

Кузнецова С.А., Исакова-Сивак И.Н., Кузнецова В.А., Петухова Г.Д., Лосев И.В., Донина С.А., Руденко Л.Г.,
Найхин А.Н.

Влияние точечных мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) на иммунный ответ мышей

ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАН, 197376, г. Санкт-Петербург

Вакцинные штаммы для живых гриппозных вакцин (ЖГВ) холодоадаптированы и имеют температурочувствительный и ослабленный фенотип за счет наличия специфических мутаций во внутренних генах от донора аттенуации. В данной работе мы использовали мутантные штаммы патогенного вируса А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), содержащие *ts*-мутации в генах *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L) и *PA* (L28P, V341L) отдельно или в различных комбинациях, с целью оценить вклад этих мутаций в формирование иммунного ответа. Последовательное внесение тестируемых мутаций приводит к ступенчатому снижению уровней вирусспецифических антител в сыворотке крови и в меньшей степени – мукозальных антител. Мы продемонстрировали сильную положительную корреляцию между аттенуацией вируса (титр вируса в легких) и титрами антител. *Ts*-мутации в *PB1*, *PB2* и *PA* генах участвуют главным образом в модуляции гуморального иммунитета и незначительно влияют на формирование клеточного адаптивного иммунного ответа.

Ключевые слова: живая гриппозная вакцина; гены полимеразного комплекса; иммунный ответ.
Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 25–30.

Kuznetsova S.A., Isakova-Sivak I.N., Kuznetsova V.A., Petukhova G.D., Losev I.V., Donina S.A.,
Rudenko L.G., Naikhin A.N.

Effect of Point Mutations in the Polymerase Genes of the Influenza A/PR/8/34 (H1N1) Virus on the Immune Response in a Mouse Model

Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, 197376, St. Petersburg, Russia

The vaccine strains for live attenuated influenza vaccines (LAIVs) have cold-adapted, temperature-sensitive, and attenuated phenotypes, which are guaranteed by the presence of specific mutations from the master donor virus in their internal genes. In this study, we used mutant viruses of the pathogenic A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) that contained *ts*-mutations in *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L), and *PA* (L28P, V341L) genes along and/or in different combinations to evaluate the impact of these mutations in the immune responses. Sequential addition of tested mutations resulted in the stepwise decrease in virus-specific serum and, to a lesser extent, mucosal antibody levels. We demonstrated strong positive correlation between virus attenuation (virus titer in lung) and antibody titers. The *ts*-mutations in *PB1*, *PB2*, and *PA* genes are mostly involved in the modulation of the humoral immunity, but also have a moderate effect on the cellular adaptive immune response.

Key words: live attenuated influenza vaccine; polymerase complex genes; immune response.
Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60 (2): 25–30. (In Russ.)

For correspondence: Svetlana Kuznetsova, candidate of biological Sciences; e-mail: kuznetsova4872@yahoo.co.uk

Введение

В инфекционной иммунологии важным и перспективным направлением является изучение зависимости формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа от генотипических особенностей возбудителя и хозяина. Применительно к противогриппозной вакцинации, в том числе противогриппозной, наибольшую актуальность приобретает исследование вопроса о связи естественных и искусственно приобретенных мутаций в генах вакцинных штаммов с количественными и качественными характеристиками поствакцинального адаптивного иммунитета [1, 2].

В настоящее время важными и наиболее эффективными методами профилактики гриппа являются живые (ЖГВ) и инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ). Принцип приготовления ЖГВ типа А основан на включении в вакцинный штамм с помощью реассортации генов поверхностных белков от дикого актуального вируса и генов внутренних белков от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России или А/

Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США. Первые обеспечивают достаточную иммуногенность вакцинных кандидатов, а вторые – аттенуацию, что гарантирует безвредность живой вакцины.

Ведущую роль в аттенуации вирусов гриппа играют гены полимеразного комплекса [3, 4]. В процессе приготовления донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), основанного на длительном пассировании дикого вируса при пониженной температуре, были приобретены стабильные мутации в полимеразных генах, которые приводят к неспособности вируса репродуцироваться в нижних отделах респираторного тракта привитых. Однако данные мутации отсутствуют в генах длительно циркулирующих вирусов гриппа А(H1N1) и А(H3N2), к которым и формируется иммунологическая память населения. В этой связи возникла необходимость изучить влияние отдельных точечных мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA* на полноценность развития адаптивного противогриппозного иммунного ответа. В данной работе представлены результаты исследований мутантных штаммов модельного патогенного вируса гриппа А/

PR/8/34 (H1N1), содержащие отдельные точечные мутации и/или их комбинации в генах *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L) и *PA* (L28P, V341L), с целью изучения индивидуального влияния этих мутаций на формирование системного гуморального и Т-клеточного иммунитета.

Материалы и методы

Вирусы. Все мутантные штаммы патогенного вируса A/PR/8/34 (H1N1) получены методом обратной генетики. Использовали плазмидные векторы с двунаправленным считыванием, в которые были клонированы все гены вируса A/PR/8/34 (H1N1). Точечный мутагенез осуществляли при помощи коммерческого набора QuikChange XL sitedirected mutagenesis kit («Stratagen», Калифорния, США), следуя рекомендациям производителя. Штаммы получали путем трансфекции клеток линии НЕК-293Т набором из 8 плазмид, несущих все гены соответствующего мутанта. Полученные штаммы, содержащие мутации *PB1* (K265N, V591I), *PB2* (V478L), *PA* (L28P, V341L) отдельно и/или в различных комбинациях, полностью секвенировали с помощью коммерческого набора реагентов BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit («Applied Biosystems») и автоматического капиллярного секвенатора 3130x1 Genetic Analyzer («Applied Biosystems»). Температурочувствительность (ts-фенотип) мутантных штаммов оценивали методом бляшкообразования в культуре клеток MDCK при оптимальной и повышенной температурах (33, 37 и 38°C). Для определения инфекционности и патогенности полученных штаммов мышей линии СВА инфицировали интраназально различными дозами этих вирусов. На 3-й день после инфицирования наличие вируса проверяли в нижних отделах дыхательного тракта титрованием 10% суспензии гомогенатов тканей в развивающихся куриных эмбрионах с последующим определением 50% инфекционной дозы (МИД₅₀) по методу Рида и Менча. Оставшихся животных наблюдали в течение 14 дней, осуществляя осмотр, взвешивание и подсчет выживших животных с последующим определением 50% летальной дозы (МЛД₅₀) по методу Рида и Менча.

Иммуногенность вирусов. Мышей линии СВА иммунизировали однократно под наркозом интраназально тестируемыми мутантными штаммами в дозе 100 МИД₅₀. Контрольные животные получали физиологический раствор. Содержание противовирусных антител в сыворотках крови лабораторных животных определяли с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА) на 28-й день после заражения. РТГА выполняли по общепринятой методике с использованием 1% суспензии куриных эритроцитов и 4 ГАЕ на 50 мкл патогенного штамма A/PR/8/34 (H1N1). С помощью ИФА определяли содержание IgG-, IgA- и IgM-антител к цельному вирусу A/PR/8/34 (H1N1), очищенному на градиенте плотности сахарозы и сорбированному на пластике в концентрации 16 ГАЕ/50 мкл. За титр антител принимали последнее разведение образцов, оптическая плотность которых в 2 и более раз превышала среднее значение оптической плотности контрольных проб, содержащих физиологический раствор вместо образцов сывороток крови. Распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенках мышей на 7-й и 28-й дни после заражения определяли методом иммунофенотипирования при помощи проточного цитофлюориметра Navios («BeckmanCoulter») и комбинации моноклональных антител, конъюгированных с флюорохромами: FITC anti-CD4, PC 5,5 anti-CD8 («BeckmanCoulter», США), APC anti-CD62L, PE anti-CD44 («BD PharMingen», США).

Статистическая обработка данных. При анализе

полученных результатов определяли средние величины и стандартные отклонения ($M \pm CO$). Статистическую достоверность различий оценивали с использованием компьютерной программы с проведением U-теста Манна–Уитни.

Результаты

В данной работе использовали вирусы, полученные методом обратной генетики, на основе штамма A/PR/8/34 (H1N1), который был выбран благодаря своей высокой вирулентности и иммуногенности для мышей. Тестируемые штаммы содержат мутации в генах полимеразного комплекса (отдельно или в различных комбинациях), соответствующие ts-мутациям донора аттенуации ЖГВ A/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Как видно из табл. 1, данные мутантные штаммы значительно различаются по своей способности инфицировать нижние дыхательные пути мышей и вирулентности. Уровни репродукции вирусов в легких *in vivo* находились в обратной зависимости от степени температурочувствительности *in vitro* в культуре клеток MDCK. Наибольшие титры вируса в легких и, наоборот, низкие значения (МЛД₅₀) отмечены у штаммов с отсутствием ts-фенотипа (non-ts) и штамма со слабо выраженным ts-фенотипом (ts+). В совокупности это свидетельствует об их высокой патогенности для мышей. Самыми аттенуированными являются штаммы с хорошо выраженным ts-фенотипом (ts++ и ts+++), что опосредовано двумя аминокислотными заменами в *PB1* (K265N) и *PB2* (V478L), тремя заменами в *PB1* (K265N, V591I) и *PB2* (V478L) или полным набором тестируемых мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA*.

Для определения иммуногенности мышей линии СВА иммунизировали интраназально тестируемыми вирусами в дозе 100 МИД₅₀. Как видно из табл. 2, комбинированное внесение тестируемых мутаций в генах *PB1*, *PB2* и *PA* приводит к значительному и статистически достоверному снижению продукции антигемагглютинирующих и вирусспецифических IgG- и IgA-антител (по данным РТГА и ИФА соответственно) в сыворотках крови мышей по сравнению с патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1). Следует отметить, что мутации в *PB1*-гене отдельно практически не изменяют продукцию противовирусных антител, а в комбинации с мутациями в *PA*-гене незначительно ее снижают. При этом единичная аминокислотная замена в *PB2*-гене приводит к более выраженному изменению продукции антител, а в комбинации с мутациями в *PB1*-и/или *PA*-генах было обнаружено дополнительное градуированное снижение системного гуморального иммунного ответа. Продукция противовирусных IgM-антител была менее выражена и практически не изменялась по сравнению с контрольным штаммом (данные не приведены). Дополнительно было показано, что только сочетание мутаций в *PB1*- и *PB2*- или в *PB1*; *PB2*- и *PA*-генах приводит к достоверному снижению общего количества вирусспецифических антител Ig(G+A+M) в смывах верхних дыхательных путей по сравнению с патогенным вирусом (среднегеометрические титры (СГТ) – 1,55, 0,85 и 16,74 соответственно).

Таким образом, мутантные штаммы с аминокислотными заменами в *PB1*- и *PB2*- генах отдельно или с комбинированными заменами в *PB1*- или *PA*-генах были слабоаттенуированными и одновременно обладали высокой иммуногенностью. В то же время замена одной или двух аминокислот в *PB1*-гене в сочетании с заменой в *PB2*-гене приводила к значительному увеличению аттенуации и снижению иммуногенности. Следует отметить, что исключение двух мутаций в *PA*-гене из полного набора тестируемых мутаций приводит

Вирусологические характеристики мутантных штаммов вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1)

Штамм*	Наличие (+) или отсутствие (-) мутаций в генах полимеразного комплекса				Инфекционный титр вируса в культуре ткани MDCK, (\log_{10} БОЕ/мл \pm ССО**, при температуре			Тs-фенотип***	Титр вируса в легких, \log_{10} \pm ССО	МЛД ₅₀
	PB1		PB2	PA	33°C	37°C	38°C			
	K265N (a)	V591I (b)	V478L	L28P V341L						
PR8-wt	-	-	-	-	8,7 \pm 0,0	8,8 \pm 0,0	8,7 \pm 0,3	non-ts	6,68 \pm 0,40	3,6
PB1+PB2+PA	+	+	+	+	8,4 \pm 0,1	5,7 \pm 0,4	3,7 \pm 0,0	ts+++	1,78 \pm 0,51	\geq 6,5
PB1	+	+	-	-	9,1 \pm 0,2	8,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,2	non-ts	5,73 \pm 0,46	4,2
PB1+PA	+	+	-	+	8,6 \pm 0,2	8,1 \pm 0,1	7,2 \pm 0,7	non-ts	3,36 \pm 1,2	4,2
PB2	-	-	+	-	8,5 \pm 0,4	7,7 \pm 0,1	6,4 \pm 0,0	ts+	4,30 \pm 1,01	4,5
PB1a+PB2	+	-	+	-	9,0 \pm 0,1	7,2 \pm 0,2	4,3 \pm 0,5	ts++	2,58 \pm 1,70	5,8
PB1+PB2	+	+	+	-	8,8 \pm 0,2	6,5 \pm 0,1	3,9 \pm 0,4	ts+++	2,10 \pm 1,11	\geq 6,5

Примечание. * – обозначение мутантного штамма соответствует наличию в полимеразных генах вируса А/PR/8/34 (H1N1) мутаций, уникальных для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2); ** ССО – среднее стандартное отклонение; *** – non-ts – температуроустойчивый; ts+ – температурочувствительный, разница титров при 33 и 38°C составляет 2,0–3,0 \log_{10} БОЕ, при 33 и 37°C может быть $<$ 2,0 \log_{10} БОЕ; ts++ – температурочувствительный, разница титров при 33°C и 38°C составляет 3,0–4,0 \log_{10} БОЕ, при 33°C и 37°C – может быть $<$ 2,0 \log_{10} БОЕ; ts+++ – температурочувствительный, разница титров при 33 и 38°C \geq 4,0 \log_{10} БОЕ; при 33 и 37°C \geq 2,0 \log_{10} БОЕ.

к увеличению продукции противовирусных антител в сыворотке крови, при этом сохраняется достаточно высокая степень аттенуации. Исследование выявило положительную корреляцию между титром вируса в легких и уровнями продукции антигемагглютинирующих антител ($r = 0,890$) и вирусспецифических IgG- и IgA-антител ($r = 0,878$ и $r = 0,925$ соответственно) в сыворотках крови лабораторных животных. В целом полученные результаты свидетельствовали о сопряженности аминокислотных замен в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А с развитием гуморального иммунного ответа.

При контроле эффективности противовирусных вакцин и прогнозе развития и течения инфекционных заболеваний в целом значительную ценность представляет оценка динамики изменения субпопуляционного состава Т-клеток. Фенотипический анализ уровня экспрессии CD62L- и CD44-маркеров на поверхности CD4⁺- и CD8⁺-клеток выявил незначительные изменения пропорции субпопуляций Т-лимфоцитов. При сравнении влияния тестируемых мутантных штаммов на распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке мышей учитывали кратность изменения полученных показателей по отношению к таковым в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор (см. рисунок). На 7-й день после

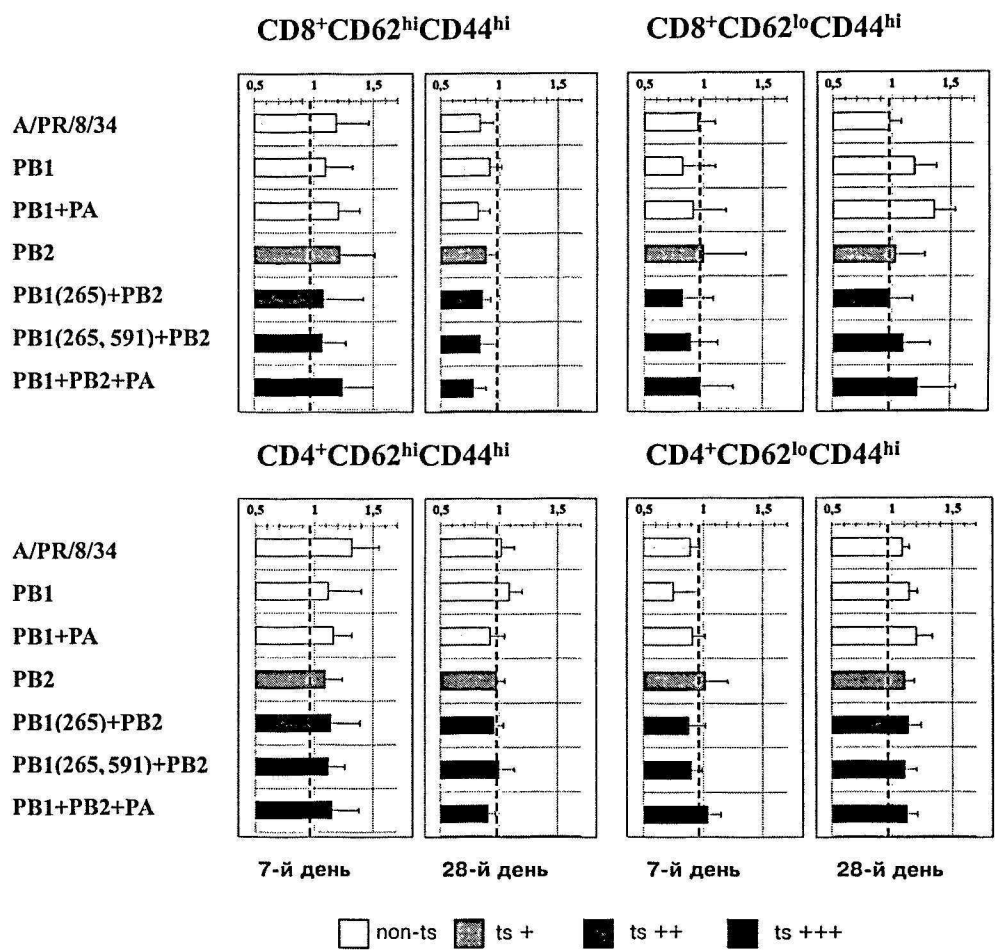
инфекции было показано достоверное различие между кратностью изменения CD4⁺CD62L^{lo}CD44^{hi} клеток, индуцированной патогенным А/PR/8/34 и вирусом, содержащим весь набор тестируемых мутаций в PB1-, PB2- и PA-генах (0,89 \pm 0,08 и 1,04 \pm 0,11 соответственно). Наоборот, на 28-й день кратность изменения CD8⁺CD62L^{lo}CD44^{hi}-клеток, вызванная патогенным вирусом, достоверно отличалась от индуцированной вирусами, содержащими мутации в PB1-гене отдельно или в комбинации с PA (0,98 \pm 0,10, 1,19 \pm 0,19 и 1,36 \pm 0,18 соответственно). Была обнаружена некоторая положительная корреляция между титром вируса в легких на 3-й день после инфекции и кратностью изменения количества CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток по отношению к контрольной группе на 7-й и 28-й дни ($r = 0,626$ и $r = 0,707$), в то время как корреляция между уровнем аттенуации и изменением количества CD8⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток на 28-й день практически отсутствовала ($r = 0,435$). Изменения количества CD4⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток относительно контроля на 28-й день положительно коррелировали с уровнями противовирусных IgG и IgA антител в сыворотках крови мышей ($r = 0,847$ и $r = 0,702$), в случае CD8⁺CD62L^{hi}CD44^{hi} Т-клеток подобная корреляция была гораздо менее выраженной ($r = 0,606$ и $r = 0,497$).

Таблица 2

Иммуногенность мутантных штаммов вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) – продукция сывороточных антител

Штамм	Наличие (+) или отсутствие (-) мутаций в генах полимеразного комплекса				Обратные титры вирусспецифических антител, (\log_{10} \pm ССО) в сыворотках крови мышей на 28-й день после инфекции		
	PB1		PB2	PA	РТГА	ИФА	
	K265N (a)	V591I (b)	V478L	L28P, V341L		IgG	IgA
PR8-wt	-	-	-	-	7,17 \pm 0,56	12,52 \pm 0,64	10,19 \pm 1,02
PB1+PB2+PA	+	+	+	+	3,87 \pm 0,31***	9,10 \pm 1,25***	6,35 \pm 0,75***
PB1	+	+	-	-	7,16 \pm 0,75	12,82 \pm 0,87	9,93 \pm 1,13
PB1+PA	+	+	-	+	6,43 \pm 0,51	11,31 \pm 0,80*	9,11 \pm 0,55*
PB2	-	-	+	-	5,75 \pm 0,99*	11,31 \pm 1,13	8,86 \pm 0,60*
PB1(a)+PB2	+	-	+	-	3,69 \pm 1,21**	9,69 \pm 1,34***	8,48 \pm 1,93
PB1+PB2	+	+	+	-	4,95 \pm 1,04**	10,51 \pm 1,00**	7,63 \pm 1,81**

Примечание. Различия между средними величинами обратных титров противовирусных антител, индуцированных патогенным вирусом гриппа А/PR/8/34 (H1N1) и мутантными штаммами, статистически достоверны при: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.



Влияние мутантных штаммов на распределение субпопуляций Т-лимфоцитов в селезенке мышей на 7-й и 28-й дни после инфекции. Фенотипический анализ уровня экспрессии CD62L и CD44 маркеров на поверхности CD4+ и CD8+ Т-клеток методом проточной цитофлюориметрии с последующим учетом кратности изменения полученных показателей по отношению к таковым в контрольной группе животных, получавших физиологический раствор.

Полученные результаты в целом указывают на влияние индивидуальных и/или комбинаторных аминокислотных замен в *PB1*, *PB2* и *PA*-генах вируса гриппа А, соответствующих таковым в генах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), на аттенуацию и иммуногенность мутантных штаммов. При этом была отмечена значительная роль тестируемых мутаций в процессе формирования системного гуморального иммунного ответа и зависимость амплитуды этого ответа от степени аттенуации мутантных штаммов. В то же время влияние этих мутаций на перераспределение пропорции клеточных субпопуляций Т-лимфоцитов было незначительным и скорее всего непосредственно не зависело от аттенуирующих свойств вируса.

Обсуждение

Ежегодная потребность в создании ЖГВ и эффективность их применения требуют постоянного совершенствования новых вакцинных кандидатов. Оптимизация соотношений между аттенуирующими свойствами, гарантирующими безопасность, и иммуногенностью, которая обеспечивает собственно защиту организма, будет неизбежно способствовать улучшению качества ЖГВ. Ранее нами и другими авторами было показано снижение продукции анти-

гемагглютинирующих антител в сыворотках крови, индуцированной ЖГВ, по сравнению с исходным патогенным вирусом, из которого вакцинные штаммы были приготовлены [5–8]. Поскольку подобные потери иммуногенности вакцинного штамма не могут быть связаны с генами, кодирующими поверхностные белки, так как они приобретены от дикого вируса, возникло предположение о связи данного процесса с генами, перенесенными от донора аттенуации. В первую очередь это касается генов полимеразного комплекса, которые обеспечивают аттенуацию вакцинного штамма [3]. В настоящее время охарактеризованы генетически стабильные мутации холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) [4, 9, 10]. Для изучения вопроса о влиянии на иммуногенность этих мутаций в отдельности или в совокупности были получены обратногогенетические штаммы вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) с разными комбинациями *ts*-мутаций в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах, соответствующие таковым в генах А/Ленинград/134/17/57 (H2N2). В последнее время особое внимание уделяется вопросу об улучшении и упрощении создания ЖГВ с помощью обратной генетики [11–14]. Уход от реассортационного способа достижения аттенуации вакцинных штаммов позволит

непосредственно переносить в гены дикого вируса набор необходимых ts-мутаций, соответствующий мутациям в генах донора аттенуации.

В данной работе было показано, что мутантные штаммы, содержащие разное количество и/или сочетание аминокислотных замен в полимеразных генах, демонстрируют широкий спектр выраженности как аттенуирующих, так и иммуногенных свойств. При этом, с одной стороны, каждая из тестируемых мутаций вносит свой вклад в изменение свойств вируса, а с другой, амплитуда этих изменений варьирует и зависит не только и не столько от количества аминокислотных замен, но и от их комбинированного действия. Так, исключение 1 мутации в *PB2*-гене (V478L), 3 мутаций в *PB2*(V478L) и *PA* (L28P, V341L) или 4 мутаций в *PB1* (K265N, V591I) и *PA* (L28P, V341L) приводит к увеличению иммуногенности в той или иной степени по сравнению с максимально аттенуированным штаммом, содержащим полный набор тестируемых мутаций. Однако указанные выше штаммы сохраняли патогенные свойства, которые мало отличались от таковых вируса A/PR/8/34 (H1N1)wt. Наоборот, исключение 2 мутаций в *PA*-гене из полного набора тестируемых мутаций приводит к увеличению продукции противовирусных антител в сыворотке крови, при этом сохраняется достаточно высокая степень аттенуации. В целом, полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы относительно роли отдельных мутаций в генах полимеразного комплекса, соответствующих ts-мутациям донора аттенуации A/Энн Арбор/6/60 (H2N2), который используется при создании ЖГВ в США, в формировании системного гуморального иммунитета [8, 15, 16].

Холодоадаптированные вакцинные кандидаты, полученные с помощью реассортации генов по общепринятой формуле 2/6 на основе донора A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в России или A/Энн Арбор/6/60 (H2N2) в США и объединяющие в себе HA и NA от современного эпидемического вируса и 6 генов внутренних белков донора аттенуации, оказываются лишены антигенных дрейфовых изменений, которые происходят в последних. В результате многие иммунодоминантные эпитопы внутренних белков новых дрейфовых вариантов вирусов гриппа А и реассортантов вакцинных штаммов существенно различаются [17–19], что в свою очередь может влиять на формирование адаптивного иммунного ответа.

Вакцинация с использованием ЖГВ, в отличие от ИГВ, моделирует естественную инфекцию и вызывает не только выраженный системный гуморальный иммунный ответ, но и одновременно обеспечивает защиту, опосредованную мукозальными антителами и Т-лимфоцитами [20]. Секреторные антитела играют ключевую роль в резистентности к инфекции, в то время как сывороточные антитела защищают нижние отделы респираторного тракта. Наряду с гуморальным иммунитетом, обеспечивающим основную защиту при гомотипической инфекции, при гетеротипической инфекции большое значение имеет иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами [1]. Проведенное исследование выявило неоднозначное влияние мутаций в генах полимеразного комплекса вируса гриппа А на индукцию разных звеньев иммунной системы. Наиболее выраженное действие ts-мутации в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах оказывают на продукцию системных противовирусных антител классов А и G, причем в этом случае сочетание мутаций приводит к синергизму. Продукция противовирусных антител класса М в сыворотках крови, индуцированная мутантными штаммами, изменялась незначительно по сравнению

с контрольным патогенным вирусом и не зависела от количества и места локализации аминокислотных замен. Достоверные изменения продукции локальных антител в сыворотках верхних дыхательных путей были вызваны только двумя тестируемыми штаммами, которые содержали комбинации мутаций в *PB1*- и *PB2*-генах или в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах. Примечательно, что в данной работе мы не обнаружили какой-либо четкой связи между наличием или композиционным сочетанием тестируемых мутаций и интенсивностью стимуляции Т-лимфоцитов. Динамические изменения пропорциональных соотношений субпопуляций наивных, эффекторных и Т-клеток памяти, индуцированных патогенным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) и всеми тестируемыми мутантными штаммами, различались очень незначительно. Это дает основание предположить, что наличие точечных мутаций в генах, кодирующих белки полимеразного комплекса вируса гриппа А, не отражается на формировании адаптивного иммунного ответа, опосредованного CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами. Однако с полной уверенностью об этом можно будет судить после дополнительных исследований, направленных на изучение функциональной активности вирусспецифических субпопуляций этих лимфоцитов.

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует индивидуальное и сочетанное влияние ts-мутаций в *PB1*-, *PB2*- и *PA*-генах вируса гриппа А на обеспечение низкой реактогенности вакцинных кандидатов, с одной стороны, и на индукцию различных звеньев противовирусного иммунитета – с другой. Полученные результаты представляют платформу для дальнейшего поиска оптимальных соотношений между факторами, гарантирующими безвредность и одновременно высокую иммуногенность живой вакцины, что в свою очередь позволит значительно эффективнее защитить население в случае пандемии.

Работа была поддержана грантом РФФИ №12-04-31364 мол_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 2011; 162(1–2): 19–30.
2. Программа фундаментальных научных исследований государственных академий на 2013–2020 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 3 декабря 2012 N2237-р), подраздел 205 «Получение новых знаний о механизмах постинфекционной и поствакцинальной иммунологии». М.; 2012.
3. Киселева И.В., Ларионова Н.В., Voeten J.T.M., Teley L.C., Drieszen-van der Crujisen S.K., Heldens J.G. и др. Ведущая роль генов полимеразного комплекса в аттенуации доноров отечественной живой гриппозной вакцины А и В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии.* 2010; 6: 41–7.
4. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G. et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of A master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57(H2N2). *Virology.* 2011; 412 (2): 297–305.
5. Донина С.А., Найхин А.Н., Петухова Г.Д., Баранцева И.Б., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П. и др. Системный гуморальный и клеточный иммунный ответ при экспериментальной гриппозной инфекции и вакцинации. *Медицинская иммунология.* 2006; 8 (1): 31–6.
6. Петухова Г.Д., Найхин А.Н., Баранцева И.Б., Донина С.А., Чиркова Т.В., Григорьева Е.П. и др. Локальный гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей при гриппозной инфекции и вакцинации. *Медицинская иммунология.* 2006; 8 (4): 511–6.
7. Petukhova G., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Naykhin A., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine.* 2009; 27(19): 2580–87.

8. Znou B., Li Y., Speer S. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691–702.
9. Jin H., Zhou H., Lu B., Kembler G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto/Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78(2): 995–8.
10. He W., Wang W., Han H., Wang L., Zhang G., Gao B. Molecular basis of live-attenuated influenza virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e60413.
11. Gabriel G., Garn H., Wegmann M., Renz H., Herwing A., Klenk H.-D. et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*. 2008; 26(7): 956–65.
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C. et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18–24.
13. Mueller S., Coleman J.R., Papamichail D., Ward C.B., Nimnual A., Fitcher B. et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (7): 723–6.
14. Solorzano A., Ye J., Perez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virology*. 2010; 84(9): 4587–96.
15. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature and attenuating mutation. *J. Virology*. 1993; 67: 7223–8.
16. Subbarao E.K., Park E. J.U, Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virology*. 1995; 69(10): 5969–77.
17. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintercolaas K., Osterhaus A.D. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2002; 76(5): 2567–72.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.
5. Donina S.A., Naykhin A.N., Petukhova G.D., Barantseva I.B., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P. et al. Systemic humoral and cellular immune response in an experimental influenza infection or vaccination. *Meitsinskaya Immunologiya*. 2006; 8 (1): 31–6. (in Russian)
6. Petukhova G.D., Naykhin A.N., Barantseva I.B., Donina S.A., Chirkova T.V., Grigor'eva E.P., et al. The local humoral and cellular immune response of mice with influenza infection and vaccination. *Meitsinskaya Immunologiya*. 2006; 8 (4): 511–6. (in Russian)
7. Petukhova G., Chirkova T., Donina S., Korenkov D., Naykhin A., Rudenko L. Comparative studies of local antibody and cellular immune responses to influenza infection and vaccination with live attenuated influenza vaccine (LAIV) utilizing a mouse nasal-associated lymphoid tissue (NALT) separation method. *Vaccine*. 2009; 27(19): 2580–87.
8. Znou B., Li Y., Speer S. Engineering temperature sensitive live attenuated influenza vaccines from emerging viruses. *Vaccine*. 2012; 30(24): 3691–702.
9. Jin H., Zhou H., Lu B., Kembler G. Imparting temperature sensitivity and attenuation in ferrets to A/Puerto/Rico/8/34 influenza virus by transferring the genetic signature for temperature sensitivity from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *J. Virol.* 2004; 78(2): 995–8.
10. He W., Wang W., Han H., Wang L., Zhang G., Gao B. Molecular basis of live-attenuated influenza virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e60413.
11. Gabriel G., Garn H., Wegmann M., Renz H., Herwing A., Klenk H.-D. et al. The potential of a protease activation mutant of a highly pathogenic avian influenza virus for a pandemic live vaccine. *Vaccine*. 2008; 26(7): 956–65.
12. Jin H., Lu B., Zhou H., Ma C., Zhao J., Yang C. et al. Multiple amino acid residues confer temperature sensitivity to human influenza virus vaccine strains (FluMist) derived from cold-adapted A/Ann Arbor/6/60. *Virology*. 2003; 306: 18–24.
13. Mueller S., Coleman J.R., Papamichail D., Ward C.B., Nimnual A., Fitcher B. et al. Live attenuated influenza virus vaccines by computer-aided rational design. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (7): 723–6.
14. Solorzano A., Ye J., Perez D.R. Alternative live-attenuated influenza vaccines based on modifications in the polymerase genes protect against epidemic and pandemic flu. *J. Virology*. 2010; 84(9): 4587–96.
15. Subbarao E.K., Kawaoka Y., Murphy B.R. Rescue of an influenza A virus wild-type PB2 gene and a mutant derivative bearing a site-specific temperature and attenuating mutation. *J. Virology*. 1993; 67: 7223–8.
16. Subbarao E.K., Park E. J.U, Lawson C.M., Chen A.Y., Murphy B.R. Sequential addition of temperature-sensitive missense mutations into the PB2 gene of influenza A transfectant viruses can effect an increase in temperature sensitivity and attenuation and permits the rational design of a genetically engineered live influenza A virus vaccine. *J. Virology*. 1995; 69(10): 5969–77.
17. Boon A.C., de Mutsert G., Graus Y.M., Fouchier R.A., Sintercolaas K., Osterhaus A.D. Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2002; 76(5): 2567–72.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.

REFERENCES

1. Kreijtz J.H., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*. 2011; 162(1–2): 19–30.
2. Program of fundamental research of the state academies for 2013–2020 years (Decree of the Russian Federation dated December 3, 2012 N2237-p), subsection 205 “Obtaining of new knowledge about the mechanisms of post-infection and post-vaccinal immunology” Moscow; 2012. (in Russian)
3. Kiseleva I.V., Larionova N.V., Voeten J.T., Teley L.C., Drieszen-van-der-Crujjsen S.K., Heldens J.G. et al. Leading role of genes coding polymerase complex in attenuation of domestic donor viruses for A and B live influenza vaccine. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii*. 2010; 6: 41–7. (in Russian)
4. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T., Kiseleva I., Heldens J.G. et al. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of A master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57(H2N2). *Virology*. 2011; 412 (2): 297–305.
18. Rimmelzwaan G.F., Boon A.C., Voeten J.T., Berkhoff E.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from Cytotoxic T lymphocytes. *Virus Res*. 2004; 103 (1–2): 97–100.
19. Voeten J.T., Bestebroer T.M., Nieuwkoop N.J., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by Cytotoxic T lymphocytes. *J. Virology*. 2000; 74 (15): 6800–7.
20. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra E.P. Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scand. J. Immunol.* 2004; 59(1): 1–15.

Поступила 22.02.14
Received 22.02.14