвращала заражение: через 2 дня после введения A/Aichi/2/68 в легких иммунизированных животных наблюдался такой же уровень репликации вируса, как и у контрольных мышей. К 4 дню после заражения данный показатель снижался в группе NS124, но полной элиминации патогена на данном сроке не происходило (Рис. 25). В группе NSfull уровень репликации штамма A/Aichi/2/68 достоверно не отличался от контрольной группы. Тем не менее, уровень макрофагов, нейтрофилов и моноцитов – основных медиаторов иммунопатологии – у иммунизированных животных был существенно ниже, чем в контроле. Различия между группами NSfull и NS124 были выявлены по уровню цитокинов IFN α/β , IL-6, IL-23, GM-CSF. У мышей, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, формировался гораздо менее

выраженный провоспалительный цитокиновый ответ на заражение гетерологичным штаммом по сравнению с группой, получавшей вирус с полноразмерным белком NS1. При этом, только в группе NS124 отмечалось достоверное снижение вирусной нагрузки по сравнению с контролем на 4 день после заражения. Полученные результаты позволяют предположить, что снижение уровня врожденного иммунного ответа на гетерологичное заражение в группе NS124 внесло существенный вклад в обеспечение выживаемости животных из данной группы. Похожие результаты были получены в работе Li et al., 2010 [537]. Авторы показали, что введение мышам аттенуированного штамма бактерии *Bordetella pertussis* предотвращает развитие иммунопатологии при последующем заражении летальной дозой вируса гриппа А. В работе было продемонстрировано существенное снижение провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α , GM-CSF, IL-12 у иммунизированных животных в ответ на введение вируса. В статье Li et al. показана зависимость формирующейся перекрестной защиты от иммунизирующей дозы *B. Pertussis*: только высокие дозы ($5 \cdot 10^6$ и $5 \cdot 10^7$ CFU) облегчали течение последующей гриппозной инфекции и частично предотвращали гибель животных, тогда как в группе, получавшей $5 \cdot 10^5$ CFU, летальность составила 100%. Учитывая отсутствие общих Т- и В-клеточных эпитопов у вируса гриппа А и *B. Pertussis* можно заключить, что результаты, полученные в работе Li et al. связаны с воздействием бактериального агента на систему врожденного иммунитета. В разделе 2.6 обзора литературы приведены другие примеры формирования перекрестной защиты от неродственных патогенов, а также описывается ряд механизмов, обеспечивающих неспецифическую резистентность (память врожденного иммунитета, ТП). Не исключено, что сходные механизмы обуславливают наблюдаемую в настоящем исследовании перекрестную защиту от вирусов A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04 после перенесения инфекции, вызванной введением штаммов A/PR/8/34 или A/PR/8/34-NS124. При этом, учитывая наличие у вирусов H1N1, H3N2 и вируса гриппа В общих эпитопов, необходимо также принимать во внимание действие механизмов адаптивного иммунитета.

В разделе 4.5.6 приводятся данные, демонстрирующие повышенное, по сравнению с контролем, содержание Т-регуляторных лимфоцитов в легочной ткани у мышей, иммунизированных штаммами A/PR/8/34 и A/PR/8/34-NS124 на 4 день после заражения вирусом A/Aichi/2/68. Анализировалось относительное содержание популяций периферических Т-регов (pTreg, FOXP3⁺Helios⁻) и Т-регуляторных лимфоцитов тимического происхождения (tTreg, FOXP3⁺Helios⁺). В группе NS124 относительное содержание tTreg было, в среднем, выше, чем в группе NSfull, однако статистически-значимых различий между группами выявлено не было. Уровень периферических Т-регов (pTreg) на данном сроке был примерно одинаков во всех трех группах. Согласно литературным данным [484], FOXP3⁺Helios⁺ Т-реги (tTreg) характеризуются наиболее выраженной иммуносупрессорной активностью по сравнению с другими популяциями

регуляторных лимфоцитов. Не исключено, что Т-регуляторные лимфоциты могут вносить существенный вклад в наблюдаемые различия в уровне нейтрофильной и макрофагальной инфильтрации легких у иммунизированных и не иммунизированных животных через 4 дня после вторичного заражения. Активностью Т-регуляторных лимфоцитов может быть также объяснено снижение уровня провоспалительных цитокинов в группе NS124. Учитывая наблюдаемые различия между группами NSfull и NS124 по концентрации цитокинов в легочной ткани, можно предположить, что регуляторные Т-лимфоциты, дифференцирующиеся после иммунизации вирусом с укороченным белком NS1, характеризуются повышенной функциональной активностью по сравнению с Т-регуляторными клетками, формирующимися после перенесения инфекции, вызванной вирусом с полноразмерным белком NS1. Косвенным подтверждением данной гипотезы является установленная в данной работе повышенная иммуногенность вируса A/PR/8/34-NS124 в отношении эффекторных Т-лимфоцитов. На рис. 30B показано, что через 21 день после иммунизации уровень антигенспецифичных Т-лимфоцитов практически совпадает в группах NSfull и NS124, однако после заражения вирусом A/Aichi/2/68 в группе NS124 происходит существенное увеличение доли антигенспецифичных эффекторных Т-клеток, что может свидетельствовать о повышенном пролиферативном потенциале клонов, сформировавшихся в результате иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124. Также, в рамках данного диссертационного исследования было показано, что антигенспецифичные полифункциональные Т-лимфоциты, сформировавшиеся после иммунизации штаммом A/PR/8/34-NS124, характеризуются повышенной экспрессией IFN γ по сравнению с аналогичными клетками у животных из группы NSfull (Рис. 17, Рис. 18D, Рис 30C), что свидетельствует о более высокой функциональной активности эффекторных Т-клеток у животных из группы NS124. Аналогичный эффект иммунизация вирусом с укороченным белком NS1 может оказывать и на Т-регуляторные лимфоциты, индуцируя дифференцировку более высокого числа антигенспецифичных Т-реггов, усиленно продуцирующих регуляторные цитокины, такие как IL-10, TGF β , IL-35. Для подтверждения этой гипотезы необходимы дальнейшие исследования с применением методов, позволяющих оценить антигенную специфичность и функциональную активность регуляторных Т-лимфоцитов, формирующихся в ходе иммунизации штаммами вируса гриппа с полноразмерным и укороченным белком NS1.

Несмотря на сходный уровень регуляторных клеток и наличие антигенспецифичных Т-лимфоцитов как в группе NS124, так и в группе NSfull, только у животных, иммунизированных штаммом с укороченным белком NS1, отмечалась 100% выживаемость при заражении вирусом A/Aichi/2/68 (Рис. 25). По-видимому, это связано с формированием более выраженного Т-клеточного иммунного ответа в группе NS124 (Рис. 30). Наличием большего числа

антигенспецифичных CD8⁺ Т-лимфоцитов может быть также объяснено снижение вирусной нагрузки в группе NS124 на 4 день после заражения.

Была отмечена зависимость уровня протекции от заражающей дозы исследуемых вирусов. Введение штамма A/PR/8/34-NS124 в дозе 6 log[ТИД₅₀], вызывавшее небольшое снижение массы тела животных (Рис. 2), приводило к формированию полноценной защиты от вирусов A/Aichi/2/68 и B/Malaysia/06/04 (Рис. 4). В то же время, использование менее высокой дозы (5 log[ТИД₅₀]), не вызывавшей симптомов заболевания, не позволило сформировать эффективную защиту от вируса B/Malaysia/06/04. Таким образом, можно утверждать, что иммунизация мышей вирусом A/PR/8/34-NS124 в дозе, вызывающей лишь незначительную потерю массы тела по сравнению с контролем позволяет достичь такого же уровня гетеротипической и гетеросубтипической защиты, который индуцирует сублетальная инфекция, вызванная штаммом дикого типа, сопровождающаяся существенной потерей массы тела и частичной гибелью экспериментальных животных.

Проведенные исследования свидетельствуют о ключевой роли мукозального иммунитета в обеспечении гетерологичной защиты, а также раскрывают механизмы формирования иммунного ответа на вирусы гриппа с укороченным белком NS1 и служат теоретическим обоснованием использования таких штаммов в качестве живых аттенуированных гриппозных вакцин и векторов. Не исключено, что для создания вакцины на основе штамма A/PR/8/34-NS124 требуется его дополнительная аттенуация.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Результаты, полученные в рамках проведенного диссертационного исследования, расширяют существующие представления о механизмах индукции гетеросубтипического и гетеротипического 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, резидентных Т-клеток памяти и клеток врожденного иммунитета в формирование перекрестной защиты, а также оценки продолжительности полученных 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 сокращений

ADCC	Антителозависимая цитотоксичность
ASC	Антителосекретирующие клетки
CD	Кластер дифференцировки
CFU	Колониеобразующие единицы
CTL	Цитотоксические лимфоциты
DPBS	Натрий-фосфатный буфер
GFP	Зеленый флуоресцентный белок
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
HLA	Человеческие лейкоцитарные антигены
BALT	Ассоциированная с бронхами лимфоидная ткань
IFN	Интерферон
IL	Интерлейкин
ISG	Интерферон-зависимые гены
LCMV	Вирус лимфоцитарного хориоменингита
LD ₅₀	50% летальная доза

MALT	Ассоциированная со слизистыми лимфоидная ткань
MCP	Фактор хемотаксиса моноцитов
MDCK	Клетки почки собаки
MedFI	Медианная интенсивность флуоресценции
MFI	Средняя интенсивность флуоресценции
MHC	Молекулы главного комплекса гистосовместимости
NEP	Белок ядерного экспорта
NK	Естественные киллеры
NLR	NOD-подобные рецепторы
NS1	Неструктурный белок 1
NS124	Группа, получавшая вирус гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий укороченный до 124 а.к. белок NS1
NSfull	Группа, получавшая вирус гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), кодирующий полноразмерный белок NS1
PBMC	Мононуклеары периферической крови человека
PI	Индекс полифункциональности
PKR	Протеин киназа R
PRR	Паттерн-распознающие рецепторы
pTreg	Периферические регуляторные Т-клетки
RNP	Рибонуклеопротеин
TCR	Т-клеточный рецептор
Tem	Эффекторные Т-клетки памяти
Th	Т-хелперы
TI	Память врожденного иммунитета
TLR	Toll-подобные рецепторы
TNF	Фактор некроза опухолей
TNFR	Рецептор фактора некроза опухолей
tTreg	Тимические регуляторные Т-клетки
WHO	Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ)
АПК	Антигенпрезентирующие клетки
БЦЖ	Бацилла Кальмета - Герена
ДК	Дендритные клетки
ЖГВ	Живая гриппозная вакцина

ИГВ	Инактивированная гриппозная вакцина
ИФА	Иммуноферментный анализ
кДК	Классические дендритные клетки
моДК	Дендритные клетки моноцитарного происхождения
пДК	Плазмацитоидные дендритные клетки
РГА	Реакция гемагглютинации
РКЭ	Развивающиеся куриные эмбрионы
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации
ТИД ₅₀	50% тканевая инфекционная доза

Список литературы

1. Krammer F. et al. Influenza // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018. Vol. 4, № 1. P. 1–21.
2. Egorov A.Y. The challenges of creating a universal influenza vaccine // *MIR J.* 2016. Vol. 3, № 1.
3. Jefferson T. et al. Vaccines for preventing influenza in healthy children // *Cochrane Database Syst. Rev.* John Wiley & Sons, Ltd, 2012. № 8.
4. Osterholm M.T. et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* Elsevier, 2012. Vol. 12, № 1. P. 36–44.
5. Pfliegerer M. et al. Summary of knowledge gaps related to quality and efficacy of current influenza vaccines // *Vaccine.* Elsevier, 2014. Vol. 32, № 35. P. 4586–4591.
6. Andersohn F. et al. Vaccination of children with a live-attenuated, intranasal influenza vaccine—analysis and evaluation through a Health Technology Assessment // *GMS Health Technol. Assess.* German Medical Science, 2014. Vol. 10.
7. Gambotto A. et al. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus // *Lancet.* Elsevier, 2008. Vol. 371, № 9622. P. 1464–1475.
8. Zhang F. et al. Human infections with recently-emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza virus in China // *J. Infect.* Elsevier, 2017. Vol. 75, № 1. P. 71–75.
9. Цыбалова Л.М., Киселев О.И. Универсальные вакцины против гриппа. Разработки, перспективы использования // *Вопросы вирусологии.* ОАО «Издательство «Медицина», 2012. Vol. 57, № 1.
10. Шмаров М.М. et al. Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5 // *Acta Naturae* (русскаяязычная версия). Общество с ограниченной ответственностью Парк-медиа, 2010. Vol. 2, № 1.

11. Седова Е.С. et al. Гриппозные рекомбинантные вакцины // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). Общество с ограниченной ответственностью Парк-медиа, 2012. Vol. 4, № 4 (15).
12. Reber A.J. et al. Extensive T cell cross-reactivity between diverse seasonal influenza strains in the ferret model // *Sci. Rep. Springer US*, 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–13.
13. Chen W. et al. Reversal in the immunodominance hierarchy in secondary CD8⁺ T cell responses to influenza A virus: roles for cross-presentation and lysis-independent immunodomination // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2004. Vol. 173, № 8. P. 5021–5027.
14. La Gruta N.L. et al. A virus-specific CD8⁺ T cell immunodominance hierarchy determined by antigen dose and precursor frequencies // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2006. Vol. 103, № 4. P. 994–999.
15. Kastenmuller W. et al. Cross-competition of CD8⁺ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2007. Vol. 204, № 9. P. 2187–2198.
16. García-Sastre A. et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems // *Virology. Elsevier*, 1998. Vol. 252, № 2. P. 324–330.
17. Egorov A. et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1998. Vol. 72, № 8. P. 6437–6441.
18. Ferko B. et al. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2004. Vol. 78, № 23. P. 13037–13045.
19. Zhou B. et al. NS-based live attenuated H1N1 pandemic vaccines protect mice and ferrets // *Vaccine. Elsevier Ltd*, 2010. Vol. 28, № 50. P. 8015–8025.
20. Ferko B. et al. Immunogenicity and Protection Efficacy of Replication-Deficient Influenza A Viruses with Altered NS1 Genes // *Society*. 2004. Vol. 78, № 23. P. 13037–13045.
21. Chambers T.M. et al. Influenza A viruses with truncated NS1 as modified live virus vaccines: pilot studies of safety and efficacy in horses. // *Equine Vet. J.* 2009. Vol. 41, № 1. P. 87–92.
22. Vincent A.L. et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine // *Vaccine. Elsevier*, 2007. Vol. 25, № 47. P. 7999–8009.
23. Romanova J. et al. Preclinical evaluation of a replication-deficient intranasal Δ NS1 H5N1 influenza vaccine // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 6.
24. Steel J. et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. // *J. Virol.* 2009. Vol. 83, № 4. P. 1742–1753.
25. Zhou H. et al. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4GI binding domain // *J. Infect. Dis. Infectious Diseases Society of America*, 2010. Vol. 202, № 9. P. 1338–1346.

26. Hai R. et al. Influenza B virus NS1-truncated mutants: live-attenuated vaccine approach. // *J. Virol.* 2008. Vol. 82, № 21. P. 10580–10590.
27. Wressnigh N. et al. Influenza B mutant viruses with truncated NS1 proteins grow efficiently in vero cells and are immunogenic in mice // *J. Gen. Virol.* 2009. Vol. 90, № 2. P. 366–374.
28. Wacheck V. et al. A novel type of influenza vaccine: safety and immunogenicity of replication-deficient influenza virus created by deletion of the interferon antagonist NS1 // *J. Infect. Dis.* The University of Chicago Press, 2010. Vol. 201, № 3. P. 354–362.
29. Mössler C. et al. Phase I/II trial of a replication-deficient trivalent influenza virus vaccine lacking NS1 // *Vaccine.* Elsevier Ltd, 2013. Vol. 31, № 52. P. 6194–6200.
30. Stukova M.A. et al. Vaccine potential of influenza vectors expressing *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein // *Tuberculosis.* 2006. Vol. 86, № 3-4 SPEC. ISS. P. 236–246.
31. Li M., Rao P., Krug R.M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits // *EMBO J.* EMBO Press, 2001. Vol. 20, № 8. P. 2078–2086.
32. Yamayoshi S. et al. Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2015. P. JVI-02175.
33. Wise H.M. et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2009. Vol. 83, № 16. P. 8021–8031.
34. Conenello G.M., Palese P. Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch // *Cell Host Microbe.* Elsevier, 2007. Vol. 2, № 4. P. 207–209.
35. James J. et al. Influenza A virus PB1-F2 protein prolongs viral shedding in chickens lengthening the transmission window // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 2016. Vol. 97, № 10. P. 2516–2527.
36. Muramoto Y. et al. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2013. Vol. 87, № 5. P. 2455–2462.
37. Jagger B.W. et al. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response // *Science (80-.). American Association for the Advancement of Science*, 2012. Vol. 337, № 6091. P. 199–204.
38. Palese P. et al. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase // *Virology.* Elsevier, 1974. Vol. 61, № 2. P. 397–410.
39. Honda A. et al. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation // *J. Biochem.* Oxford University Press, 1988. Vol. 104, № 6. P. 1021–1026.
40. Huang T.S., Palese P., Krystal M. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1990. Vol. 64, № 11. P. 5669–5673.
41. Martin K., Heleniust A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix

- protein (M1) promotes export and inhibits import // *Cell*. Elsevier, 1991. Vol. 67, № 1. P. 117–130.
42. O'Neill R.E., Talon J., Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins // *EMBO J*. EMBO Press, 1998. Vol. 17, № 1. P. 288–296.
 43. Bukrinskaya A.G., Vorkunova N.K., Pushkarskaya N.L. Uncoating of a rimantadine-resistant variant of influenza virus in the presence of rimantadine // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 1982. Vol. 60, № 1. P. 61–66.
 44. Hay A.J. et al. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. // *EMBO J*. Wiley Online Library, 1985. Vol. 4, № 11. P. 3021–3024.
 45. Wise H.M. et al. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain // *PLoS Pathog*. Public Library of Science, 2012. Vol. 8, № 11. P. e1002998.
 46. Selman M. et al. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing // *Emerg. Microbes Infect. Nature Publishing Group*, 2012. Vol. 1, № 11. P. e42.
 47. Bourmakina S. V, García-Sastre A. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 2003. Vol. 84, № 3. P. 517–527.
 48. Bruce E.A., Digard P., Stuart A.D. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2010. Vol. 84, № 12. P. 5848–5859.
 49. Roberts P.C., Compans R.W. Host cell dependence of viral morphology // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1998. Vol. 95, № 10. P. 5746–5751.
 50. Simpson-Holley M. et al. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions // *Virology*. Elsevier, 2002. Vol. 301, № 2. P. 212–225.
 51. Hutchinson E.C. et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2014. Vol. 5. P. 4816.
 52. Kuchipudi S. V et al. Differences in influenza virus receptors in chickens and ducks: implications for interspecies transmission // *J. Mol. Genet. Med. an Int. J. Biomed. Res. Library Publishing Media*, 2009. Vol. 3, № 1. P. 143.
 53. Trebbien R., Larsen L.E., Viuff B.M. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs // *Virol. J. BioMed Central*, 2011. Vol. 8, № 1. P. 434.
 54. Shinya K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway // *Nature. Nature Publishing Group*, 2006. Vol. 440, № 7083. P. 435.
 55. Marsh M., Helenius A. Virus entry: open sesame // *Cell*. Elsevier, 2006. Vol. 124, № 4. P. 729–740.

56. Lazarowitz S.G., Goldberg A.R., Choppin P.W. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen // *Virology*. Elsevier, 1973. Vol. 56, № 1. P. 172–180.
57. Klenk H.-D. et al. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment // *Virology*. Elsevier, 1975. Vol. 68, № 2. P. 426–439.
58. Galloway S.E. et al. Influenza HA subtypes demonstrate divergent phenotypes for cleavage activation and pH of fusion: implications for host range and adaptation // *PLoS Pathog.* Public Library of Science, 2013. Vol. 9, № 2. P. e1003151.
59. Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin // *Annu. Rev. Biochem.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 2000. Vol. 69, № 1. P. 531–569.
60. Plotch S.J., Bouloy M., Krug R.M. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1979. Vol. 76, № 4. P. 1618–1622.
61. Plotch S.J. et al. A unique cap (m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription // *Cell*. Elsevier, 1981. Vol. 23, № 3. P. 847–858.
62. Robertson J.S., Schubert M., Lazzarini R.A. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1981. Vol. 38, № 1. P. 157–163.
63. Lamb R.A., Horvath C.M. Diversity of coding strategies in influenza viruses // *Trends Genet.* Elsevier Current Trends, 1991. Vol. 7, № 8. P. 261–266.
64. Lamb R.A. et al. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1980. Vol. 77, № 4. P. 1857–1861.
65. Chua M.A. et al. Influenza A virus utilizes suboptimal splicing to coordinate the timing of infection // *Cell Rep.* Elsevier, 2013. Vol. 3, № 1. P. 23–29.
66. te Velthuis A.J.W., Fodor E. Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis // *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 14, № 8. P. 479.
67. Hay A.J., Skehel J.J., McCauley J. Characterization of influenza virus RNA complete transcripts // *Virology*. Elsevier, 1982. Vol. 116, № 2. P. 517–522.
68. Beaton A.R., Krug R.M. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1986. Vol. 83, № 17. P. 6282–6286.
69. Cros J.F., Palese P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses // *Virus Res.* Elsevier, 2003. Vol. 95, № 1–2. P. 3–12.

70. Neumann G., Hughes M.T., Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1 // *EMBO J.* EMBO Press, 2000. Vol. 19, № 24. P. 6751–6758.
71. Akarsu H. et al. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2) // *EMBO J.* EMBO Press, 2003. Vol. 22, № 18. P. 4646–4655.
72. Elton D. et al. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2001. Vol. 75, № 1. P. 408–419.
73. Amorim M.J. et al. A Rab11 and microtubule dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus vRNA // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2011.
74. Doms R.W. et al. Folding and assembly of viral membrane proteins. // *Virology*. 1993. Vol. 193, № 2. P. 545–562.
75. Barman S. et al. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses // *Virus Res. Elsevier*, 2001. Vol. 77, № 1. P. 61–69.
76. Rossman J.S. et al. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission // *Cell. Elsevier*, 2010. Vol. 142, № 6. P. 902–913.
77. Rossman J.S., Lamb R.A. Influenza virus assembly and budding // *Virology. Elsevier*, 2011. Vol. 411, № 2. P. 229–236.
78. Hutchinson E.C. et al. Genome packaging in influenza A virus // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 2010. Vol. 91, № 2. P. 313–328.
79. Le Goffic R. et al. Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, № 6. P. 3368 LP – 3372.
80. Ильичева Т.Н. et al. Репродукция вируса гриппа человека и иммунопатогенез вызываемого им заболевания // *Инфекционные болезни. Общество с ограниченной ответственностью Издательство Династия*, 2012. Vol. 10, № 4. P. 59–66.
81. Pichlmair A. et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates // *Science (80-.)*. American Association for the Advancement of Science, 2006. Vol. 314, № 5801. P. 997–1001.
82. Wisskirchen C. et al. The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of dsRNA formation during influenza A virus infection // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2011. P. JVI-02559.
83. Wong J.P. et al. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection // *Vaccine. Elsevier*, 2009. Vol. 27, № 25–26. P. 3481–3483.
84. Le Goffic R. et al. Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR) 3 to influenza A virus-induced acute pneumonia // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2006. Vol. 2, № 6. P. e53.

85. Kawasaki T., Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways // *Front. Immunol. Frontiers*, 2014. Vol. 5. P. 461.
86. Loo Y.-M., Gale Jr M. Immune signaling by RIG-I-like receptors // *Immunity. Elsevier*, 2011. Vol. 34, № 5. P. 680–692.
87. Kanneganti T.-D. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*, 2010. Vol. 10, № 10. P. 688.
88. Allen I.C. et al. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA // *Immunity. Elsevier*, 2009. Vol. 30, № 4. P. 556–565.
89. Thomas P.G. et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1 // *Immunity. Elsevier*, 2009. Vol. 30, № 4. P. 566–575.
90. Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2010. Vol. 11, № 5. P. 404.
91. Lietzén N. et al. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza A virus-infected human primary macrophages // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2011. Vol. 7, № 5. P. e1001340.
92. Bergsbaken T., Fink S.L., Cookson B.T. Pyroptosis: host cell death and inflammation // *Nat. Rev. Microbiol. Nature Publishing Group*, 2009. Vol. 7, № 2. P. 99.
93. Lupfer C., Thomas P.G., Kanneganti T.-D. NOD2 dependent DC activation is necessary for innate immunity and optimal CD8⁺ T cell responses to influenza A virus infection. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2014. P. JVI-01110.
94. Sabbah A. et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2 // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2009. Vol. 10, № 10. P. 1073.
95. Kang J.H., Hwang S.M., Chung I.Y. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC 5 AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B pathways // *Immunology. Wiley Online Library*, 2015. Vol. 144, № 1. P. 79–90.
96. Ellson C.D. et al. Danger-associated molecular patterns and danger signals in idiopathic pulmonary fibrosis // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2014. Vol. 51, № 2. P. 163–168.
97. Whitsett J.A., Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 16, № 1. P. 27–35.
98. Witte K. et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties // *Cytokine Growth Factor Rev. Elsevier*, 2010. Vol. 21, № 4. P. 237–251.
99. Ivashkiv L.B., Donlin L.T. Regulation of type I interferon responses // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*, 2014. Vol. 14, № 1. P. 36.

100. Yan N., Chen Z.J. Intrinsic antiviral immunity // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 13, № 3. P. 214.
101. Zimmermann P. et al. The viral nucleoprotein determines Mx sensitivity of influenza A viruses // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2011. P. JVI-00712.
102. Dauber B. et al. Influenza B virus ribonucleoprotein is a potent activator of the antiviral kinase PKR // *PLoS Pathog.* Public Library of Science, 2009. Vol. 5, № 6. P. e1000473.
103. Pindel A., Sadler A. The role of protein kinase R in the interferon response // *J. Interf. cytokine Res.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2011. Vol. 31, № 1. P. 59–70.
104. Chakrabarti A., Jha B.K., Silverman R.H. New insights into the role of RNase L in innate immunity // *J. Interf. Cytokine Res.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2011. Vol. 31, № 1. P. 49–57.
105. Wang J. et al. Innate immune response to influenza A virus in differentiated human alveolar type II cells // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* American Thoracic Society, 2011. Vol. 45, № 3. P. 582–591.
106. Garcia-Sastre A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses // *Virus Res.* Elsevier, 2011. Vol. 162, № 1–2. P. 12–18.
107. Everitt A.R. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza // *Nature.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 484, № 7395. P. 519.
108. Simmons D.P. et al. Type I IFN drives a distinctive dendritic cell maturation phenotype that allows continued class II MHC synthesis and antigen processing // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2012. P. 1101313.
109. Parlato S. et al. Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities // *Blood.* Am Soc Hematology, 2001. Vol. 98, № 10. P. 3022–3029.
110. Padovan E. et al. IFN- α 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells // *J. Leukoc. Biol.* Wiley Online Library, 2002. Vol. 71, № 4. P. 669–676.
111. Rouzaut A. et al. Dendritic cells adhere to and transmigrate across lymphatic endothelium in response to IFN- α // *Eur. J. Immunol.* Wiley Online Library, 2010. Vol. 40, № 11. P. 3054–3063.
112. Radvanyi L.G. et al. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7. 2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. // *Scand. J. Immunol.* 1999. Vol. 50, № 5. P. 499–509.
113. Luft T. et al. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1998. Vol. 161, № 4. P. 1947–1953.

114. Le Bon A. et al. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2003. Vol. 4, № 10. P. 1009.
115. Spadaro F. et al. IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing // *Blood.* Am Soc Hematology, 2012. Vol. 119, № 6. P. 1407–1417.
116. Nguyen K.B. et al. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon- γ response to viral infection // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 2002. Vol. 297, № 5589. P. 2063–2066.
117. Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells // *Immunity.* Elsevier, 2008. Vol. 29, № 6. P. 848–862.
118. Högner K. et al. Macrophage-expressed IFN- β contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia // *PLoS Pathog.* Public Library of Science, 2013. Vol. 9, № 2. P. e1003188.
119. Davidson S. et al. Pathogenic potential of interferon $\alpha\beta$ in acute influenza infection // *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 5. P. 3864.
120. Galani I.E. et al. Interferon- λ mediates non-redundant front-line antiviral protection against influenza virus infection without compromising host fitness // *Immunity.* Elsevier, 2017. Vol. 46, № 5. P. 875–890.
121. Wack A., Terczyńska-Dyla E., Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 16, № 8. P. 802.
122. Klinkhammer J. et al. IFN- λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission // *Elife.* eLife Sciences Publications Limited, 2018. Vol. 7. P. e33354.
123. Dinarello C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 2009. Vol. 27. P. 519–550.
124. Schmitz N. et al. Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection // *J. Virol.* Am Soc Microbiol, 2005. Vol. 79, № 10. P. 6441–6448.
125. Tate M.D. et al. Reassessing the role of the NLRP3 inflammasome during pathogenic influenza A virus infection via temporal inhibition // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6. P. 27912.
126. Yang Y. et al. Regulation of interleukin-1 β and interleukin-1 β inhibitor release by human airway epithelial cells // *Eur. Respir. J.* Eur Respiratory Soc, 2004. Vol. 24, № 3. P. 360–366.
127. Liu B. et al. Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity // *J. Gen. Virol.* Microbiology Society,

2004. Vol. 85, № 2. P. 423–428.
128. Sareneva T. et al. Influenza A virus-induced IFN- α/β and IL-18 synergistically enhance IFN- γ gene expression in human T cells // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1998. Vol. 160, № 12. P. 6032–6038.
129. Chao Y. et al. Human plasmacytoid dendritic cells regulate IFN- α production through activation-induced splicing of IL-18R α // *J. Leukoc. Biol. Wiley Online Library*, 2014. Vol. 96, № 6. P. 1037–1046.
130. Lupfer C. et al. Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 14, № 5. P. 480.
131. Peper R.L., Van Campen H. Tumor necrosis factor as a mediator of inflammation in influenza A viral pneumonia // *Microb. Pathog. Elsevier*, 1995. Vol. 19, № 3. P. 175–183.
132. Belisle S.E. et al. Genomic profiling of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) receptor and interleukin-1 receptor knockout mice reveals a link between TNF- α signaling and increased severity of 1918 pandemic influenza virus infection // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2010. Vol. 84, № 24. P. 12576–12588.
133. Tavares L.P., Teixeira M.M., Garcia C.C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two edged sword // *Inflamm. Res. Springer International Publishing*, 2017. Vol. 66, № 4. P. 283–302.
134. Szretter K.J. et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2007. Vol. 81, № 6. P. 2736–2744.
135. Hussell T., Pennycook A., Openshaw P.J.M. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology // *Eur. J. Immunol. Wiley Online Library*, 2001. Vol. 31, № 9. P. 2566–2573.
136. Kaiser L. et al. Symptom pathogenesis during acute influenza: interleukin-6 and other cytokine responses // *J. Med. Virol. Wiley Online Library*, 2001. Vol. 64, № 3. P. 262–268.
137. Salomon R., Hoffmann E., Webster R.G. Inhibition of the cytokine response does not protect against lethal H5N1 influenza infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2007. Vol. 104, № 30. P. 12479–12481.
138. Dienz O. et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung // *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*, 2012. P. 258.
139. Hunter C.A., Jones S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 16, № 5. P. 448–457.
140. Denney L. et al. Epithelial-derived TGF- β 1 acts as a pro-viral factor in the lung during influenza A infection // *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*, 2018. Vol. 11, № 2. P. 523.

141. Williams A.E. et al. TGF- β prevents eosinophilic lung disease but impairs pathogen clearance // *Microbes Infect.* Elsevier, 2005. Vol. 7, № 3. P. 365–374.
142. Schultz-Cherry S., Hinshaw V.S. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1996. Vol. 70, № 12. P. 8624–8629.
143. Benam K.H., Denney L., Ho L.-P. How the Respiratory Epithelium Senses and Reacts to Influenza Virus // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2018. P. rcmb.2018-0247TR.
144. Dawson T.C. et al. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2000. Vol. 156, № 6. P. 1951–1959.
145. Dessing M.C. et al. Monocyte chemoattractant protein 1 contributes to an adequate immune response in influenza pneumonia // *Clin. Immunol.* Elsevier, 2007. Vol. 125, № 3. P. 328–336.
146. Arpaia N. et al. A distinct function of regulatory T cells in tissue protection // *Cell.* Elsevier, 2015. Vol. 162, № 5. P. 1078–1089.
147. Hashimoto Y. et al. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2007. Vol. 178, № 4. P. 2448–2457.
148. Tate M.D. et al. The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice // *PLoS One. Public Library of Science*, 2011. Vol. 6, № 3. P. e17618.
149. McGill J., Legge K.L. Cutting edge: contribution of lung-resident T cell proliferation to the overall magnitude of the antigen-specific CD8 T cell response in the lungs following murine influenza virus infection // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2009. Vol. 183, № 7. P. 4177–4181.
150. Tough D.F., Borrow P., Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo // *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science, 1996. Vol. 272, № 5270. P. 1947–1950.
151. Lim K. et al. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8⁺ T cells in the airways // *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 349, № 6252. P. aaa4352.
152. Gorlino C. V et al. Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2014. P. 1301791.
153. Hampton H.R. et al. Microbe-dependent lymphatic migration of neutrophils modulates lymphocyte proliferation in lymph nodes // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 6. P. 7139.
154. Tate M.D. et al. Neutrophils sustain effective CD8⁺ T-cell responses in the respiratory tract following influenza infection // *Immunol. Cell Biol. Wiley Online Library*, 2012. Vol. 90, № 2.

- P. 197–205.
155. Hufford M.M. et al. Influenza-infected neutrophils within the infected lungs act as antigen presenting cells for anti-viral CD8⁺ T cells // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 10. P. e46581.
 156. Abi Abdallah D.S. et al. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation // *Int. Immunol. Oxford University Press*, 2011. Vol. 23, № 5. P. 317–326.
 157. Draghi M. et al. NKP46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2007. Vol. 178, № 5. P. 2688–2698.
 158. Denney L. et al. Reduction of natural killer but not effector CD8 T lymphocytes in three consecutive cases of severe/lethal H1N1/09 influenza a virus infection // *PLoS One. Public Library of Science*, 2010. Vol. 5, № 5. P. e10675.
 159. Fox A. et al. Severe pandemic H1N1 2009 infection is associated with transient NK and T deficiency and aberrant CD8 responses // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 2. P. e31535.
 160. Kumar P. et al. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection // *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 6, № 1. P. 69.
 161. Zhou G., Juang S.W.W., Kane K.P. NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice // *Eur. J. Immunol. Wiley Online Library*, 2013. Vol. 43, № 4. P. 929–938.
 162. Kok W.L. et al. Pivotal Advance: Invariant NKT cells reduce accumulation of inflammatory monocytes in the lungs and decrease immune-pathology during severe influenza A virus infection // *J. Leukoc. Biol. Wiley Online Library*, 2012. Vol. 91, № 3. P. 357–368.
 163. Strickland D.H. et al. Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. // *Immunology. Wiley-Blackwell*, 1993. Vol. 80, № 2. P. 266.
 164. Thepen T., Van Rooijen N., Kraal G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 1989. Vol. 170, № 2. P. 499–509.
 165. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment // *F1000Prime Rep. Faculty of 1000 Ltd*, 2014. Vol. 6.
 166. Spence S. et al. RETRACTED: Suppressors of Cytokine Signaling 2 and 3 Diametrically Control Macrophage Polarization. Elsevier, 2013.
 167. Jablonski K.A. et al. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages // *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 12. P. 5–11.

168. Gordon S. Alternative activation of macrophages // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2003. Vol. 3, № 1. P. 23.
169. Becker S., Quay J., Soukup J. Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1991. Vol. 147, № 12. P. 4307–4312.
170. Perrone L.A. et al. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice // *PLoS Pathog.* 2008.
171. Herold S. et al. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2006. Vol. 177, № 3. P. 1817–1824.
172. Tamoutounour S. et al. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin // *Immunity.* Elsevier, 2013. Vol. 39, № 5. P. 925–938.
173. Plantinga M. et al. Conventional and monocyte-derived CD11b⁺ dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen // *Immunity.* Elsevier, 2013. Vol. 38, № 2. P. 322–335.
174. Tumpey T.M. et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2005. Vol. 79, № 23. P. 14933–14944.
175. Kim H.M. et al. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2008. Vol. 82, № 9. P. 4265–4274.
176. Lin K.L. et al. CCR2⁺ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2008. Vol. 180, № 4. P. 2562–2572.
177. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity // *Nature.* Nature Publishing Group, 1998. Vol. 392, № 6673. P. 245.
178. Merad M. et al. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting.
179. Hemann E.A. et al. Plasmacytoid dendritic cells require direct infection to sustain the pulmonary influenza A virus-specific CD8 T cell response // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2015. P. JVI-02546.
180. Förster R., Braun A., Worbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics // *Trends Immunol.* Elsevier, 2012. Vol. 33, № 6. P. 271–280.
181. Desch A.N. et al. CD103⁺ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2011. Vol. 208, № 9. P. 1789–1797.

182. Helft J. et al. Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection // *J. Clin. Invest. Am Soc Clin Investig*, 2012. Vol. 122, № 11. P. 4037–4047.
183. Legge K.L., Braciale T.J. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection // *Immunity*. Elsevier, 2003. Vol. 18, № 2. P. 265–277.
184. Vermaelen K.Y. et al. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2001. Vol. 193, № 1. P. 51–60.
185. Jakubzick C. et al. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2006. Vol. 176, № 6. P. 3578–3584.
186. Belz G.T. et al. Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2004. Vol. 101, № 23. P. 8670–8675.
187. GeurtsvanKessel C.H. et al. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+ CD11b– but not plasmacytoid dendritic cells // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2008. Vol. 205, № 7. P. 1621–1634.
188. Albert M.L., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs // *Nature*. Nature Publishing Group, 1998. Vol. 392, № 6671. P. 86.
189. Kim T.S. et al. Distinct dendritic cell subsets dictate the fate decision between effector and memory CD8+ T cell differentiation by a CD24-dependent mechanism // *Immunity*. Elsevier, 2014. Vol. 40, № 3. P. 400–413.
190. McGill J., Van Rooijen N., Legge K.L. IL-15 trans-presentation by pulmonary dendritic cells promotes effector CD8 T cell survival during influenza virus infection // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2010. Vol. 207, № 3. P. 521–534.
191. McKenna H.J. et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells // *Blood. Am Soc Hematology*, 2000. Vol. 95, № 11. P. 3489–3497.
192. Lukens M. V et al. Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2009. Vol. 83, № 14. P. 7235–7243.
193. Belz G.T. et al. CD8 α + dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2005. Vol. 175, № 1. P. 196–200.
194. Nakano H. et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T

- helper type 1 immune responses // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 10, № 4. P. 394.
195. Ballesteros-Tato A. et al. Temporal changes in dendritic cell subsets, cross-priming and costimulation via CD70 control CD8⁺ T cell responses to influenza // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 11, № 3. P. 216.
196. Bhardwaj N. et al. Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8⁺ T cells. // *J. Clin. Invest. Am Soc Clin Investig*, 1994. Vol. 94, № 2. P. 797–807.
197. Macatonia S.E. et al. Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 1989. Vol. 169, № 4. P. 1255–1264.
198. Nonacs R. et al. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 1992. Vol. 176, № 2. P. 519–529.
199. Hao X., Kim T.S., Braciale T.J. Differential response of respiratory dendritic cell subsets to influenza virus infection. // *J. Virol.* 2008. Vol. 82, № 10. P. 4908–4919.
200. Oh S., McCaffery J.M., Eichelberger M.C. Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2000. Vol. 74, № 12. P. 5460–5469.
201. Oh S., Eichelberger M.C. Influenza virus neuraminidase alters allogeneic T cell proliferation // *Virology.* Elsevier, 1999. Vol. 264, № 2. P. 427–435.
202. Christiaansen A.F. et al. The CD8 T Cell Response to Respiratory Virus Infections Megan // *Immunol. Res.* 2014. Vol. 59, № 1–3. P. 109–117.
203. Thatte J. et al. LFA-1 is required for retention of effector CD8 T cells in mouse lungs // *Blood.* Am Soc Hematology, 2003. Vol. 101, № 12. P. 4916–4922.
204. Verbist K.C. et al. A role for IL-15 in the migration of effector CD8 T cells to the lung airways following influenza infection // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2011. Vol. 186, № 1. P. 174–182.
205. Mikhak Z., Strassner J.P., Luster A.D. Lung dendritic cells imprint T cell lung homing and promote lung immunity through the chemokine receptor CCR4 // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2013. Vol. 210, № 9. P. 1855–1869.
206. Brown D.M. et al. CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2006. Vol. 177, № 5. P. 2888–2898.
207. Hua L. et al. Cytokine-dependent induction of CD4⁺ T cells with cytotoxic potential during

- influenza virus infection // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2013. P. JVI-01461.
208. Dustin M.L., Long E.O. Cytotoxic immunological synapses. // *Immunol. Rev. England*, 2010. Vol. 235, № 1. P. 24–34.
209. Lukacher A.E., Braciale V.L., Braciale T.J. In vivo effector function of influenza virus-specific cytotoxic T lymphocyte clones is highly specific. // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 1984. Vol. 160, № 3. P. 814–826.
210. Russell J.H., Ley T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. // *Annu. Rev. Immunol. United States*, 2002. Vol. 20. P. 323–370.
211. Yap K.L., Ada G.L., McKenzie I.F.C. Transfer of specific cytotoxic T lymphocytes protects mice inoculated with influenza virus // *Nature. Nature Publishing Group*, 1978. Vol. 273, № 5659. P. 238.
212. Wells M.A., Ennis F.A., Albrecht P. Recovery from a viral respiratory infection. II. Passive transfer of immune spleen cells to mice with influenza pneumonia. // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1981. Vol. 126, № 3. P. 1042–1046.
213. Taylor P.M., Askonas B.A. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. // *Immunology. Wiley-Blackwell*, 1986. Vol. 58, № 3. P. 417.
214. Bender B.S. et al. Transgenic mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted T cells have delayed viral clearance and increased mortality after influenza virus challenge. // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 1992. Vol. 175, № 4. P. 1143–1145.
215. Brown D.M. et al. Multi-functional CD4 cells expressing IFN- γ and perforin mediate protection against lethal influenza infection // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2012. P. JVI-07172.
216. Workman A.M. et al. Inflammation enhances IL-2 driven differentiation of cytolytic CD4 T cells // *PLoS One. Public Library of Science*, 2014. Vol. 9, № 2. P. e89010.
217. Takeuchi A. et al. CRTAM determines the CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte lineage // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2016. Vol. 213, № 1. P. 123–138.
218. Brown D.M. et al. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin-and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4⁺ T cells // *Cell. Immunol. Elsevier*, 2009. Vol. 257, № 1. P. 69–79.
219. Brown D. et al. Inflammation regulates the differentiation of CD4 T cells with cytolytic potential (P6088). *Am Assoc Immunol*, 2013.
220. Cox M.A., Kahan S.M., Zajac A.J. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love // *Virology. Elsevier*, 2013. Vol. 435, № 1. P. 157–169.
221. Bachmann M.F., Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again // *EMBO Rep. EMBO Press*, 2007. Vol. 8, № 12. P. 1142–1148.
222. Liao W., Lin J.-X., Leonard W.J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of

- IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation // *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier, 2011. Vol. 23, № 5. P. 598–604.
223. Malek T.R. The biology of interleukin-2 // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 2008. Vol. 26. P. 453–479.
224. Kalia V. et al. Prolonged interleukin-2R α expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation in vivo // *Immunity.* Elsevier, 2010. Vol. 32, № 1. P. 91–103.
225. Pipkin M.E. et al. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells // *Immunity.* Elsevier, 2010. Vol. 32, № 1. P. 79–90.
226. Hufford M.M. et al. Antiviral CD8⁺ T cell effector activities in situ are regulated by target cell type // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2011. Vol. 208, № 1. P. 167–180.
227. Baumgarth N., Kelso A. In vivo blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue. // *J. Virol. Am Soc Microbiol.* 1996. Vol. 70, № 7. P. 4411–4418.
228. Turner S.J. et al. Disregulated influenza A virus-specific CD8⁺ T cell homeostasis in the absence of IFN- γ signaling // *J. Immunol. Am Assoc Immunol.* 2007. Vol. 178, № 12. P. 7616–7622.
229. Karupiah G. et al. Rapid interferon γ -dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 1998. Vol. 188, № 8. P. 1541–1546.
230. Yang Y.-L. et al. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. // *EMBO J. Wiley Online Library.* 1995. Vol. 14, № 24. P. 6095–6106.
231. Bauvois B. et al. Types I and II interferons upregulate the costimulatory CD80 molecule in monocytes via interferon regulatory factor-1 // *Biochem. Pharmacol.* Elsevier, 2009. Vol. 78, № 5. P. 514–522.
232. Kang K. et al. Interferon- γ represses M2 gene expression in human macrophages by disassembling enhancers bound by the transcription factor MAF // *Immunity.* Elsevier, 2017. Vol. 47, № 2. P. 235–250.
233. Wang F. et al. Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity // *EBioMedicine.* Elsevier, 2018. Vol. 30. P. 303–316.
234. Ribechini E. et al. Novel GM-CSF signals via IFN- γ R/IRF-1 and AKT/mTOR license monocytes for suppressor function // *Blood Adv. American Society of Hematology.* 2017. Vol. 1, № 14. P. 947–960.
235. Wiley J.A. et al. Production of interferon- γ by influenza hemagglutinin-specific CD8 effector T cells influences the development of pulmonary immunopathology // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2001.

- Vol. 158, № 1. P. 119–130.
236. Fulton R.B., Varga S.M. CD8 T cells cut back on calcium intake in the lungs // *J. Leukoc. Biol.* Wiley Online Library, 2010. Vol. 87, № 6. P. 961–964.
 237. Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2008. Vol. 180, № 9. P. 5771–5777.
 238. Sun J. et al. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10 // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 15, № 3. P. 277.
 239. McKinstry K.K. et al. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2009. Vol. 182, № 12. P. 7353–7363.
 240. Bachmann M.F. et al. Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor α and CD62L // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2005. Vol. 175, № 7. P. 4686–4696.
 241. Huster K.M. et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2004. Vol. 101, № 15. P. 5610–5615.
 242. Becker T.C. et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2002. Vol. 195, № 12. P. 1541–1548.
 243. Sallusto F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions // *Nature.* Nature Publishing Group, 1999. Vol. 401, № 6754. P. 708.
 244. Masopust D. et al. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue // *Science (80-.)*. American Association for the Advancement of Science, 2001. Vol. 291, № 5512. P. 2413–2417.
 245. Bingaman A.W. et al. Novel phenotypes and migratory properties distinguish memory CD4 T cell subsets in lymphoid and lung tissue // *Eur. J. Immunol.* Wiley Online Library, 2005. Vol. 35, № 11. P. 3173–3186.
 246. Wu T. et al. Lung-resident memory CD8 T cells (TRM) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection // *J. Leukoc. Biol.* 2014. Vol. 95, № 2. P. 215–224.
 247. Wakim L.M. et al. Enhanced survival of lung tissue-resident memory CD8⁺ T cells during infection with influenza virus due to selective expression of IFITM3 // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 14, № 3. P. 238.
 248. Braeckel-budimir N. Van et al. Dynamic equilibrium of lung Trm dictates waning immunity after Influenza A infection. 2018. Vol. 2, № 7.
 249. Takamura S. et al. Specific niches for lung-resident memory CD8⁺ T cells at the site of tissue regeneration enable CD69-independent maintenance // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press,

2016. P. jem-20160938.
250. Laidlaw B.J. et al. CD4⁺ T cell help guides formation of CD103⁺ lung-resident memory CD8⁺ T cells during influenza viral infection // *Immunity*. Elsevier, 2014. Vol. 41, № 4. P. 633–645.
 251. Xu L. et al. Cutting edge: pulmonary immunopathology mediated by antigen-specific expression of TNF- α by antiviral CD8⁺ T cells // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2004. Vol. 173, № 2. P. 721–725.
 252. Theron M. et al. A probable role for IFN- γ in the development of a lung immunopathology in SARS // *Cytokine*. Elsevier, 2005. Vol. 32, № 1. P. 30–38.
 253. Kannanganat S. et al. Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells // *J. Virol*. 2007. Vol. 81, № 16. P. 8468–8476.
 254. Kannanganat S. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Controllers but Not Noncontrollers Maintain CD4 T Cells Coexpressing Three Cytokines // *J. Virol*. 2007. Vol. 81, № 21. P. 12071–12076.
 255. Liew F.Y., Li Y., Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1990. Vol. 145, № 12. P. 4306–4310.
 256. Darrah P.A. et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major* // *Nat. Med*. 2007. Vol. 13, № 7. P. 843–850.
 257. Lindenstrom T. et al. Tuberculosis Subunit Vaccination Provides Long-Term Protective Immunity Characterized by Multifunctional CD4 Memory T Cells // *J. Immunol*. 2009. Vol. 182, № 12. P. 8047–8055.
 258. Williams M.A. et al. Developing and maintaining protective CD8⁺ memory T cells // *Immunol. Rev. Wiley Online Library*, 2006. Vol. 211, № 1. P. 146–153.
 259. Lelic A. et al. The Polyfunctionality of Human Memory CD8⁺ T Cells Elicited by Acute and Chronic Virus Infections Is Not Influenced by Age // *PLoS Pathog*. 2012. Vol. 8, № 12.
 260. Trieu M.C. et al. Erratum to: Augmented CD4⁺ T-cell and humoral responses after repeated annual influenza vaccination with the same vaccine component A/H1N1pdm09 over 5 years (npj Vaccines, (2018), 3, 1, (37), 10.1038/s41541-018-0069-1) // *npj Vaccines*. Springer US, 2018. Vol. 3, № 1.
 261. Zaph C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2004. Vol. 10, № 10. P. 1104.
 262. Wille-Reece U. et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2006. Vol. 203, № 5. P. 1249–1258.

263. Jarrossay D. et al. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* Wiley Online Library, 2001. Vol. 31, № 11. P. 3388–3393.
264. Kadowaki N. et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2001. Vol. 194, № 6. P. 863–870.
265. Kandasamy M. et al. RIG-I Signaling Is Critical for Efficient Polyfunctional T Cell Responses during Influenza Virus Infection. // *PLoS Pathog.* 2016. Vol. 12, № 7. P. e1005754.
266. Kurosaki T., Kometani K., Ise W. Memory B cells // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 15, № 3. P. 149.
267. Tarlinton D., Good-Jacobson K. Diversity among memory B cells: origin, consequences, and utility // *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science, 2013. Vol. 341, № 6151. P. 1205–1211.
268. Henle W., Stokes Jr J., Shaw D.R. Passive Immunization of Mice against Human Influenza Virus by the Intranasal Route. // *J. Immunol.* 1941. Vol. 40, № 2. P. 201–212.
269. Gerhard W. et al. Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection // *Immunol. Rev.* Wiley Online Library, 1997. Vol. 159, № 1. P. 95–103.
270. Choi Y.S., Baumgarth N. Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2008. Vol. 205, № 13. P. 3053–3064.
271. Pape K.A. et al. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles // *Immunity.* Elsevier, 2007. Vol. 26, № 4. P. 491–502.
272. Batista F.D., Harwood N.E. The who, how and where of antigen presentation to B cells // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 9, № 1. P. 15.
273. Lee F.E.-H. et al. Circulating human antibody-secreting cells during vaccinations and respiratory viral infections are characterized by high specificity and lack of bystander effect // *J. Immunol.* Am Assoc Immunol, 2011. P. 1002932.
274. Chu V.T., Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow // *Immunol. Rev.* Wiley Online Library, 2013. Vol. 251, № 1. P. 177–188.
275. McHeyzer-Williams M. et al. Molecular programming of B cell memory // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 12, № 1. P. 24.
276. King C., Tangye S.G., Mackay C.R. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 2008. Vol. 26. P. 741–766.
277. Chiu C., Openshaw P.J. Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs // *Nat Immunol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 16, № 1. P. 18–26.
278. Bergström J.J.E., Xu H., Heyman B. Epitope-specific suppression of IgG responses by passively

- administered specific IgG: evidence of epitope masking // *Front. Immunol. Frontiers*, 2017. Vol. 8. P. 238.
279. Li G.-M. et al. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2012. Vol. 109, № 23. P. 9047–9052.
280. Tharakaraman K. et al. Broadly neutralizing influenza hemagglutinin stem-specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure // *Cell Host Microbe. Elsevier*, 2014. Vol. 15, № 5. P. 644–651.
281. Hensley S.E. et al. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift // *Science (80-.)*. American Association for the Advancement of Science, 2009. Vol. 326, № 5953. P. 734–736.
282. Guthmiller J.J., Wilson P.C. Harnessing immune history to combat influenza viruses // *Curr. Opin. Immunol. Elsevier Ltd*, 2018. Vol. 53. P. 187–195.
283. Dunand C.J.H. et al. Preexisting human antibodies neutralize recently emerged H7N9 influenza strains // *J. Clin. Invest. Am Soc Clin Investig*, 2015. Vol. 125, № 3. P. 1255–1268.
284. Pabst R., Tschernig T. Lymphocytes in the lung: an often neglected cell // *Anat. Embryol. (Berl)*. Springer, 1995. Vol. 192, № 4. P. 293–299.
285. Kuroda E. et al. Inhaled fine particles induce alveolar macrophage death and interleukin-1 α release to promote inducible bronchus-associated lymphoid tissue formation // *Immunity. Elsevier*, 2016. Vol. 45, № 6. P. 1299–1310.
286. Halle S. et al. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2009. Vol. 206, № 12. P. 2593–2601.
287. Moyron-Quiroz J.E. et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2004. Vol. 10, № 9. P. 927.
288. Onodera T. et al. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2012. Vol. 109, № 7. P. 2485–2490.
289. Adachi Y. et al. Distinct germinal center selection at local sites shapes memory B cell response to viral escape // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2015. Vol. 212, № 10. P. 1709–1723.
290. Woof J.M., Russell M.W. Structure and function relationships in IgA // *Mucosal Immunol. Nature Publishing Group*, 2011. Vol. 4, № 6. P. 590.
291. Lambkin-Williams R. et al. An intranasal proteosome-adjuvanted trivalent influenza vaccine is safe, immunogenic & efficacious in the human viral influenza challenge model. Serum IgG & mucosal IgA are important correlates of protection against illness associated with infection //

- PLoS One. Public Library of Science, 2016. Vol. 11, № 12. P. e0163089.
292. Greenbaum E. et al. Mucosal (SIgA) and serum (IgG) immunologic responses in young adults following intranasal administration of one or two doses of inactivated, trivalent anti-influenza vaccine // *Vaccine*. Elsevier, 2004. Vol. 22, № 20. P. 2566–2577.
 293. Greenbaum E. et al. Mucosal [SIgA] and serum [IgG] immunologic responses in the community after a single intra-nasal immunization with a new inactivated trivalent influenza vaccine // *Vaccine*. Elsevier, 2002. Vol. 20, № 7–8. P. 1232–1239.
 294. Ainai A. et al. Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine // *J. Med. Virol.* Wiley Online Library, 2012. Vol. 84, № 2. P. 336–344.
 295. Asahi Y. et al. Protection against influenza virus infection in polymeric Ig receptor knockout mice immunized intranasally with adjuvant-combined vaccines // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2002. Vol. 168, № 6. P. 2930–2938.
 296. Asahi-Ozaki Y. et al. Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus // *J. Med. Virol.* Wiley Online Library, 2004. Vol. 74, № 2. P. 328–335.
 297. DiLillo D.J. et al. Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection // *J. Clin. Invest. Am Soc Clin Investig*, 2016. Vol. 126, № 2. P. 605–610.
 298. DiLillo D.J. et al. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 20, № 2. P. 143.
 299. Jegaskanda S. et al. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity in intravenous immunoglobulin as a potential therapeutic against emerging influenza viruses // *J. Infect. Dis.* Oxford University Press, 2014. Vol. 210, № 11. P. 1811–1822.
 300. Ritz J. et al. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells // *Adv Immunol.* 1988. Vol. 42, № 181. P. 32.
 301. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models // *Blood.* Am Soc Hematology, 2012. Vol. 119, № 24. P. 5640–5649.
 302. De Maria A. et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-γ on activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2011. Vol. 108, № 2. P. 728–732.
 303. Seidel U.J.E., Schlegel P., Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies // *Front. Immunol. Frontiers*, 2013. Vol. 4. P. 76.
 304. Lotzova E. *Nk Cell Mediated Cytotoxicity: Receptors, Signaling, and Mechanisms.* CRC Press,

- 1992.
305. Bodewes R. et al. In vitro assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza A virus nucleoprotein // *Clin. Vaccine Immunol. Am Soc Microbiol*, 2013. Vol. 20, № 8. P. 1333–1337.
 306. Carragher D.M. et al. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2008. Vol. 181, № 6. P. 4168–4176.
 307. LaMere M.W. et al. Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2011. P. 1003057.
 308. Qian X.Y., Alonso-Caplen F., Krug R.M. Two functional domains of the influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1994. Vol. 68, № 4. P. 2433–2441.
 309. Nemeroff M.E., Qian X.-Y., Krug R.M. The influenza virus NS1 protein forms multimers in vitro and in vivo // *Virology. Elsevier*, 1995. Vol. 212, № 2. P. 422–428.
 310. Qian X.Y. et al. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. // *Rna. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995. Vol. 1, № 9. P. 948.
 311. Santos A. et al. SUMOylation affects the interferon blocking activity of the influenza A non-structural protein NS1 without affecting its stability or cellular localization // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2013. P. JVI-02063.
 312. Xu K. et al. Modification of nonstructural protein 1 of influenza A virus by SUMO1 // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2011. Vol. 85, № 2. P. 1086–1098.
 313. Melén K. et al. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2007. Vol. 81, № 11. P. 5995–6006.
 314. Li Y., Yamakita Y., Krug R.M. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1998. Vol. 95, № 9. P. 4864–4869.
 315. Forbes N. et al. Identification of adaptive mutations in the influenza A virus non-structural 1 gene that increase cytoplasmic localization and differentially regulate host gene expression // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 12. P. e84673.
 316. Volmer R. et al. Nucleolar localization of influenza A NS1: striking differences between mammalian and avian cells // *Virol. J. BioMed Central*, 2010. Vol. 7, № 1. P. 63.
 317. Stasakova J. et al. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels

- of interleukins 1 β and 18 // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 2005. Vol. 86, № 1. P. 185–195.
318. Wahle E., Keller W. The biochemistry of polyadenylation // *Trends Biochem. Sci. Elsevier Current Trends*, 1996. Vol. 21, № 7. P. 247–250.
319. Colgan D.F., Manley J.L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation // *Genes Dev. Cold Spring Harbor Lab*, 1997. Vol. 11, № 21. P. 2755–2766.
320. Nemeroff M.E. et al. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs // *Mol. Cell. Elsevier*, 1998. Vol. 1, № 7. P. 991–1000.
321. Twu K.Y. et al. The CPSF30 binding site on the NS1A protein of influenza A virus is a potential antiviral target // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2006. Vol. 80, № 8. P. 3957–3965.
322. de Chassey B. et al. The interactomes of influenza virus NS1 and NS2 proteins identify new host factors and provide insights for ADAR1 playing a supportive role in virus replication // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2013. Vol. 9, № 7. P. e1003440.
323. Gack M.U. et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I // *Cell Host Microbe. Elsevier*, 2009. Vol. 5, № 5. P. 439–449.
324. Rajsbaum R. et al. Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2012. Vol. 8, № 11. P. e1003059.
325. Opitz B. et al. IFN β induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein // *Cell. Microbiol. Wiley Online Library*, 2007. Vol. 9, № 4. P. 930–938.
326. Mibayashi M. et al. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2007. Vol. 81, № 2. P. 514–524.
327. Lu Y., Qian X.-Y., Krug R.M. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. // *Genes Dev. Cold Spring Harbor Lab*, 1994. Vol. 8, № 15. P. 1817–1828.
328. Qiu Y., Krug R.M. The influenza virus NS1 protein is a poly (A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly (A). // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1994. Vol. 68, № 4. P. 2425–2432.
329. Hatada E. et al. Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs. // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 1997. Vol. 78, № 5. P. 1059–1063.
330. Marc D., Barbachou S., Soubieux D. The RNA-binding domain of influenzavirus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner // *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*, 2012. Vol. 41, № 1. P. 434–449.
331. Hovanessian A.G. The double stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon:

- dsRNA-PK // *J. Interferon Res.* 1989. Vol. 9, № 6. P. 641–647.
332. Silverman R.H. Viral encounters with 2', 5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2007. Vol. 81, № 23. P. 12720–12729.
333. Min J.-Y., Krug R.M. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2006. Vol. 103, № 18. P. 7100–7105.
334. Li S. et al. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA // *Virology. Elsevier*, 2006. Vol. 349, № 1. P. 13–21.
335. De La Luna S. et al. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1995. Vol. 69, № 4. P. 2427–2433.
336. Aragón T. et al. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus // *Mol. Cell. Biol. Am Soc Microbiol*, 2000. Vol. 20, № 17. P. 6259–6268.
337. Fernandez-Sesma A. et al. Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2006. Vol. 80, № 13. P. 6295–6304.
338. Houser K., Subbarao K. Influenza vaccines: Challenges and solutions // *Cell Host Microbe. Elsevier Inc.*, 2015. Vol. 17, № 3. P. 295–300.
339. Федорова Е.А. et al. Факторы, влияющие на иммуногенность вируса гриппа и гриппозных вакцин // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком»*, 2014. № 3 (76).
340. Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П. Безопасность, иммуногенность и эффективность живых гриппозных аттенуированных интраназальных вакцин-опыт многолетнего применения в различных возрастных группах // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком»*, 2013. № 4 (71).
341. Руденко Л.Г. et al. Разработка и клиническое изучение отечественной живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком»*, 2013. № 4 (71).
342. Сергеева М.В. et al. Иммунизация живым аттенуированным вирусом гриппа А/Н5N1 защищает морских свинок от реинфекции // *Вопросы вирусологии. ОАО «Издательство «Медицина»*, 2013. Vol. 58, № 6.
343. Дони́на С.А. et al. Системный гуморальный и клеточный иммунный ответ при экспериментальной гриппозной инфекции и вакцинации // *Медицинская иммунология. Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации ...*, 2006. Vol. 8, №

- 1.
344. Петухова Г.Д. et al. Локальный гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации // Медицинская иммунология. Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации ..., 2006. Vol. 8, № 4.
345. Сергеева М.В. Сравнительное исследование специфической активности живой и инактивированной вакцин против потенциально пандемического гриппа на морских свинках // МЕДИЦИНСКИЙ АКАДЕМИЧЕСКИЙ. 2012. Vol. 12, № 4. P. 52.
346. Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г. Современное состояние вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком», 2005. № 4.
347. Coelingh K.L. et al. Development of live attenuated influenza vaccines against pandemic influenza strains // Expert Rev Vaccines. 2014. Vol. 13, № 7. P. 855–871.
348. Кузнецов О.К., Степанова Л.А. Продолжительность защиты от гриппа после инфицирования и вакцинации // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком», 2009. № 4.
349. Bodewes R., Kreijtz J.H., Rimmelzwaan G.F. Yearly influenza vaccinations: a double-edged sword? // Lancet Infect. Dis. 2009. Vol. 9, № 12. P. 784–788.
350. Дриневский В.П. et al. Профилактика гриппа живой гриппозной вакциной у детей // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком», 2005. № 5.
351. Bodewes R. et al. Annual influenza vaccination affects the development of heterosubtypic immunity // Vaccine. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 30, № 51. P. 7407–7410.
352. Skowronski D.M. et al. Association between the 2008-09 seasonal influenza vaccine and pandemic H1N1 illness during spring-summer 2009: Four observational studies from Canada // PLoS Med. 2010. Vol. 7, № 4.
353. Gotoff R. et al. Primary influenza A virus infection induces cross-reactive antibodies that enhance uptake of virus into Fc receptor-bearing cells // J. Infect. Dis. The University of Chicago Press, 1994. Vol. 169, № 1. P. 200–203.
354. Ochiai H. et al. Infection enhancement of influenza A H1 subtype viruses in macrophage-like P388D1 cells by cross-reactive antibodies // J. Med. Virol. Wiley Online Library, 1990. Vol. 30, № 4. P. 258–265.
355. Ochiai H. et al. Antibody-mediated growth of influenza A NWS virus in macrophagelike cell line P388D1. // J. Virol. Am Soc Microbiol, 1988. Vol. 62, № 1. P. 20–26.
356. Ochiai H. et al. Infection enhancement of influenza A NWS virus in primary murine macrophages

- by anti-hemagglutinin monoclonal antibody // *J. Med. Virol.* Wiley Online Library, 1992. Vol. 36, № 3. P. 217–221.
357. Sui J. et al. Wide prevalence of heterosubtypic broadly neutralizing human anti-influenza A antibodies // *Clin. Infect. Dis.* Oxford University Press, 2011. Vol. 52, № 8. P. 1003–1009.
358. Каверин Н.В. et al. Антигенная структура гемагглютинина вируса гриппа А // *Вопросы вирусологии.* ОАО «Издательство «Медицина», 2012. № S1.
359. Wrammert J. et al. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection // *J. Exp. Med.* Rockefeller University Press, 2011. Vol. 208, № 1. P. 181–193.
360. Pica N. et al. Hemagglutinin stalk antibodies elicited by the 2009 pandemic influenza virus as a mechanism for the extinction of seasonal H1N1 viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2012. Vol. 109, № 7. P. 2573–2578.
361. Qiu C. et al. Boosting heterosubtypic neutralization antibodies in recipients of 2009 pandemic H1N1 influenza vaccine // *Clin. Infect. Dis.* Oxford University Press, 2011. Vol. 54, № 1. P. 17–24.
362. Zhao C., Xu J. Toward universal influenza virus vaccines: from natural infection to vaccination strategy // *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 53. P. 1–6.
363. Nachbagauer R., Palese P. Development of next generation hemagglutinin-based broadly protective influenza virus vaccines // *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 53. P. 51–57.
364. Krammer F. The quest for a universal flu vaccine: headless HA 2.0 // *Cell Host Microbe.* Elsevier, 2015. Vol. 18, № 4. P. 395–397.
365. Valkenburg S.A. et al. Stalking influenza by vaccination with pre-fusion headless HA mini-stem // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6. P. 22666.
366. Impagliazzo A. et al. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen // *Science (80-).* American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 349, № 6254. P. 1301–1306.
367. Yassine H.M. et al. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 21, № 9. P. 1065.
368. Gauger P.C. et al. Kinetics of lung lesion development and pro-inflammatory cytokine response in pigs with vaccine-associated enhanced respiratory disease induced by challenge with pandemic (2009) A/H1N1 influenza virus // *Vet. Pathol.* SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 2012. Vol. 49, № 6. P. 900–912.
369. Gauger P.C. et al. Enhanced pneumonia and disease in pigs vaccinated with an inactivated human-like (δ -cluster) H1N2 vaccine and challenged with pandemic 2009 H1N1 influenza virus //

- Vaccine. Elsevier, 2011. Vol. 29, № 15. P. 2712–2719.
370. Giles B.M., Ross T.M. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets // Vaccine. Elsevier, 2011. Vol. 29, № 16. P. 3043–3054.
371. Carter D.M. et al. Design and Characterization of a Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Vaccine for H1N1 Influenza Viruses // J. Virol. 2016. Vol. 90, № 9. P. 4720–4734.
372. Fox A., Quinn K.M., Subbarao K. Extending the Breadth of Influenza Vaccines: Status and Prospects for a Universal Vaccine // Drugs. Springer International Publishing, 2018. Vol. 78, № 13. P. 1297–1308.
373. Soema P.C. et al. Whole-inactivated influenza virus is a potent adjuvant for influenza peptides containing CD8+T cell epitopes // Front. Immunol. 2018. Vol. 9, № MAR.
374. Feng J. et al. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2 // Virol. J. BioMed Central, 2006. Vol. 3, № 1. P. 102.
375. Zhong W. et al. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in humans // J. Infect. Dis. Oxford University Press, 2013. Vol. 209, № 7. P. 986–994.
376. Deng L. et al. Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses // Nat. Commun. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 9, № 1. P. 359.
377. Memoli M.J. et al. Evaluation of antihemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model // MBio. Am Soc Microbiol, 2016. Vol. 7, № 2. P. e00417-16.
378. Monto A.S. et al. Antibody to influenza virus neuraminidase: an independent correlate of protection // J. Infect. Dis. Oxford University Press, 2015. Vol. 212, № 8. P. 1191–1199.
379. Wan H. et al. Molecular basis for broad neuraminidase immunity: conserved epitopes in seasonal and pandemic H1N1 as well as H5N1 influenza viruses // J. Virol. Am Soc Microbiol, 2013. P. JVI-01203.
380. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация // Вопросы вирусологии. ОАО «Издательство «Медицина», 2012. Vol. 57, № 3.
381. Kees U., Krammer P.H. Most influenza A virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes react with antigenic epitopes associated with internal virus determinants. // J. Exp. Med. Rockefeller University Press, 1984. Vol. 159, № 2. P. 365–377.
382. Zweerink H.J. et al. Cytotoxic T cells kill influenza virus infected cells but do not distinguish between serologically distinct type A viruses // Nature. Nature Publishing Group, 1977. Vol. 267,

- № 5609. P. 354.
383. Yewdell J.W. et al. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 1985. Vol. 82, № 6. P. 1785–1789.
384. Gras S. et al. Cross-reactive CD8⁺ T-cell immunity between the pandemic H1N1-2009 and H1N1-1918 influenza A viruses // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010. Vol. 107, № 28. P. 12599–12604.
385. Altmüller A., Fitch W.M., Scholtissek C. Biological and genetic evolution of the nucleoprotein gene of human influenza A viruses // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 1989. Vol. 70, № 8. P. 2111–2119.
386. Bui H.-H. et al. Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 1. P. 246–251.
387. Wilkinson T.M. a. et al. Preexisting influenza-specific CD4⁺ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans // *Nat. Med. Nature Publishing Group*, 2012. Vol. 18, № 2. P. 276–282.
388. Kreijtz J. et al. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice // *Vaccine. Elsevier*, 2007. Vol. 25, № 4. P. 612–620.
389. Liang S. et al. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1994. Vol. 152, № 4. P. 1653–1661.
390. Hoft D.F. et al. Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children // *J. Infect. Dis.* 2011. Vol. 204, № 6. P. 845–853.
391. Seo S.H., Peiris M., Webster R.G. Protective cross-reactive cellular immunity to lethal A/Goose/Guangdong/1/96-like H5N1 influenza virus is correlated with the proportion of pulmonary CD8⁺ T cells expressing gamma interferon // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2002. Vol. 76, № 10. P. 4886–4890.
392. Hillaire M.L.B. et al. Cross-protective immunity against influenza pH1N1 2009 viruses induced by seasonal influenza A (H3N2) virus is mediated by virus-specific T-cells // *J. Gen. Virol.* 2011. Vol. 92, № 10. P. 2339–2349.
393. Weinfurter J.T. et al. Cross-reactive T cells are involved in rapid clearance of 2009 pandemic H1N1 influenza virus in nonhuman primates // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2011. Vol. 7, № 11. P. e1002381.
394. Guo H. et al. T cell-mediated protection against lethal 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection in a mouse model // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2011. Vol. 85, № 1. P. 448–455.
395. Jameson J. et al. Human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine

- and avian species // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 1999. Vol. 162, № 12. P. 7578–7583.
396. Kreijtz J.H. et al. Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T-lymphocyte populations directed to human influenza A virus // *J Virol*. 2008. Vol. 82, № 11. P. 5161–5166.
 397. Carman W.F. et al. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. 2013. № SEPTEMBER.
 398. Lee L.Y. et al. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. 2008. Vol. 118, № 10.
 399. Hillaire M.L.B., Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines // *J. Biomed. Biotechnol*. 2011. Vol. 2011.
 400. Topham D.J., Doherty P.C. Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 1998. Vol. 72, № 1. P. 882–885.
 401. Alam S., Sant A.J. Infection with Seasonal Influenza Virus Elicits CD4 T Cells Specific for Genetically Conserved Epitopes That Can Be Rapidly Mobilized for Protective Immunity to Pandemic H1N1 Influenza Virus †. 2011. Vol. 85, № 24. P. 13310–13321.
 402. McKinstry K.K. et al. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms // *J. Clin. Invest. Am Soc Clin Investig*, 2012. Vol. 122, № 8. P. 2847–2856.
 403. Sridhar S. et al. Predominance of heterosubtypic IFN- γ -only-secreting effector memory T cells in pandemic H 1 N 1 naive adults // *Eur. J. Immunol. Wiley Online Library*, 2012. Vol. 42, № 11. P. 2913–2924.
 404. Hayward A.C. et al. Natural T cell-mediated protection against seasonal and pandemic influenza. Results of the flu watch cohort study // *Am. J. Respir. Crit. Care Med. American Thoracic Society*, 2015. Vol. 191, № 12. P. 1422–1431.
 405. He X.-S. et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. // *J. Virol*. 2006. Vol. 80, № 23. P. 11756–11766.
 406. Lambe T. et al. T-Cell Responses in Children to Internal Influenza Antigens, 1 Year After Immunization with Pandemic H1N1 Influenza Vaccine, and Response to Revaccination with Seasonal Trivalent-inactivated Influenza Vaccine // *Pediatr. Infect. Dis. J*. 2012. Vol. 31, № 6. P. e86–e91.
 407. Mohn K.G.I. et al. Boosting of Cross-Reactive and Protection-Associated T Cells in Children After Live Attenuated Influenza Vaccination // *J. Infect. Dis*. 2017. Vol. 215, № 10. P. 1527–1535.

408. Steinhoff M.C. et al. Effect of heterosubtypic immunity on infection with attenuated influenza A virus vaccines in young children. // *J. Clin. Microbiol. Am Soc Microbiol*, 1993. Vol. 31, № 4. P. 836–838.
409. Jeon S.H., Ben-Yedidia T., Arnon R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus // *Vaccine. Elsevier*, 2002. Vol. 20, № 21–22. P. 2772–2780.
410. Lambe T. et al. Immunity against heterosubtypic influenza virus induced by adenovirus and MVA expressing nucleoprotein and matrix protein-1 // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 3. P. 1443.
411. Vitelli A. et al. Vaccination to conserved influenza antigens in mice using a novel Simian adenovirus vector, PanAd3, derived from the bonobo *Pan paniscus* // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 3. P. e55435.
412. Koday M.T. et al. Multigenic DNA vaccine induces protective cross-reactive T cell responses against heterologous influenza virus in nonhuman primates // *PLoS One*. 2017. Vol. 12, № 12. P. 1–26.
413. Poon L.L.M. et al. Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2009. Vol. 182, № 5. P. 3063–3071.
414. Karlsson I. et al. Protective effect of a polyvalent influenza DNA vaccine in pigs // *Vet. Immunol. Immunopathol. Elsevier*, 2018. Vol. 195. P. 25–32.
415. Coughlan L., Mullarkey C., Gilbert S. Adenoviral vectors as novel vaccines for influenza // *J. Pharm. Pharmacol. Wiley Online Library*, 2015. Vol. 67, № 3. P. 382–399.
416. Dudek T., Knipe D.M. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors // *Virology. Elsevier*, 2006. Vol. 344, № 1. P. 230–239.
417. He F., Madhan S., Kwang J. Baculovirus vector as a delivery vehicle for influenza vaccines // *Expert Rev. Vaccines. Taylor & Francis*, 2009. Vol. 8, № 4. P. 455–467.
418. Draper S.J., Cottingham M.G., Gilbert S.C. Utilizing poxviral vectored vaccines for antibody induction—progress and prospects // *Vaccine. Elsevier*, 2013. Vol. 31, № 39. P. 4223–4230.
419. Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development // *Curr. Opin. Biotechnol. Elsevier*, 2007. Vol. 18, № 6. P. 546–556.
420. Lambe T. Novel viral vectored vaccines for the prevention of influenza // *Mol. Med. Springer*, 2012. Vol. 18, № 8. P. 1153–1160.
421. Mogler M.A., Kamrud K.I. RNA-based viral vectors // *Expert Rev. Vaccines. Taylor & Francis*, 2015. Vol. 14, № 2. P. 283–312.
422. Price G.E. et al. Single-dose mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine

- provides rapid protection from virulent H5N1, H3N2 and H1N1 viruses // *PLoS One. Public Library of Science*, 2010. Vol. 5, № 10. P. e13162.
423. Kim S.-H. et al. Mucosal vaccination with recombinant adenovirus encoding nucleoprotein provides potent protection against influenza virus infection // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 9. P. e75460.
424. Florek N.W. et al. Modified vaccinia Ankara encoding influenza virus hemagglutinin induces heterosubtypic immunity in macaques // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2014. P. JVI-01219.
425. Brewoo J.N. et al. Cross-protective immunity against multiple influenza virus subtypes by a novel modified vaccinia Ankara (MVA) vectored vaccine in mice // *Vaccine. Elsevier*, 2013. Vol. 31, № 14. P. 1848–1855.
426. Antrobus R.D. et al. AT cell-inducing influenza vaccine for the elderly: safety and immunogenicity of MVA-NP+ M1 in adults aged over 50 years // *PLoS One. Public Library of Science*, 2012. Vol. 7, № 10. P. e48322.
427. Berthoud T.K. et al. Potent CD8+T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza a vaccine, MVA-NP+M1 // *Clin. Infect. Dis.* 2011. Vol. 52, № 1. P. 1–7.
428. Powell T.J. et al. Examination of influenza specific T cell responses after influenza virus challenge in individuals vaccinated with MVA-NP+ M1 vaccine // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 5. P. e62778.
429. Ryder A.B. et al. Vaccination with vesicular stomatitis virus-vectored chimeric hemagglutinins protects mice against divergent influenza virus challenge strains // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2016. Vol. 90, № 5. P. 2544–2550.
430. García M. et al. Age dependence of immunity induced by a candidate universal influenza vaccine in mice // *PLoS One. Public Library of Science*, 2016. Vol. 11, № 4. P. e0153195.
431. Pleguezuelos O. et al. Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial // *Vaccine. Elsevier*, 2012. Vol. 30, № 31. P. 4655–4660.
432. Pleguezuelos O. et al. A synthetic influenza vaccine induces a cellular immune response which correlates with reduction in symptomatology and virus shedding in a randomised phase Ib live viral challenge in man // *Clin. Vaccine Immunol. Am Soc Microbiol*, 2015. P. CVI-00098.
433. Atsmon J. et al. Safety and immunogenicity of multimeric-001—a novel universal influenza vaccine // *J. Clin. Immunol. Springer*, 2012. Vol. 32, № 3. P. 595–603.
434. Francis J.N. et al. A novel peptide-based pan-influenza A vaccine: a double blind, randomised clinical trial of immunogenicity and safety // *Vaccine. Elsevier*, 2015. Vol. 33, № 2. P. 396–402.
435. Khan K.H. DNA vaccines: roles against diseases // *Germes. European Academy of HIV/AIDS and Infectious Diseases*, 2013. Vol. 3, № 1. P. 26.

436. Ulmer J.B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 1993. Vol. 259, № 5102. P. 1745–1749.
437. Donnelly J.J. et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 1995. Vol. 1, № 6. P. 583.
438. Laddy D.J. et al. Heterosubtypic protection against pathogenic human and avian influenza viruses via in vivo electroporation of synthetic consensus DNA antigens // *PLoS One*. Public Library of Science, 2008. Vol. 3, № 6. P. e2517.
439. Smith L.R. et al. Phase 1 clinical trials of the safety and immunogenicity of adjuvanted plasmid DNA vaccines encoding influenza A virus H5 hemagglutinin // *Vaccine*. Elsevier, 2010. Vol. 28, № 13. P. 2565–2572.
440. Kallen K.-J. et al. A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive® vaccines // *Hum. Vaccin. Immunother.* Taylor & Francis, 2013. Vol. 9, № 10. P. 2263–2276.
441. Kranz L.M. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy // *Nature*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 534, № 7607. P. 396.
442. Wakim L.M. et al. Antibody-targeted vaccination to lung dendritic cells generates tissue-resident memory CD8 T cells that are highly protective against influenza virus infection // *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 8, № 5. P. 1060.
443. Zens K.D., Chen J.K., Farber D.L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection // *JCI Insight*. 2016. Vol. 1, № 10. P. 1–12.
444. Teijaro J.R. et al. Cutting edge: Tissue-retentive lung memory CD4 T cells mediate optimal protection to respiratory virus infection // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2011. P. 1102243.
445. Slütter B. et al. Dynamics of influenza-induced lung-resident memory T cells underlie waning heterosubtypic immunity. // *Sci. Immunol.* NIH Public Access, 2017. Vol. 2, № 7.
446. Pizzolla A. et al. Resident memory CD8+ T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection // *Sci. Immunol. Science Immunology*, 2017. Vol. 2, № 12. P. eaam6970.
447. Gilchuk P. et al. A distinct lung-interstitium-resident memory CD8+ T cell subset confers enhanced protection to lower respiratory tract infection // *Cell Rep.* Elsevier, 2016. Vol. 16, № 7. P. 1800–1809.
448. Deliyannis G. et al. Intranasal lipopeptide primes lung-resident memory CD8+ T cells for long-term pulmonary protection against influenza // *Eur. J. Immunol.* Wiley Online Library, 2006. Vol. 36, № 3. P. 770–778.
449. Gasper D.J. et al. Effective Respiratory CD8 T-Cell Immunity to Influenza Virus Induced by Intranasal Carbomer-Lecithin-Adjuvanted Non-replicating Vaccines // *PLoS Pathog.* Public

- Library of Science, 2016. Vol. 12, № 12. P. e1006064.
450. Jung Y.J. et al. Heat-killed *Lactobacillus casei* confers broad protection against influenza A virus primary infection and develops heterosubtypic immunity against future secondary infection // *Sci. Rep.* Springer US, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–12.
 451. Chen F. et al. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 10. P. 938.
 452. Di Luzio N.R., Williams D.L. Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal and leukemic mice. // *Infect. Immun. Am Soc Microbiol*, 1978. Vol. 20, № 3. P. 804–810.
 453. Marakalala M.J. et al. Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of β -glucan-rich ligands in vivo // *Microbes Infect.* Elsevier, 2013. Vol. 15, № 6–7. P. 511–515.
 454. Krahenbuhl J.L. et al. Effects of muramyl dipeptide treatment on resistance to infection with *Toxoplasma gondii* in mice. // *Infect. Immun. Am Soc Microbiol*, 1981. Vol. 31, № 2. P. 716–722.
 455. Ribes S. et al. Intraperitoneal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotides protects neutropenic mice against intracerebral *Escherichia coli* K1 infection // *J. Neuroinflammation.* BioMed Central, 2014. Vol. 11, № 1. P. 14.
 456. Munoz N. et al. Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection // *Infect. Immun. Am Soc Microbiol*, 2010. Vol. 78, № 10. P. 4226–4233.
 457. Zhang B. et al. Prevention and cure of rotavirus infection via TLR5/NLRC4–mediated production of IL-22 and IL-18 // *Science (80-)*. American Association for the Advancement of Science, 2014. Vol. 346, № 6211. P. 861–865.
 458. Kleinnijenhuis J. et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2012. Vol. 109, № 43. P. 17537–17542.
 459. Tribouley J., Tribouley-Duret J., Appriou M. Effect of *Bacillus Callmette Guerin* (BCG) on the receptivity of nude mice to *Schistosoma mansoni* // *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1978. Vol. 172, № 5. P. 902–904.
 460. Barton E.S. et al. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection // *Nature.* Nature Publishing Group, 2007. Vol. 447, № 7142. P. 326.
 461. Leentjens J. et al. BCG vaccination enhances the immunogenicity of subsequent influenza vaccination in healthy volunteers: A randomized, placebo-controlled pilot study // *J. Infect. Dis.* 2015. Vol. 212, № 12. P. 1930–1938.

462. Mohanty S. et al. Prolonged proinflammatory cytokine production in monocytes modulated by interleukin 10 after influenza vaccination in older adults // *J. Infect. Dis.* 2015. Vol. 211, № 7. P. 1174–1184.
463. Tai L.-H. et al. Perioperative influenza vaccination reduces postoperative metastatic disease by reversing surgery-induced dysfunction in natural killer cells // *Clin. Cancer Res. AACR*, 2013.
464. Goodier M.R. et al. Influenza Vaccination Generates Cytokine-Induced Memory-like NK Cells: Impact of Human Cytomegalovirus Infection // *J. Immunol.* 2016. Vol. 197, № 1. P. 313–325.
465. Jost S. et al. Expansion of 2B4+ natural killer (NK) cells and decrease in NKp46+ NK cells in response to influenza // *Immunology. Wiley Online Library*, 2011. Vol. 132, № 4. P. 516–526.
466. Soudja S.M. et al. Inflammatory monocytes activate memory CD8+ T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion // *Immunity. Elsevier*, 2012. Vol. 37, № 3. P. 549–562.
467. Ahmed S.S. et al. Narcolepsy, 2009 A (H1N1) pandemic influenza, and pandemic influenza vaccinations: what is known and unknown about the neurological disorder, the role for autoimmunity, and vaccine adjuvants // *J. Autoimmun. Elsevier*, 2014. Vol. 50. P. 1–11.
468. Tesoriero C. et al. H1N1 influenza virus induces narcolepsy-like sleep disruption and targets sleep–wake regulatory neurons in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2016. Vol. 113, № 3. P. E368–E377.
469. Su L.F. et al. Virus-specific CD4+ memory-phenotype T cells are abundant in unexposed adults // *Immunity. Elsevier*, 2013. Vol. 38, № 2. P. 373–383.
470. Krammer F. Emerging influenza viruses and the prospect of a universal influenza virus vaccine // *Biotechnol. J. Wiley Online Library*, 2015. Vol. 10, № 5. P. 690–701.
471. Quiñones-Parra S. et al. Universal immunity to influenza must outwit immune evasion // *Front. Microbiol.* 2014. Vol. 5, № JUN. P. 1–11.
472. Voeten J.T.M. et al. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2000. Vol. 74, № 15. P. 6800–6807.
473. Boon A.C.M. et al. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2002. Vol. 76, № 5. P. 2567–2572.
474. Valkenburg S.A. et al. Acute emergence and reversion of influenza A virus quasispecies within CD8+ T cell antigenic peptides // *Nat. Commun. Nature Publishing Group*, 2013. Vol. 4. P. 2663.
475. Berkhoff E.G.M. et al. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8+ T-cell clones // *J. Gen. Virol. Microbiology Society*, 2007. Vol. 88, № 2. P. 530–535.

476. Price G.E. et al. Viral escape by selection of cytotoxic t cell-resistant variants in influenza a virus pneumonia // *J. Exp. Med. Rockefeller University Press*, 2000. Vol. 191, № 11. P. 1853–1868.
477. Valkenburg S.A. et al. Preemptive priming readily overcomes structure-based mechanisms of virus escape // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2013. Vol. 110, № 14. P. 5570–5575.
478. Valkenburg S.A. et al. Protective efficacy of cross-reactive CD8+ T cells recognising mutant viral epitopes depends on peptide-MHC-I structural interactions and T cell activation threshold // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2010. Vol. 6, № 8. P. e1001039.
479. Throsby M. et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells // *PLoS One. Public Library of Science*, 2008. Vol. 3, № 12. P. e3942.
480. Wang T.T. et al. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2010. Vol. 6, № 2. P. e1000796.
481. Chai N. et al. Two escape mechanisms of influenza A virus to a broadly neutralizing stalk-binding antibody // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2016. Vol. 12, № 6. P. e1005702.
482. Lo C.-Y. et al. Surveillance study of influenza occurrence and immunity in a Wisconsin cohort during the 2009 pandemic // *Open forum infectious diseases. Oxford University Press*, 2017. Vol. 4, № 2.
483. Day E.B. et al. Effect of MHC class I diversification on influenza epitope-specific CD8+ T cell precursor frequency and subsequent effector function // *J. Immunol. Am Assoc Immnol*, 2011. P. 1000883.
484. Quiñones-Parra S. et al. Preexisting CD8+ T-cell immunity to the H7N9 influenza A virus varies across ethnicities // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2014. Vol. 111, № 3. P. 1049–1054.
485. Hertz T. et al. HLA targeting efficiency correlates with human T-cell response magnitude and with mortality from influenza A infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. National Acad Sciences*, 2013. Vol. 110, № 33. P. 13492–13497.
486. Scott N. Mueller, William A. Langley, Elena Carnero, Adolfo Garcí'a-Sastre and R.A. Immunization with Live Attenuated Influenza Viruses That Express Altered NS1 Proteins Results in Potent and Protective. 2010. Vol. 84, № 4. P. 1847–1855.
487. Baskin C.R. et al. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. Vol. 106, № 9. P. 3455–3460.
488. Quinlivan M. et al. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein

- // J. Virol. Am Soc Microbiol, 2005. Vol. 79, № 13. P. 8431–8439.
489. Richt J.A. et al. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine // J. Virol. Am Soc Microbiol, 2006. Vol. 80, № 22. P. 11009–11018.
490. Steel J. et al. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza // J. Virol. Am Soc Microbiol, 2009. Vol. 83, № 4. P. 1742–1753.
491. Chen L. et al. Immunodominant CD4⁺ T-cell responses to influenza A virus in healthy individuals focus on matrix 1 and nucleoprotein // J. Virol. Am Soc Microbiol, 2014. P. JVI-01631.
492. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // Am. J. Epidemiol. Oxford University Press, 1938. Vol. 27, № 3. P. 493–497.
493. Reading P.C. et al. Influenza viruses differ in ability to infect macrophages and to induce a local inflammatory response following intraperitoneal injection of mice // Immunol. Cell Biol. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 88, № 6. P. 641–650.
494. Misharin A. V et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society, 2013. Vol. 49, № 4. P. 503–510.
495. Yu Y.R.A. et al. A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 3. P. 1–23.
496. Schweitzer A.N. et al. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. // J. Immunol. Am Assoc Immunol, 1997. Vol. 158, № 6. P. 2713–2722.
497. Lechmann M. et al. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation // Trends Immunol. Elsevier, 2002. Vol. 23, № 6. P. 273–275.
498. Crowe S.R. et al. Uneven distribution of MHC class II epitopes within the influenza virus. 2006. Vol. 24. P. 457–467.
499. Nayak J.L. et al. Analyses of the Specificity of CD4 T Cells During the Primary Immune Response to Influenza Virus Reveals Dramatic MHC-Linked Asymmetries in Reactivity to Individual Viral Proteins. 2010. Vol. 23, № 2. P. 169–180.
500. Darrah P.A. et al. Tuberculosis Subunit Vaccination Provides Long-Term Protective Immunity Characterized by Multifunctional CD4 Memory T Cells // J. Immunol. 2009. Vol. 182, № 12. P. 8047–8055.
501. Larsen M. et al. Evaluating cellular polyfunctionality with a novel polyfunctionality index // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 7. P. 1–10.
502. Kannanganat S. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Controllers but Not Noncontrollers Maintain CD4 T Cells Coexpressing Three Cytokines // J. Virol. 2007. Vol. 81, № 21. P. 12071–

- 12076.
503. Amara R.R. et al. Multiple-Cytokine-Producing Antiviral CD4 T Cells Are Functionally Superior to Single-Cytokine-Producing Cells // *J. Virol.* 2007. Vol. 81, № 16. P. 8468–8476.
 504. Yager E.J. et al. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus // *J. Exp. Med.* 2008. Vol. 205, № 3. P. 711–723.
 505. Narasaraju T. et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis // *Am. J. Pathol.* Elsevier, 2011. Vol. 179, № 1. P. 199–210.
 506. Elkord E., Abd Al Samid M., Chaudhary B. Helios, and not FoxP3, is the marker of activated Tregs expressing GARP/LAP. // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, № 24. P. 20026–20036.
 507. Talon J. et al. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2000. Vol. 74, № 17. P. 7989–7996.
 508. Guo Z. et al. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. American Thoracic Society*, 2007. Vol. 36, № 3. P. 263–269.
 509. Rynda-Apple A., Robinson K.M., Alcorn J.F. Influenza and bacterial superinfection: illuminating the immunologic mechanisms of disease // *Infect. Immun. Am Soc Microbiol*, 2015. Vol. 83, № 10. P. 3764–3770.
 510. Lee B. et al. Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to gram-negative and gram-positive bacterial pneumonia in mice // *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol. American Physiological Society Bethesda, MD*, 2015. Vol. 309, № 2. P. L158–L167.
 511. Kudva A. et al. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2011. Vol. 186, № 3. P. 1666–1674.
 512. Cao J. et al. Activation of IL-27 signalling promotes development of postinfluenza pneumococcal pneumonia // *EMBO Mol. Med. EMBO Press*, 2014. Vol. 6, № 1. P. 120–140.
 513. Liu F.D.M. et al. Timed action of IL-27 protects from immunopathology while preserving defense in influenza // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2014. Vol. 10, № 5. P. e1004110.
 514. Tarabichi Y. et al. The administration of intranasal live attenuated influenza vaccine induces changes in the nasal microbiota and nasal epithelium gene expression profiles // *Microbiome. BioMed Central*, 2015. Vol. 3. P. 74.
 515. Sun J. et al. CD4+ T cell help and innate-derived IL-27 induce Blimp-1-dependent IL-10 production by antiviral CTLs // *Nat. Immunol. Nature Publishing Group*, 2011. Vol. 12, № 4. P. 327.
 516. Kohlmeier J.E., Woodland D.L. Immunity to respiratory viruses // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*, 2009. Vol. 27. P. 61–82.

517. McGill J., Heusel J.W., Legge K.L. Innate immune control and regulation of influenza virus infections // *J Leukoc Biol.* 2009. Vol. 86, № 4. P. 803–812.
518. Cruz J.L.G. et al. Monocyte-derived dendritic cells enhance protection against secondary influenza challenge by controlling the switch in CD8+ T-cell immunodominance // *Eur. J. Immunol. Wiley Online Library*, 2017. Vol. 47, № 2. P. 345–352.
519. Pulendran B., Maddur M.S. Innate immune sensing and response to influenza // *Influenza Pathogenesis and Control-Volume II. Springer*, 2014. P. 23–71.
520. Leliefeld P.H.C., Koenderman L., Pillay J. How neutrophils shape adaptive immune responses // *Front. Immunol. Frontiers*, 2015. Vol. 6. P. 471.
521. McNab F. et al. Type I interferons in infectious disease // *Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 15, № 2. P. 87.
522. Rauch I., Müller M., Decker T. The regulation of inflammation by interferons and their STATs // *JAK-STAT*. 2013/01/01. Landes Bioscience, 2013. Vol. 2, № 1. P. e23820–e23820.
523. Yewdell J.W., Haeryfar S.M.M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design // *Annu. Rev. Immunol. Annual Reviews*, 2005. Vol. 23. P. 651–682.
524. Brombacher F., Kastelein R.A., Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses // *Trends Immunol. Elsevier*, 2003. Vol. 24, № 4. P. 207–212.
525. Kleinnijenhuis J., Van Crevel R., Netea M.G. Trained immunity: Consequences for the heterologous effects of BCG vaccination // *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2014. Vol. 109, № 1. P. 29–35.
526. Kaufmann E. et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis // *Cell*. 2018. Vol. 172, № 1–2. P. 176–182.e19.
527. Blok B.A. et al. Trained innate immunity as underlying mechanism for the long-term, nonspecific effects of vaccines // *J. Leukoc. Biol.* 2015. Vol. 98, № 3. P. 347–356.
528. Braun D., Caramalho I., Demengeot J. IFN- α/β enhances BCR-dependent B cell responses // *Int. Immunol. Oxford University Press*, 2002. Vol. 14, № 4. P. 411–419.
529. Le Bon A. et al. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2006. Vol. 176, № 4. P. 2074–2078.
530. Le Bon A. et al. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo // *Immunity. Elsevier*, 2001. Vol. 14, № 4. P. 461–470.
531. Bekeredjian-Ding I.B. et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN // *J. Immunol. Am Assoc Immunol*, 2005. Vol. 174, № 7. P. 4043–4050.

532. Fink K. et al. Early type I interferon-mediated signals on B cells specifically enhance antiviral humoral responses // *Eur. J. Immunol.* Wiley Online Library, 2006. Vol. 36, № 8. P. 2094–2105.
533. Ruuth K. et al. Interferon- α promotes survival of human primary B-lymphocytes via phosphatidylinositol 3-kinase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Elsevier, 2001. Vol. 284, № 3. P. 583–586.
534. Sarmiceli S. et al. Inflammatory monocytes hinder antiviral B cell responses // *Sci. Immunol.* Europe PMC Funders, 2016. Vol. 1, № 4.
535. Moseman E.A. et al. Type I interferon suppresses virus-specific B cell responses by modulating CD8+ T cell differentiation // *Sci. Immunol.* NIH Public Access, 2016. Vol. 1, № 4.
536. Peiris J.S.M., Hui K.P.Y., Yen H.-L. Host response to influenza virus: protection versus immunopathology // *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier, 2010. Vol. 22, № 4. P. 475–481.
537. Li R. et al. Attenuated *Bordetella pertussis* protects against highly pathogenic influenza A viruses by dampening the cytokine storm // *J. Virol. Am Soc Microbiol*, 2010. Vol. 84, № 14. P. 7105–7113.

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 Anne-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.