

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ NS1 СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ НА ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ И ВТОРИЧНУЮ БАКТЕРИАЛЬНУЮ ПНЕВМОНИЮ У МЫШЕЙ

Карташова Н.П., Ленева И.А., Фалынскова И.Н., Поддубиков А.В.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. Грипп – высококонтагиозное респираторное заболевание, распространенное по всему миру и вызывающее заболевания у человека, птиц и многих видов млекопитающих. Ежегодно гриппом заболевает около 20% жителей земного шара, при этом более 500 тыс. человек умирает от различных осложнений после гриппа. Наибольшую опасность при гриппе представляют вторичные бактериальные пневмонии, при этом наиболее частым их этиологическим бактериальным агентом является *S. pneumoniae*. Многочисленные исследования у людей подтверждают негативное влияние инфицирования вирусом гриппа на дальнейший исход бактериальной пневмонии и дают понимание повышенной заболеваемости и смертности как результат осложнений после гриппозной инфекции. Так, во время последней пандемии, вызванной H1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам.

В связи с вышесказанным, актуальным является изучение роли белков вируса гриппа в возникновении синергизма патогенов при вирусно-бактериальных пневмониях, в частности неструктурного белка NS1.

Целью данной работы являлось исследование влияния NS1-специфических антител на гриппозную и вторичную бактериальную пневмонию мышей после гриппозной инфекции. Для этих целей нами была использована экспериментальная модель сублетальной гриппозной инфекции и вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *Streptococcus pneumoniae*, после сублетальной гриппозной инфекции. Для моделирования гриппозной инфекции использовался штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) и бактериальный агент *S. pneumoniae* № 3405. Для вакцинирования использовали сыворотку крови кролика, содержащую антитела к рекомбинантному белку NS1 вируса А/Пуэрто Рико/8/34, и нативную сыворотку кролика (не содержащую антител). Работа проводилась на самках мышей BALB/c весом 20-22 г. Оценку защитной (протективной) активности сывороток у животных оценивали по трем критериям клинического течения болезни: смертность от инфекции, продолжительность жизни и изменение массы тела.

Полученные результаты показали, что пассивный перенос антител к NS1-белку не приводил к снижению репликации вируса в сублетальной модели гриппозной инфекции. На модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции выявлено отсутствие протективного эффекта антител к NS1-белку: выживаемость животных, титры вируса и бактерий в их легких не отличались от таковых в группе контрольных животных.

Ключевые слова: вирус гриппа, *Streptococcus pneumoniae*, вторичная бактериальная пневмония, специфические антитела, сублетальная гриппозная пневмония, белок NS1

Адрес для переписки:

Карташова Надежда Павловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а, стр. 9.
Тел.: 8 (917) 584-59-61.
E-mail: nadezdakartasova10571@gmail.com

Address for correspondence:

Kartashova Nadezhda P.
I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Malyy Kazenny lane,
5a, bldg 9.
Phone: 7 (917) 584-59-61.
E-mail: nadezdakartasova10571@gmail.com

Образец цитирования:

Н.П. Карташова, И.А. Ленева, И.Н. Фалынскова,
А.В. Поддубиков «Исследование влияния NS1
специфических антител на гриппозную инфекцию
и вторичную бактериальную пневмонию у мышей»
// Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23,
№ 4. С. 383-388.
doi: 10.46235/1028-7221-438-EEO
© Карташова Н.П. и соавт., 2020

For citation:

N.P. Kartashova, I.A. Leneva, I.N. Falynskova,
A.V. Poddubikov "Examining effects of NS1 specific antibodies
on sublethal influenza infection and secondary bacterial
pneumonia in mice", Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 4,
pp. 383-388.
doi: 10.46235/1028-7221-438-EEO
DOI: 10.46235/1028-7221-438-EEO

EXAMINING EFFECTS OF NS1 SPECIFIC ANTIBODIES ON SUBLETHAL INFLUENZA INFECTION AND SECONDARY BACTERIAL PNEUMONIA IN MICE

Kartashova N.P., Leneva I.A., Falynskova I.N., Poddubikov A.V.

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

Abstract. Influenza is a highly contagious respiratory disease widespread throughout the world that causes disease in humans, birds and many mammalian species. Annually, around 20% of the global human gets sick with influenza so that more than 500,000 people die its various complications. Secondary bacterial pneumonia poses the peak threat during influenza infection, being most frequently caused by *S. pneumoniae*. Multiple studies in humans confirm the negative impact of influenza virus infection on subsequent outcome of bacterial pneumonia and provides insight into increased morbidity and mortality due to complicated influenza infection. In particular, the last 2009 influenza pandemic caused by H1N1 virus revealed that 25-56% cases of severe disease forms were associated with secondary pneumonia, among which 14-46% of them were fatal. Based on the aforementioned, it is of high priority to investigate a role of influenza virus proteins in developing of pathogen synergism in viral-bacterial pneumonia, particularly influenza virus non-structural protein NS1. The study objective was to examine effects of NS1-specific antibodies on course of influenza infection and secondary bacterial pneumonia in mice. For this, we used an experimental model of sublethal influenza infection followed by secondary *Streptococcus pneumoniae* bacterial pneumonia. Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) virus and *S. pneumoniae* No. 3405 strain were used to simulate influenza infection. Rabbit serum containing antibodies against recombinant NS1 protein from A/Puerto Rico/8/34 virus and native rabbit serum (contain no specific antibodies) were used for vaccination. The study was carried out with female BALB/c mice, weighing 20-22 g. Protective activity of animal serum was assessed by using the three criteria: infection-related mortality, life expectancy and body weight change. The data obtained showed that passive transfer of antibodies specific to influenza virus NS1 protein did not lowered viral replication in sublethal murine model of influenza infection. Subsequent secondary bacterial pneumonia induced by *S. pneumoniae* revealed no protective effect of anti-NS1 protein antibodies assessed by measuring survival rate, lung viral and bacterial titers in treated vs. control mice.

Keywords: influenza virus, *Streptococcus pneumoniae*, secondary bacterial infection, specific antibodies, sublethal influenza pneumonia, NS1 protein

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

Введение

Грипп — высококонтагиозное респираторное заболевание, распространенное по всему миру и вызывающее заболевания у человека, птиц и многих видов млекопитающих. Ежегодно гриппом заболевает около 20% жителей земного шара, при этом более 500 тыс. человек умирает от различных осложнений после гриппа. Наибольшую опасность при гриппе представляют вторичные бактериальные пневмонии, при этом наиболее частым их этиологическим бактериальным агентом является *S. pneumoniae*. Многочисленные исследования у людей подтверждают негативное влияние инфицирования вирусом гриппа на дальнейший исход бактериальной пневмонии и дают понимание повышенной заболеваемости

и смертности как результат осложнений после гриппозной инфекции. Так, во время последней пандемии, вызванной H1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам.

В связи с вышесказанным, актуальным является изучение роли белков вируса гриппа в возникновении синергизма патогенов при вирусно-бактериальных пневмониях, в частности неструктурного белка NS1. NS1-белок является уникальным посттранскрипционным регулятором, поддерживающий высокий уровень трансляции вирусной иРНК. Также показано, что среди всех вирусов с негативным геномом только белок вируса гриппа NS1 может способствовать клеточному антивирусному интерфероновому ответу, подавляя экспрессию генов, отвечающих за образование цитокинов. При связывании с РНК, белок NS1 подавляет действие двухцепочечной РНК-зависимой протеинкиназы, которая опосредованно стимулирует клеточный интерфероновый ответ первого типа и играет немало-

важную роль в антивирусном иммунном ответе организма. Антитела к белку NS1 обнаруживаются только у людей, переболевших гриппом, но не после вакцинации, так как данный белок находится в ничтожно малом количестве в частицах вируса. Это затрудняет возможность оценить потенциал иммунного ответа к этому антигену, в частности в формировании резистентности к бактериальной инфекции.

Целью нашей работы являлось изучение роли иммунного ответа к NS1-белку в формировании резистентности ко вторичным бактериальным пневмониям с использованием подхода пассивного переноса антител к нему. В связи с поставленной целью в задачи исследования входило изучение эффекта пассивного переноса антител к NS1-белку:

- 1) на вирусную репликацию при сублетальной гриппозной инфекции;
- 2) на защиту от гриппозной инфекции;
- 3) на защиту от вторичной бактериальной инфекции после гриппозной инфекции.

Материалы и методы

Материалы

Для моделирования гриппозной инфекции использовался штамм вируса гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1), полученный из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России и *S. pneumoniae* № 3405 из коллекции лаборатории условно патогенных микроорганизмов ФГНБУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Работа проводилась на самках мышей BALB/c весом 20–22 г, полученных из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и содержащихся на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария. Содержание и кормление животных соответствовало правилам по устройству и оборудованию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (Приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации»). Для вакцинирования использовали сыворотку крови кролика, содержащую антитела к рекомбинантному белку NS1 вируса А/Пуэрто Рико/8/34 и нативную сыворотку кролика (не содержащую антител). В качестве отрицательного контроля использовался ФСБ. Сыворотка была предоставлена Сергеевой М.В., ведущим научным сотрудником лаборатории векторных вакцин ФГБНУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева.

Методы

Изучение сывороток на модели сублетальной гриппозной инфекции и вторичной бактериальной

пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции

Изучение сывороток с антителами к NS1-белку животных проводили на модели сублетальной гриппозной инфекции, индуцированной вирусом гриппа А/Пуэрто Рико/8/34 и на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции А/Пуэрто Рико/8/34. Мышей (BALB/C, самки, массой 20–22 г) распределяли по группам рандомизированно, в экспериментах были сформированы следующие группы:

- 1) инъекция NS1 иммунной сывороткой + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34 + *S. pneumoniae* № 3405;
- 2) инъекция нативной сывороткой + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34 + *S. pneumoniae* № 3405;
- 3) инъекция ФСБ + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34 + *S. pneumoniae* № 3405;
- 4) инъекция NS1 иммунной сывороткой + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34;
- 5) инъекция нативной сывороткой + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34;
- 6) инъекция ФСБ + инфекция А/Пуэрто Рико/8/34.

Препараты сывороток и используемый в качестве плацебо ФСБ вводили в объеме 0,1 мл внутривенно за сутки до заражения вирусом. На следующий день все мыши заражались вирусом интраназально под легким наркозом 0,05 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкостью А/Пуэрто Рико/8/34 в дозе 0,5 МЛД₅₀. На 2-й и 5-й день после инфекции в каждой их групп по 3 мыши гуманно умерщвлялись с целью определения титра вируса в легких. При изучении эффекта пассивного переноса антител NS1-белку на 5-й день после вирусного заражения мышей инфицировали в объеме 0,05 мл интраназально под легким наркозом *S. pneumoniae* № 3405 в дозе 25×10^6 КОЕ/мл. На 7-е сутки после вирусной инфекции инъекции и легкие в каждой группе забирали для определения инфекционного титра вируса путем титрования гомогенатов тканей на развивающихся куриных эмбрионах (определение эмбриональной инфекционной дозы ЭИД_{50/0,1} мл), и бактериальной обсемененности (колониеобразующие единицы КОЕ/мл) на чашках Петри с ГРМ-агар с добавлением 5% лошадиной крови для *S. pneumoniae*. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после инъекции NS1 иммунной сывороткой. Оценку защитной (протективной) активности сывороток у животных оценивали по трем критериям клинического течения болезни: смертность от инфекции, продолжительность жизни и изменение веса. Уменьшение или увеличение веса рассчи-

тывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах. При этом за 100% принимали вес животного перед инфицированием. Для мышей одной группы определяли среднее значение процента потери или увеличения веса.

Результаты

Эффект сыворотки, содержащей антитела к NS1-белку, в модели сублетальной гриппозной инфекции и вторичной бактериальной инфекции после гриппозной инфекции

В группах, которым вводили ФСБ или контрольную кроличью сыворотку с дальнейшим заражением сублетальной дозой вируса А/Пуэрто Рико/8/34, погибло только 2 из 10 животных, потеря веса была незначительной. Титр вируса в легких животных на 2-й и 5-й дни после инфекции был примерно одинаковым ($7,3 \pm 0,5$ – $8,0 \pm 0,5$ лг ЭИД₅₀), однако на 7-й день после вирусной ин-

фекции уменьшался до примерно 2,0 лг ЭИД₅₀ (табл. 1). Инъекция сыворотки, содержащей антитела к NS1-белку, не оказывала влияния на изучаемые параметры. Выживаемость животных, потеря их веса, а также титр вируса в легких не отличались от таковых в контрольных группах, которым вместо антител вводили ФСБ или сыворотку без антител.

В контрольной группе животных, инфицированных сублетальной дозой А/Пуэрто Рико/8/34 с последующим заражением *S. pneumoniae*, наблюдалась высокая гибель (10 из 12) животных при большой потере веса (рис. 1). Титры вируса в легких животных на 2-й и 5-й день после инфекции не отличались практически от таковых в группах животных, зараженных только вирусом, однако на 7-й день после инфекции титр вируса при комбинированном заражении был значительно выше (7 ± 0 – $7,3 \pm 0,5$ лг ЭИД₅₀) (табл. 1, рис. 2). Инъекция нативной сыворотки и сыво-

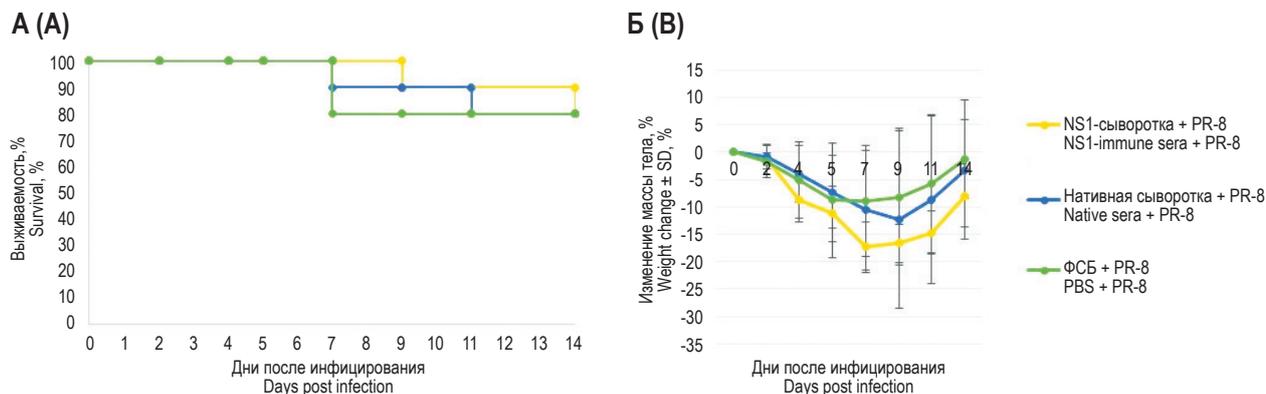


Рисунок 1. Выживаемость (А) и изменение массы тела (Б) мышей, зараженных А/Пуэрто Рико/8/34

Figure 1. Survival rate (A) and weight change (B) of mice infected with A/Puerto Rico/8/34

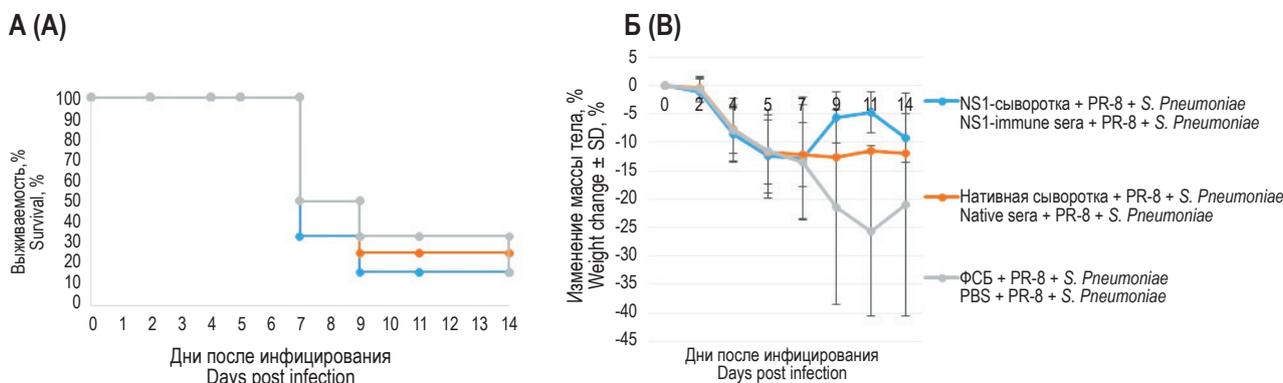


Рисунок 2. Выживаемость (А) и изменение массы тела (Б) мышей, зараженных А/Пуэрто Рико/8/34 с последующим заражением *S. pneumoniae*

Figure 2. Survival rate (A) and weight change (B) of mice infected with A/Puerto Rico/8/34 with subsequent infection with *S. pneumoniae*

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ, СОДЕРЖАЩЕЙ АНТИТЕЛА К NS1-БЕЛКУ, НА РАЗМНОЖЕНИЕ ПАТОГЕНОВ В МОДЕЛИ СУБЛЕТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВТОРИЧНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОСЛЕ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

TABLE 1. EFFECT OF SERUM CONTAINING ANTIBODIES TO NS1 PROTEIN ON THE REPRODUCTION OF PATHOGENS IN A MODEL OF SUBLETHAL INFLUENZA INFECTION AND SECONDARY BACTERIAL INFECTION AFTER INFLUENZA INFECTION

Препараты Preparation	Титр вируса в легких животных (IgЭИД50/0,1 мл) Virus titre in lungs in log (EID50/0.1 ml)			Бактериальная обсемененность легких (lgКОЕ/мл) Bacterial density in the lung in log CFU/ml
	2 дня после инфекции 2 days post infection	4 дня после инфекции 4 days post infection	7 дней после инфекции 7 days post infection	7 дней после инфекции 7 days post infection
Сыворотка, содержащая антитела к NS1-белку + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) + <i>S. pneumoniae</i> NS1-immune sera + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose) + <i>S. pneumoniae</i>	5,5±0,5	6,7±0,6	7±0	8,3±7,7
Нативная сыворотка + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) + <i>S. pneumoniae</i> Naïve sera + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose) + <i>S. pneumoniae</i>	–	7±0	7,0±0,5	7,7±7,5
ФСБ + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) + <i>S. pneumoniae</i> PBS + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose) + <i>S. pneumoniae</i>	6,3±0,6	7,3±0,5	7,3±0,5	7,9±7,4
Сыворотка, содержащая антитела к NS1-белку + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) NS1-immune sera + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose)	6,5±0,5	7,6±0,6	2,0±0,5	–
Нативная сыворотка + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) Naïve sera + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose)	–	–	3±0	–
ФСБ + А/Пуэрто Рико/8/34 (сублетальная доза) PBS + A/Puerto Rico/8/34 (sublethal dose)	6,3±0,6	7,3±0,5	2,0±3,5	–

ротки, содержащей антитела к NS1-белку, практически не оказывали влияния на выживаемость животных, титр вируса на 2-й, 5-й и 7-й дни после вирусной инфекции и плотность бактерий в легких. Однако инъекции обеих сывороток, особенно сыворотки, содержащей NS1-антитела, снижали потерю веса животных по сравнению с контрольной группой, которой вводили буфер.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что пассивный перенос антител к NS1-белку не приводил к снижению репликации виру-

са в сублетальной модели гриппозной инфекции. Титры вируса в легких были высокими, из чего следует предположить, что данные антитела не являются нейтрализующими. На модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, выявлено отсутствие протективного эффекта антител к NS1-белку, о чем свидетельствуют данные по выживаемости титры вируса и бактерий в легких. Вместе с тем введение NS1 специфических антител улучшило восстановление веса у выживших животных после бактериального заражения. Обнаруженный эффект требует дополнительного изучения.

Список литературы / References

1. Карташова Н.П., Вартанова Н.О., Поддубиков А.В., Ленева И.А. Разработка экспериментальной вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* после заражения пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1 // Вестник «Биомедицина и социология», 2018. Т. 3, № 3. С. 15-17. [Kartashova N.P., Vartanova N.O., Poddubikov A.V., Leneva I.A. Development of experimental secondary bacterial pneumonia induced by *S. pneumoniae* after infection with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Vestnik "Biomeditsina i sotsiologiya" = Bulletin "Biomedicine and Sociology"*, 2018. Vol. 3, no. 3, pp. 15-17. (In Russ.)]
2. Ленева И.А., Егоров А.Ю., Фалынская И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Вартанова Н.О., Поддубиков А. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторным штаммами вируса гриппа H1N1 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2019. № 1. С. 68-74. [Leneva I.A., Egorov A.Yu., Falynskaya I.N., Makhmudova N.R., Kartashova N., Glubokova E.A., Vartanova N.O., Poddubikov A.V. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice upon infection with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 68-74. (In Russ.)]
3. Egorov A. The problem of bacterial complications post respiratory viral infections. *MIR J.*, 2018, Vol. 5, no. 1, pp. 12-21.

Авторы:

Карташова Н.П. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

Ленева И.А. — д.б.н., заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

Фалынская И.Н. — научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии отдела вирусологии имени О.Г. Анджаридзе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

Поддубиков А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией микробиологии условно патогенных бактерий отдела микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Москва, Россия

Authors:

Kartashova N.P., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Leneva I.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Falynskaya I.N., Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, O.G. Anjaparidze Department of Virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Poddubikov A.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Microbiology of Opportunistic Bacteria, Department of Microbiology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 03.08.2020
Отправлена на доработку 02.09.2020
Принята к печати 03.09.2020

Received 03.08.2020
Revision received 02.09.2020
Accepted 03.09.2020