

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

Усиление иммуногенности вируса гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1К. А. Васильев^{1#}, М. А. Юхнева¹, А.-П. С. Шурыгина¹, М. А. Стукова¹, А. Ю. Егоров^{1,2}¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева», Санкт-Петербург, Российская Федерация² Университет природных ресурсов и естественных наук, Вена, Австрия[#] Для корреспонденции: Кирилл Васильев: kirill.vasilyev@influenza.spb.ru**Ключевые слова:** вирус гриппа, белок NS1, иммунный ответ, иммуногенность, проточная цитометрия**DOI:** 10.18527/2500-2236-2018-5-1-36-47

Получена 3 июля 2018 г.

Принята к печати 1 августа 2018 г.

Опубликована 28 сентября 2018 г.

АННОТАЦИЯ

Укорочение неструктурного белка NS1 является перспективным методом создания аттенуированных высокоиммуногенных вирусов гриппа. Однако механизмы врожденного иммунитета, обуславливающие повышенную иммуногенность штаммов с модифицированным NS1 в настоящее время изучены недостаточно. Целью данной работы было сравнение продукции цитокинов, динамики изменения популяционного состава клеток врожденного иммунитета и уровня адаптивного Т-клеточного иммунного ответа после иммунизации мышей двумя вариантами вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR8): вирусом дикого типа A/PR8/full NS и вирусом с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1 (A/PR8/NS124). В данном исследовании для компенсации различий в репродуктивной активности исследуемых штаммов в респираторном тракте был выбран интраперитонеальный способ введения вирусов. Уровень интерферона β (IFN β), фактора некроза опухолей α (TNF α), моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (MCP1), интерлейкина 6 (IL6) и IL27 в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных A/PR8/NS124, был существенно выше, чем в группе, получившей A/PR8/full NS. В то же время группа A/PR8/NS124 характеризовалась замедленным привлечением моноцитов и нейтрофилов в перитонеальную полость и более выраженным снижением относительного содержания дендритных клеток по сравнению с A/PR8/full NS. Важно, что уровень экспрессии активационного маркера CD86 на клетках, экспрессирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости II (MHCII⁺) перитонеальной полости мышей, иммунизированных штаммом A/PR8/NS124, имел более высокие значения по сравнению с группой A/PR8/full NS. Анализ адаптивного иммунного ответа показал, что иммунизация штаммом A/PR8/NS124 приводит к формированию повышенного содержания вирус-специфических CD8⁺-эффекторных Т-лимфоцитов, характеризующихся одновременной продукцией IFN γ , IL2 и TNF α . Мы предполагаем, что повышенная продукция цитокинов, усиленная миграция дендритных клеток, а также сохранение высокого уровня экспрессии CD86 на антигенпрезентирующих клетках (АПК) мышей через 24 ч после иммунизации штаммом A/PR8/NS124 приводит к более эффективной презентации антигенов вируса гриппа и, как следствие, к усилению вирус-специфического Т-клеточного иммунного ответа.

Enhancement of the immunogenicity of influenza A virus by the inhibition of immunosuppressive function of NS1 proteinKirill A. Vasilyev^{1#}, Maria A. Yukhneva¹, Anna-Polina S. Shurygina¹, Marina A. Stukova¹, Andrej Y.Egorov^{1,2}¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation² University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Austria[#] Corresponding author: Kirill Vasilyev: kirill.vasilyev@influenza.spb.ru**Keywords:** influenza virus, NS1 protein, immune response, immunogenicity, flow cytometry

ABSTRACT

The truncation of the nonstructural NS1 protein is a novel approach for the generation of immunogenic attenuated influenza viruses. However, the innate immune mechanisms that cause the increased immunogenicity of influenza viruses with altered NS1 proteins are poorly understood. The goal of this study was to compare the immune responses in mice immunized with two variants of the influenza A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR8) virus: the wild type virus (A/PR8/full NS) and the variant with the NS1 protein shortened to 124 amino acid residues (A/PR8/NS124). The investigated parameters of immunity included cytokine production, the dynamic variation of the innate immune cell populations, and the rate of the influenza-specific T-cell responses. An intraperitoneal route of immunization was chosen due to the variability in the replication capacity of the investigated viruses in the respiratory tract. The levels of interferon β (IFN β), tumor necrosis factor α (TNF α), monocyte chemo-attractant protein 1 (MCP1), interleukin 6 (IL6), and IL27 in peritoneal washings of mice immunized with A/PR8/NS124 were significantly higher compared to the mice immunized with the wild-type virus. The A/PR8/NS124 treated group showed a delayed attraction of monocytes and neutrophils as well as a more pronounced reduction in the percentage of dendritic cells in the peritoneal cavity. The expression level of the CD86 activation marker on the cells expressing the molecules of the major histocompatibility complex II (MHCII⁺) was significantly higher in mice immunized with A/PR8/NS124 than in the group immunized with A/PR8/full NS. Finally, immunization with A/PR8/NS124 led to an increased formation of influenza-specific CD8⁺ effector T-cells characterized by the simultaneous production of IFN γ , IL2, and TNF α . We hypothesize that elevated cytokine production, enhanced dendritic cell migration, and increased CD86 expression on antigen-presenting cells upon immunization with A/PR8/NS124 lead to a more effective presentation of viral antigens and, therefore, promote an increased antigen-specific CD8⁺ immune response.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа с укороченным неструктурным белком NS1 обладают сниженной репродуктивной активностью в респираторном тракте организма-хозяина, однако могут вызывать полноценный гуморальный и клеточный иммунный ответ, что позволяет использовать эти вирусы для создания живых аттенуированных гриппозных вакцин [1, 2]. Формирование вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов в легких и лимфоузлах, дренирующих респираторный тракт, а также антител в высоком титре к поверхностным антигенам вируса гриппа с модифицированным геном NS было показано в исследованиях на мышах [3, 4], лошадях [5], свиньях [6, 7], домашней птице [1], хорьках [8] и макаках [9]. Живая интраназальная гриппозная вакцина, разработанная на основе вируса гриппа с удаленной рамкой считывания белка NS1, успешно прошла клинические испытания [2]. Модификация гена NS путем внедрения в его состав фрагментов генома патогенных организмов, не родственных вирусу гриппа, является перспективным подходом для создания векторных вакцин мукозального применения против различных инфекций. В частности, показано, что иммунизация штаммом, экспрессирующим белок ESAT-6 *Mycobacterium tuberculosis* в составе NS1, приводит к формированию протективного ESAT-6-специфичного иммунного ответа Th1-типа [10].

Несмотря на большое число исследований, посвященных изучению влияния модификаций белка NS1 на формирование адаптивного иммунитета к вирусу гриппа, до сих пор уделялось недостаточное внимание клеточным реакциям врожденного иммунитета на ранних стадиях иммунного ответа. Именно клетки врожденного иммунитета обеспечивают первую линию иммунной защиты организма при вирусных инфекциях, а также активацию адаптивного иммунитета

за счет процессинга и презентации антигенов в составе главного комплекса гистосовместимости (МНС), продукции провоспалительных и регуляторных цитокинов, хемокинов и факторов дифференцировки [11, 12].

Известно, что полноразмерный белок NS1 принимает непосредственное участие в подавлении реакций врожденного иммунного ответа при гриппозной инфекции за счет угнетения экспрессии генов интерферонов I типа и других провоспалительных факторов [13]. Кроме того, действие белка NS1 оказывает влияние на эффективность презентации вирусных антигенов в составе МНС и, как следствие, на иммуногенность белков вируса гриппа [13, 14].

Целью данной работы было сравнение продукции цитокинов воспаления, экспрессии активационных маркеров и динамики относительного состава дендритных клеток, макрофагов, моноцитов и нейтрофилов у мышей, иммунизированных штаммами вируса гриппа А с полноразмерным и укороченным до 124 аминокислотных остатков (а. к.) белком NS1 с последующей оценкой адаптивного Т-клеточного иммунного ответа на указанные штаммы.

С учетом разной репродуктивной активности вирусов с укороченным и интактным белком NS1 в респираторном тракте животных, для данного исследования был выбран интраперитонеальный способ иммунизации мышей, позволяющий нивелировать потенциальные различия в антигенной нагрузке, поскольку вирус гриппа не способен к размножению в перитонеальной полости [15]. Данный подход описан в работе В. Ferko *et al.*, [4], где интраперитонеальная иммунизация мышей вирусами с полноразмерным и модифицированным белком NS1 применялась для оценки цитокиногенного потенциала исследуемых вирусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы

В работе использовали два штамма на основе вируса гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (A/PR8), кодирующих (1) полноразмерный белок NS1 (A/PR8/full NS) и (2) укороченный до 124 а. к. белок NS1 (A/PR8/NS124). Вирусы были накоплены в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и очищены путем фракционирования в градиенте плотности сахарозы.

Лабораторные животные

Исследование выполняли на мышах линии C57BL/6, полученных из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий ФМБА (Россия). При проведении исследования соблюдались правила работы с лабораторными животными [16].

Определение инфекционной активности вирусов

Для определения репродуктивной активности исследуемых штаммов в респираторном тракте мышам под легким эфирным наркозом вводили $6.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ /мышь (tissue culture infective dose, TCID) вирусной суспензии в объеме 30 мкл. Забор легких осуществляли на 2-й, 4-й и 6-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 (Madin-Darby Canine Kidney) методом предельных разведений.

Инфекционную активность исследуемых штаммов оценивали методом предельных разведений на культуре клеток эмбриона цыпленка (chicken embryo kidney, CEK) в среде DMEM-F12 (Gibco, США), содержащей 6 mM GlutaMAX (Gibco, США), 1 mM $\text{CH}_3(\text{CO})\text{COONa}$ (Gibco, США) и 1% антибиотик/антимикотик (Gibco, США). Для определения TCID_{50} использовали 96-луночные культуральные планшеты (Nunc, Дания). В лунки вносили по 100 мкл приготовленных разведений вируссодержащего материала, после чего планшеты инкубировали 5 суток при температуре 34°C и 5% CO_2 . Учет результатов проводили визуально по наличию цитопатического эффекта и контролировали с помощью метода гемагглютинации с использованием 0.5% суспензии куриных эритроцитов. Расчет TCID_{50} проводили по методу Рида и Менча [17] и выражали в $\log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{мл}$.

Иммунизация животных

Мыши были иммунизированы интраперитонеально суспензией вируса в натрий-фосфатном буфере (PBS, Биолот, Россия) в объеме 500 мкл ($7.1 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ /мышь). Животные контрольной группы получали PBS в том же объеме.

Анализ продукции цитокинов в перитонеальных смывах

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 (ротатор-бакет А-4-81). Концентрацию цитокинов воспаления в супернатантах определяли при помощи набора реагентов LEGENDplex Mouse Inflammation Panel Kit в планшетах с V-образным дном лунок (Biolegend, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Проточная цитометрия

Для анализа динамики популяций клеток врожденного иммунитета перитонеальные смывы получали через 12 и 24 ч после иммунизации. Для окрашивания флуорохром-конъюгированными антителами использовали 10^6 клеток в 100 мкл. Для анализа адаптивного иммунного ответа осуществляли забор селезенок и выделение спленоцитов через 8 и 21 день после иммунизации (д. п. и.). Стимуляцию клеток проводили в плоскостонных 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 6 ч при помощи пептида ASNENMETM, соответствующего высокоиммуногенному эпитопу белка NP вируса гриппа A/PR8 в присутствии брэфельдина-A (BD Biosciences, США). Для выявления популяций клеток врожденного иммунитета и анализа уровня экспрессии активационных маркеров использовали две панели флуорохром-конъюгированных антител: 1) CD11b-PE/Cy7, CD11c-PE, MHCII-Alexa488, CD103-PerCP-Cy5.5, CD45-APC/Cy7, CD64-BV421, CD24-BV510; 2) CD45-APC/Cy7, MHCII-Alexa488, Ly6G-PerCP-Cy5.5, CD86-BV421, CD83-BV510 (Biolegend, США). Для определения фенотипа клеток адаптивного иммунитета использовали набор флуорохром-конъюгированных антител: CD4-PerCP-Cy5.5, CD8-PE/Cy7, CD62L-APC/Cy7, CD44-BV421 (Biolegend, США). Внутриклеточную продукцию цитокинов оценивали при помощи антител против IFN γ -FITC, IL2-PE, TNF α -BV510. Окраску для выявления внутриклеточных маркеров осуществляли с использованием набора реагентов Fixation and Permeabilization Solution (BD Biosciences, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для идентификации мертвых клеток использовали маркер жизнеспособности Zombie Red (Biolegend, США). Для блокирования неспецифического связывания антител использовали реагент True Stain, содержащий антитела к CD16/CD32 (Biolegend, США). Сбор данных осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, США). Результаты анализировали в программе Kaluza Analyziz 1.5a (Beckman Coulter, США).

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 экспериментальных групп между собой осуществляли при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка патогенности и репродуктивной активности исследуемых штаммов в респираторном тракте мышей

Для оценки влияния укорочения белка NS1 на патогенность и репродуктивную активность вируса гриппа при интраназальном введении была проведена оценка динамики изменения массы тела мышей, однократно иммунизированных штаммами A/PR8/NS124 и A/PR8/full NS.

Однократная иммунизация животных вирусом с укороченным до 124 а.к. белком NS1 (A/PR8/NS124) не приводила к снижению массы тела (Рис. 1). В то же время иммунизация животных эквивалентной дозой патогенного вируса A/PR8/full NS приводила к снижению массы тела до 85% от исходной к 6-му дню после заражения.

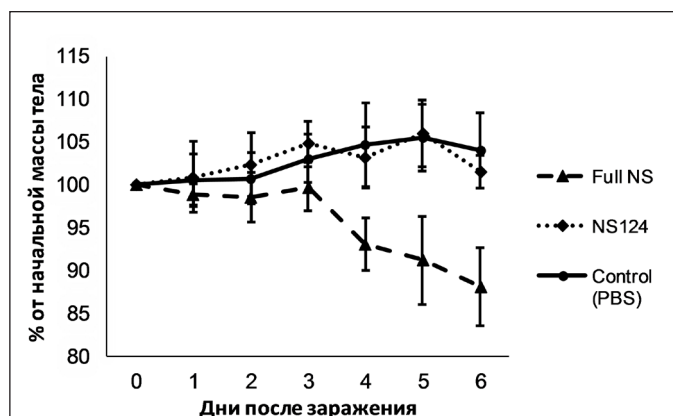


Рис. 1. Динамика изменения массы тела мышей, иммунизированных вирусами A/PR8/full NS и A/PR8/NS124. Индивидуальными символами показаны процентные доли средней массы тела животных в группе относительно исходного показателя средней массы тела в группе (Mean ± SEM). Число животных: n=6 в контрольной группе, n=10 в остальных группах.

Результаты определения репродуктивной активности исследуемых штаммов представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Уровень репликации вирусов в легких мышей, иммунизированных штаммами A/PR8/NS124 и A/PR8/full NS

Название штамма вируса	Вирусовыделение из легких (\log_{10} [TCID ₅₀]/мл ± SD, n = 5)		
	2-й день	4-й день	6-й день
A/PR8/NS124	3.70 ± 0.71***	3.80 ± 1.20***	4.40 ± 1.85
A/PR8/full NS	6.80 ± 0.71	7.00 ± 0.54	6.50 ± 0.67

***: p<0.001, t-критерий Стьюдента

Полученные результаты позволяют заключить, что укорочение белка NS1 ведет к аттенуации вируса, проявляющейся в снижении репродукции вируса в легких и отсутствии снижения массы тела иммунизированных животных. Достоверные различия по выделению вируса были отмечены на 2-й и 4-й д. п. и. (p=0.0008, p=0.003 соответственно), тогда как на 6-й день разница между группами приобретала менее выраженный характер (p=0.08).

Повышенная индукция цитокинов штаммом A/PR8/NS124 по сравнению с A/PR8/full NS

С учетом обнаруженных на первом этапе работы различий в репродуктивной активности между штаммами A/PR8/full NS и A/PR8/NS124 в респираторном тракте мышей для дальнейшего изучения иммуногенности данных вирусов применялся интраперитонеальный способ иммунизации.

Анализ концентрации цитокинов воспаления в перитонеальных смывах мышей через 12 ч после введения исследуемых вирусов показал, что для штамма A/PR8/NS124 характерна более высокая цитокиногенная активность, чем для вируса с полноразмерным белком NS1 (Рис. 2). 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 full NS (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 full NS (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 MCP1, при этом у животных, иммунизированных вирусом A/PR8/NS124, данные показатели в среднем были в 1.8 (IL6) и 2.0 (MCP1) раза выше, чем у мышей, получивших штамм A/PR8/full NS. Аналогичные различия (в 1.5 – 2.0 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/PR8/full NS, были получены более высокие значения концентрации данного цитокина (full NS: 82.2 ± 26.7 пг/мл, NS124: 62.3 ± 27.0 пг/мл, p = 0.09).

Основные популяции клеток врожденного иммунитета в перитонеальных смывах мышей

Набор маркеров CD45, MHCII, CD11c, CD11b, CD24, CD64, Ly6G изначально был предложен для идентификации основных популяций клеток врожденного иммунитета в легких [18, 19] и других органах мышей (тонкий кишечник, сердце, почки, печень, периферические органы иммунной системы и др.) [19]. В данной работе этот подход был использован для анализа клеточного состава перитонеальных смывов мышей. Была разработана панель флуорохром-конъюгированных

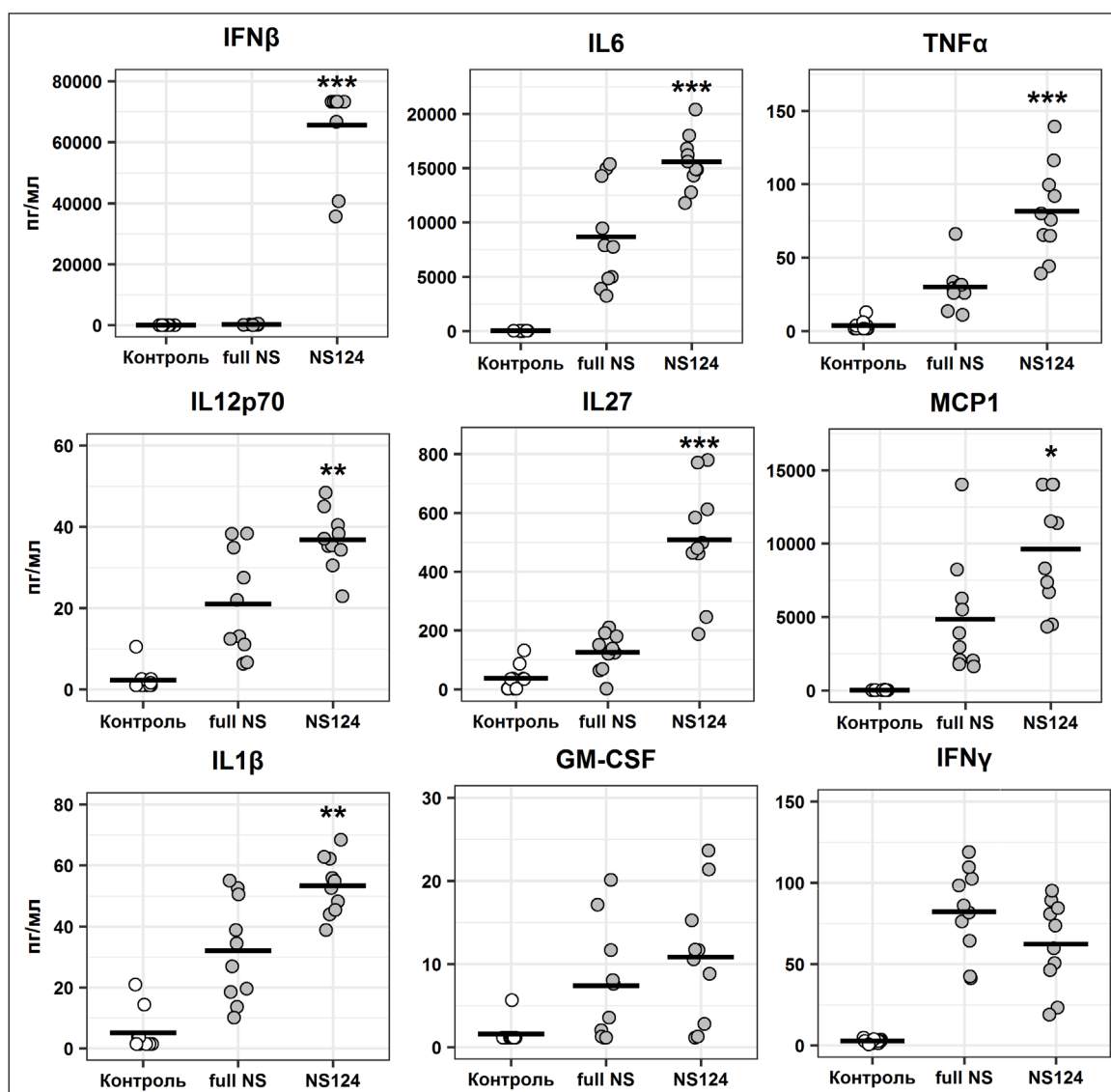


Рис. 2. Концентрация цитокинов в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных вирусами A/PR8/full NS и A/PR8/NS124. Представлены значения по каждому образцу (n=10) и средние значения по каждой группе. Символ * означает наличие достоверных различий между группами full NS и NS124 (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, t-критерий Стьюдента).

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. 3).

Динамика привлечения моноцитов и нейтрофилов в перитонеальную полость мышей

Результаты оценки относительного содержания основных популяций клеток врожденного иммунитета на разных сроках после иммунизации представлены на Рис. 4. Через 12 ч после введения вируса A/PR8/NS124 было отмечено незначительное превышение относительного содержания моноцитов и нейтрофилов по сравнению с контролем, тогда как в группе, иммунизированной A/PR8/full NS, доля данных клеток составила $2.74 \pm 2.48\%$ и $17.65 \pm 11.32\%$ соответственно

(в контроле: $0.14 \pm 0.10\%$ и $0.93 \pm 0.24\%$). Относительный состав макрофагов через 12 ч претерпевал выраженные изменения в обеих экспериментальных группах: был отмечен достоверный прирост содержания клеток по сравнению с контролем в группе full NS ($p=0.01$) и NS124 ($p=0.05$). Через 24 ч для обеих групп были получены похожие значения относительного содержания моноцитов и макрофагов, тогда как уровень нейтрофилов в группе NS124 по-прежнему оставался сниженным относительно группы full NS.

Относительное содержание популяций дендритных клеток в перитонеальной полости

Согласно данным, представленным на рис. 3, использованный в работе набор маркеров позволяет четко 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 составляют

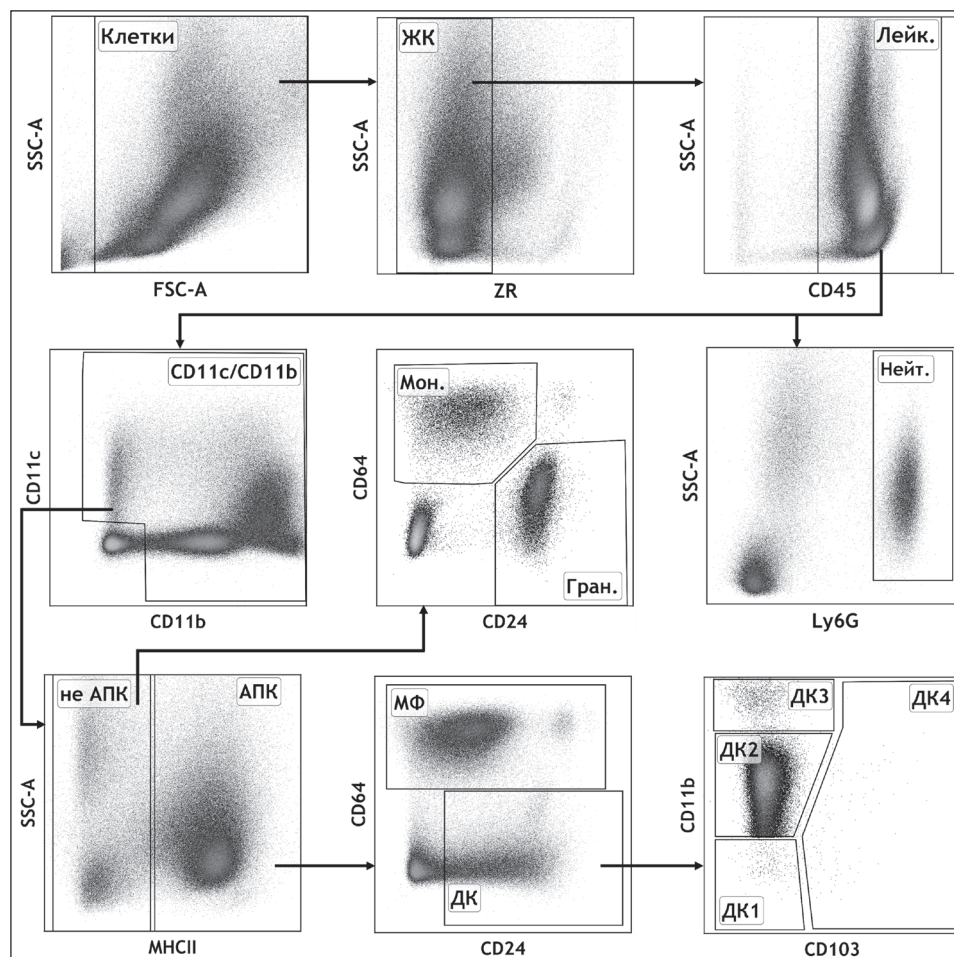


Рис. 3. Тактика гейтирования при идентификации основных клеточных популяций перитонеальных смывов мышей. После отсеечения дублетов по FSC-A/FSC-H (не показано на рисунке) и выделения популяции живых одиночных клеток на основании характеристик светорассеяния (FSC-A/SSC-A) и связывания красителя Zombie Red иммунциты 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⁺); 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⁺).

дендритные клетки, характеризующиеся промежуточным уровнем экспрессии CD11b (CD11b^{int} ДК).

Через 12 ч после введения вирусов в группе full NS отмечалось достоверное сокращение доли CD11b^{int} ДК по сравнению с контролем ($p=0.0009$) (Рис. 5). При этом 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 CD11b^{hi} ДК и CD103⁺ ДК различия с контролем были статистически достоверны (full NS: 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 full NS относительное содержание CD11b^{hi} ДК оставалось на повышенном относительно контроля уровне, а доля CD103⁺ ДК снижалась только до уровня контрольной группы, тогда как в группе NS124 процент данной популяции оказывался существенно ниже, чем в контроле. Таким образом, через 24 ч после иммунизации штаммом A/PR8/NS124 отмечалось достоверное снижение относительного содержания CD11b^{hi} ДК и CD103⁺ ДК ($p=0.004$ и $p=0.02$ соответственно).

Усиление экспрессии костимуляторного фактора CD86

Результаты анализа медианной интенсивности флуоресценции (median fluorescence intensity, MFI) активационных маркеров CD83 и CD86 на АПК (CD45⁺МНСII⁺) на сроках 12 и 24 ч после иммунизации представлены на Рис. 6. Установлено, что уровень экспрессии CD83 увеличивался в ответ на введение вируса как в группе

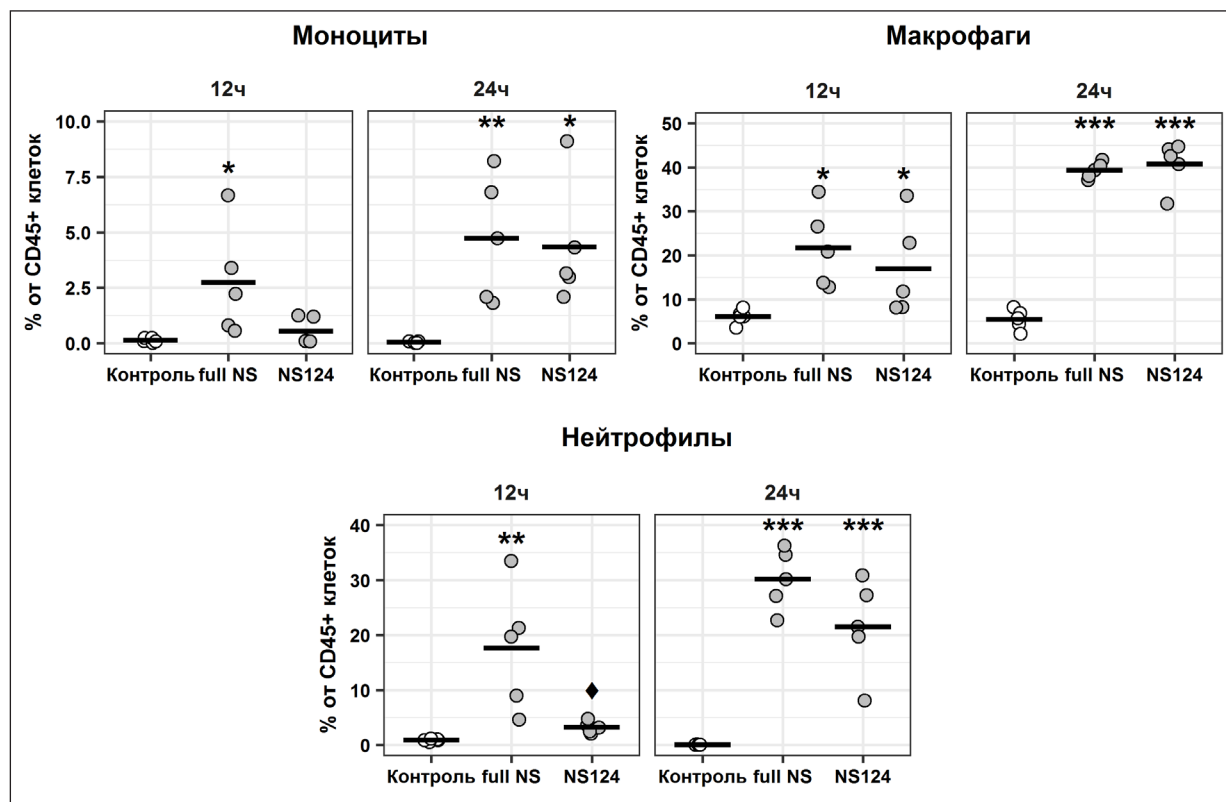


Рис. 4. Относительный состав основных популяций клеток врожденного иммунитета. Точками отмечены индивидуальные показатели доли исследуемых популяций от общего числа живых CD45⁺-клеток. Также представлены средние значения по группам (n=5). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Даннета). Символом ♦ отмечены достоверные различия между экспериментальными группами full NS и NS124 (♦: p<0.05, ♦♦: p<0.01, ♦♦♦: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

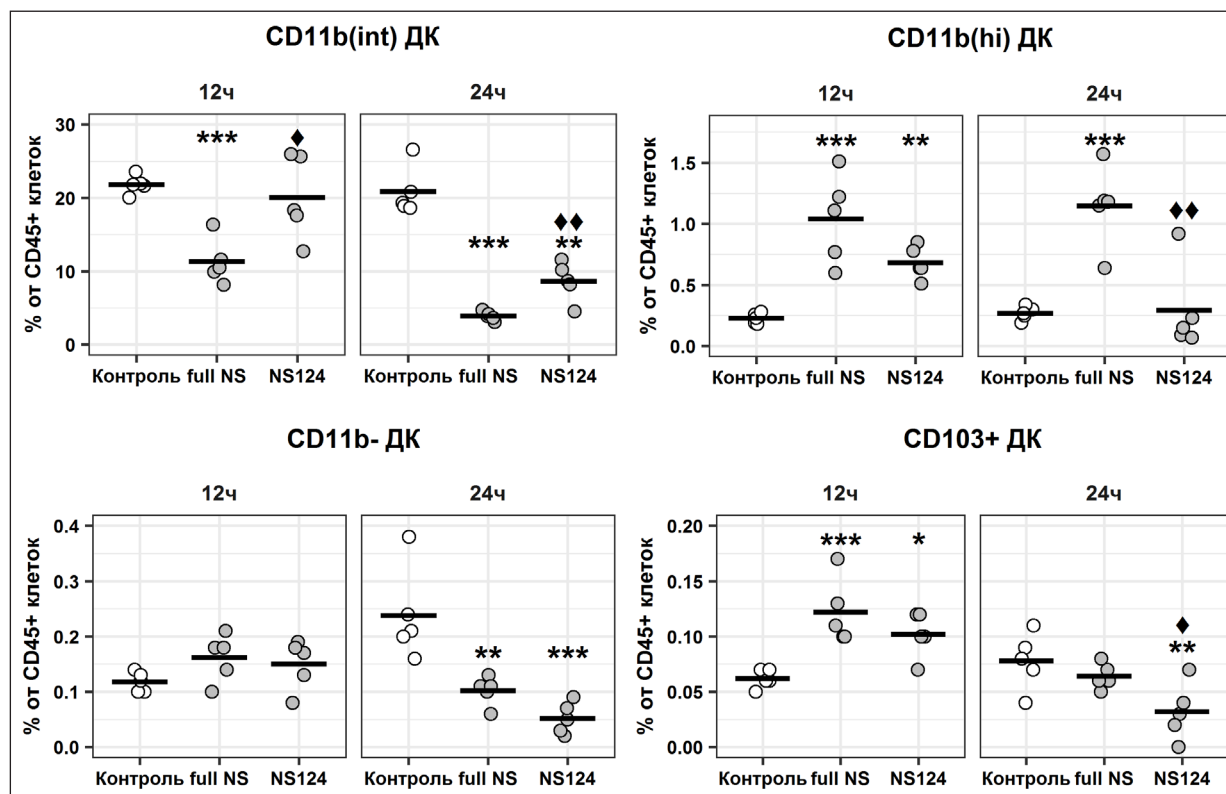


Рис. 5. Относительный состав различных популяций дендритных клеток. Точками отмечены индивидуальные показатели доли исследуемых популяций от общего числа живых CD45⁺-клеток. Также представлены средние значения по группам (n=5). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, критерий Даннета). Символом ♦ отмечены достоверные различия между экспериментальными группами full NS и NS124 (♦: p<0.05, ♦♦: p<0.01, ♦♦♦: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

full NS, так и в группе NS124: уже через 12 ч отмечались статистически значимые различия с контролем ($p=0.01$, $p=0.03$), сохранявшиеся и на сроке 24 ч после иммунизации.

Уровень экспрессии CD86 значительно возрастал через 12 ч после иммунизации. Значимые различия с контролем были отмечены в обеих экспериментальных группах, причем показатели MFI, полученные на данном сроке, имели близкие значения в группах full NS 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 full NS ($p=0.00003$ при сравнении с контролем; $p=0.006$ при сравнении с full NS).

Адаптивный Т-клеточный иммунный ответ

На заключительном этапе исследования была проведена оценка адаптивного Т-клеточного иммунного ответа на иммунодоминантный эпитоп белка NP. Было установлено, что доля антиген-специфических CD8⁺ Т-клеток в селезенках мышей из группы NS124 в 1.5-2.0 раза превышала аналогичный показатель в группе full NS через 8 и 21 д. п. и. (Рис. 7). При этом наибольший вклад в различия между группами вносили полифункциональные CD8⁺ Т-лимфоциты, одновременно экспрессирующие цитокины IFN γ , IL2 и TNF α (full NS: 5.9 ± 0.5 , NS124: 10.7 ± 1.6 , $p=0.0008$ через 8 дней; full NS: 4.9 ± 0.5 , NS124: 7.3 ± 0.4 , $p=0.0003$ через 21 день). Кроме того, в группе NS124 на 8-й день отмечено формирование более высокого содержания субпопуляций CD8⁺ Т-лимфоцитов с фенотипом IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ (full NS: 0.5 ± 0.08 и 5.6 ± 1.04 , NS124: 1.5 ± 0.5 и 8.9 ± 2.6 , $p=0.008$ и 0.05 соответственно). Через 21 день после иммунизации в группе NS124 происходило изменение состава популяций цитокин-продуцирующих клеток, выражающееся в увеличении доли IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ и IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ Т-лимфоцитов и сокращении

относительного содержания IFN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ клеток (Рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании было проведено сравнение врожденного и адаптивного Т-клеточного иммунного ответа на вирусы гриппа А с полноразмерным и укороченным до 124 а. к. белком NS1. Анализ продукции цитокинов воспаления в перитонеальных смывах мышей, иммунизированных штаммами А/PR8/full NS и А/PR8/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 и IL1 β в ответ на иммунизацию штаммом А/PR8/NS124. Полученные данные о повышении экспрессии цитокинов семейства IL12 (IL12p70, IL27) расширяют имеющиеся в литературе сведения о высоком цитокиногенном потенциале вирусов гриппа с укороченным белком NS1 [4, 20]. Наиболее выраженные различия между вирусами А/PR8/full NS и А/PR8/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 [21, 22]. 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 провоспалительных цитокинов после иммунизации вирусом А/PR8/NS124 является, вероятно, следствием высокой интерферогенности данного штамма.

Показано, что интраперитонеальное введение вирусов вызывало активную миграцию в брюшную полость моноцитов, макрофагов и нейтрофилов. Согласно литературным данным, именно эти клетки

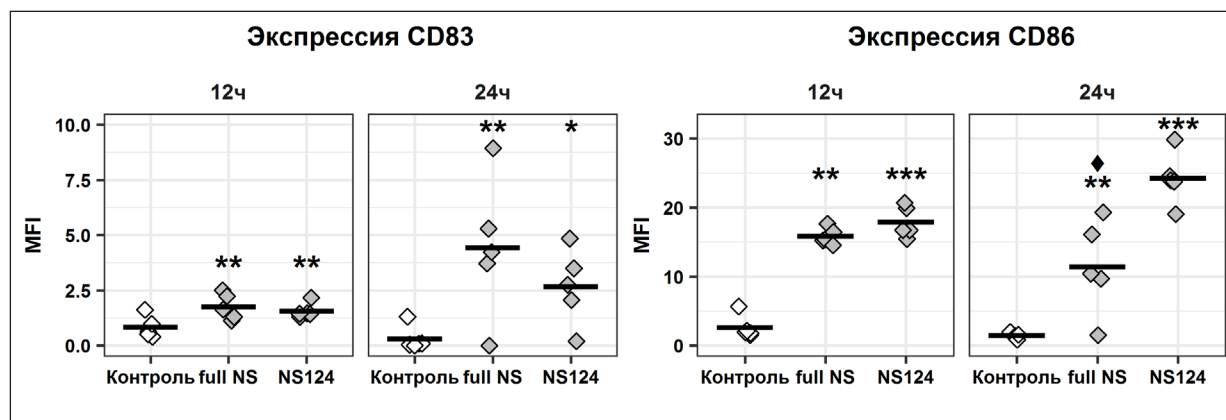


Рис. 6. Уровень экспрессии молекул CD83 и CD86 на антигенпрезентирующих клетках перитонеальной полости мышей. На рисунке представлены медианные значения интенсивности флуоресценции (MFI) маркеров CD83 и CD86 по каждому животному. Также представлены средние значения по группам ($n=5$). Символ * означает наличие достоверных различий с контрольной группой (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, критерий Даннета). Символом ♦ отмечены достоверные различия между экспериментальными группами (♦: $p<0.05$, ♦♦: $p<0.01$, ♦♦♦: $p<0.001$, t-критерий Стьюдента).

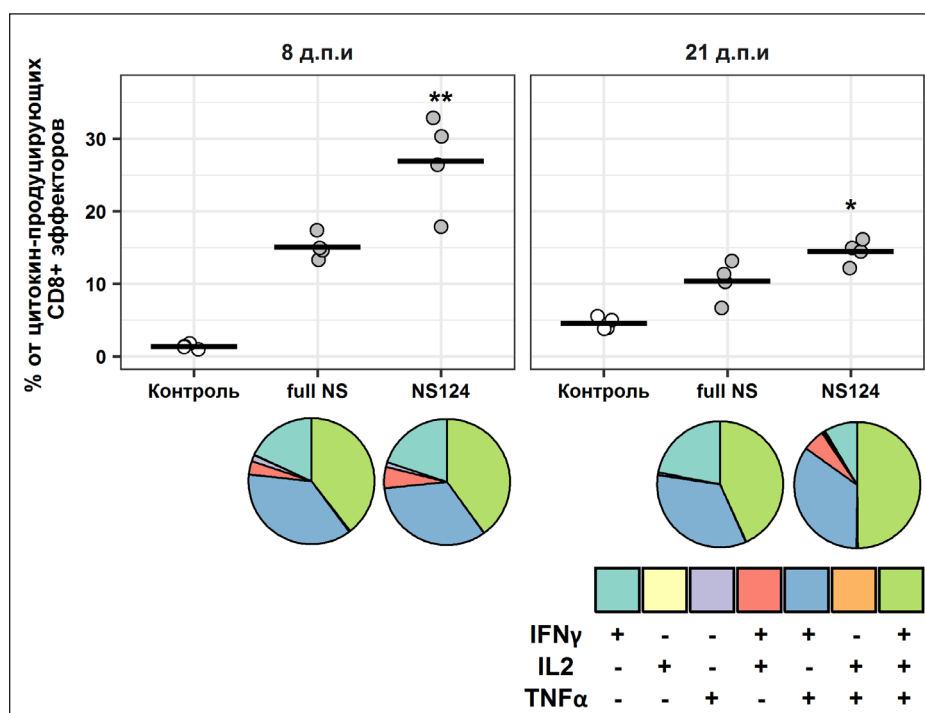


Рис. 7. Продукция цитокинов IFN γ , IL2 и TNF α CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитами мышей, иммунизированных вирусами A/PR8/full NS и A/PR8/NS124. На графиках представлены индивидуальные значения совокупной доли цитокин-продуцирующих Т-лимфоцитов от общего числа эффекторных CD8 $^{+}$ Т-клеток (CD8 $^{+}$ CD44 $^{+}$ CD62L $^{-}$), а также средние значения по каждой группе (n = 4). На круговых диаграммах представлен относительный состав популяций, продуцирующих 1, 2 или 3 цитокина одновременно. Символом * отмечены достоверные различия между группами full NS и NS124 (*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, t-критерий Стьюдента).

обеспечивают первую линию иммунной защиты при гриппе [23]. Резидентные макрофаги осуществляют фагоцитоз инфицированных клеток организма-хозяина, ограничивая распространение вируса [24]. Кроме того, они привлекают в очаг воспаления моноциты, дифференцирующиеся в макрофаги и дендритные клетки моноцитарного происхождения [25]. Нейтрофилы также принимают активное участие в фагоцитозе вирусных частиц и апоптотических клеток в очаге инфекции [26]. Помимо этого, им принадлежит важная роль в привлечении цитотоксических Т-лимфоцитов: согласно данным, полученным в работе Lim *et al.* [27], при перемещении нейтрофилы оставляют за собой хемокиновый след, содержащий преимущественно CXCL12, который направляет миграцию Т-клеток. Известно, что у мышей нейтрофилы осуществляют МНСI-зависимую презентацию вирусных антигенов, а также экспрессируют коstimуляторные молекулы CD80 и CD86 [28].

Несмотря на повышенную индукцию цитокинов штаммом A/PR8/NS124, увеличение доли моноцитов, макрофагов и нейтрофилов в перитонеальных смывах быстрее происходило 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 [29]. 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/PR8/NS124, вызвала подавление миграции нейтрофилов и моноцитов в перитонеальную полость.

В работе анализировалась динамика относительного состава различных субпопуляций дендритных клеток. Данные иммунциты 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. В исследовании с рекомбинантным вирусом PR8, содержащим зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) в составе полноразмерного белка NS1, было установлено, что через 48 ч после иммунизации 8.5% CD103 $^{+}$ кДК медиастинальных лимфоузлов позитивны по GFP, тогда как среди CD11b $^{+}$ кДК только 0.5% клеток содержало флуоресцентный белок, что, по мнению авторов исследования, свидетельствует о более интенсивной миграции CD103 $^{+}$ кДК в лимфоузлы, хотя может указывать и на различия в перmissивности разных популяций ДК для вируса гриппа [30].

Использованная панель флуорохром-конъюгированных антител позволила идентифицировать четыре субпопуляции дендритных клеток на основании экспрессии маркеров CD11b и CD103. Анализ динамики CD11b hi ДК, CD11b lo 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 [31, 32].

Анализ экспрессии молекул CD83 и CD86 широко применяется для изучения активации клеток врожденного и приобретенного иммунитета. Известно, что повышение экспрессии данных маркеров сопряжено с созревaniem АПК и презентацией антигенов [33, 34]. Показано, что через 24 ч после иммунизации экспрессия CD86 у мышей, иммунизированных штаммом A/PR8/NS124, достоверно превышала соответствующие значения в группе A/PR8/full NS. Не исключено, что данный эффект связан с отсутствием иммуносупрессорной активности у укороченного белка NS1, что позволяет АПК животных, иммунизированных вирусом A/PR8/NS124, поддерживать экспрессию CD86 на высоком уровне, в то время как у мышей, иммунизированных штаммом A/PR8/full NS, исследуемый показатель снижается на сроке 24 ч.

Данные о более высокой экспрессии цитокинов вирусом гриппа с укороченным белком NS1, а также о его способности стимулировать экспрессию CD86 позволяют предположить, что иммунизация вирусом A/PR8/NS124 может приводить к развитию более выраженного адаптивного CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа на антигены вируса гриппа. Результаты экспериментов показали, что иммунизация штаммом A/PR8/NS124 индуцирует формирование большего числа вирус-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов. Среди данных клеток преобладают полифункциональные CD8⁺-эффекторы (FN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺ и FN γ ⁺IL2⁺TNF α ⁺), для которых была показана важная роль в формировании протективного противовирусного иммунного ответа [35].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что укорочение белка NS1

приводит к повышению иммуногенности вируса гриппа, что способствует более эффективной презентации вирусных антигенов за счет интенсификации миграции дендритных клеток, а также повышения уровня экспрессии костимуляторного фактора CD86, что, в свою очередь, ведет к формированию более выраженного адаптивного Т-клеточного иммунного ответа, сопровождающегося формированием полифункциональных эффекторных Т-лимфоцитов. Полученные результаты являются теоретическим обоснованием использования вирусов с укороченным белком NS1 в качестве живых аттенуированных гриппозных вакцин и векторов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

ЦИТИРОВАНИЕ

К. Васильев, М. Юхнева, А.-П. Шурыгина, М. Стукова, А. Егоров. Усиление иммуногенности вируса гриппа А путем подавления иммуносупрессорной функции белка NS1. MIR J, 2018; 5(1), 36-47, doi: 10.18527/2500-2236-2018-5-1-36-47

АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2018 Васильев и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

ЛИТЕРАТУРА

- Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, Perez DR, García-Sastre A, Palese P. Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. J Virol 2009; 83(4), 1742-53. doi: 10.1128/JVI.01920-08.
- Wachek V, Egorov A, Groiss F, Pfeiffer A, Fuereder T, Hoeflmayer D, Kundi M, Popow-Kraupp T, Redlberger-Fritz M, Mueller CA. 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 2010; 201(3), 354-62. doi: 10.1086/649428.
- Ferko B, Stasakova J, Sereinig S, Romanova J, Katinger D, Niebler B, Katinger H, Egorov A. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. J Virol 2001; 75(19), 8899-908. doi: 10.1128/JVI.75.19.8899-8908.2001.
- Ferko B, Stasakova J, Romanova J, Kittel C, Sereinig S, Katinger H, Egorov A. Immunogenicity and protection efficacy of replication-deficient influenza A viruses with altered NS1 genes. J Virol 2004; 78(23), 13037-45. doi: 10.1128/JVI.78.23.13037-13045.2004.
- Quinlivan M, Zamarin D, García-Sastre A, Cullinane A, Chambers T, Palese P. Attenuation of equine influenza viruses through truncations of the NS1 protein. J Virol 2005; 79(13), 8431-9. doi: 10.1128/JVI.79.13.8431-8439.2005.
- Richt JA, Lekcharoensuk P, Lager KM, Vincent AL, Loiacono CM, Janke BH, Wu W-H, Yoon K-J, Webby RJ, Solórzano A. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. J Virol 2006; 80(22), 11009-18. doi: 10.1128/JVI.00787-06.

7. Vincent AL, Ma W, Lager KM, Janke BH, Webby RJ, García-Sastre A, Richt JA. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 2007; 25(47), 7999-8009. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.09.019.
8. Zhou H, Zhu J, Tu J, Zou W, Hu Y, Yu Z, Yin W, Li Y, Zhang A, Wu Y. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4G1 binding domain. *J Infect Dis* 2010; 202(9), 1338-46. doi: 10.1086/656536.
9. Baskin CR, Bielefeldt-Ohmann H, Tumpey TM, Sabourin PJ, Long JP, Garcia-Sastre A, Tolnay AE, Albrecht R, Pyles JA, Olson PH, Aicher LD, Rosenzweig ER, Murali-Krishna K, Clark EA, Kotur MS, Fornek JL, Proll S, Palermo RE, Sabourin CL, Katze MG. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(9), 3455-60. doi: 10.1073/pnas.0813234106.
10. Stukova MA, Sereinig S, Zabolotnyh NV, Ferko B, Kittel C, Romanova J, Vinogradova TI, Katinger H, Kiselev OI, Egorov A. Vaccine potential of influenza vectors expressing Mycobacterium tuberculosis ESAT-6 protein. *Tuberculosis* 2006; 86(3-4), 236-46. doi: 10.1016/j.tube.2006.01.010.
11. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(5), 315-328. doi: 10.1038/nri3665.
12. Tripathi S, White MR, Hartshorn KL. The amazing innate immune response to influenza A virus infection. *Innate Immun* 2015; 21(1), 73-98. doi: 10.1177/1753425913508992.
13. Haye K, Burmakina S, Moran T, García-Sastre A, Fernandez-Sesma A. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol* 2009; 83(13), 6849-62. doi: 10.1128/JVI.02323-08.
14. Tisoncik JR, Billharz R, Burmakina S, Belisle SE, Proll SC, Korth MJ, García-Sastre A, Katze MG. The NS1 protein of influenza A virus suppresses interferon-regulated activation of antigen-presentation and immune-proteasome pathways. *J Gen Virol* 2011; 92(9), 2093-104. doi: 10.1099/vir.0.032060-0.
15. Reading PC, Whitney PG, Pickett DL, Tate MD, Brooks AG. Influenza viruses differ in ability to infect macrophages and to induce a local inflammatory response following intraperitoneal injection of mice. *Immunol Cell Biol* 2010; 88(6), 641-50. doi: 10.1038/icb.2010.11.
16. Council NR. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; 2010.
17. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol* 1938; 27(3), 493-7. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
18. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GRS, Perlman H. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49(4), 503-10. doi: 10.1165/rcmb.2013-0086MA.
19. Yu X, Xie J. Roles and underlying mechanisms of ESAT-6 in the context of Mycobacterium tuberculosis-host interaction from a systems biology perspective. *Cell Signal* 2012; 24(9), 1841-6. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.05.014.
20. Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, Egorov A. 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* 2005; 86(1), 185-95. doi: 10.1099/vir.0.80422-0.
21. Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, García-Sastre A. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol* 2000; 74(17), 7989-96. doi: 10.1128/JVI.74.17.7989-7996.2000.
22. Guo Z, Chen L, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(3), 263-9. doi: 10.1165/rcmb.2006-0283RC.
23. Kohlmeier JE, Woodland DL. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27, 61-82. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132625.
24. McGill J, Heusel JW, Legge KL. Innate immune control and regulation of influenza virus infections. *J Leukoc Biol* 2009; 86(4), 803-12. doi: 10.1189/jlb.0509368.
25. Cruz JLG, Pérez-Girón JV, Lüdtke A, Gómez-Medina S, Ruibal P, Idoyaga J, Muñoz-Fontela C. Monocyte-derived dendritic cells enhance protection against secondary influenza challenge by controlling the switch in CD8⁺ T-cell immunodominance. *Eur J Immunol* 2017; 47(2), 345-52. doi: 10.1002/eji.201646523.
26. Pulendran B, Maddur MS. Innate immune sensing and response to influenza. In: *Influenza Pathogenesis and Control*. Volume II. Springer; 2014, p. 23-71.
27. Lim K, Hyun Y-M, Lambert-Emo K, Capece T, Bae S, Miller R, Topham DJ, Kim M. Neutrophil trails guide influenza-specific CD8⁺ T cells in the airways. *Science* 2015; 349(6252), aaa4352. doi: 10.1126/science.aaa4352.
28. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How neutrophils shape adaptive immune responses. *Front Immunol* 2015; 6, 471. doi: 10.3389/fimmu.2015.00471.
29. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(2), 87-103. doi: 10.1038/nri3787.
30. Manicassamy B, Manicassamy S, Belicha-Villanueva A, Pisanelli G, Pulendran B, García-Sastre A. Analysis of

- in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107(25), 11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107.
31. Legge KL, Braciale TJ. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity* 2003; 18(2), 265-77. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00023-2.
 32. Yewdell JW, Haeryfar SMM. Understanding presentation of viral antigens to CD8⁺ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu Rev Immunol* 2005; 23, 651-82. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115702.
 33. Schweitzer AN, Borriello F, Wong RC, Abbas AK, Sharpe AH. Role of costimulators in T cell differentiation: studies using antigen-presenting cells lacking expression of CD80 or CD86. *J Immunol* 1997; 158(6), 2713-22. PubMed PMID: 9058805.
 34. Lechmann M, Berchtold S, Steinkasserer A, Hauber J. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol* 2002; 23(6), 273-5. doi: 10.1016/S1471-4906(02)02214-7.
 35. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(4), 247-58. doi: 10.1038/nri2274.