

ИССЛЕДОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ЗВЕНЬЕВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИМИ МУТАНТАМИ ВИРУСА ГРИППА

С.Г. Маркушин, Н.К. Ахматова, В.Н. Столпникова, И.И. Аكوпова, А.А. Ртищев,
Е.О. Калининченко

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Резюме. Путем прямого введения ts-мутаций из генов, кодирующих белки полимеразного комплекса ряда холодоадаптированных штаммов — доноров аттенуации вируса гриппа в геном вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1), были получены сайт-специфические мутанты — кандидаты в живые гриппозные вакцины. В данном сообщении представлены результаты сравнительного исследования отдельных звеньев иммунной системы мышей, иммунизированных интраназально мутантами и классическим холодоадаптированным реассортантом, полученным путем скрещивания холодоадаптированного штамма — донора А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) со штаммом А/WSN/33 (H1N1), имеющим сходные поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидаза) с мутантами. Изучение иммунофенотипа мононуклеарных лейкоцитов иммунизированных мышей свидетельствовало об умеренном супрессирующем влиянии сайт-специфических мутантов и ХА реассортанта на отдельные субпопуляции иммунотропных клеток. Все исследуемые вирусы индуцировали у иммунизированных мышей активацию ряда субпопуляций лимфоцитов, включая МНС II-позитивные клетки, CD45⁺/CD19⁺ В-лимфоциты и натуральные киллеры (CD16/32⁺/CD3⁻). Сроки и степень активации отдельных субпопуляций значительно отличались. У мышей, иммунизированных мутантами M26 и U2, наблюдалось наиболее активное повышение количества CD16/32⁺/CD3⁻ экспрессирующих клеток на вторые сутки после второй иммунизации по сравнению с контролем ($p < 0,05$), что может указывать на важную роль натуральных киллеров в активации иммунного ответа. В отношении субпопуляций CD4⁺/CD25⁺/Fox P3 регуляторных клеток, CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов существенных изменений на протяжении всего срока наблюдений не отмечалось, за исключением резкого снижения количества активированных CD4⁺/CD25⁺ клеток (в 4 раза) на седьмые сутки после второй иммунизации мышей мутантом M26. Мутанты U2 и M26 вызывали более умеренное повышение TLR2- и TLR4-позитивных клеток. Исследуемые вирусы оказывали неоднозначное влияние на количество TLR9-экспрессирующих клеток у иммунизированных животных. Все исследованные вирусы повышали фагоцитарную активность моноцитов, но не нейтрофилов. Несмотря на умеренную активацию исследованных звеньев врожденного и адаптивного иммунитета, сайт-специфические мутанты активнее воздействовали на гуморальные реакции, индуцируя нарастание ти-

Адрес для переписки:

Маркушин Станислав Георгиевич
115088, Россия, Москва, 1-я Дубровская ул., 15,
НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.
Тел.: 8 (495) 674-02-47.
E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Contacts:

Stanislav G. Markushin
115088, Russian Federation, Moscow, 1st Dubrovskaya str., 15,
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera.
Phone: +7 (495) 674-02-47.
E-mail: s.g.markushin@rambler.ru

Библиографическое описание:

Маркушин С.Г., Ахматова Н.К., Столпникова В.Н., Акупова И.И., Ртищев А.А., Калининченко Е.О. Исследование отдельных звеньев иммунной системы мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 2. С. 295–304. doi: 10.15789/2220-7619-EIA-1175

Citation:

Markushin S.G., Akhmatova N.K., Stolpnikova V.N., Akopova I.I., Rtishchev A.A., Kalinichenko E.O. Examining immune arms in mice immunized with site-specific influenza virus mutants // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 295–304. doi: 10.15789/2220-7619-EIA-1175

тров антител, причем иммуногенность мутантов была выше, чем иммуногенность холодоадаптированного реассортанта. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования сайт-специфических мутантов в качестве живых гриппозных вакцин.

Ключевые слова: вирус гриппа, сайт-специфические мутанты, аттенуация, иммуногенность, субпопуляции лимфоцитов, Toll-подобные рецепторы, фагоцитоз.

EXAMINING IMMUNE ARMS IN MICE IMMUNIZED WITH SITE-SPECIFIC INFLUENZA VIRUS MUTANTS

Markushin S.G., Akhmatova N.K., Stolpnikova V.N., Akopova I.I., Rtishchev A.A., Kalinichenko E.O.

Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. Site-specific mutants as candidates for live influenza vaccines were resulted from directly introducing into the genome of the pathogenic influenza virus A/WSN/33 (H1N1) strain ts mutations derived from the genes encoding the polymerase complex proteins from some cold-adapted strains serving as attenuation donor. Here we present the data of a comparative study examining immune system arms in mice immunized intranasally with influenza virus mutants and classical cold-adapted reassortant obtained by crossing cold-adapted strain Donor A/Krasnodar/101/35/59 (H2N2) with strain A/WSN/33 (H1N1) bearing surface antigens (hemagglutinin and neuraminidase) similar to mutants. Immunophenotyping mononuclear leukocytes from immunized mice indicated at moderate suppressive effect after using site-specific mutant and the HA reassortant viruses on some immune cell subsets. All viruses in immunized mice resulted in activation of certain lymphocyte subsets including MHC II-positive cells, CD45⁺/CD19⁺ B lymphocytes and natural killer cells (CD16/32⁺/CD3⁻). Timescale and magnitude of activation markedly differed for each cell subsets. Mice immunized with mutants M26 and U2 peaked with count of CD16/32⁺/CD3⁻ expressing cells on day 2 after the second immunization compared with control ($p < 0.05$) that may suggest about an important role for NK cells in activating immune response. In contrast, no significant changes were observed during the study in percentage of CD4⁺/CD25⁺/Fox P3 regulatory T cells, CD4⁺ T helpers and CD8⁺ cytotoxic cells, except for a sharply decreased count of activated CD4⁺/CD25⁺ cells (4-fold) on day 7 after immunization with mutant virus M26. Moreover, mutants U2 and M26 more moderately increased percentage of TLR2- and TLR4-positive cells. The viruses studied ambiguously affected count of TLR9-expressing cells in immunized animals. All viruses increased phagocytic activity in monocytes, but not neutrophils. Despite the moderate activation of innate and adaptive immunity arms, site-specific mutants more profoundly affected humoral reactions inducing increased antibody titers, so that immunogenicity of mutant viruses was higher than that of the cold-adapted reassortant. Thus, the findings hold a promise of using site-specific mutants as live influenza vaccines.

Key words: influenza virus, site-specific mutants, attenuation, immunogenicity, subpopulations of leukocytes, Toll-like receptors, phagocytosis

Введение

Введение в практику получения гриппозных живых вакцин генно-инженерных подходов может значительно оптимизировать отдельные этапы этого процесса. В частности, в последнее время большой интерес среди исследователей вызывает подход, предполагающий прямое включение ts-мутаций, взятых из генома холодоадаптированных (ХА) штаммов — доноров аттенуации в геном актуального эпидемического штамма вируса гриппа [4, 5, 8, 9]. Полученные данные свидетельствуют о том, что аттенуированные варианты вируса гриппа, полученные с помощью сайт-специфического мутагенеза, индуцируют при иммунизации более высокий гуморальный ответ и обладают более высокой эффективностью в опытах при гомологичном и гетерологичном контрольном заражении [6, 12]. Однако молекулярно-клеточные основы высокой эффективности сайт-специфических мутантов вируса гриппа оста-

ются неизученными. В данной работе на модели сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33, имеющих различное количество мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса и их различное распределение в этих генах, мы попытались исследовать влияние интраназальной иммунизации данными мутантами на отдельные звенья иммунного ответа мышей, взяв в качестве объекта сравнения ХА реассортант, полученный путем скрещивания ХА штамма А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентного штамма А/WSN/33 (H1N1) и имеющий общие поверхностные антигены с сайт-специфическими мутантами.

Материалы и методы

Вирусы. В работе использовали сайт-специфические мутанты штамма А/WSN/33 вируса гриппа [1, 6]. Мутант М26 имел 3 ts-мутации в РВ1-гене, полученные из генома ХА штамма А/Энн Арбор/6/60 (К 391 Е,

Е 581 G, Е 457 D), мутацию V 290 L в PB2-гене, полученную из генома ХА штамма А/Краснодар/101/35/59, и мутацию F 658 A в PA-гене. Мутант U2 имел 3 мутации в PB2-гене, полученные из генома ХА штаммов А/Энн Арбор/6/60, А/Краснодар/101/35/59 и А/Ленинград/134/17/57 (V 290 L, V 478 L, N 265 S соответственно). Мутант LAK2 имел 2 мутации в PB2 гене, полученные из генома ХА штаммов А/Ленинград/134/17/57 и А/Краснодар/101/35/59 (V 478 L, V 290 L соответственно). В работе также был использован ХА реассортант, имеющий 6 «внутренних» генов от ХА штамма А/Краснодар /101/35/59 и 2 гена, кодирующие поверхностные белки HA и NA от штамма А/WSN/33. Все использованные в работе вирусы поддерживали путем пассажей в 10–11-дневных куриных эмбрионах.

Сравнительное исследование иммуногенности сайт-специфических мутантов и ХА реассортанта. В работе использовали беспородных мышей (самки, вес 10–12 г) из питомника РАН «Андреевка». Группы мышей были интраназально иммунизированы двукратно дозой 10^5 ЭИД₅₀. Инфекционный материал вводился мышам в объеме 50 мкл под легким эфирным наркозом. Мышам контрольной группы двукратно вводили физраствор. Через 10 дней после второй иммунизации у мышей брали кровь и определяли титр антител, ингибирующих геммагглютинацию.

Оценка субпопуляционной структуры лимфоцитов. Через 7 суток после первой и на 2-е и 7-е сутки после второй иммунизации у животных осуществляли тотальное взятие крови под эфирным наркозом. В каждой группе было использовано по 14 животных. Оценку субпопуляционной структуры лимфоцитов осуществляли методом проточной цитометрии с применением моноклональных антител (МКА) (eBioscience, США) против клеточных антигенов. Кровь инкубировали в присутствии FITC- и PE-меченных антител согласно инструкции производителя. Эритроциты разрушали с помощью лизирующего раствора «Optilyse» (eBioscience, США). Затем клетки два раза отмывали холодным ФСБ. Результаты учитывали на проточном цитометре «Cytomix FC-500» (Beckman Coulter, США). Исследовали содержание клеток с экспрессией клеточных антигенов: CD45⁺/CD3⁺, CD3⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD25⁺/Foxp3, CD16/32⁺/CD3⁻, CD16/32⁺/CD3⁺, CD45⁺/CD19⁺, CD19⁺/CD5⁺, белков МНС II класса. Также оценивали содержание клеток, экспрессирующих TLRs (TLR2, TLR4, TLR9). Гейт популяции клеток устанавливали на основе комбинации прямого

и бокового светорассеяния и размера клеток. При учете результатов подсчитывали 5000 клеток в гейте.

Определение фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов. Фагоцитарную активность определяли по поглотительной способности убитых нагреванием микробных клеток *S. aureus* моноцитами и нейтрофилами периферической крови иммунизированных мышей (n = 10). Убитые нагреванием бактерии окрашивали FITC. К периферической крови мышей прибавляли FITC-меченные бактерии (10^9 микробных клеток/мкл). Затем проводилась отмывка непоглощенных бактерий.

Количество моноцитов и нейтрофилов, захвативших FITC-меченные бактерии, определяли с помощью проточной цитометрии («Cytomix FC-500» фирмы Beckman Coulter, США, с СХР программным обеспечением). Гейт клеточной популяции определяли путем оценки фронтального и бокового светорассеивания и размера клеток. В каждом гейте оценивали 10 000 клеток. Результат представляли как процент нейтрофилов или моноцитов, фагоцитировавших убитые нагреванием FITC-меченные бактериальные клетки *S. aureus*.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия рассматривались как значительные при $p < 0,05$.

Результаты

Имунофенотипические характеристики мононуклеарных лейкоцитов мышей, иммунизированных интраназально сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33 вируса гриппа и ХА-реассортантом. Как видно из таблицы 1, интраназальное введение мышам ХА реассортанта А/Краснодар/101/35/59 х А./WSN/33 сопровождалось снижением количества МНС II-экспрессирующих клеток на 7-е сутки после первой иммунизации (–22%). Однако на первые и на 7-е сутки после второй иммунизации наблюдалось небольшое повышение МНС II-экспрессирующих клеток (в 1,3 и 1,2 раза). Наряду с этим отмечалась невысокая активация В-лимфоцитов, содержащих на своей поверхности рецептор CD19, функционирующий как корецептор с CD21 и CD81. Повышение количества этих клеток наблюдалось на 2-е сутки (в 1,4 раза) и на 7-е сутки после второй

Таблица 1. Субпопуляционная структура лимфоцитов у иммунизированных мышей, %

Table 1. Subpopulation structure of lymphocytes of immunized mice, %

Сроки определения The time of determination	CD45 ⁺ /CD3 ⁺	CD3 ⁺ /CD8a ⁺	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺	CD4 ⁺ /CD25 ⁺ / Foxp3
Группа 1 (мутант M26) (M±SD) Group 1 (mutant M26) (M±SD)					
7 сут I имм. 7 day I imm.	68,76±2,27	12,7±1,26	53,5±1,63	2,5±0,3*	2,36±0,4
2 сут II имм. 2 day II imm.	63,7±1,16*	20±1,41*	40,4±2	2,96±0,3	2,6±0,2
7 сут II имм. 7 day II imm.	63,1±2,61	15,55±0,42*	48,55±1,5	1,42±0,22*	4,97±0,25
Группа 2 (мутант U2) (M±SD) Group 2 (mutant U2) (M±SD)					
7 сут I имм. 7 day I imm.	65,6±1,25	16,43±0,87	49,46±1,98	4,43±0,35	3,76±0,55
2 сут II имм. 2 day II imm.	65,46±2,05	19,56±1,26*	50,26±2,05	5,73±0,35*	4,6±0,3
7 сут II имм. 7 day II imm.	73,5±2,64*	13,75±1,1*	51±1,35	3,9±0,33*	3,5±0,29*
Группа 3 (мутант LAK2) (M±SD) Group 3 (mutant LAK2) (M±SD)					
7 сут I имм. 7 day I imm.	64,3±0,9*	15,43±0,97	42,4±2,07*	3,33±0,35	2,66±0,35
2 сут II имм. 2 day II imm.	64,56±2,1	14,2±1,1	46,53±1,91	3,03±0,25	2,73±0,25
7 сут II имм. 7 day II imm.	67,5±2,58	15,72±0,62	42,62±1,98	4,05±0,2*	3,87±0,29
Группа 4 (ХА Реассортант) (M±SD) Group 4 (CA Reasortant) (M±SD)					
7 сут I имм. 7 day I imm.	72,36±1,69	17,43±0,97	51,46±1,27	3,43±0,3	3,2±0,2
2 сут II имм. 2 day II imm.	66,7±1,56	16,43±1,09	40,5±9,92	3,96±0,45	3,33±0,35
7 сут II имм. 7 day II imm.	66,6±3,1	14,67±0,86	45,65±4,12	4,87±0,46	4,7±0,39
Группа 5 (контроль) (M±SD) Group 5 (control) (M±SD)					
7 сут I имм. 7 day I imm.	69,23±2,45	14,6±0,9	49,5±1,9	4,93±0,6	4,06±0,25
2 сут II имм. 2 day II imm.	69,96±2,41	17,36±1,07	48,3±2	3,9±0,3	3,26±0,25
7 сут II имм. 7 day II imm.	69,75±3,1	18,3±0,84	54,35±1,63	5,6±0,25	5,44±0,25

Примечание. * $p \leq 0,05$ — достоверность различий относительно контроля (неиммунизированные мыши) в соответствующие сроки наблюдения (тест Манна–Уитни).

Note. * $p \leq 0,05$ — trustworthiness of differences relatively control (unimmunized mice) in time of observation (Mann–Witney test).

иммунизации (в 1,6 раза). У мышей, иммунизированных ХА реассортантом, повышенная активация отмечена среди натуральных киллеров, экспрессирующих белок CD16, на 2-й и 7-й день после второй иммунизации (в 1,64 и 2,1 раза соответственно). При этом не наблюдалось заметной активации субпопуляций CD4/CD25 и CD4/CD25/Foxp3 регуляторных клеток на протяжении всего периода наблюдения. Иммунизация мышей ХА реассортантом сопровождалась небольшим снижением численности Т-хелперов на поздних сроках иммунизации (на 2-й день после второй иммунизации (-17%) и на 7-й день после второй иммунизации (-17%). Наряду с этим не выявлено существенных изменений в численности CD8-цитотоксических лимфоцитов на протяжении всего периода наблюдений (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что интраназальное введение мышам мутанта LAK2 также сопровождалось снижением количества МНС II-экспрессирующих клеток на 7-е сутки после первой иммунизации (-22%) с последующим небольшим повышением на 2-е и 7-е сутки после второй иммунизации (в 1,36 и 1,4 раза соответственно). В отличие от ХА реассортанта мутант LAK2 индуцировал умеренную активацию, в среднем в 1,4 раза, В-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD19 на своей поверхности на протяжении всего периода наблюдений. При иммунизации мутантом LAK2 наблюдалась замедленная активация натуральных киллеров на 7-е сутки после второй иммунизации. Также на 7-е сутки после второй иммунизации отмечено повышение количества клеток с экспрессией маркера CD16 в 2 раза. У мышей, иммунизированных LAK2, не наблюдалось заметной активации субпопуляций CD8-цитотоксических лимфоцитов, регуляторных клеток CD4/CD25/Foxp3, и Th-2 с маркером ранней активации CD4/CD25 на протяжении всего периода наблюдений. В отличие от ХА реассортанта и мутанта LAK2 у мышей, иммунизированных мутантом U2 не наблюдалось снижения субпопуляции МНС II-экспрессирующих клеток после первой иммунизации (табл. 1). При этом было отмечено повышение численности клеток на 2-й и 7-й дни после второй иммунизации (в 1,7 раза и 1,4 раза соответственно). Субпопуляция CD19-позитивных В-лимфоцитов повышалась на 2-е и 7-е сутки после второй иммунизации (в 1,3 раза и 1,4 раза соответственно). Следует особо отметить резкое повышение популяции натуральных киллеров на 2-е (в 2,7 раза) и на 7-е сутки (в 1,7 раза) после второй иммунизации. Со стороны субпопуляций регулятор-

ных клеток, а также субпопуляций Т-хелперов и CD8-лимфоцитов не было замечено значительных колебаний на протяжении всего срока наблюдений.

При иммунизации мышей мутантом M26 наблюдалось снижение численности МНС II-экспрессирующих клеток на 7-е сутки после первой иммунизации (-29%) с последующим кратковременным резким повышением на 2-е сутки после второй иммунизации (в 2,17 раза). Однако уже на 7-е сутки после второй иммунизации количество клеток, входящих в данную субпопуляцию, сравнялось с контролем. Наряду с этим наблюдалось заметное увеличение количества CD19-позитивных В-клеток на 7-й день после второй иммунизации (в 1,4 раза). У мышей, иммунизированных мутантом M26, наблюдался резкий подъем количества натуральных киллеров на 2-е сутки (в 2,7 раза) после второй иммунизации. Интересно отметить, что анализ субпопуляции регуляторных клеток CD4/CD25/Foxp3 и активированных хелперов CD4/CD25 показал различное поведение данных клеток. Субпопуляция CD4/CD25/Foxp3 не претерпевала изменений на протяжении всего периода наблюдений. С другой стороны, субпопуляция CD4/CD25 резко снижалась на 7-е сутки после второй иммунизации (снижение в 4 раза). У мышей, иммунизированных мутантом M26, наблюдалось незначительное снижение субпопуляции Т-хелперов на 2-е сутки (-17%) и на 7-е сутки после второй иммунизации (-12%). Субпопуляция CD8 цитотоксических Т-лимфоцитов не изменялась по численности за весь период наблюдений. Отмечено небольшое снижение субпопуляции CD45/CD3 на 2-й и 7-й дни после второй иммунизации (10% и 10% соответственно).

Влияние интраназальной иммунизации мышей сайт-специфическими мутантами штамма A/WSN/33 на содержание TLR2, TLR4 и TLR9-экспрессирующих клеток (гранулоцитов). Toll-подобные рецепторы являются наиболее важными представителями семейства сигнальных рецепторов и играют важную роль в активации механизмов врожденного иммунитета. Основные структурные компоненты вирионов вируса гриппа распознаются Toll-рецепторами TLR3, TLR7, TLR8, TLR9. Однако в данной работе нам важно было исследовать влияние интраназальной иммунизации сайт-специфическими мутантами вируса гриппа на субпопуляции TLR2- и TLR4-позитивных клеток, поскольку имелись сообщения о супрессии данных клеток в процессе гриппозных инфекций [3, 7]. Вместе с тем выраженная

Таблица 2. Влияние иммунизации различными типами аттенуированных вариантов вируса гриппа на содержание TLRs-экспрессирующих клеток у мышей

Table 2. The effect of immunization with various types of attenuated influenza virus variants on the content of TLRs-expressing cells in mice

Сроки определения The time of determination	TLR2, %		TLR4, %		TLR9, %	
	Гранулоциты Granulocytes	Моноциты Monocytes	Гранулоциты Granulocytes	Моноциты Monocytes	Гранулоциты Granulocytes	Моноциты Monocytes
	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD	M±SD
Группа 1* Group 1*						
7 сут I имм. 7 day I imm.	62,47±1,86 ***	56,38±1,4 #^	19,7±2,06 •	14,3±1,8 •	26,8±2,29 ^•	10,6±1,59 ^•
2 сут II имм. 2 day II imm.	28,4±2,23 #^**	48,95±2,5 #^**	16,9±0,8 #^	11,7±1,1#^•	18,6±1,43 #^•	19,5±2,09 ^**
7 сут II имм. 7 day II imm.	37,6±2,05 ^**	29,4±1,66 #^**	25±1,86 ♦	11±1,59 #^•	35,1±1,96 #^**	11,56±1,38 ***
Группа 2# Group 2#						
7 сут I имм. 7 day I imm.	72,12±2,8*^**	67,08±3,56 *^**	23,4±2,37 •	18,6±1,77 •	24,3±1,59 ^•	15,4±1,53 ^**
2 сут II имм. 2 day II imm.	50,3±3,16*^**	69,7±3,9 *^**	32,36±2,2 *^**	30,4±2 *^**	26,43±2,12 *^**	13,4±1,85 ^**
7 сут II имм. 7 day II imm.	36,2±1,73 *^**	27,56±2,77 ^**	28,6±2,56 ^♦	23,4±2,43 **	53,84±2,54 ***	21±1,76 *^♦
Группа 3^ Group 3^						
7 сут I имм. 7 day I imm.	60,18±2,5 #**	42,8±2,08 ***	19±1,9 •	16,04±1,7 •	47,92±2,46 ***	25,2±1,59 ***
2 сут II имм. 2 day II imm.	82,9±2,42 ***	83,9±2,74 ***	47,1±3,29 ***	49,14±2,43 ***	46,24±3,46 ***	39,3±1,95 ***
7 сут II имм. 7 day II imm.	47,6±2,27 ***	24,86±1,75 ♦	21,7±1,55 ♦	20,6±1,4 **	61,32±5,9 **	14,36±1,82 ***
Группа 4° Group 4°						
7 сут I имм. 7 day I imm.	86±2,66 **^♦	62,38±3,61 *^♦	83,6±2,55 **^♦	43,7±2,95 **^♦	46,63±3,63 **♦	24±2,72 **^♦
2 сут II имм. 2 day II imm.	27,9±3,3 #^♦	35,6±1,67 **^♦	18,4±1,45 #^	17±1,56 **^	35,48±1,57 **^♦	28,3±1,34 **^♦
7 сут II имм. 7 day II imm.	23,36±1,61 **^♦	19,38±1,48 **	25,4±1,96 ♦	17,5±1,58 *	52,9±2,47 **	20,34±1,57 *^♦
Группа 5♦ (контроль) Group 5♦ (control)						
7 сут I имм. 7 day I imm.	25,2±1,57 **^•	19,18±1,63 **^•	19,2±1,57 •	15,2±0,66 •	23,14±1,85 ^•	7,02±1 #^•
2 сут II имм. 2 day II imm.	20,3±1,56 **^•	18,1±1,55 **^•	14,5±1,59 #^	13,8±1,94 #^	19,2±1,82 #^•	5,45±0,65 **^•
7 сут II имм. 7 day II imm.	19,4±1,62 **^•	17,7±1,54 **^	13,7±1,9 **^•	12,5±1,98 #^	19,3±1,46 **^•	6,7±0,53 **^•

Примечание. **^♦♦ p ≤ 0,01 — достоверность различий между группами (тест Манна-Уитни) в соответствующие сроки наблюдения.

Note. **^♦♦ p ≤ 0,01 — trustworthiness of difference between groups (Mann-Witney test) in respective time of observation.

супрессия этих клеток могла повлечь за собой повышение риска появления вторичных бактериальных инфекций.

Из таблицы 2 видно, что интраназальная иммунизация мышей мутантом М26 оказывает неоднозначное влияние на TLR-экспрессирующие клетки. На 7-е сутки после первой иммунизации наблюдается повышение численности только TLR2-позитивных клеток (в 2,4 раза). Однако на 7-е сутки после второй иммунизации мы видим заметное повышение численности TLR2-, TLR4- и TLR9-позитивных клеток (в 1,93; в 1,83 и 1,81 раза соответственно). Несколько другая ситуация наблюдается у мышей, иммунизированных мутантом U2. Отмечено повышение численности TLR2 и TLR4-позитивных клеток на 7-е сутки после первой иммунизации, причем пик активности просматривается на 2-е сутки после второй иммунизации (в 2,47 и 2,28 раза соответственно). Подъем численности TLR9-позитивных клеток начинается с большим опозданием и достигает своего пика на 7-е сутки после второй иммунизации (в 2,76 раза). Интраназальное введение мышам мутанта LAK2 сопровождалось более значительным повышением численности клеток, экспрессирующих исследуемые Toll-подобные рецепторы, однако пик максимального подъема численности TLR2- и TLR4-позитивных клеток был отмечен на 2-е сутки после второй иммунизации, в то время как пик подъема количества TLR9-позитивных клеток наблюдался на 7-е сутки после второй иммунизации. У мышей, иммунизированных ХА-реассортантом мы наблюдали наивысшую активацию TLR2- и TLR4-позитивных клеток на 7-е сутки после первой иммунизации, в то время как TLR9-позитивные клетки достигали максимальной численности на 7-е сутки после второй иммунизации. Уровень активации TLR2, TLR4, TLR9 на моноцитах мало отличался от такового на гранулоцитах (табл. 2).

Влияние интраназальной иммунизации мышей сайт-специфическими мутантами на активацию фагоцитарной активности моноцитов и нейтрофилов. Моноциты и нейтрофилы могут осуществлять противовирусный эффект с помощью поглощения, обезвреживания и элиминации вирусов и инфицированных ими клеток, что ведет к их активации, системной и локальной продукции цитокинов. Фагоцитарную активность определяли по поглощательной активности убитых нагреванием микробных клеток *S. aureus* моноцитами и нейтрофилами крови иммунизированных мышей. Как видно из рисунка, фагоцитарная

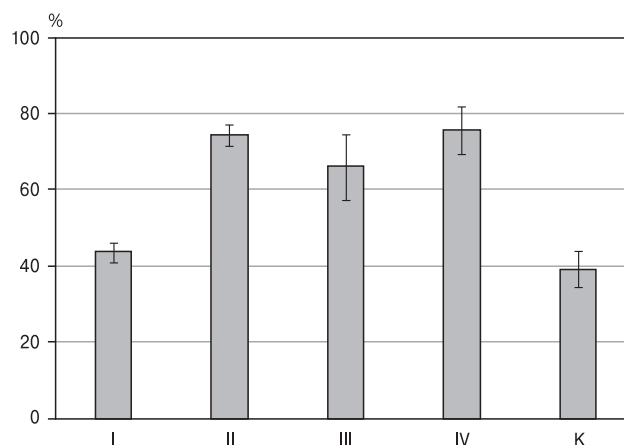


Рисунок. Фагоцитарная активность моноцитов у мышей, иммунизированных различными типами аттенуированных вариантов вируса гриппа (представлено количество (%) моноцитов, поглотивших микробные клетки *S. aureus*)

Figure. Phagocytic activity of monocytes in mice immunized with various types of attenuated variants of influenza virus (presents the number (%) of monocytes that have absorbed the microbial cells of *S. aureus*)

Примечание. I — Мутант М26, II — Мутант U2, III — Мутант LAK2, IV — ХА реассортант, К — контроль (неиммунизированные мыши).

Note. I — mutant M26, II — mutant U2, III — mutant LAK2, IV — CA reassortant, K — Control (nonimmunized mice).

активность моноцитов у мышей, интраназально иммунизированных сайт-специфическими мутантами, повышалась в различной степени по сравнению с контролем. Наиболее заметная активация фагоцитоза наблюдалась у мышей, иммунизированных мутантом U2 и ХА реассортантом (в 1,9 и 1,93 раза). Более умеренная активация фагоцитоза наблюдалась у мышей, иммунизированных мутантом LAK2 (в 1,67 раза). У мышей, иммунизированных мутантом М26, наблюдался самый низкий индекс активации фагоцитоза (в 1,11 раза). Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов не выявило существенных различий в исследованных группах (рис.).

Изучение иммуногенности сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33. Представляло большой интерес исследовать способность отдельных сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33, имеющих различное количество мутаций в геноме, индуцировать гуморальный иммунный ответ у мышей на интраназальную иммунизацию. Как видно из таблицы 3, мыши, иммунизированные мутантами U2 и М26, характеризовались наивысшим титром гуморальных антител. Мутант LAK2

индуцировал более умеренный титр гуморальных антител. У мышей, иммунизированных ХА-реассортантом, наблюдался минимальный титр гуморальных антител (табл. 3).

Обсуждение

Полученные нами ранее данные свидетельствовали о том, что как при интраназальном введении мышам эпидемического штамма вируса гриппа А/Краснодар/101/59 (H2N2), вызывающего вирусную пневмонию у мышей, так и при интраназальном введении штамма-донора аттенуации А/Краснодар/101/35/59 (H2N2) наблюдается снижение численности субпопуляций CD3, NK/CD3, CD5 (В1-лимфоцитов) и CD4-позитивных клеток [2]. Существует предположение, что иммуносупрессирующее действие вакцинного вируса может быть одной из главных причин низкой эффективности ХА живой гриппозной вакцины у лиц пожилого возраста.

В нашей работе при интраназальной иммунизации мышей сайт-специфическими мутантами штамма А/WSN/33 мы также наблюдали супрессирующее действие вирусов на численность отдельных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, однако оно было выражено слабее. Супрессивное действие мутантов М26 и LAK2 на численность субпопуляции МНС II-

позитивных клеток было скоротечным и сменялось заметным повышением количества клеток. Супрессивное воздействие мутанта U2 на субпопуляцию МНС II-позитивных клеток вообще отсутствовало. В отличие от ХА реассортанта мутант LAK 2 индуцировал умеренную активацию CD19-позитивных В-лимфоцитов на протяжении всего периода наблюдения. Мутанты U2 и M26 характеризовались повышением популяции данного типа клеток после второй иммунизации.

Мутанты M26 и U2 превосходили ХА реассортант по активации натуральных киллеров. Полученные нами факты позволяют предположить, что данный вид иммунокомпетентных клеток играет центральную роль в иммунном ответе, индуцированном аттенуированными вариантами вируса гриппа. В пользу этого предположения говорит и высокая защитная эффективность сайт-специфических мутантов при гетерологичном контрольном заражении [6]. Toll-подобные рецепторы (TLRs) являются важнейшим звеном в активации врожденного иммунитета. Определение степени участия в иммунном процессе индивидуальных Toll-подобных рецепторов при иммунизации инактивированными или живыми гриппозными вакцинами в перспективе позволит прогнозировать развитие врожденных иммунных реакций и их влияние на формирование

Таблица 3. Сравнительное исследование иммуногенности сайт-специфических мутантов штамма А/WSN/33 и ХА реассортанта, полученного при скрещивании штамма А/WSN/33 и ХА штамма А/Краснодар/101/35/59

Table 3. Comparative study of the immunogenicity of site-specific mutants of A/WSN/33 strain and CA reassortant obtained by crossing A/WSN/33 strain and CA A/Krasnodar/101/35/59

Сыворотка мышей, полученная при иммунизации исследуемыми вирусами Serum of mice obtained during immunization by investigated viruses	Титр сывороточных антител, ингибирующих гемагглютинацию (log ₂) The titer of serum hemagglutination inhibiting antibodies	
	1 иммунизация 1 immunization	2 иммунизация 2 immunization
Мутант M26/Mutant M26 PB1** А/АА (K391E, E581G, E457D)*** PB2 А/Kr ₃₅ * (V290L) PA А/WSN/33 (F 685 A)	4,0±0,5	7,0±0,5
Мутант U2/Mutant U2 PB2 А/Len ₁₇ (M478L), А/Kr ₃₅ (V290L), А/АА (N265S)	3,0±0,4	7,0±0,5
Мутант LAK2/Mutant LAK2 А/Len ₁₇ (V478L), А/Kr ₃₅ (V290L)	4,0±0,5	6,0±1,0
ХА реассортант/CA reassortant А/WSN/33 × А/Kr ₃₅	2,0±0,5	5,0±0,4
Неиммунизированные мыши (Контроль) Unimmunized (Control)	ND	3,0±0,4

Примечания. *ХА штамм: А/АА — А/Энн Арбор/6/69, А/Kr35 — А/Краснодар/101/35/59 А/Len17 — А/Ленинград/134/17/57; **полимеразный ген; ***локализация мутации.

Notes. *CA strains: A/AA — A/Ann Arbor/6/69, A/Kr35 — A/Krasnodar /101/35/59 A/Len17 — A/Leningrad /134/17/57; **polymerase gene; ***mutation localization.

адаптивного иммунитета, и, как следствие, поможет оценить эффективность гриппозных вакцин. При иммунизации мышей сайт-специфическими мутантами мы наблюдали активацию TLR9. Известно, что активация TLR9 в дендритных клетках индуцирует синтез интерферона I типа и провоспалительных цитокинов, а также продукцию костимулирующих молекул CD80/CD86 [10, 11]. Активация TLR9 на гранулоцитах наблюдалась у мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами, на поздних стадиях иммунизации в умеренной степени.

Данные литературы свидетельствуют о том, что при гриппозных инфекциях наблюдается супрессия TLR2 и TLR4 [3, 7]. Следует отметить, что снижение активности этих Toll-подобных рецепторов ведет к подавлению активности макрофагов и элиминации бактерий, что повышает опасность возникновения вторичных инфекций. Однако нами была отмечена активация TLR2 и TLR4 у мышей, иммунизированных сайт-специфическими мутантами. Не было найдено значительных различий в динамике и уровне экспрессии TLR2 и TLR4 у мышей, иммунизированных различными мутантами. Этот факт отражает менее специфическую природу врожденного иммунитета, которая может оказаться преимуществом, когда мы рассматриваем активацию Toll-подобных рецепторов как средство профилактики гриппозных заболеваний. Активация Toll-подобных рецепторов на иммунocyтах иммунизированных мышей не выявила серьезных различий

по сравнению с активацией данных рецепторов на гранулоцитах. У мышей, интраназально иммунизированных сайт-специфическими мутантами вируса гриппа, наблюдалась заметная активация фагоцитоза моноцитов, причем наивысший индекс активации фагоцитоза наблюдался у мышей, иммунизированных мутантом U2 и ХА реассортантом.

Ранее было показано, что сайт-специфические мутанты r NY1682-S1 и r NY1682-TS2 вируса гриппа, имеющие ts-мутации в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса, обладали большей иммуногенностью, чем коммерческий ХА реассортант Flumist-H1N1pdm [12]. Полученные нами данные на модели наших сайт-специфических мутантов позволяют подтвердить этот вывод о более высокой иммуногенности сайт-специфических мутантов по сравнению с ХА-реассортантами, имеющими сходные поверхностные антигены. Следует особо отметить, что несмотря на умеренное влияние иммунизации сайт-специфическими мутантами вируса гриппа на отдельные звенья врожденного иммунитета мышей, мы наблюдали сравнительно высокие показатели гуморального ответа. Этот факт свидетельствует о перспективности использования сайт-специфических мутантов вируса гриппа в качестве живых гриппозных вакцин.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Минтаеву Р.Р. за серию критических замечаний.

Список литературы/References

1. Маркушин С.Г., Кост В.Ю., Аكوпова И.И., Коптяева И.Б., Лисовская К.В., Переверзев А.Д., Цфасман Т.М. Исследование возможности использования сайт-специфического мутагенеза в конструировании живых гриппозных вакцин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2014. № 6 (79). С. 100–103. [Markushin S.G., Kost V.Yu., Akopova I.I., Koptiaeva I.B., Lisovskaya K.V., Pereversev A.D., Tsfasman T.M. the investigation of the possibility of site-specific mutagenesis using in construction of live influenza vaccines. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*, 2014, no. 6 (79), pp. 100–103. (In Russ.)]
2. Маркушин С.Г., Переверзев А.Д., Ахматова Н.К., Кривцов Г.Г. Изучение иммунного ответа мышей, иммунизированных интраназально живой гриппозной холодадаптированной вакциной в комбинации с производными хитозана в качестве адъювантов // Российский иммунологический журнал. 2011. Т. 5 (14), № 3–4. С. 233–243. [Markushin S.G., Pereversev A.D., Akhmatova N.K., Krivtsov G.G. Study of the immune responses of mice, immunized intranasally with live cold-adapted flu vaccine in combination with chitosan derivatives as adjuvants. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2011, vol. 5 (14), no. 3–4, pp. 233–243. (In Russ.)]
3. Arankalle V.A., Lole K.S., Arya R.P., Tripathy A.S., Ramdasi A.Y., Chadha M.S. Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 2009 influenza virus interaction in indian patients. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 10: e13099. doi: 10.1371/journal.pone.0013099
4. Cox A., Dewhurst S. A single mutation at PB1 residue 319 dramatically increases the safety of PR8 live attenuated influenza vaccine in a murine model without compromising vaccine efficacy. *J. Virol.*, 2015, vol. 90, no. 5, pp. 2702–2705. doi: 10.1128/JVI.02723-15
5. Jin H., Zhou H., Lu B., Kemble G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.*, 2004, vol. 2, pp. 995–998. doi: 10.1128/JVI.78.2.995-998.2004
6. Kost V.Y., Koptiaeva I.B., Akopova I.I., Tsfasman T.M., Rtishchev A.A., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterological control infection. *EC Microbiology*, 2017, vol. 12, no. 5, pp. 232–242.

7. Liu Y., Chen H., Sun Y., Chen F. Antiviral role of Toll-like receptors and cytokines against the new 2009 H1N1 virus infection. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, vol. 39, pp. 1163–1172. doi: 10.1007/s11033-011-0846-7
8. Solorzano A., Ye J., Perez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modification in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 9, pp. 4587–4596. doi: 10.1128/JVI.00101-10
9. Song H., Nieto G., Perez D. A new generation of modified live-attenuated avian influenza viruses using a two-strategy combination as potential vaccine candidates. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 17, pp. 9238–9248. doi: 10.1128/JVI.00893-07
10. Takeuchi O., Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol. Rev.*, 2009, vol. 363, pp. 2036–2044. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x
11. Tuvim V.I., Gilbert B.E., Dickey B.F., Evans S.E. Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 1: e30596. doi: 10.1371/journal.pone.0030596
12. Zhou B., Li Y., Speer S.D., Subba A., Lin X., Wentworth D.E. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*, 2012, vol. 30, no. 24, pp. 3691–3702. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.025

Авторы:

Маркушин С.Г., д.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов, ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия;

Ахматова Н.К., д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией механизмов регуляции иммунитета, Москва, Россия;

Столпникова В.Н., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета, Москва, Россия;

Акопова И.И., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов, Москва, Россия;

Ртищев А.А., младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов, Москва, Россия;

Калиниченко Е.О., младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета, Москва, Россия.

Authors:

Markushin S.G., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Head of Laboratory of Genetics of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Akhmatova N.K., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Head of Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Stolpnikova V.N., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Akopova I.I., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Genetics of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Rtishchev A.A., Junior Researcher, Laboratory of Genetics of RNA viruses, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;

Kalinichenko E.O., Junior Researcher, Laboratory of Mechanisms of Immunity Regulation, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 03.04.2019
Отправлена на доработку 23.05.2019
Принята к печати 14.03.2020

Received 03.04.2019
Revision received 23.05.2019
Accepted 14.03.2020