



Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные

Фалынскова И.Н.¹, Егоров А. Ю.^{1,2}, Поддубиков А.В.¹, Вартанова Н.О.¹, Карташова Н.П.¹, Глубокова Е.А.¹, Мхитаров В.А.³, Джалилова Д.Ш.³, Макарова О.В.³, Ленева И.А.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева», 197022, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, Москва, Россия

Введение. Грипп – тяжёлое вирусное заболевание, его частым осложнением являются вторичные бактериальные пневмонии. Предотвратить вторичные бактериальные осложнения позволяют гриппозные вакцины. Одним из перспективных направлений создания новых вакцин является создание вирусоподобных частиц (ВПЧ), в том числе несущих отдельные вирусные белки.

Цель настоящей работы – изучение корреляции патоморфологической характеристики лёгких с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания при вакцинации ВПЧ, несущими гемагглютинин вируса гриппа (HA-Gag-ВПЧ), на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, индуцированной гомологичным и гетерологичным штаммами вируса гриппа.

Материал и методы. Самок мышей линии BALB/c массой тела 12–14 г вакцинировали HA-Gag-ВПЧ, через 21 день инфицировали двумя штаммами вирусами гриппа (гомологичным и гетерологичным), а ещё через 5 дней инфицировали *S. pneumoniae*. Эффект вакцинации оценивали по морфологическим, вирусологическим (титр вируса в лёгких) и микробиологическим (титр бактерий в лёгких) данным и подтверждали клиническими показателями (выживаемость, изменение массы тела).

Результаты. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ с последующим инфицированием гомологичным вирусом гриппа и *S. pneumoniae* уменьшала площадь очагов воспаления в лёгких, ингибировала размножение вируса и бактерий в них, а также защищала животных от гибели и уменьшала снижение массы тела. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ при заражении гетерологичным штаммом и *S. pneumoniae* не влияла на перечисленные признаки.

Заключение. В экспериментальной мышинной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции индукция иммунного ответа к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ способна предотвращать размножение вируса, обеспечивая снижение бактериальной нагрузки *S. pneumoniae* и степень поражения лёгких, защищая животных от заболевания при антигенном соответствии вакцины и штамма вируса гриппа, используемого для провокации бактериальной инфекции.

Ключевые слова: вирус гриппа; *Streptococcus pneumoniae*; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

Для цитирования: Фалынскова И.Н., Егоров А. Ю., Поддубиков А.В., Вартанова Н.О., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Ленева И.А. Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 150-158. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-150-158>

Для корреспонденции: Фалынскова Ирина Николаевна, науч. сотр. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва. E-mail: falynskova@mail.ru

Участие авторов: Ленева И. А., Егоров А. Ю. – концепция и дизайн исследования, руководство исследованием; Фалынскова И. Н. – написание текста; Карташова Н.П., Глубокова Е.А. вирусологическая часть исследования; Поддубиков А.В., Вартанова Н.О. – микробиологическая часть исследования; Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. – морфологическая часть исследования.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями», 2018–2020 гг.).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.06.2020

Принята в печать 22.06.2020

Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data

Irina N. Falynskova¹, Andrej Yu. Egorov^{1,2}, Alexander V. Poddubikov A.¹, Nune O. Vartanova¹, Nadezhda P. Kartashova¹, Ekaterina A. Glubokova¹, Vladimir A. Mkhitarov³, Dzhuliya S. Dzhaliilova³, Olga V. Makarova³, Irina A. Leneva¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

²Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, 197022, Russia;

³Research Institute of Human Morphology, Moscow, 117418, Russia

Introduction. Influenza is a severe viral disease, a frequent complication of which is a secondary bacterial pneumonia. Influenza vaccines prevent secondary bacterial complications. Virus-like particles are one of the promising areas for the development of new vaccines.

The aim of this work is to study the correlation of the pathomorphological characteristics of the lungs with clinical, virological, and microbiological markers of the disease at vaccination with virus-like particles (VLPs), containing hemagglutinin (HA) of influenza virus (HA-Gag-VLPs) in a murine model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. pneumoniae* after influenza infection.

Material and methods. BALB/c mice were vaccinated with VLPs containing influenza HA. After 21 days, mice were infected with two strains of influenza viruses, homologous and non-homologous, and 5 days after viral infection, were infected with *S. pneumoniae*. The vaccination effect was evaluated by morphological, virological (titer of the virus in the lungs) and microbiological (titer of bacteria in the lungs) data, and was confirmed by clinical data (survival, change in body weight).

Results. Immunization with HA-Gag-VLPs, followed by infection with a homologous influenza virus and *S. pneumoniae*, reduced the area of foci of inflammation, inhibited the replication of the virus and bacteria in the lungs, and also protected animals from death and reduced their weight loss. Immunization with HA-Gag-VLPs upon infection with a heterologous strain and *S. pneumoniae* did not affect these criteria.

Conclusion. The immunization with HA-Gag-VLPs prevented the viral replication, providing a reduction of *S. pneumoniae* titer and the degree of lung damage, protecting animals from the disease in a murine model of secondary bacterial pneumonia, induced by *S. pneumoniae*, after influenza infection with homologous strain of the virus.

Keywords: influenza virus; *Streptococcus pneumoniae*, VLP; secondary bacterial pneumonia after influenza infection.

For citation: Falynskova I.N., Egorov A.Yu., Poddubikov A.V., Vartanova N. O., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Mkhitarov V.A., Dzhaliilova D.S., Makarova O.V., Leneva I.A. Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 150-158. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-150-158>

For correspondence: Irina N. Falynskova, researcher of Laboratory experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia. E-mail: falynskova@mail.ru

Information about the authors:

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Egorov A.Y., <https://orcid.org/0000-0003-2068-3745>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Vartanova N.O., <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>

Kartashova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Glubokova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>

Mkhitarov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-4427-1991>

Dzhaliilova D.S., <https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Makarova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

Contribution: Leneva I. A., Egorov A. Yu. – research concept and design, research management; Falynskova I. N. – writing a text; Kartashova N.P., Glubokova E.A. – virological part of the study; Poddubikov A.V., Vartanova N.O. – microbiological part of the study; Mkhitarov V.A., Dzhaliilova D.Sh., Makarova O.V. – morphological part of the study.

Acknowledgment. This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-45-05002 Virus-like particles for the control of post-influenza bacterial infections, 2018-2020).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 08 June 2020

Accepted 22 June 2020

Введение

Вирус гриппа – один из возбудителей острых респираторных вирусных заболеваний, ежегодно наносящий ущерб здоровью людей. Основная причина

смертности, наблюдаемая во время как сезонных, так и пандемических вспышек гриппа, связана со вторичными бактериальными пневмониями, среди возбудителей которых наиболее распространён *Streptococcus*

pneumoniae [1]. Патогенез вирусно-бактериальной пневмонии и её тяжесть определяются комплексным сочетанием факторов, зависящих от патогенности возбудителей вирусной и бактериальных инфекций, существующего специфического иммунитета и реакций системы врождённого иммунитета [2, 3].

Вакцинация остаётся основной и наиболее экономически эффективной стратегией по профилактике и борьбе с инфекциями гриппа, при этом противогриппозный иммунитет может определять не только чувствительность организма к вирусу, но и вероятность развития вторичной бактериальной инфекции. На данный момент гриппозные вакцины – эффективных осложнений при условии использования вакцины, специфичной к вирусному штамму и вызывающей образование нейтрализующих антител [4–6]. Нейтрализующие антитела к гемагглютинуину (НА) узко специфичны [7], а постоянный антигенный дрейф вирусов гриппа приводит к тому, что штаммы, входящие в состав вакцин и циркулирующие среди населения, не совпадают, это снижает или нивелирует эффективность сезонных вакцин. Одним из перспективных подходов, используемых в современной вирусологии, представляется создание вирусоподобных частиц (ВПЧ), использующихся как платформа для разработки противогриппозных вакцин, некоторые из них уже находятся на стадии клинических испытаний.

Исследования, включая экспериментальные, посвящённые изучению эффекта вакцинации на развитие вторичных бактериальных пневмоний после гриппозной инфекции, ограничены. Особенно малочисленны патоморфологические исследования, отражающие состояние лёгких и патологический процесс в них, а также изучение их корреляции с остальными маркерами заболевания. Так в исследовании, проведённом Y. Desheva и соавт. [8], использование живой противогриппозной вакцины у животных, инфицированных вирусом гриппа с последующим заражением *S. pneumoniae*, позволило сохранить морфологическую структуру лёгких и уменьшило, хотя и не предотвращало полностью, их повреждение.

Ранее нами разработана экспериментальная мышечная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *S. pneumoniae*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами [9]. Данная модель использована нами для изучения эффективности лекарственных препаратов, живой и инактивированной гриппозных вакцин, а также ВПЧ, содержащих НА вируса гриппа [10].

Цель работы – изучение корреляции патоморфологической характеристики лёгких с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания при вакцинации ВПЧ, несущими НА вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышшей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, индуцированной гомологичным и гетерологичным штаммами вируса гриппа. Использование гомологичного и гетерологичного штаммов вируса гриппа

имитирует ситуацию совпадения и несовпадения вакцинного штамма с циркулирующими, что позволяет изучить неспецифические эффекты иммунизации.

Материал и методы

Вирусоподобные частицы. М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Вена) были сконструированы, наработаны и охарактеризованы препараты ВПЧ двух видов: содержащие гемагглютинин (НА-Gag-ВПЧ) вируса гриппа A/PR/8/34 и не содержащие белков вируса гриппа (Gag-ВПЧ). Препараты ВПЧ, образованные комбинацией ретровирусного Gag белка с НА вируса гриппа, происходящего от штамма A/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), были получены с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего вирусоподобные частицы при заражении клеток насекомых (Tnms42 клетки). Содержание антигена НА составило 2500 нг/мл.

Патогены. Для вирусного инфицирования мышшей были использованы и охарактеризованы вирусы гриппа: A/PR/8/34 (H1N1) и реассортант A/NIBRG-121xp (A/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) XA/PR/8/34 (H1N1) (2:6), содержащий поверхностные белки НА и нейраминидазу (NA) от вируса A/Калифорния/04/2009, а внутренние белки – от A/PR/8/34 (H1N1). Оба штамма получены из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) в течение 72 ч при 37 °С. После определения инфекционной активности вирусов, выраженной в Ig эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀/мл), их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *S. pneumoniae* № 3405 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия) в дозе 25·10⁶ КОЕ/мл. Бактериальную культуру для заражения получали для каждого опыта непосредственно перед его проведением, однако процесс приготовления культуры был стандартизован в предварительных опытах. Для восстановления жизнеспособности культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали, добавляли 2 мл сердечно-мозгового бульона и инкубировали 4 ч при температуре 37 °С. Затем осуществляли посев на ГРМ-агар (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия) с добавлением 5% лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5,5% CO₂ среде. В исследовании использовали второй пассаж бактерий после регенерации штамма. Рабочие разведения бактериальной суспензии готовили с использованием денситометра Densi-Lameter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Словакия). За 1·10⁹ бактерий в 1 мл объёма принимали 0,8 ЕД мутности по McFarland.

Животные. В исследованиях использовали мышшей линии BALB/c. Самки массой тела 12–14 г были получены из ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, филиала «Андреевка» (Московская область, Россия). Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали Правилам проведения работ с использованием экс-

периментальных животных (приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации»). Мышей распределяли по группам рандомизированно, каждая группа содержала 25 животных.

Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Животных иммунизировали, вводя HA-Gag-ВПЧ (две исследуемые группы), либо Gag-ВПЧ (две контрольные группы) внутривентриально в объеме 0,2 мл (концентрация антигена 0,05 мкг). Через 21 день после вакцинации мышей инфицировали интраназально под эфирным наркозом соответствующей (A/PR/8/34 (H1N1) или A/NIBRG-121xp) вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (объем 0,03 мл, по 0,5 50% мышинной летальной дозы (МЛД₅₀/мл)). На 4-е сутки после заражения 5 животных из каждой группы гуманно умерщвляли, у них забирали лёгкие для определения инфекционного титра вируса. На 5-й день после вирусного заражения оставшихся мышей инфицировали, вводя *S. pneumoniae* интраназально под эфирным наркозом (объем 0,03 мл). На 8-е сутки после вирусного и 3-и сутки после бактериального заражения у 5 животных из каждой группы брали лёгкие для оценки влияния вакцинации на морфологические изменения гистологическим методом, а также для определения инфекционного титра вируса путём титрования гомогенатов тканей лёгких на РКЭ и бактериальной обсеменённости. Наблюдали за животными в течение 14 дней после вирусного заражения. Защитную (протективную) активность HA-Gag-ВПЧ оценивали, учитывая количество выживших мышей и потерю животными массы тела. Изменение массы тела рассчитывали отдельно для каждой мыши в процентах, принимая за 100% массу тела животного перед инфицированием. Для мышей каждой группы определяли среднее значение изменения массы тела в процентах. Кроме клинических показателей, для оценки протективной активности вакцинации ВПЧ использовали вирусные (определение титра вируса в лёгких на 4-й и 8-й дни после вирусного заражения) и бактериальные (обсеменённость лёгких бактериями) характеристики.

Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей. РКЭ получали из ООО «Майские просторы» (Московская область, Россия). Готовили 10-кратные разведения суспензии лёгких мышей на среде Игла MEM и инокулировали по 100 мкл каждого разведения в аллантоисную полость 9-дневных РКЭ. Инфицированные РКЭ инкубировали во влажной среде при 37 °C в течение 48 ч, затем охлаждали при +4 °C в течение 4 ч. Отбирали 50 мкл аллантоисной жидкости, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Через 45 мин инкубации по реакции гемоглютинации определяли, в каких РКЭ размножился вирус, и рассчитывали ЭИД_{50/мл}.

Определение обсеменённости респираторных путей. Для определения содержания *S. pneumoniae* образцы гомогенизированных лёгких разводили фосфатно-со-

левым буфером. Осуществляли посев на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °C в 5,5% CO₂ среде в течение 18–24 ч. Чистоту выросшей культуры определяли визуально и микроскопически в мазках, окрашенных по Грамму. Обсеменённость лёгочной ткани рассчитывали, умножая число выросших колоний на степень разведения и коэффициент, обратный объёму посеянного материала, и выражали в lg КОЕ/мл.

Морфологическое и морфометрическое исследование лёгких. Полученные на 4-й день после вирусного заражения лёгкие сразу фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. Гистологическую проводку выполняли в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США), заключение образцов тканей в гистомикс проводили на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США). На микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) изготавливали по 6 сагитально ориентированных ступенчатых срезов с каждого лёгкого с шагом 200 мкм, окрашивали срезы гематоксилином и эозином. Визуальный анализ изменений ткани лёгких экспериментальных животных проводили на микроскопе Axioptan 2 Imaging Zeiss. На слайде тотального среза лёгкого в программе Photoshop CC 14 очаги воспаления обводили световым пером и маркировали красным цветом. В программе Image Pro Plus 6.0 измеряли площади выделенных участков и вычисляли их долю от общей площади срезов лёгкого.

Статистическая обработка данных. Выживаемость в группах мышей сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 8.0, для графического представления данных использовали метод Каплана–Мейера.

Для сравнения изменения массы тела мышей применяли однофакторный дисперсионный анализ для нелинейных моделей, использовали четырёхпараметрическую log-логистическую модель. Анализ выполнен в приложении R-Studio (Version 1.0.136), пакет 'drc' (C. Ritz, 2016).

Статистическую обработку морфометрических данных проводили в программе StatSoft Statistica 8. Анализ характера распределения вариационных рядов методом Колмогорова–Смирнова показал необходимость применения непараметрических методов, были вычислены медианы и квартили: нижние (25%) и верхние (75%). Для сравнения экспериментальных групп был применён ANOVA, метод множественного сравнения Tukey HSD.

Результаты

Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на патоморфологическое состояние лёгких на модели вторичной бактериальной пневмонии после гомологичной и гетерологичной гриппозной инфекции. Мыши были иммунизированы HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA штамма A/PR/8/34 (H1N1), или Gag-ВПЧ. Для воссоздания ситуации совпадения и несовпадения вакцинного штамма с циркулирующими штаммами вируса гриппа инфицирование проводили гомо-

логичным A/PR/8/34 (H1N1) или гетерологичным A/NIBRG-121xp (H1N1) штаммами вируса гриппа с последующим заражением *S. pneumoniae*.

Морфологические изменения лёгких оценивали количественно по относительной площади очагов воспаления, которые представляли собой очаги бронхопневмонии и микроабсцессы.

При морфологическом исследовании лёгких неинфицированных интактных мышей патологических изменений не выявлено: просветы бронхов свободные, эпителиальная выстилка бронхов не нарушена; альвеолы различных размеров и форм; межальвеолярные перегородки тонкие, их сосуды и капилляры неравномерно полнокровные. При исследовании в лёгких всех инфицированных мышей были выявлены очаги бронхопневмонии (рис. 1). В просветах бронхов, локализованных в зонах пневмонических очагов, определялся экссудат из нейтрофилов и небольшого числа макрофагов; эпителиальная выстилка бронхов была очагово нарушена; в стенках бронхов и прилежащем к ним респираторном отделе наблюдали воспалительную инфильтрацию из нейтрофилов и небольшого количества макрофагов и лимфоцитов. Несмотря на перечисленные изменения у всех инфицированных животных уровень их был различен в зависимости от вируса, использованного для заражения и вакцинирования ВПЧ. Влияние двух штаммов вируса гриппа на морфологические изменения в лёгких различалось. У животных 1-й контрольной группы, вакцинированных Gag-ВПЧ при инфицировании вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, выявлены наиболее тяжёлые и распространённые воспалительные изменения, представляющие собой обширную очаговую пневмонию. Кроме того, у трёх из пяти животных были выявлены множественные микроабсцессы. Во 2-й контрольной группе мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, при последующем инфицировании A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae* относительная площадь воспалительных очагов была такой же, однако в отличие от вакцинированных Gag-ВПЧ с последующим инфицированием вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae* в группе животных, вакцинированных Gag-ВПЧ, при инфицировании вирусом A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*

единичные микроабсцессы выявлены только у одного животного.

По данным морфометрического исследования, в группе мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), и инфицированных гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления была минимальной (табл. 1, см. рис. 1, 2), и статистически значимо меньше, чем в остальных группах. Тем не менее у части мышей в этой группе выявлены очаги бронхопневмонии, и у одного животного обнаружены микроабсцессы.

Напротив, в группе мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), и инфицированных гетерологичным вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления статистически значимо не отличалась от такового в контрольных группах, вакцинированных Gag-ВПЧ без HA, при инфицировании вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) или вирусом A/PR/8/34 (H1N1) с последующим инфицированием *S. pneumoniae*. У всех мышей в лёгких выявлена очаговая бронхопневмония, а у части – множественные микроабсцессы. В этой группе относительная площадь очагов воспаления в лёгких была статистически значимо больше, чем у мышей, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae* с предварительной вакцинацией HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA гомологичного A/PR/8/34 (H1N1) вируса (см. табл. 1).

Вирусологические и микробиологические характеристики. Патоморфологическое состояние органов дыхания мышей было подтверждено данными вирусологических и микробиологических исследований.

В контрольных группах животных, вакцинированных Gag-ВПЧ и инфицированных обоими штаммами вируса гриппа и *S. pneumoniae*, скорость размножения вируса и бактерий в лёгких была самой высокой. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), полностью подавляла размножение вируса, статистически значимо снижала титр бактерий в лёгких при инфицировании гомологичным вирусом и не влияла на эти показатели при гетерологичном заражении (табл. 2).

Таблица 1. Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на относительную площадь очагов воспаления в лёгких мышей

Table 1. The effect of HA-Gag-VLPs vaccination on the relative area of foci of inflammation in the lungs of mice

Экспериментальная группа Groups		Относительная площадь очага воспаления The relative area of the focus of inflammation				Сравнение площади очага воспаления Comparison of the area of the focus of inflammation			
инфицирование Infection	вакцинация Vaccination	Valid N	Медиана Median*	L 25%*	U 75%*	A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>		A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	
						HA-Gag- VLPs	Gag- VLPs	HA-Gag- VLPs	Gag-VLPs
A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	22	33,79	19,94	46,91	–	0,005	0,017	0,004
	Gag-VLPs	14	59,34	50,86	73,86	0,005	–	0,911	–
A/NIBRG- 121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	19	47,55	19,62	89,82	0,017	0,911	–	0,986
	Gag-VLPs	20	70,56	23,56	89,58	0,004	0,986	0,984	–

Примечание. * L 25% – нижний квартиль; ** U 75% – верхний квартиль.

Note. * L 25% – lower quartile; ** U 75% – upper quartile.

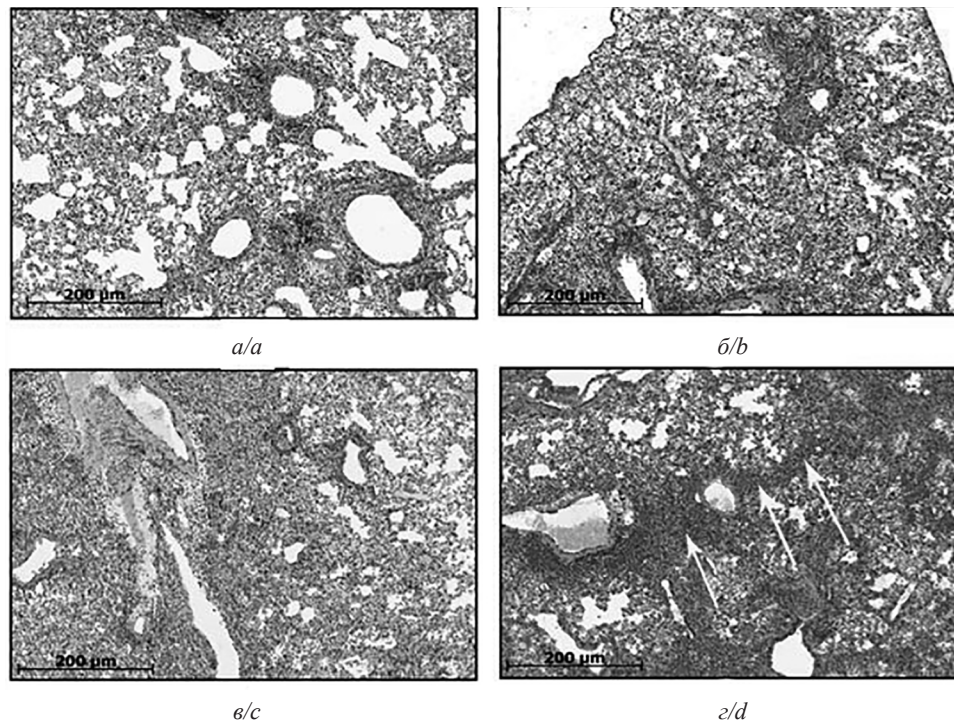


Рис. 1. Морфологические изменения в лёгких мышей (ув. $\times 200$, окраска гематоксилином и эозином).

a – очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, единичные микроабсцессы; *б* – очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких; *в* – обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких, микроабсцессы; *г* – обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, множественные микроабсцессы (указаны стрелкой).

Fig. 1. Morphological changes in the lungs of mice (magnification $\times 200$, stained with hematoxylin and eosin).

a – focal bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and re-helication department, single microabscesses; *b* – focal bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and parenchyma of the lungs; *c* – extensive bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and lung parenchyma, microabscess; *d* – extensive bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and re-helication, multiple microabscesses (indicated by an arrow).

Таблица 2. Эффект вакцинации на выживаемость, вирусологические и микробиологические характеристики в экспериментальной модели вторичной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции

Table 2. The effect of vaccination on survival, virological and microbiological characteristics in an experimental murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after influenza infection

Экспериментальная группа Groups		Выживаемость, % Survival rate, %	Титр вируса в лёгких, lg ТЦИД ₅₀ /мл Lung virus titer, lg TCID ₅₀ /ml		Бактериальная обсеменённость, lg КОЕ/мл Bacterial density, lg CFU/ml
инфицирование Infection	вакцинация Vaccination		4 сут 4 day	8 сут 8 day	
Гомологичный вирус / Homologous virus A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	82	0	0	2,46 ± 3,01
	Gag-VLPs	27	5 ± 0,4	6 ± 0,7	7,53 ± 1,2
Гетерологичный вирус / Heterologous virus A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	27	5 ± 0,4	6,9 ± 0,5	7,14 ± 0,85
	Gag-VLPs	27	4,5 ± 1	7,2 ± 1	7,65 ± 1,01

Исследование протективной активности препаратов ВПЧ. Морфологические, вирусологические и микробиологические данные были подтверждены показателями протективной активности. В группах животных, вакцинированных контрольными Gag-ВПЧ, не содержащими вирусных белков, и инфицированных обоими штаммами вируса гриппа и *S. pneumoniae*, наблюдалась гибель 73% мышей при большом снижении массы тела. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ, содержащими HAA/PR/8/34 (H1N1), при последующем заражении этим же вирусом и *S. pneumoniae* приводила

к значительному увеличению выживаемости мышей и уменьшению снижения массы тела. Иммунизация этими же частицами при заражении гетерологичным вирусом гриппа и *S. pneumoniae* не оказывала статистически значимого влияния на выживаемость и снижение массы тела мышей (см. табл. 2, рис. 3, 4).

Обсуждение

Известно, что клинические случаи тяжёлого течения заболеваний, вызванных респираторными вирусными инфекциями, ассоциированы с развитием осложнений,

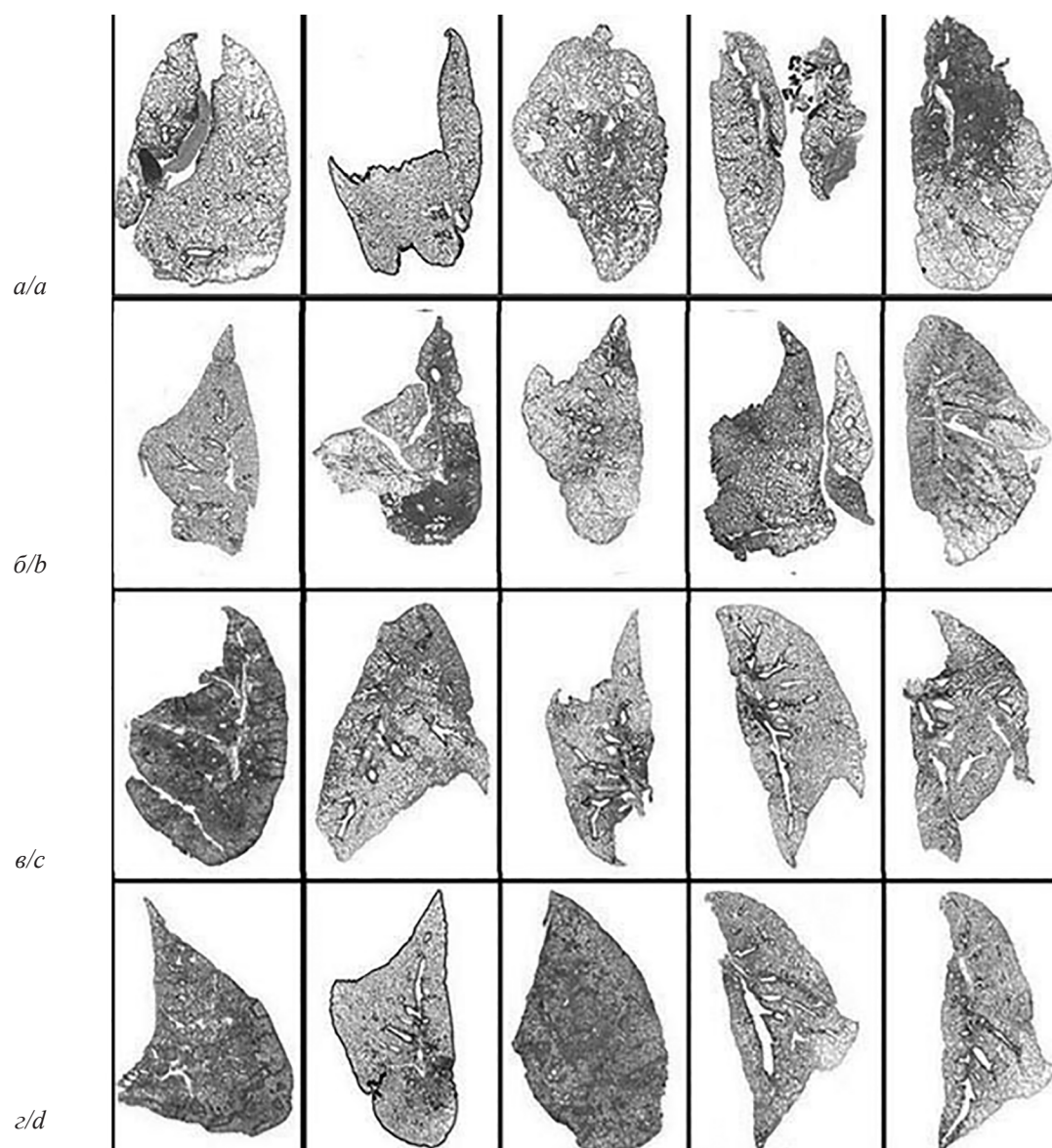


Рис. 2. Воспалительная инфильтрация в лёгких мышей.

a – лёгкие мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *б* – лёгкие мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *в* – лёгкие мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*; *г* – лёгкие мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*.

Fig. 2. Inflammatory infiltration in the lungs of mice.

a – vaccination HA-Gag VLPs, infection A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *b* – vaccination Gag VLPs, infection A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *c* – vaccination HA-Gag VLPs, infection A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*; *d* – vaccination Gag VLPs, infection A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*.

таких как острый респираторный дистресс-синдром, инфаркт миокарда и инсульт, однако чаще всего тяжёлый грипп ассоциируется с присоединением вторичных бактериальных инфекций. Как показали патоморфологические исследования материалов, собранных во время пандемии гриппа H1N1 1918 г., 90% смертельных случаев были связаны с бактериальной пневмонией. Даже в эпоху эффективных антибиотиков число вторичных бактериальных осложнений после гриппа достигает 50–60%, как это было показано в пандемию H1N1 2009 г. Иммунизация гриппозными инак-

тивированными вакцинами способна предотвращать бактериальные осложнения, однако остаётся малоизученной эффективность подобных вакцин при несопадении антигенной композиции вакцины с внезапно появившимся антигенно отличающимся штаммом вируса гриппа. В данном исследовании моделировали подобную ситуацию с помощью парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ, экспрессирующими HA вируса гриппа A/PR/8/34, проводя провоцирующую гриппозную инфекцию гомологичным и гетерологичным вирусами гриппа подтипа H1N1. В отличие

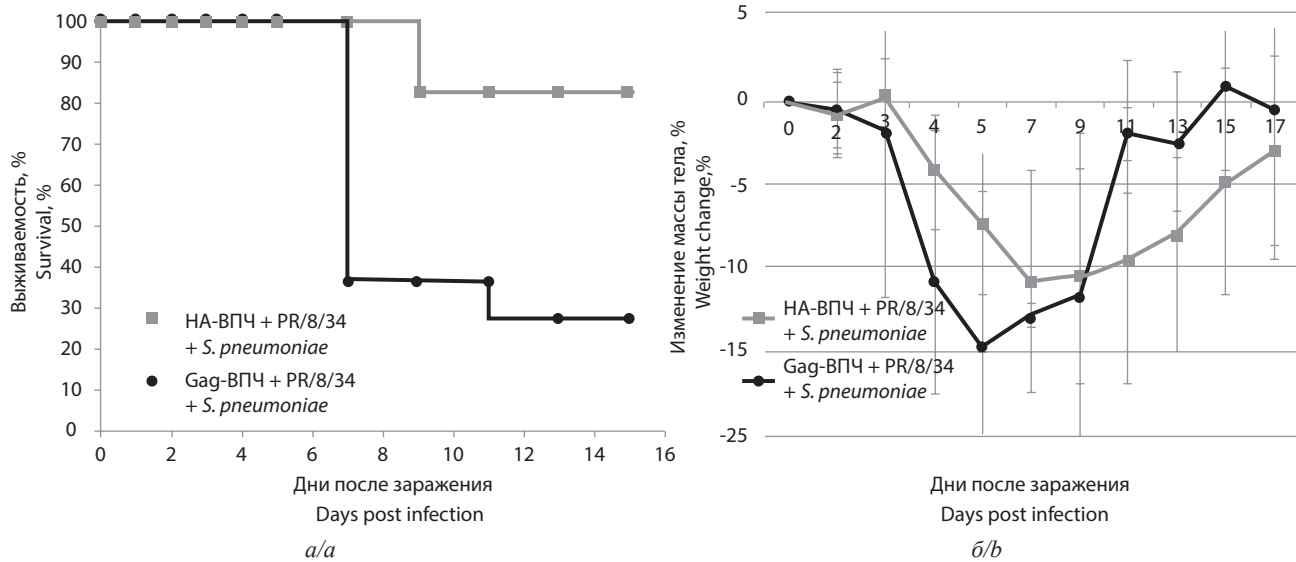


Рис. 3. Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей в модели вторичной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции гомологичным вирусом А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1).

Fig. 3. Effect of vaccination with HA-Gag-VLPs on survival (a) and weight changes (b) in murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after infection with homologous influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

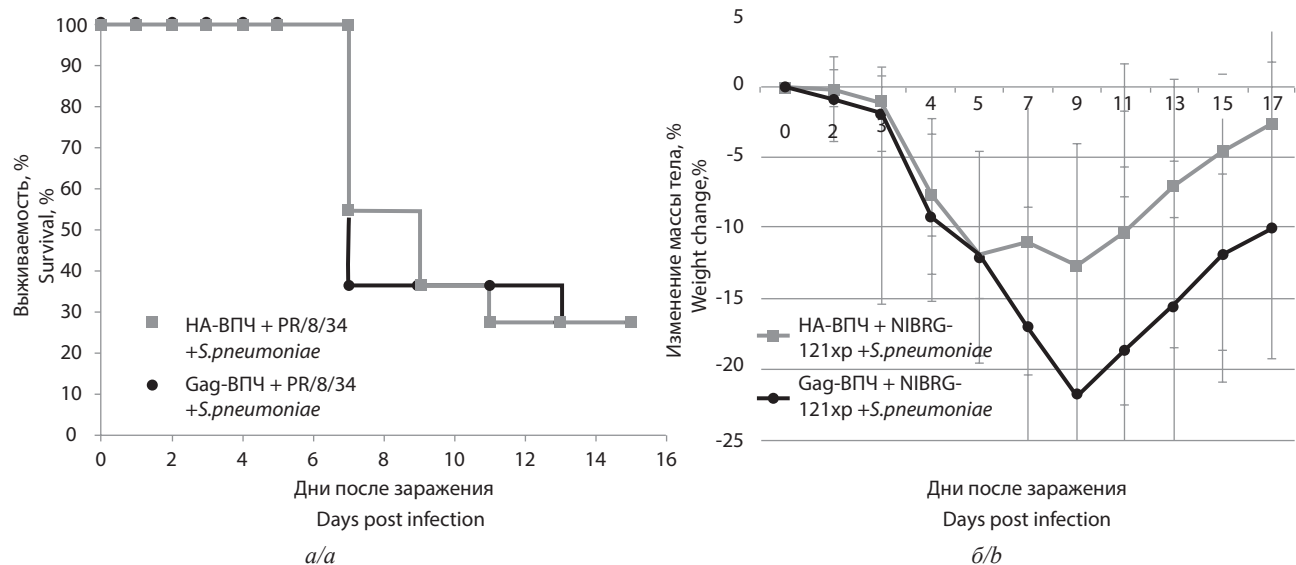


Рис. 4. Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей в модели вторичной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом А/NIBRG-121xp(H1N1).

Fig. 4. Effect of vaccination with HA-Gag-VLPs on survival (a) and weight changes (b) in murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after infection with heterologous influenza virus A / NIBRG-121xp (H1N1).

от инактивированных вирусов, ВПЧ – удобный инструмент для иммунизации избранным антигеном. Это позволило в настоящей работе оценить влияние иммунитета к HA вируса гриппа на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии. Полученные в нашем исследовании патоморфологические данные подтверждены клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания. Показано, что иммунизация HA-Gag-ВПЧ предотвращала репродукцию гомологичного вируса А/PR/8/34 (H1N1), и, как следствие, способствовала снижению бактериальной

нагрузки *S. pneumoniae*, статистически значимо уменьшила площади очагов воспаления и воспалительной инфильтрации в лёгких мышей после бактериального заражения. Патоморфологические исследования лёгких показали, что, хотя относительная площадь очагов воспаления в лёгких мышей после бактериального заражения в этой группе была наименьшей по сравнению с другими, тем не менее выявлялись очаги бронхопневмонии и микроабсцессы в количествах, сопоставимых с показателями контрольных групп животных. Данная патология развивалась при низких титрах бактериальной

ной нагрузки и, по-видимому, была связана с прямым повреждающим действием бактериальной инфекции. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ не защищала мышей от репродукции вируса A/NIBRG-121xp (H1N1) и не предотвращала провоцирующее действие гетерологичной гриппозной инфекции на развитие бактериальной пневмонии с высокими показателями микробной нагрузки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция системного иммунного ответа только к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации недостаточна для обеспечения защиты от репродукции гетерологичного штамма вируса гриппа подтипа H1N1 и провоцируемой им вторичной бактериальной инфекции. Будущие исследования с применением ВПЧ, селективно экспрессирующих различные белки вируса гриппа, позволят выявить потенциал консервативных антигенов вируса гриппа и создать теоретическую базу для создания рекомбинантных гриппозных вакцин с широким спектром действия, эффективных в отношении дрейф-вариантов вируса гриппа.

Заключение

В экспериментальной мышинной модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, изучен эффект HA-Gag-ВПЧ, содержащих HA вируса гриппа, на состояние лёгких. Патоморфологические, клинические, вирусологические и микробиологические данные показывают, что индукция иммунного ответа к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ способна предотвращать размножение вируса, обеспечивая снижение бактериальной нагрузки *S. pneumoniae*, и степени поражения лёгких, защищая животных от заболевания при антигенном соответствии вакцины и штамма вируса гриппа, используемого для провокации бактериальной инфекции.

Благодарность. Авторы выражают признательность лаборантам ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова за проведение работ с животными – Г.А. Богачевой, Е.А. Потаповой и С.К. Кирьяновой.

ЛИТЕРАТУРА

- Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962-70. DOI: <http://doi.org/10.1086/591708>
- Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus Aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859-67. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
- Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 187. DOI: <http://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
- Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
- Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>

- Mina M., Klugman K., McCullers J. Live attenuated influenza vaccine, but not pneumococcal conjugate vaccine, protects against increased density and duration of pneumococcal carriage after influenza infection in pneumococcal colonized mice. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(8): 1281-5. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jit317>
- Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852-62. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Desheva Y., Leontieva G., Kramskaya T., Grabovskaya K.B., Karev V., Mamontov A., et al. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and the group B *Streptococcus* recombinant peptides protected mice from influenza and *S. pneumoniae* infections. *PLoS One*. 2019; 14(6): e0218544. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0218544>
- Ленёва И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А. и др. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторными штаммами вируса гриппа H1N1. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(2): 68-74. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74>
- Махмудова Н.Р., Ленёва И.А., Ларионова Н.В., Поддубиков А.В., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П. и др. Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(6): 30-9. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

REFERENCES

- Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962-70. DOI: <http://doi.org/10.1086/591708>
- Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus Aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859-67. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
- Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 187. DOI: <http://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
- Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
- Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>
- Mina M., Klugman K., McCullers J. Live attenuated influenza vaccine, but not pneumococcal conjugate vaccine, protects against increased density and duration of pneumococcal carriage after influenza infection in pneumococcal colonized mice. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(8): 1281-5. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jit317>
- Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852-62. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Desheva Y., Leontieva G., Kramskaya T., Grabovskaya K.B., Karev V., Mamontov A., et al. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and the group B *Streptococcus* recombinant peptides protected mice from influenza and *S. pneumoniae* infections. *PLoS One*. 2019; 14(6): e0218544. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0218544>
- Leneva I.A., Egorov A.Yu., Falynskova I.N., Makhmudova N.R., Kartashova N.P., Glubokova E.A., et al. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice infected with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(2): 68-74. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74> (in Russian)
- Makhmudova N.R., Leneva I.A., Lariionova N.V., Poddubikov A.V., Falynskova I.N., Kartashova N.P., et al. The safety of attenuated and recombinant nasal influenza vaccines in terms of the development of secondary bacterial superinfection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(6): 30-9. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39> (in Russian)