



## Усиление системного и локализованного в лёгких CD4<sup>+</sup>-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной живой гриппозной вакцины

Прокопенко П.И.<sup>✉</sup>, Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Комлев А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

### Аннотация

**Введение.** В мире существует большое разнообразие лицензированных вакцин против гриппа, но их общими недостатками являются достаточно узкая специфичность и неспособность защищать от дрейфовых вариантов вируса. Соответственно, оптимизация иммуногенных и кросс-протективных свойств лицензированных гриппозных вакцин — актуальная задача практического здравоохранения. Одним из таких подходов является модуляция иммуногенных свойств живой гриппозной вакцины (ЖГВ) за счёт усечения рамки считывания неструктурного белка 1 вируса гриппа (NS1). Основной целью данной работы является оценка иммуногенных свойств сезонной ЖГВ подтипа H1N1 при усечении рамки считывания белка NS1 до 126 аминокислот.

**Материалы и методы.** Методами обратной генетики сконструированы 2 штамма ЖГВ подтипа H1N1 с полноразмерным и с усечённым белком NS1, где после 126 аминокислот добавлены 3 последовательных стоп-кодона. Мышей линии C57Bl/6J иммунизировали интраназально двукратно с 3-недельным интервалом. Через 7 дней после повторной иммунизации у мышей выделяли клетки из тканей селезёнки и лёгких, стимулировали цельным диким вирусом H1N1 и оценивали уровни системных и тканерезидентных цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток памяти методом внутриклеточного окрашивания цитокинов. Также была проведена оценка репродукции штаммов в системах *in vitro* и *in vivo*.

**Результаты.** Укорочение белка NS1 в ЖГВ значительно повышало уровни вирусспецифических CD4<sup>+</sup>-Т-клеток эффекторной памяти в селезёнке и уровни тканерезидентных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток в лёгких мышей после двукратной иммунизации, что указывает на более высокий потенциал защиты от гриппозной инфекции у ЖГВ с усечённым белком NS1 по сравнению с классическим вариантом ЖГВ. Важно отметить, что ЖГВ с усечённым белком NS1 также имела более выраженный аттенуированный фенотип в эксперименте на мышах, чем её классический аналог.

**Ключевые слова:** вирус гриппа, живая гриппозная вакцина, белок NS1, Т-клетки памяти, Т-клетки эффекторной памяти, тканерезидентные Т-клетки, CD4<sup>+</sup>-Т-клетки, CD8<sup>+</sup>-Т-клетки

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

**Источник финансирования.** Работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки России FGWG-2022-0001.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Прокопенко П.И., Степанова Е.А., Матюшенко В.А., Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С., Кудрявцев И.В., Рубинштейн А.А., Комлев А.С., Руденко Л.Г., Исакова-Сивак И.Н. Усиление системного и локализованного в лёгких CD4<sup>+</sup>-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной живой гриппозной вакцины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2024;101(5):619–627.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rwupfs>

Original Study Article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

# Enhancement of systemic and lung-localized CD4<sup>+</sup> T-cell immune responses by truncation of NS1 protein of a seasonal live influenza vaccine strain

Polina I. Prokopenko<sup>✉</sup>, Ekaterina A. Stepanova, Victoria A. Matyushenko, Alexandra Ya. Rak, Anna K. Chistjakova, Arina D. Kostromitina, Tatyana S. Kotomina, Igor V. Kudryavtsev, Artem A. Rubinstein, Alexey S. Komlev, Larisa G. Rudenko, Irina N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

## Abstract

**Introduction.** There is a large variety of licensed influenza vaccines worldwide, but their common limitation is rather narrow specificity and inability to protect against antigenic-drift variants of influenza virus. Therefore, optimization of immunogenic and cross-protective properties of licensed influenza vaccines is an urgent priority of public health agenda. One such approach is to modulate the immunogenic properties of live attenuated influenza vaccine (LAIV) by truncating the open reading frame of influenza virus non-structural protein 1 (NS1). The **main objective** of this study is to evaluate the immunogenic properties of the H1N1 seasonal LAIV strain by truncation of the NS1 protein to 126 amino acids.

**Materials and methods.** Using reverse genetics technique, two H1N1 LAIV strains with full-length and truncated NS1 protein with three consecutive stop codons added after the 126<sup>th</sup> amino acid residue were obtained. C57BL/6J mice were immunized intranasally with the vaccine candidates, twice at a three-week interval. Seven days after the second immunization, cells were isolated from spleen and lung tissues and stimulated with whole wild-type H1N1 influenza virus. Levels of systemic and tissue-resident cytokine-producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> memory T cells were assessed by intracellular cytokine staining assay with flow cytometry. Replication of engineered vaccine strains in *in vitro* and *in vivo* systems was also evaluated.

**Results.** Truncation of NS1 protein of the LAIV strain significantly increased the levels of virus-specific CD4<sup>+</sup> effector memory T cells in spleens and the levels of CD4<sup>+</sup> tissue-resident memory T cells in lungs of mice after two-dose immunization, indicating a higher potential for protection against influenza infection of the LAIV NS<sub>126</sub> vaccine strain compared to the classical variant of LAIV. Importantly, the LAIV NS<sub>126</sub> strain also had a more pronounced attenuated phenotype in mice than its classical counterpart.

**Keywords:** influenza virus, live attenuated influenza vaccine, NS1 protein, memory T cells, tissue-resident memory T cells, tissue-resident memory T cells, CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells

**Ethics approval.** Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine (protocol No. 1/20, February 27, 2020).

**Funding source.** The work was carried out within the framework of the Ministry of Education and Science project FGWG-2022-0001.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Prokopenko P.I., Stepanova E.A., Matyushenko V.A., Rak A.Ya., Chistjakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S., Kudryavtsev I.V., Rubinstein A.A., Komlev A.S., Rudenko L.G., Isakova-Sivak I.N. Enhancement of systemic and lung-localized CD4<sup>+</sup> T-cell immune responses by truncation of NS1 protein of a seasonal live influenza vaccine strain. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2024;101(5):619–627.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-582>

EDN: <https://www.elibrary.ru/rwupfs>

## Введение

Вирусы гриппа представляют собой постоянную угрозу мировому сообществу ввиду их высокой контагиозности и способности вызывать тяжёлые эпидемии, ежегодно уносящие до 650 тыс. человеческих жизней [1]. Наиболее эффективным средством борьбы с гриппозной инфекцией остаётся вакцинация, которая направлена в основном

на предотвращение развития тяжёлых случаев заболевания, а также его осложнений. Существует достаточно большое разнообразие лицензированных вакцин против гриппа, но их эффективность в различные эпидемические сезоны сильно варьируется ввиду узкой специфичности индуцируемого иммунного ответа на вакцинацию [2]. В этой связи поиск новых подходов к повышению иммуноген-

ности и расширению спектра действия сезонных гриппозных вакцин имеет первостепенное значение для мирового здравоохранения.

Неструктурный белок 1 (NS1) вируса гриппа А многофункциональный и участвует в различных стадиях взаимодействия вируса с клеткой: он является антагонистом противовирусного клеточного ответа и регулятором экспрессии вирусных и клеточных генов [3, 4]. В частности, белок NS1 вируса гриппа выполняет функцию антагониста интерферона (ИФН) и тем самым способствует развитию продуктивной инфекции, нарушая одно из важнейших звеньев противовирусного иммунитета [5]. Кроме того, С-концу белка NS1 приписывают функцию снижения активации дендритных клеток и, следовательно, нарушения стимуляции наивных Т-клеток [6]. Соответственно, иммуногенность живой гриппозной вакцины (ЖГВ) может быть усилена за счёт усечения белка NS1 с С-конца с целью ослабления его анти-ИФН-активности. Ранее нами был сконструирован вакцинный штамм ЖГВ подтипа H7N9, который кодировал укороченный до 126 аминокислот белок NS1. Эксперименты на мышах показали, что такая модификация приводила к существенному усилению Т-клеточного ответа к иммунодоминантному эпитопу NP<sub>366</sub> по сравнению с иммунизацией ЖГВ с полноразмерным NS1 [7].

**Целью** настоящего исследования явилась оценка модуляции иммуногенных свойств вакцинного штамма сезонной ЖГВ подтипа H1N1 при усечении рамки считывания белка NS1 до 126 аминокислот. При этом изучался системный и локальный Т-клеточный ответ ко всем антигенам вируса гриппа путём стимуляции иммунных клеток цельным живым эпидемическим вирусом гриппа H1N1.

## Материалы и методы

### Вирусы

Экспериментальные реассортантные штаммы подтипа H1N1 получены стандартными методами обратной генетики на основе донора аттенуации отечественной ЖГВ А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Лен/17) [8]. В качестве родительского эпидемического вируса гриппа выступал штамм А/Гуандун-Маонань/SWL1536/2019 (H1N1) [H1N1/wt], полученный из коллекции NIBSC (Великобритания). Вакцинный штамм ЖГВ H1N1 с полноразмерным белком NS1 содержал гены *PB2*, *PB1*, *PA*, *NP*, *M* и *NS* от донора аттенуации Лен/17, а гены гемагглютинина и нейраминидазы — от эпидемического вируса H1N1/wt. Для получения рекомбинантного вируса гриппа, экспрессирующего усечённый белок NS1, после 126 аминокислот открытой рамки считывания белка NS1 вируса Лен/17 добавлены 3 последовательных стоп-кодона с помощью сайт-направленного мутагенеза с использова-

нием набора «Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit» («New England Biolabs») и специфических праймеров («Evrogen Ltd.»). Вирусы культивировали в 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) (птицефабрика «Синявинская») при 33°C (для вакцинных штаммов ЖГВ) или при 37°C (для эпидемического штамма H1N1/wt) и хранили при –70°C в аликвотах.

### Клеточные линии

Клетки почки собаки MDCK (ATCC CCL-34) и клетки почки зелёной мартишки Vero (ATCC CCL-81) культивировали в ростовой среде DMEM с содержанием 10% эмбриональной бычьей сыворотки и добавлением антибиотика-антимикотика (перечисленные реагенты — «Capricorn»).

### Определение инфекционной активности вирусов гриппа

Инфекционные титры вирусов определяли методом предельных разведений. Для заражения РКЭ вирусы разводили в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и каждым разведением заражали 4–6 эмбрионов в объёме 200 мкл. РКЭ инкубировали при 33°C и 38°C в течение 48 ч или при 26°C в течение 6 сут, после чего эмбрионы охлаждали; наличие вируса в аллантаической жидкости определяли в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами. Определение инфекционных титров вирусов на клеточных культурах проводили путём заражения суточной монослойной культуры в формате 96-луночных планшетов серийными 10-кратными разведениями вирусов. После адсорбции инокулят удаляли, клетки промывали, инкубировали в среде DMEM с содержанием 1 мкг/мл трипсина TPCK и антибиотика-антимикотика при 33°C в течение 4 сут. Наличие вирусов в лунках определяли путём окрашивания зафиксированных в ацетоне клеток моноклональным анти-NP-антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (ООО «ППДП»). Проявку осуществляли с помощью субстрата ТМБ («Thermo Fisher Scientific»), и оптическую плотность измеряли на планшетном спектрофотометре «xMark» («BioRad»). Лунки считали положительными при значениях оптической плотности ( $\lambda = 450$  нм), превышающих значения отрицательных контрольных лунок минимум в 2 раза. Титры вирусов в РКЭ и клетках Vero и MDCK рассчитывали по методу L.J. Reed и соавт. [9] и выражали в 50% инфекционных дозах (lg ЭИД<sub>50</sub>/мл и lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл).

### Накопление и очистка вируса гриппа на градиенте сахарозы

Для проведения иммунологических тестов вирус гриппа H1N1/wt очищали на градиенте сахарозы для удаления неспецифических белков куриных эмбрионов и для концентрирования вируса.

Очистку вирусов проводили на 30%/60% градиенте плотности с использованием ультрацентрифуги («BeckmanCoulter») в несколько этапов:

1) осветление собранной аллантоисной жидкости путём центрифугирования в течение 15 мин при 4°C при 3500g;

2) осаждение при 16 000g в течение 2 ч при 4°C и ресуспендирование образованного осадка в 2 мл ФСБ;

3) наслаивание ресуспендированного осадка на 30%/60% ступенчатый градиент сахарозы с последующим ультрацентрифугированием в течение 2 ч и при 4°C при 23 000g;

4) сбор концентрированного вируса на границах градиента и его отмывка в 10 мл ФСБ путём центрифугирования в течение 1,5 ч при 23 000g. На последнем этапе вирусный осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ и хранили при -70°C в аликвотах.

#### *Иммунизация мышей и сбор органов*

В работе использовали самок мышей линии C57Bl/6J, поставляемых из питомника «Филиал Столбовая» НЦБМТ ФМБА России. Мышей иммунизировали двукратно интраназально с интервалом в 21 день одним из рекомбинантных штаммов ЖГВ в дозе  $10^6$  ЭИД<sub>50</sub> в объёме 50 мкл с использованием лёгкого эфирного наркоза. Контрольные животные получали равный объём ФСБ. На 3-и сутки у 4 вакцинированных мышей из каждой группы осуществляли забор лёгких и носовых ходов, которые в дальнейшем гомогенизировали с использованием автоматического гомогенизатора «TissueLyser LT» («Qiagen»). Гомогенаты лёгочной и носовой ткани использовали для определения инфекционного титра вируса в системе РКЭ. Через 7 сут после повторной иммунизации у 6 мышей из каждой группы собирали лёгочную ткань и селезёнки для дальнейшей оценки Т-клеточного иммунитета. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 1/20 от 27.02.2020).

#### *Оценка Т-клеточного иммунного ответа*

Определение системных и локализованных в лёгких Т-клеток памяти проводили по ранее описанному методу [7] с небольшими модификациями. Одиночные спленоциты выделяли в среде CR-0 (RPMI-1640 с добавлением антибиотика-антимикотика, 25 мМ HEPES (перечисленные реагенты от «Cargilorn») и 50 мкМ 2-меркаптоэтанолом («Sigma-Aldrich»), используя фильтры с размером пор 70 мкм («BD Biosciences»). Затем эритроциты лизировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов («BioLegend»). Для внутриклеточного окрашивания цитокинов  $2 \times 10^6$  клеток добавляли в стерильные микропланшеты с U-образным дном в 100 мкл среды CR-10 (среда CR-0, содержащая

10% эмбриональной бычьей сыворотки). Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл среды CR-10, содержащей очищенный цельный вирус H1N1/wt в дозе 2 инфекционные единицы на клетку, и инкубировали в течение 18 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Затем к пробам добавляли раствор GolgiPlug («BD Biosciences») в конечной концентрации 1 : 1000 для остановки белкового транспорта. Стимуляцию форболмиристил ацетатом («Sigma-Aldrich») использовали в качестве положительного контроля; также были приготовлены нестимулированные контрольные образцы и образцы изотипического контроля. Клетки инкубировали в течение 5 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, затем окрашивали в течение 20 мин при 4°C в темноте с помощью флуоресцентного красителя для выявления живых/мёртвых клеток ZombieAqua и смесью следующих флуоресцентно меченных поверхностных антител: CD4-PerCP/Cy5.5, CD8-APC/Cy7, CD44-PE, и CD62L-BV421 (перечисленные реагенты — «BioLegend»). Набор «Cytofix/Cytoperm» («BD Biosciences») использовали для фиксации/пермеабиллизации, после чего клетки окрашивали антителами к цитокинам: ИФН-γ — FITC, фактору некроза опухоли-α (ФНО-α) — APC, интерлейкину-2 (ИЛ-2) — PE/Cy7 в течение 20 мин при 4°C в темноте. Образцы фиксировали буфером CytoLast (антитела и буфер — «BioLegend») и анализировали с помощью цитофлуориметра «Navios» («BeckmanCoulter»).

Для обнаружения тканерезидентных Т-клеток памяти (T<sub>RM</sub>) перфузированные раствором ФСБ лёгкие разрезали на мелкие кусочки стерильными ножницами и обрабатывали смесью ДНКазы I и коллагеназы («Sigma-Aldrich») в течение 40 мин при 37°C. Затем готовили суспензию отдельных клеток с помощью фильтров с размером пор 70 мкм. Эритроциты лизировали, как описано выше, и стимулировали цельным вирусом H1N1/wt с последующим выявлением вирусспецифических Т-клеток эффекторной памяти (T<sub>EM</sub>; CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), экспрессирующих маркеры тканерезидентности (CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>). Набор для окраски поверхностных маркеров и внутриклеточных цитокинов включал: CD4 — PerCP/Cy5.5, CD8 — APC/Cy7, CD44 — APC, CD62L — BV421, CD69 — PE/Cy7, CD103 — FITC, в то время как внутриклеточную окраску проводили только на один цитокин — ИФН-γ — PE/Dazzle (перечисленные реагенты — «BioLegend»). Подсчитывали количество цитокин-позитивных клеток в стимулированных группах и вычитали уровень спонтанной секреции цитокинов в нестимулированных контрольных образцах.

#### *Статистическая обработка результатов*

Данные проточной цитометрии проанализированы в программе «Kaluza Analysis» («BeckmanCoulter»). Статистический анализ и под-

готовку иллюстраций проводили с помощью программы «GraphPad Prism v. 7.0». Для сравнения данных использовали дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Тьюки или U-критерий Манна–Уитни; различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

В настоящем исследовании генно-инженерными методами получен штамм сезонной ЖГВ подтипа H1N1, экспрессирующий усечённый до 126 аминокислот неструктурный белок 1 (ЖГВ H1N1 NS1<sub>126</sub>). В экспериментах *in vitro* было показано, что классический вакцинный штамм ЖГВ H1N1 и модифицированный вариант ЖГВ H1N1 NS1<sub>126</sub> обладали сходными ростовыми характеристиками в различных системах культивирования, однако вариант с NS1<sub>126</sub> достоверно более слабо размножался при пониженной до 26°C температуре (таблица). Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о фенотипических характеристиках вакцинных штаммов ЖГВ с NS1<sub>126</sub> [7, 10]. Кроме того, модифицированный штамм практически не размножался в верхних дыхательных путях мышей, в отличие от классического штамма ЖГВ, что также согласуется с полученными ранее данными об усилении аттенуирующих свойств вакцины при укорочении рамки считывания белка NS1.

Двукратная иммунизация мышей ЖГВ и ЖГВ NS1<sub>126</sub> стимулировала индукцию высоких уровней вирус-специфических T<sub>EM</sub> с фенотипом CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> в селезёнках мышей, причём укорочение белка NS1 в вакцинном штамме ЖГВ значительно повышало уровни полифункциональных CD4<sup>+</sup>T<sub>EM</sub>-клеток, секретирующих одновременно 2 (ИФН-γ, ФНО-α) или 3 (ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-2) цитокина (рис. 1, а). Кроме того, только в группе мышей, получивших ЖГВ NS1<sub>126</sub>, обнаруживались достоверно более высокие уровни ИФН-γ-продуцирующих цитотоксических T-клеток памяти по сравнению с контролем (рис. 1, б). Таким образом, полученные данные указывают на то, что модифицированный штамм ЖГВ NS1<sub>126</sub> может обладать более высоким потенциалом защиты от гриппозной инфекции, чем классический вариант ЖГВ.

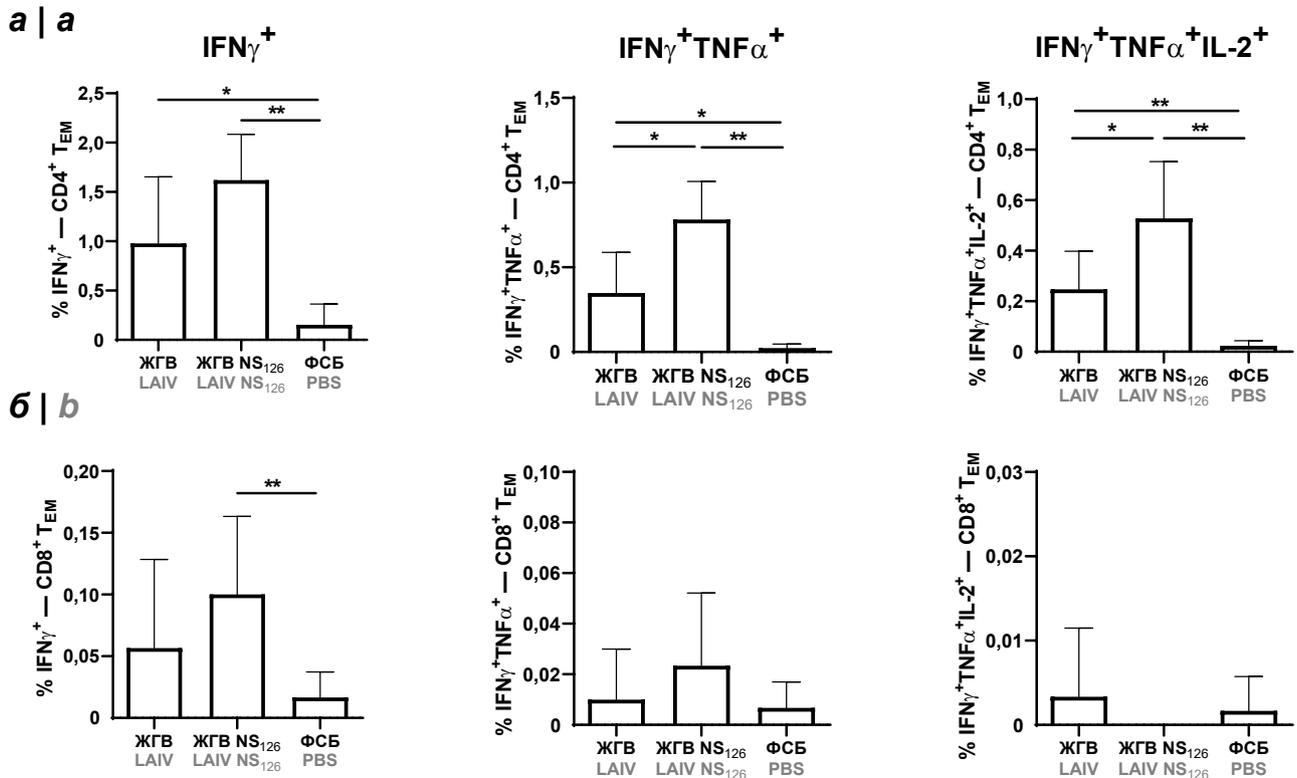
Далее проведено исследование субпопуляций вирус-специфических T<sub>EM</sub>-клеток в лёгких с оценкой экспрессии этими клетками поверхностных маркеров T<sub>RM</sub>-клеток памяти. Оценка уровней ИФН-γ-продуцирующих T<sub>EM</sub>-клеток в лёгких иммунизированных мышей выявила достоверное усиление CD4<sup>+</sup>-T-клеточного ответа в группе животных, привитых прототипом ЖГВ NS1<sub>126</sub>, по сравнению с классическим вариантом вакцины (рис. 2, а). Для цитотоксических CD8<sup>+</sup>-T<sub>EM</sub>-клеток в лёгких был показан сопоставимый уровень иммуногенности ЖГВ, не зависящий от модификации белка NS1 (рис. 2, з). При этом уровень экспрессии маркеров тканерезидентности был сопоставим в обеих вакцинных группах (рис. 2, б, в, д, е), что свидетельствует о локализации выявленных вирус-специфических клеток в эпителии лёгких, в непосредственной близости от потенциального места проникновения патогена.

### Обсуждение

Существующие противогриппозные вакцины индуцируют преимущественно нейтрализующие антитела, нацеленные на гипервариабельные эпитопы основного антигена вируса гриппа — молекулы гемагглютинина, из-за чего требуется практически ежегодное обновление штаммового состава вакцин. За последнее десятилетие достигнут существенный прогресс в разработке противогриппозных вакцин более широкого защитного спектра, нацеленных на консервативные вирусные антигены, такие как домен стебля гемагглютинина, нейраминидаза или M2e; а также разработаны подходы на основе T-клеток, которые обладают наибольшим потенциалом вызывать долговременные перекрёстные защитные реакции клеток памяти [11]. К настоящему времени накоплен большой массив данных о способности вирусов гриппа, экспрессирующих усечённый белок NS1, стимулировать образование более выраженного адаптивного иммунного ответа, одновременно делая вирус более аттенуированным [12–15]. Однако в подавляющем большинстве исследований использовался модельный лабораторный штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) или штамм, созданный

Репликативные свойства вакцинных штаммов ЖГВ в системах *in vitro* и *in vivo*  
 Replicative properties of LAIV vaccine strains *in vitro* and *in vivo* systems

Вакцинный штамм Vaccine strain	Титр вируса в РКЭ, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл Virus titer in ECE, lg EID <sub>50</sub> /ml			Титр вируса в клетках, lg ТЦИД <sub>50</sub> /мл Virus titer in cells, lg TCID <sub>50</sub> /ml		Титр вируса в органах мышей, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл Virus titer in mouse organs, lg EID <sub>50</sub> /ml	
	26°C	33°C	38°C	MDCK	Vero	лёгкие   lungs	нос   nose
ЖГВ H1N1 LAIV H1N1	5,8 ± 0,4	8,7 ± 0,3	1,9 ± 0,4	7,2 ± 0,3	6,2 ± 0,2	< 1,2	2,3 ± 1,2
ЖГВ H1N1 NS1 <sub>126</sub> LAIV H1N1 NS1 <sub>126</sub>	4,4 ± 0,7	7,6 ± 0,5	< 1,2	5,8 ± 0,8	5,4 ± 0,4	< 1,2	< 1,2



**Рис. 1.** Количество T<sub>EM</sub>-клеток (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) с фенотипом CD4<sup>+</sup> (а) и CD8<sup>+</sup> (б), экспрессирующих ИФН- $\gamma$  (I), ИФН- $\gamma$  и TNF $\alpha$  (II) и ИФН- $\gamma$ , TNF $\alpha$  и IL-2 (III), в группах мышей, иммунизированных ЖГВ или ЖГВ с укороченным NS1 белком, а также в контрольной группе (ФСБ).

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (критерий Манна–Уитни).

**Fig. 1.** Number of effector memory T cells (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) with CD4<sup>+</sup> (a) and CD8<sup>+</sup> (b) phenotype expressing IFN $\gamma$  (left panel), IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (middle panel) and IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  and IL-2 (right panel) in groups of mice immunized with LAIV or LAIV with truncated NS1 protein, as well as in the control group (PBS).

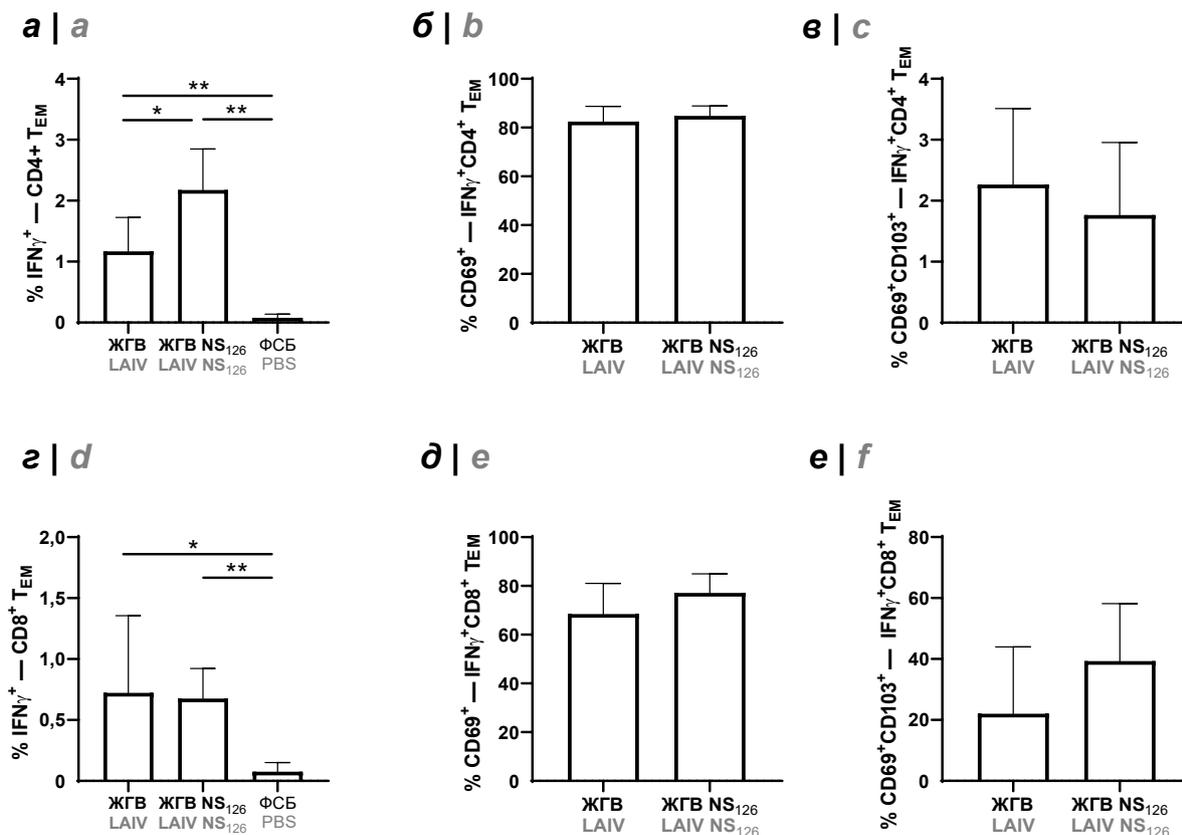
Significant differences between groups (Mann–Whitney test), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

на основе вируса гриппа дикого типа, что имеет существенный недостаток — вероятность возврата к вирулентному фенотипу в случае возможной реассортации с другими циркулирующими вирусами. В нашем исследовании в качестве основы использован штамм отечественной лицензированной живой гриппозной вакцины, широко применяемой в практике здравоохранения в России и в ряде зарубежных стран [16].

Ранее нами было показано, что усечение до 126 аминокислот белка NS1 вакцинного штамма ЖГВ H7N9 приводит к усилению гуморального и T-клеточного ответа в эксперименте на мышах [7]. В отличие от указанного исследования, где T-клеточный иммунный ответ оценивался путём стимуляции клеток синтетическими пептидами, соответствующими иммунодоминантным CD8<sup>+</sup>-T-клеточным эпитопам NP<sub>366</sub>, в настоящей работе проводили стимуляцию иммунных клеток вакцинированных мышей цельным очищенным вирусом гриппа H1N1/wt. Такая стимуляция лучше отражает реальную клиническую ситуацию, поскольку при гриппе организм сталкивается с циркулирующим вирусом в его естественном виде и инфицированные клетки презентир-

руют на комплексах МНС-I и МНС-II большое разнообразие T-клеточных вирусных эпитопов.

В настоящем исследовании продемонстрировано усиление CD4<sup>+</sup>-T-клеточного ответа у мышей при их иммунизации штаммом живой гриппозной вакцины с модифицированным белком NS1, причём данный эффект был выражен как на системном (спленоциты), так и на локальном уровне (клетки из тканей лёгких). При этом системные вирусспецифические CD4<sup>+</sup>-T-клетки характеризовались полифункциональным фенотипом, продуцируя, помимо ИФН- $\gamma$ , и другие ключевые провоспалительные цитокины, участвующие в противовирусном ответе, такие как ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2. Известно, что T-лимфоциты, способные секретировать одновременно несколько цитокинов в ответ на антигенную стимуляцию, являются более точными предикторами способности организма противостоять реинфекции, чем монофункциональные клетки с секрецией только ИФН- $\gamma$  [17]. Для системных CD8<sup>+</sup>-T<sub>EM</sub>-клеток не было выявлено значимого увеличения пропорции цитокинпродуцирующих T-клеток при укорочении белка NS1, вероятно, из-за небольшого количества животных в группе и высокой дисперсии. Эти данные в целом



**Рис. 2.** Индукция вирусспецифических Т-клеток памяти в ткани лёгких при иммунизации мышей исследуемыми вакцинными вирусами.

а, г — количество ИФН- $\gamma$ -продуцирующих Т<sub>EM</sub>-клеток (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) с фенотипом CD4<sup>+</sup> (а) и CD8<sup>+</sup>-клеток (г) в группах мышей, иммунизированных ЖГВ или ЖГВ NS<sub>126</sub>, а также в контрольной группе; б, д — уровень вирусспецифических тканерезидентных клеток памяти с фенотипом CD69<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> среди ИФН- $\gamma$ -клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> (б) и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (д); в, е — количество вирусспецифических тканерезидентных клеток памяти с фенотипом CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> среди ИФН- $\gamma$ -клеток в популяциях CD4<sup>+</sup> (в) и CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (е). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  (критерий Манна-Уитни).

**Fig. 2.** Induction of virus-specific memory T cells in the lungs after immunization of mice with the study vaccine viruses.

(a, d) Number of IFN $\gamma$ -producing effector memory T cells (CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) with CD4<sup>+</sup> (a) and CD8<sup>+</sup> (d) cell phenotype in groups of mice immunized with LAIV or LAIV with truncated NS<sub>126</sub>, as well as in controls. Proportion of virus-specific tissue-resident memory cells with CD69<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> phenotype among IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell populations (b and f, respectively). Proportion of virus-specific tissue-resident memory cells with CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> phenotype among IFN $\gamma$ <sup>+</sup> cells in CD4<sup>+</sup> (c) and CD8<sup>+</sup> T cell populations (e and f, respectively). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  between groups (Mann–Whitney test).

согласуются с полученными ранее результатами для вакцинного штамма H7N9, экспрессирующего укороченный вариант белка NS1, где CD8<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ оценивали после стимуляции спленоцитов пептидом, соответствующим иммунодоминантному эпитопу NP<sub>366</sub> [7]. Важно отметить, что более выраженный Т-клеточный ответ, формирующийся непосредственно в тканях лёгких мышей, иммунизированных вакцинным штаммом ЖГВ с NS1<sub>126</sub>, указывает на потенциал развития ускоренного иммунного ответа при последующем контакте с патогеном, поскольку Т<sub>RM</sub>-клетки в лёгких представляют собой первую линию иммунной защиты организма от респираторных патогенов [18, 19].

### Заключение

В настоящей работе приведены свидетельства усиления системного и локализованного в лёгких

CD4<sup>+</sup>-Т-клеточного иммунного ответа при укорочении белка NS1 штамма сезонной ЖГВ. Поскольку вирусспецифические Т-клетки выявлялись при стимуляции лимфоцитов цельным живым вирусом H1N1/wt, можно предположить, что при повторном инфицировании современным циркулирующим вирусом данного подтипа иммунизированные вариантом ЖГВ H1N1 NS1<sub>126</sub> мыши будут лучше защищены от клинических проявлений заболевания, чем животные, получившие классический вариант ЖГВ.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391(10127):1285–300. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2)
2. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic re-

- view and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012;12(1):36–44. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70295-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70295-x)
3. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., et al. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 2014;185:53–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.015>
  4. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 2014;95(Pt. 12):2594–611. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.069542-0>
  5. García-Sastre A., Egorov A., Matassov D., et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 1998;252(2):324–30. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9508>
  6. Haye K., Burmakina S., Moran T., et al. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J. Virol.* 2009;83(13):6849–62. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.02323-08>
  7. Prokopenko P., Matyushenko V., Rak A., et al. Truncation of NS1 protein enhances T cell-mediated cross-protection of a live attenuated influenza vaccine virus expressing wild-type nucleoprotein. *Vaccines (Basel).* 2023;11(3):501. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines11030501>
  8. Rekestin A., Isakova-Sivak I., Petukhova G., et al. Immunogenicity and cross protection in mice afforded by pandemic H1N1 live attenuated influenza vaccine containing wild-type nucleoprotein. *Biomed. Res. Int.* 2017;2017(1):9359276. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/9359276>
  9. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938;27:493–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
  10. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Matyushenko V., et al. Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease. *Antiviral. Res.* 2019;168:9–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.05.001>
  11. Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenkaya D., et al. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response. *Expert. Rev. Vaccines.* 2021;20(9):1097–112. DOI: <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1964961>
  12. Pica N., Langlois R.A., Krammer F., et al. NS1-truncated live attenuated virus vaccine provides robust protection to aged mice from viral challenge. *J. Virol.* 2012;86(19):10293–301. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.01131-12>
  13. Baskin C.R., Bielefeldt-Ohmann H., García-Sastre A., et al. Functional genomic and serological analysis of the protective immune response resulting from vaccination of macaques with an NS1-truncated influenza virus. *J. Virol.* 2007;81(21):11817–27. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.00590-07>
  14. Vasilyev K.A., Yukhneva M.A., Shurygina A.P.S., et al. Enhancement of the immunogenicity of influenza A virus by the inhibition of immunosuppressive function of NS1 protein. *Microbiology Independent Research Journal.* 2018;(5):48–58. DOI: <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2018-5-1-48-58> EDN: <https://elibrary.ru/ytgzsp>
  15. Vasilyev K., Shurygina A.P., Sergeeva M., et al. Intranasal immunization with the influenza A virus encoding truncated NS1 protein protects mice from heterologous challenge by restraining the inflammatory response in the lungs. *Microorganisms.* 2021;9(4):690. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040690> EDN: <https://elibrary.ru/zfpdqm>
  16. Rudenko L., Yeolekar L., Kiseleva I., Isakova-Sivak I. Development and approval of live attenuated influenza vaccines based on Russian master donor viruses: process challenges and success stories. *Vaccine.* 2016;34(45):5436–41. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.018>
  17. Makedonas G., Betts M.R. Polyfunctional analysis of human T cell responses: importance in vaccine immunogenicity and natural infection. *Springer Semin. Immunopathol.* 2006;28(3):209–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00281-006-0025-4>
  18. Takamura S. Persistence in temporary lung niches: a survival strategy of lung-resident memory CD8+ T cells. *Viral. Immunol.* 2017;30(6):438–50. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0016>
  19. Topham D.J., Reilly E.C. Tissue-resident memory CD8+ T cells: from phenotype to function. *Front. Immunol.* 2018;9:515. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00515>

### Информация об авторах

**Прокопенко Полина Игоревна** — м. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, [pi.prokopenko@gmail.com](mailto:pi.prokopenko@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7247-979X>

**Степанова Екатерина Алексеевна** — к. б. н., в. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

**Матюшенко Виктория Аркадьевна** — н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

**Рак Александра Яковлевна** — к. б. н., с. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>

**Чистякова Анна Константиновна** — лаборант-исследователь отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9541-5636>

**Костромитина Арина Дмитриевна** — м. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

**Котомина Татьяна Сергеевна** — к. б. н., с. н. с. отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

### Information about the authors

**Polina I. Prokopenko** — junior researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, [pi.prokopenko@gmail.com](mailto:pi.prokopenko@gmail.com), <https://orcid.org/0000-0002-7247-979X>

**Ekaterina A. Stepanova** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8670-8645>

**Victoria A. Matyushenko** — researcher, A.A. Smorodintsev Department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4698-6085>

**Alexandra Ya. Rak** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5552-9874>

**Anna K. Chistyakova** — laboratory assistant, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9541-5636>

**Arina D. Kostromitina** — junior research assistant, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5432-0171>

**Tatyana S. Kotomina** — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9999-089X>

**Igor V. Kudryavtsev** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of cellular immunology, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

*Кудрявцев Игорь Владимирович* — к. б. н., зав. лаб. клеточной иммунологии отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>

*Рубинштейн Артем Аркадьевич* — лаборант-исследователь отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8493-5211>

*Комлев Алексей Сергеевич* — м. н. с. отдела общей патологии и патофизиологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9111-0755>

*Руденко Лариса Георгиевна* — д. м. н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

*Исакова-Сивак Ирина Николаевна* — д. б. н, член-корреспондент РАН, зав. лаб. иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

**Участие авторов.** *Прокопенко П.И.* — разработка концепции статьи, подготовка и проведение экспериментальных исследований, сбор, обработка и анализ данных, написание текста статьи; *Степанова Е.А.* — разработка концепции статьи, разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи; *Матюшенко В.А.* — разработка концепции статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи; *Рак А.Я., Чистякова А.К., Костромитина А.Д., Котомина Т.С.* — участие в экспериментах на лабораторных животных, сбор и обработка данных, редактирование текста статьи; *Кудрявцев И.В.* — разработка концепции статьи, разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных; *Рубинштейн А.А.* — разработка методологических подходов, анализ и интерпретация данных, сбор, обработка и анализ данных; *Комлев А.С.* — подготовка материалов для исследования, сбор и обработка данных, редактирование текста статьи; *Руденко Л.Г.* — идея и разработка концепции статьи, написание текста статьи, окончательное утверждение версии для публикации; *Исакова-Сивак И.Н.* — идея и разработка концепции статьи, общее руководство проектом, написание статьи, рецензирование и редактирование текста, окончательное утверждение версии для публикации. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 01.09.2024;  
принята к публикации 16.10.2024;  
опубликована 30.10.2024

*Artem A. Rubinstein* — laboratory assistant, Department of immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8493-5211>

*Alexey S. Komlev* — junior researcher, Department of general pathology and pathophysiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9111-0755>

*Larisa G. Rudenko* — D. Sci. (Med.), Professor, Head, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-0107-9959>

*Irina N. Isakova-Sivak* — D. Sci. (Biol.), RAS Corresponding Member, Head, Laboratory of immunology and prevention of viral infections, A.A. Smorodintsev department of virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2801-1508>

**Author contribution.** *Prokopenko P.I.* — development of the concept of the article, preparation and conduct of experimental research, collection, processing and analysis of data, writing the text of the article; *Stepanova E.A.* — development of the concept of the article, development of methodological approaches, analysis and interpretation of data, writing the text of the article; *Matyushenko V.A.* — development of the concept of the article, analysis and interpretation of data, writing the text of the article; *Rak A.Ya., Chistyakova A.K., Kostromitina A.D., Kotomina T.S.* — participation in experiments on laboratory animals, data collection and processing, editing of the text of the article; *Kudryavtsev I.V.* — development of the concept of the article, development of methodological approaches, analysis and interpretation of data; *Rubinstein A.A.* — development of methodological approaches, analysis and interpretation of data, collection, processing and analysis of data; *Komlev A.S.* — preparation of materials for research, data collection and processing, editing of the text of the article; *Rudenko L.G.* — idea and development of the concept articles, writing the text of the article, final approval of the version for publication; *Isakova-Sivak I.N.* — the idea and development of the concept of the article, general project management, writing the article, reviewing and editing the text, final approval of the version for publication. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 01.09.2024;  
accepted for publication 16.10.2024;  
published 30.10.2024