

УДК 57

DOI 10.21661/r-554501

Г. Ландграф, А.Р. Рекстин, Ю.А. Дешева

РАННЯЯ ЗАЩИТА ОТ ГЕТЕРОЛОГИЧНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ

***Аннотация:** наиболее эффективной стратегией предупреждения гриппозной инфекции является вакцинация [1]. Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) – эффективное средство в борьбе против гриппа, которое отличается простотой введения, экономичностью и быстрым производством [2; 3; 4]. При разработке новых вакцин против гриппа важно изучение индивидуальных иммуностимулирующих свойств вакцинных штаммов и их взаимодействия с компонентами врожденного и приобретенного иммунитета. Цитокины являются ключевыми медиаторами, которые не только регулируют иммунный ответ на вакцинацию, но также опосредуют защитные механизмы при вирусной реинфекции. Изучение экспрессии генов цитокинов может быть перспективным подходом молекулярно-генетического анализа для определения иммуномодулирующего действия вакцинных штаммов. В работе изучалась ранняя защита против гетерологичной гриппозной инфекции после иммунизации ЖГВ потенциально пандемического подтипа А/Н7N3 на модели мышей и возможные факторы ранней защиты в клеточной культуре ТНР-1.*

***Ключевые слова:** живая гриппозная вакцина, иммунизация, гриппозная инфекция, цитокины.*

Работа поддержана грантом РФФИ №19-34-90021/19.

Материалы и методы.

Вирусы. В работе использовали реассортантный вакцинный вирус А/17/кряква/Нидерланды/00/95(Н7N3), подготовленный в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ», и вирус гриппа А/Южная Африка/3626/13 (Н1N1)pdm09,

полученный из коллекции вирусов отдела вирусологии Института экспериментальной медицины (Санкт-Петербург, Россия).

Работа с мышами. 8–10-недельных самок мышей СВА получали из лабораторного питомника Российской академии наук (Рапполово, Ленинградская область, Россия). Группам мышей под легким эфирным наркозом вводили интраназально 50 мкл ЖГВ, содержащей $6 \lg$ ЭИД₅₀ вируса А/17/кряква/Нидерланды/00/95(Н7Н3) (ЖГВ), контрольным животным вводили фосфатный буферный раствор (ФБ). Все процедуры, связанные с животными, проводились в соответствии с «Правилами лабораторной практики» Министерства здравоохранения Российской Федерации №708 п. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» (протокол 1/20 от 27 февраля 2020 г.).

Заражение вирусом А/Южная Африка/3626/2013 (Н1Н1)рdm09 (10 50% мышинных летальных доз, МЛД₅₀) проводили на 5-е и 7-е сутки после иммунизации ЖГВ. Мониторинг осуществляли в течение 14 дней после заражения. Образцы легких отбирали для изучения репродукции инфекционного вируса и гомогенизировали с использованием системы Tissue Lyser LT (Qiagen, Venlo, The Netherlands). Полученные гомогенаты титровали в развивающихся куриных эмбрионах. Титры вируса в легких выражали как \log_{10} ЭИД₅₀.

Анализ экспрессии генов ранних цитокинов в клетках ТНР-1. В исследовании использовали перевиваемую суспензионную культуру макрофагов человека (Human acute monocytic leukemia cell line), ТНР-1 [5]. Клетки ТНР-1 высевали на 24-луночные планшеты для клеточных культур по $3,0 \times 10^6$ клеток на лунку в среде RPMI (Roswell Park Memorial Institute), дополненной 10% фетальной сывороткой теленка, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Планшеты для культивирования инкубировали при 37° С в атмосфере 5% CO₂ в течение 48 ч. В клетки вносили 10⁶ эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀)/мл вируса А/17/кряква/Нидерланды/00/95(Н7Н3), в качестве контроля использовали иммуностимулятор Poly I:C [6] (0,1 мкг/мл). Уровни экспрессии мРНК интерферонов 1 типа, интерлейкина 6 (ИЛ-6) и воспалительного белка макрофагов 1-альфа (MIP-1-альфа) определяли с помощью полимеразной цепной реакции

обратной транскрипции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) в лизатах клеток, полученных после 3-х часовой инкубации. Экстракцию РНК проводили с помощью набора RNeasy Mini (QIAGEN, Хилден, Германия). ОТ-ПЦР-РВ проводили в термоциклере CFX96 (Biorad, Hercules, CA, USA) с использованием SybrGreen master mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Для нормализации использовали гены глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) и гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT). Данные были проанализированы с использованием сравнительного метода C_t , нормализованного по GAPDH и HPRT, и представлены как кратность изменений в экспрессии генов обработанных клеток относительно контрольных необработанных клеток.

Таблица 1

Праймеры для выявления экспрессии м-РНК цитокинов в клетках ТНР-1

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
Гены домашнего хозяйства		
GAPDH	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT
HPRT	CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT	AGACGTTTCAGTCCTGTCCATAA
Гены интереса		
ИФН-альфа	TCAAAGACTCTCACCCCTGC	CAGTGTAAGGTGCACATGACG
ИФН-бета	GCGACACTGTTCGTGTTGTC	GCCTCCCATCAATTGCCAC
ИЛ-6	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTCAGGTTG
МIP-1 альфа (CCL-3)	AGTTCTCTGCATCACTTGCTG	CGGCTTCGCTTGGTTAGGAA

Статистическая обработка данных.

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения Statistica, версия 6.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, Оклахома, США). Данные представляли как среднее \pm стандартная ошибка средних (СО). Для сравнения двух независимых групп использовали U-критерий Манна – Уитни. Для сравнения распределений выживаемости использовался лог-ранг критерий Мантела – Кокса. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты.

Иммунизация ЖГВ подтипа А(Н7N3) защищала от летальной инфекции гетерологичным вирусом А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)pdm09 20%

иммунизированных животных на 5-й день после иммунизации и 80% – на 7-й день после иммунизации (рис. 1).

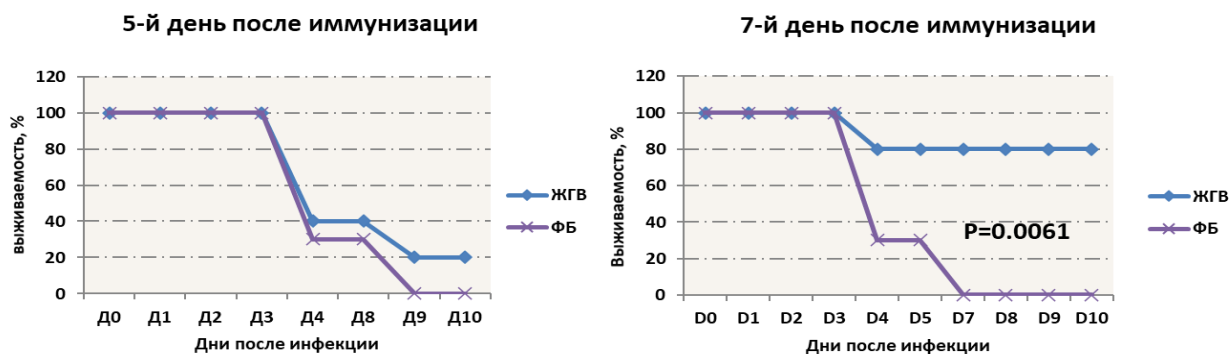


Рис. 1. Анализ выживаемости после заражения мышей вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09 на 5-е и 7-е сутки после иммунизации ЖГВ на основе вакцинного вируса А/17/кряква/Нидерланды/00/95(H7N3) (n=10)

Выявлено снижение репродукции инфекционного вируса А/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09 в легких иммунизированных мышей в среднем в 10 раз (рис. 2).

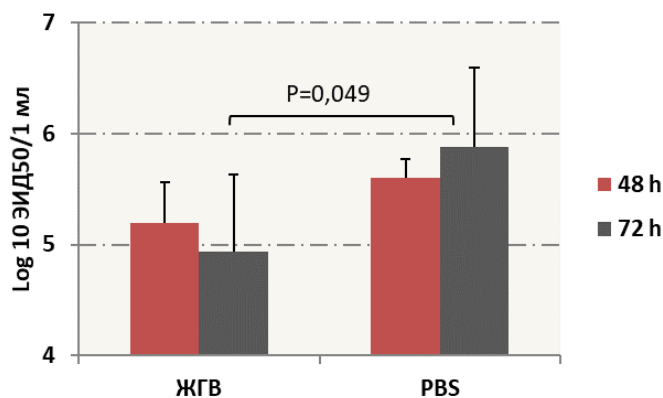


Рис. 2. Выделение заражающего вируса А/Южная Африка/3626/13 (H1N1)pdm09 из легких мышей через 48 и 72 часа после вирусной инфекции на 5-й день после иммунизации (n=6).

Для оценки факторов врожденного иммунитета при первичном контакте вакцинного вируса гриппа с клетками иммунной системы мы использовали анализ экспрессии генов ранних цитокинов в клеточной культуре ТНР-1. На ранних стадиях инфекции, макрофаги продуцируют значительные количества противовирусных цитокинов и интерферонов 1 типа (в большей степени, чем

эпителиальные клетки), провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6), а также хемокинов, вовлеченных в процесс миграции лейкоцитов из циркуляции в очаг воспаления [7].

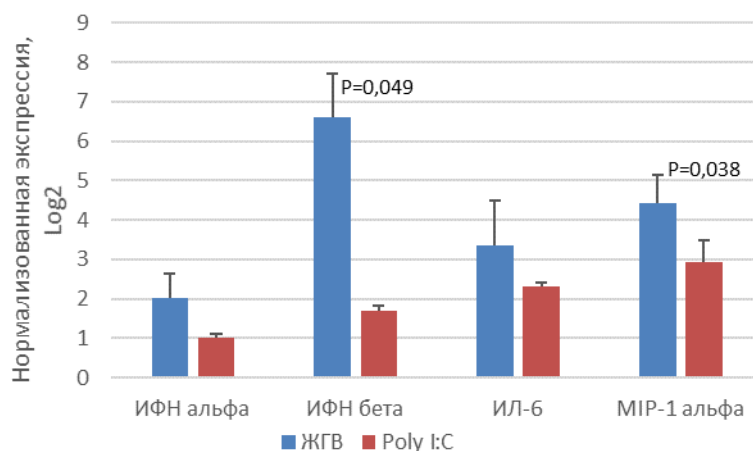


Рис. 3. Нормализованная экспрессия м-РНК интерферонов 1 типа, ИЛ-6 и MIP-1 альфа в клеточной культуре THP-1

Показано статистически значимое повышение уровней м-РНК ИФН-бета и MIP-1-альфа при внесении в клетки THP-1 вакцинного вируса A(H7N3) (Рис.3). Выявлено повышение экспрессии ИФН-альфа и ИЛ-6, которое не было статистически значимым. Система интерферонов представляет собой главный гуморальный фактор врожденной противовирусной защиты. Интерфероны 1 типа (ИФН-альфа, ИФН-бета) продуцируются непосредственно в ответ на введение вируса, после чего они частично подавляют репликацию вируса и ограничивают распространение вирусного потомства. Синтез интерферонов 1 типа приводит к образованию в клетках IL-6, IL-12, IL-18 и TNF- α . Интерфероны типа 1 альфа / бета оказывают противовирусное действие как в инфицированных, так и в неинфицированных клетках и различными способами регулируют врожденный и адаптивный иммунитет не только против вирусных, но также бактериальных и многих других патогенов [8]. Раннее защитное действие ЖГВ может быть связано с эффектом предстимулирования, поскольку ранее было показано, что респираторные клетки вакцинированных мышей, обработанных определенными дозами интерферона, вырабатывали больше интерферона, чем у невакцинированных мышей [9].

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунизация ЖГВ частично защищала мышей против летальной гриппозной инфекции уже в течение первой недели после вакцинации. Это является важным для успешного применения ЖГВ в период сезонного подъема заболеваемости, вызванной не только вирусами гриппа, но и другими возбудителями острых респираторных заболеваний. Изучение экспрессии ранних цитокинов и интерферонов при вирусной инфекции и вакцинации будет способствовать лучшему пониманию взаимодействия иммунных механизмов и изучению независимых функций цитокинов в последовательной регуляции неспецифической защиты от вирусных инфекций.

Список литературы

1. Grohskopf L.A., Alyanak E., Broder K.R., Walter E.B., Fry A.M., & Jernigan D.B. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices-United States, 2019–20 influenza season [Текст] / L.A. Grohskopf // MMWR Recommendations and reports. – 2019. – №68 (3).

2. Reed L.J. Simple method of estimating fifty percent endpoints [Текст] / L.J. Reed // American Journal of Hygiene. – 1938. – P. 493–497.

3. Richard Pebody, Jim McMenamin, Hanna Nohynek. Live attenuated influenza vaccine (LAIV): recent effectiveness results from the USA and implications for LAIV programmes elsewhere [Текст] / Pebody Richard // Arch Dis Child. – 2018. – №103. – P. 101–105.

4. Belshe R.B., Toback S.L., Yi T., & Ambrose C.S. Efficacy of live attenuated influenza vaccine in children 6 months to 17 years of age [Текст] / R.B. Belshe // Influenza and other respiratory viruses. – 2010. – №4 (3). – P. 141–145.

5. Tsuchiya S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) // International journal of cancer. – 1980. – Т. 26, №2. – С. 171–176.

6. Fortier M.E. et al. The viral mimic, polyinosinic: polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism // American Journal of

Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. – 2004. – Т. 287, №4. – С. R759-R766.

7. Julkunen I., Sareneva T., Pirhonen J., Ronni T., Melen K., et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression // J. Cytokine & Growth Factor Reviews-2001. – Vol. 12. – Pp. 171–180.

8. McNab F. et al. Type I interferons in infectious disease // Nature Reviews Immunology. – 2015. – Т. 15, №2. – С. 87–103.

9. Liedmann S. et al. New virulence determinants contribute to the enhanced immune response and reduced virulence of an influenza A virus A/PR8/34 variant // The Journal of infectious diseases. – 2014. – Т. 209, №4. – С. 532–541.

Ландграф Галина – аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Россия, Санкт-Петербург.

Рекстин Андрей Роальдович – ведущий научный сотрудник отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Россия, Санкт-Петербург.

Дешева Юлия Андреевна – д-р мед. наук, профессор, доцент, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Россия, Санкт-Петербург.
