

УДК 571.27:578.245:578.74

Влияние липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* PG на развитие воспаления, вызванного различными штаммами вируса гриппа

С. В. Зубова^{1*}, М. Ф. Ворович^{2,3}, А. С. Гамбарян², А. А. Ишмухаметов^{2,3}, С. В. Грачев^{1,3}, И. Р. Прохоренко¹

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 3

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 142782, Московская обл., пос. Института полиомиелита, Киевское ш., 27-й км, домовладение 8, стр. 1

³Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119811, Москва, ул. Трубецкая, 8

*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.12.2018

Принята к печати 15.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-46-55

РЕФЕРАТ Исследованы особенности развития воспалительных процессов у мышей, инфицированных двумя разными штаммами вируса гриппа: A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и A/Hamburg/2009 MA (H1N1). Оценено влияние нетоксичного липополисахарида *Rhodobacter capsulatus* PG на выживаемость и изменение массы тела мышей, продукцию антител IgG и индукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Показано, что липополисахарид *R. capsulatus* PG индуцирует синтез интерферона- β как при самостоятельном введении, так и на фоне заражения вирусом гриппа А, а также способствует образованию противовирусных антител в крови инфицированных гриппом животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гриппа, H5N1, H1N1, липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG, мыши, противовирусные антитела, цитокины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DAMP – молекулярные структуры, связанные с повреждением; HA – гемагглютинин; HMGBl – белок амфотерин; IFN – интерферон; Ig – иммуноглобулин; IL – интерлейкин; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; MDCK – клетки почки собаки; MyD88 – белок миелоидной дифференцировки; NP – нуклеопротеин; PA, PB1 – белки полимеразного комплекса; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; ИФА – иммуноферментный анализ; ЛПС – липополисахарид.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемии гриппа продолжают охватывать миллионы людей в мире, несмотря на использование рекомендуемых вакцин, эффективность которых оказывается ниже прогнозируемой [1, 2]. Вирусы гриппа А обладают высокой степенью изменчивости генома и продуцируют резистентные штаммы, которые некоторое время контролируются вакцинами или антивирусными препаратами общеукрепляющего действия. Разработка безопасных и эффективных вакцин остается важной проблемой здравоохранения.

Взаимодействие вирусных компонентов с различными рецепторами активирует внутриклеточ-

ные пути, ответственные за секрецию IFN типа I, провоспалительных цитокинов и хемокинов. Ключевыми факторами, вовлеченными в распознавание вирусных лигандов, являются Toll-подобные рецепторы (TLR) клеток врожденного иммунитета. Локализованные на поверхности клеток TLR2 и TLR4 обнаруживают глико/липопротеины оболочки вирусов, а внутриклеточные и эндосомальные TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 – нуклеиновые кислоты [3, 4]. Toll-подобные рецепторы могут взаимодействовать с другими рецепторами, стимулируя ответ клеток врожденного иммунитета на патогены, включая вирусы гриппа [4]. TLR4 может активироваться

DAMP (damage-associated molecular patterns), молекулярными структурами, высвобождаемыми из зараженных вирусом клеток [5]. Показано, что разные штаммы гриппа активируют клетки с использованием различных механизмов, что приводит к синтезу различных цитокинов и хемокинов [6, 7].

На мышях линии C57BL/6J показано, что соединение E5564 (Эриторан), синтетический аналог нетоксичного липида А из *Rhodobacter sphaeroides*, при определенной схеме введения защищает мышей от смерти, вызываемой вирусом гриппа H1N1, адаптированным к мышам [8]. Известно, что ядерный негистоновый белок HMGB1 (High Mobility Group Box1, или амфотерин), представляющий собой DAMP, высвобождается сравнительно поздно после начала инфекции и участвует в развитии как граммотрицательного сепсиса, так и осложнений при гриппе, взаимодействуя с MD-2 и активируя TLR4 [5, 9, 10]. Активация TLR4 приводит к цитокиновому шторму с огромным выбросом провоспалительных цитокинов, включая интерфероны, факторы некроза опухолей, интерлейкины и хемокины [11]. Фармакологическая блокада TLR4 Эритораном значительно снижает смертность мышей от птичьего гриппа [8]. Липополисахарид (ЛПС) из штамма фототрофной бактерии *R. capsulatus* PG (*Rb.*) [12], структура липида А которого аналогична структуре липида А *R. sphaeroides*, является антагонистом эндотоксинов и подавляет активацию синтеза широкого спектра провоспалительных цитокинов клетками крови человека [13], что указывает на его способность блокировать TLR4.

Мыши являются основным инструментом для изучения иммунной системы и иммунных ответов человека. Однако существуют значительные различия между врожденной и адаптивной иммунной системами мыши и человека, которые отличаются соотношением клеток крови, составом плазмы, поверхностными рецепторами, уровнем экспрессии различных цитокинов и хемокинов и т.д. [14, 15]. Это следует учитывать при использовании мышей в качестве моделей болезней человека.

В настоящей работе изучено влияние нетоксичного ЛПС *Rb.* на индукцию про- и противовоспалительных цитокинов, а также на выживаемость мышей при заражении животных различными штаммами вируса гриппа А. Данное исследование направлено на изучение особенностей развития воспалительных процессов, вызванных вирусами гриппа H1N1 и H5N1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы наборы для ИФА: Mouse TNF alpha Platinum ELISA, Mouse IL-6 Platinum ELISA, Mouse IL-10 Platinum ELISA, Mouse INF gamma

Platinum ELISA (eBioscience, США), Mouse IFN beta ELISA Kit (PBL Assay Science, США).

ЛПС *Rb.* получен в лаборатории ИФПБ РАН согласно методике, описанной ранее [16].

Вирусы

В работе использовали штаммы вируса гриппа А: chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и Hamburg/2009 MA (H1N1), адаптированный к мышам. Вирусы культивировали в куриных эмбрионах. 50% инфекционную дозу вируса (TCID₅₀) определяли титрованием в культуре клеток MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). 50% летальную дозу (LD₅₀) определяли путем титрования на мышах. Эксперименты с высокопатогенным вирусом А/chicken/Kurgan/5/2005 проводили в боксах с уровнем безопасности BSL-3.

Мыши

В работе использовали мышей Balb/c массой 10–14 г возрастом 36–38 дней без различия пола. Животные получены из питомника ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА. Все манипуляции с животными проводили согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации [17] с соблюдением биологической этики при проведении экспериментов на лабораторных животных.

Экспериментальная гриппозная инфекция у мышей, зараженных штаммом H5N1 вируса гриппа

Мыши были разделены на шесть групп в зависимости от получаемых препаратов. Каждая группа включала не менее 12 животных. Животные пяти групп были заражены интраназально (по 50 мкл) под легким эфирным наркозом высокопатогенным вирусом гриппа птиц H5N1 в дозах от 10 до 10⁵ TCID₅₀ на мышь, что составляло от 10⁻¹ до 10³ LD₅₀. Шестая контрольная группа оставалась незараженной. Через 24 ч все группы делили пополам. Одной половине животных ежедневно в течение последующих 4 сут вводили внутривенно физраствор по 500 мкл/мышь, другой – ЛПС *Rb.* по 400 мкг/500 мкл/мышь. Контролем служили мыши, которым не вводили никаких агентов. Схема эксперимента представлена на рис. 1. У выживших к концу эксперимента животных (14-й день) после эвтаназии в CO₂-камере отбирали кровь, клетки крови осаждали, полученную сыворотку замораживали при -20°C до определения в ней титра антител к вирусу гриппа H5N1 методом ИФА.

Экспериментальная гриппозная инфекция у мышей, зараженных адаптированным к мышам штаммом H1N1 вируса гриппа

Использованный в работе пандемический вирус H1N1, адаптированный к мышам, был проведен че-

рез 20 пассажей в легких мышей и отличался от родительского штамма A/Hamburg/2009 (H1N1) делецией в нейраминидазе (NA) и мутациями в белках HA, NP, PA и PB1 (таблица). Вирус гриппа H1N1 обладает в 10^5 раз большей патогенностью для мышей, чем исходный родительский штамм.

Мышей делили на три группы в зависимости от получаемых препаратов. Каждая группа включала не менее 12 животных. Две группы мышей были заражены интраназально (по 50 мкл) под легким эфирным наркозом вирусом гриппа H1N1, адаптированным к мышам, в дозах 10 и 300 TCID₅₀ на мышь. Контрольная группа включала незараженных мышей. Через 2 сут после заражения все группы делили пополам. Одной половине ежедневно в течение последующих 4 сут вводили внутривенно физраствор по 500 мкл/мышь, другой – ЛПС Rb. по 400 мкг/500 мкл/мышь. Контролем служили мыши, которым не вводили никаких агентов. Схема эксперимента представлена на рис. 2. Через 5 ч после введения ЛПС Rb. у трех мышей каждой группы на 3, 4 и 5 день проводили забор крови после эвтаназии в CO₂-камере. Кровь центрифугировали, полученную сыворотку замораживали при -20°C до определения содержания цитокинов методом ИФА. У выживших к концу эксперимента (12-й день) животных после эвтаназии в CO₂-камере отбирали кровь, клетки крови осаждали, сыворотку замораживали при -20°C до определения уровня IgG1 и IgG2a антител к вирусу гриппа H1N1 методом ИФА.

Определение содержания цитокинов

Содержание цитокинов TNF-α, IL-6, IL-10, IFN-γ и IFN-β в образцах сывороток крови мышей, зараженных вирусом гриппа H1N1, определяли с помощью наборов для ИФА по методике, рекомендованной производителем. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 (Awareness, США) при длине волны 450 нм.

Определение содержания антител к вирусу гриппа

Для определения уровня антител на гемагглютинин (HA) вирусов гриппа H5N1 и H1N1 в сыворотке мышей в планшет (Nunc, MaxiSorp, США), сенсibilизированный фетуином, добавляли аллантоисную жидкость, содержащую 64 единицы HA одного из вирусов, выдерживали в течение ночи при 40°C, отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7.4 с 0.1% Твин-20 и блокировали буфером А (0.1% Твин-20, 0.2% БСА в ФСБ) в течение 1 ч. Для определения антител IgG1 и IgG2a каждую сыворотку титровали на двух разных планшетах. Блокирующий раствор удаляли, в лунки вносили

по 100 мкл сыворотки мышей, инфицированных H5N1, в разведениях от 1 : 40 до 1 : 2560, или H1N1 в разведениях от 1 : 50 до 1 : 3200 в буфере А. Плашки инкубировали в течение 4 ч при 40°C, отмывали ФСБ и добавляли меченные пероксидазой хрена антитела кролика против иммуноглобулинов мыши (Sigma, США), либо против IgG1 или IgG2a мыши и инкубировали при 40°C в течение 2 ч. Затем плашки отмывали ФСБ и окрашивали ортофенилендиамином. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 Униплан («Пикон», Россия) при длине волны 492 нм. Для исключения неспецифического связывания использовали контрольные лунки без вирусной подложки. Содержание антител в образцах выражали как разведение сыворотки, обеспечивающее сигнал, превышающий в 2 раза значение фона.

Статистический анализ

Для статистического анализа и графического представления данных использовали Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat) и OriginPro 7.5. Статистически значимые различия результатов оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние экспериментальных животных оценивали по выживаемости и изменению массы тела. Введение ЛПС Rb. мышам контрольной группы, а также заражение минимальной дозой 10 TCID₅₀ вируса H5N1, независимо от введения ЛПС Rb., не влияло на выживаемость животных до конца эксперимента (14-й день) (рис. 3). Гибель животных в группах, инфицированных дозами 10² и 10³ TCID₅₀ вируса H5N1, началась на 8-е сут после заражения, в дозе 10⁴ и 10⁵ TCID₅₀ – на 6-е. Все мыши, получившие 10³, 10⁴ и 10⁵ TCID₅₀ вируса гриппа, погибли к 10 сут после заражения независимо от введения ЛПС Rb. Дополнительное введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа в дозе 10² TCID₅₀, повысило их смертность (рис. 3). Кривые изменения веса показали, что введение ЛПС Rb. здоровым животным не влияло на их состояние и вес (рис. 4). Мыши, зараженные 10–10² TCID₅₀ вируса, продолжали набирать вес в течение всего времени эксперимента. Инфицирование дозами 10³–10⁵ TCID₅₀ заметно влияло на состояние животных, вызывая значительное воспаление и стремительное снижение веса. Дополнительное введение ЛПС Rb. на фоне заражения вирусом приводило к еще большему снижению веса (рис. 4).

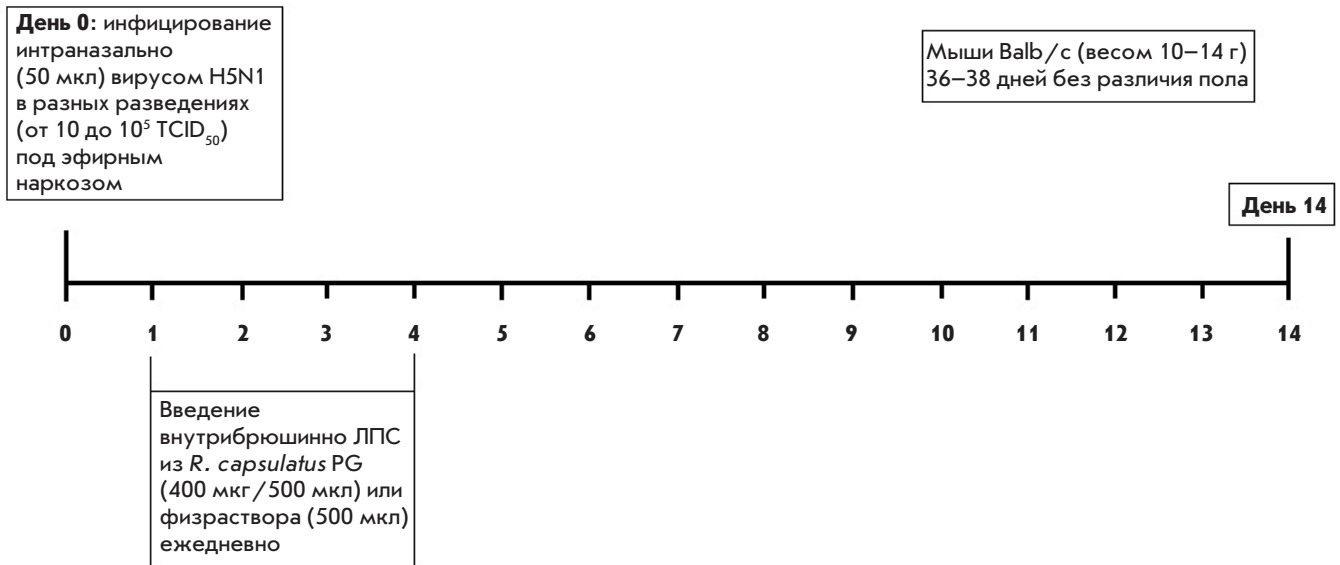


Рис. 1. Схема эксперимента по инфицированию мышей вирусом гриппа штамма A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1)

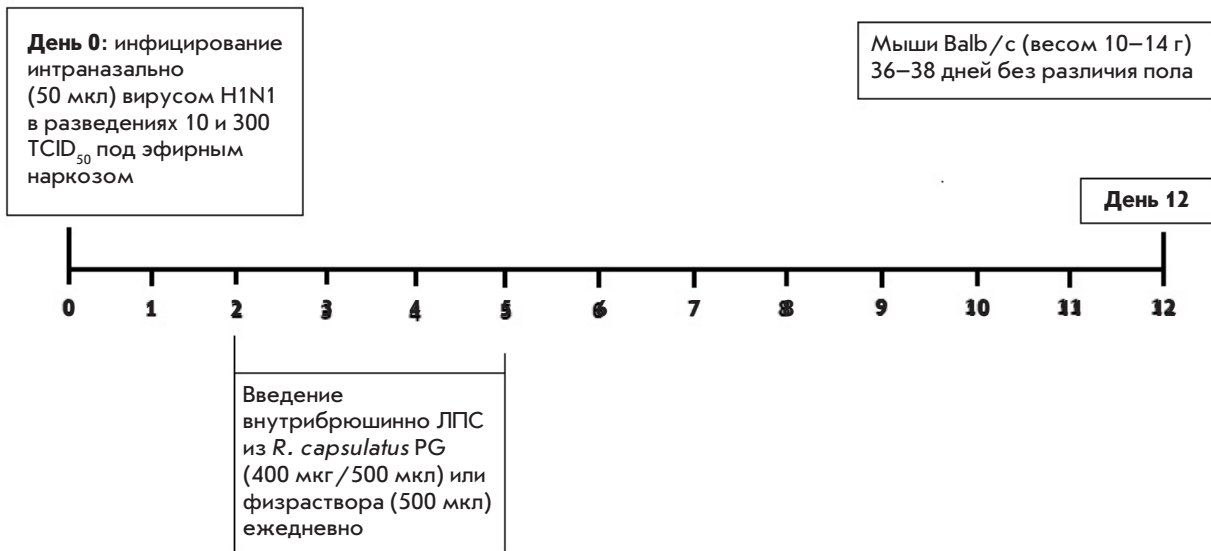


Рис. 2. Схема эксперимента по инфицированию мышей вирусом гриппа штамма A/Hamburg/2009 MA (H1N1)

Замены в вирусе A/Hamburg/2009 в процессе адаптации к мышам

Штамм вируса	Белок вируса, аминокислотная последовательность						
	NA	HA			NP	PA	PB1
Hamburg/2009	56–67	158	224	225	289	92	317
Hamburg/2009 MA	Del 56-67	G	R	D	H	N	M
		E	K	G	Y	S	V

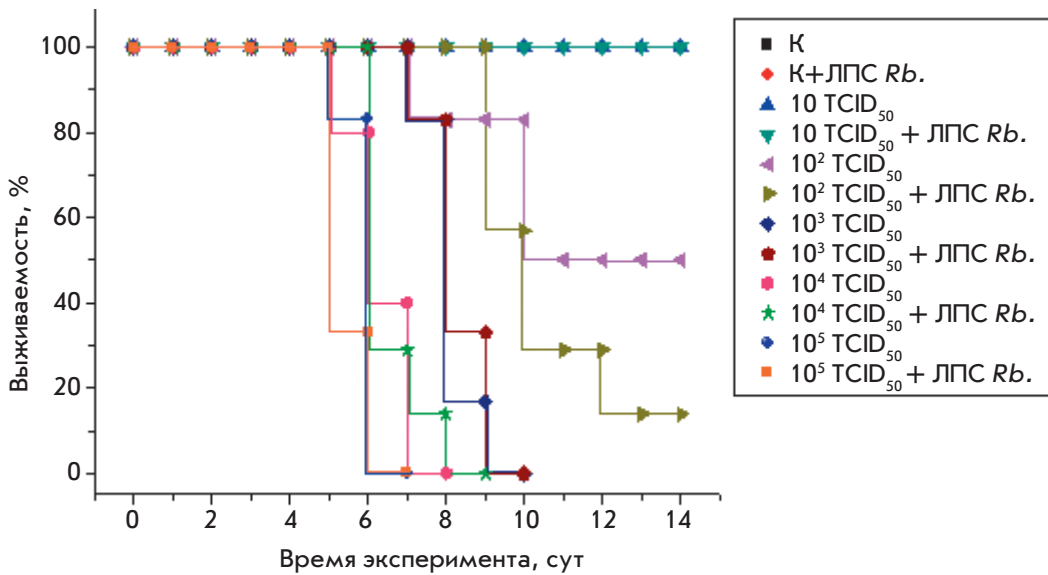


Рис. 3. Выживаемость мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и на их совместное действие

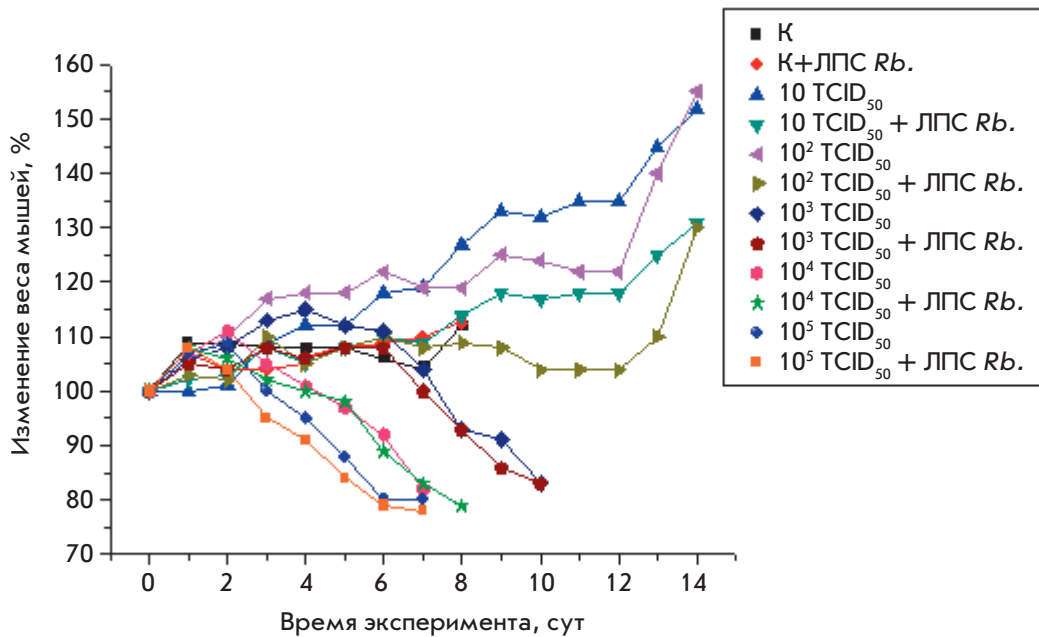


Рис. 4. Изменение веса мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и на их совместное действие

Введение ЛПС *Rb.* мышам контрольной группы и инфицирование дозой 10 TCID₅₀ вируса гриппа H1N1 с последующим введением ЛПС *Rb.* не влияло на выживаемость животных до конца эксперимента (12-й день). В группе мышей, зараженных вирусом гриппа в дозе 300 TCID₅₀, к концу эксперимента выжило 14% мышей, дополнительное введение ЛПС *Rb.* увеличивало смертность мышей (рис. 5). Анализ кривых изменения веса показал, что введение ЛПС *Rb.* здоровым мышам не влияло на состояние и вес контрольных животных. Мыши, инфицированные 10 TCID₅₀ вируса H1N1, не проявляли признаков болезни и на 3-й день после инфицирования начинали быстро прибавлять в весе до окончания эксперимен-

та (12-й день). Дополнительное введение ЛПС *Rb.* животным, инфицированным вирусом в этой дозе, приводило к снижению их веса после 7-го дня эксперимента. Инфицирование вирусом (300 TCID₅₀) заметно влияло на состояние мышей, вызывая значительное воспаление и снижение веса. Введение ЛПС *Rb.* на фоне заражения вирусом ухудшало состояние животных и приводило к дополнительному снижению веса (рис. 6).

Определение выживаемости и изменения массы животных, инфицированных вирусом гриппа H5N1 или H1N1, показало, что ЛПС *Rb.* не защищал мышей от летальной инфекции (рис. 3–6). Известно, что ежедневное (в течение 5-ти сут) внутривенное

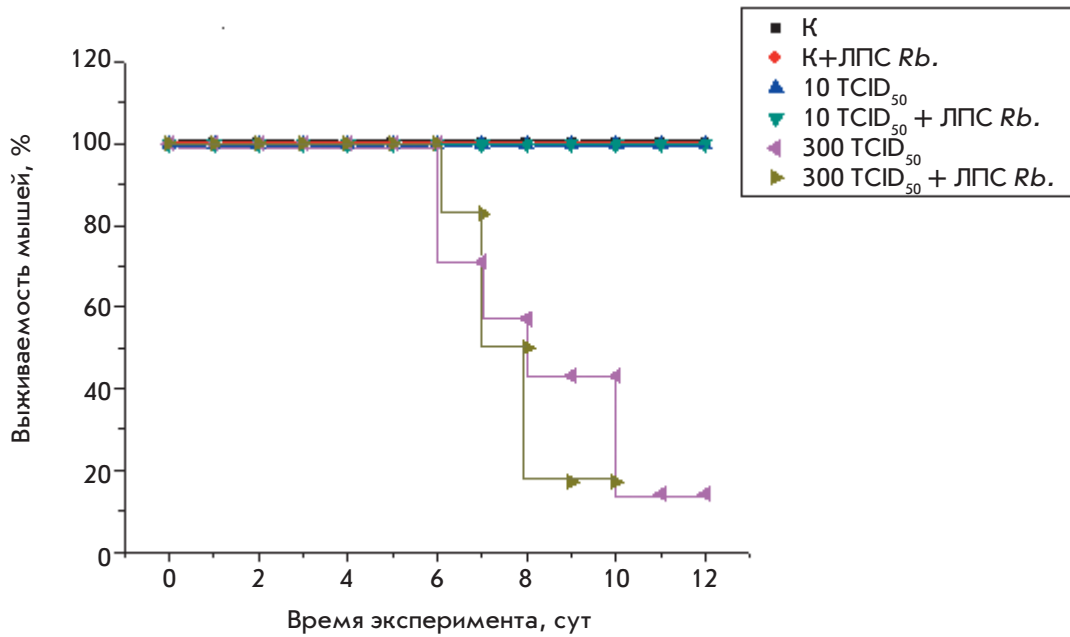


Рис. 5. Выживаемость мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) и на их совместное действие

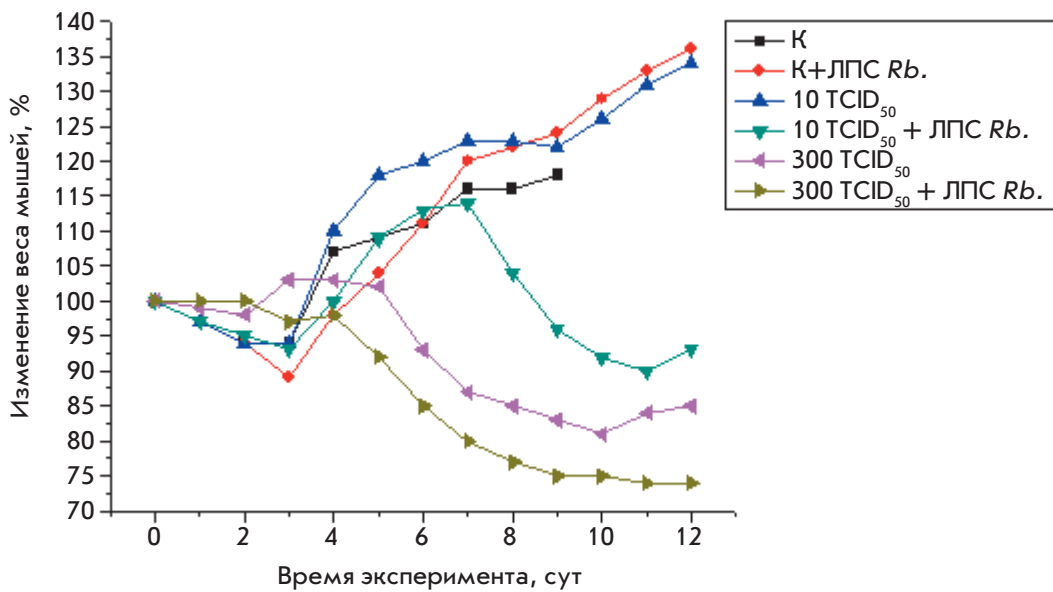


Рис. 6. Изменение веса мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) и на их совместное действие

введение Эриторана через 2 сут после инфицирования защищало мышей от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Показано, что защита от DAMP, высвобождаемых к этому времени из инфицированных и разрушенных вирусом гриппа клеток, происходит по TLR4-зависимому механизму [18]. Тип вируса определяет механизмы ответа врожденного иммунитета на инфекцию. Пути сигнализации при инфицировании разными штаммами вирусов H5N1 и H1N1 различаются и определяют выживание и патологию развития воспаления [7]. Очевидно, в наших экспериментах инфекция развивается по молекулярным механизмам, отличным от активации клеток по пути

TLR4. Возможно также, что использованная нами схема введения и концентрация ЛПС *Rb.* не эффективны для защиты от этих штаммов вируса.

К признакам вирусной инфекции относятся повышенная индукция провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких, как TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 [19], а также IFN- β и IFN- γ , обладающих противовирусным действием [20, 21].

Введение мышам ЛПС *Rb.* вызывало к 3 дню возрастание содержания TNF- α в сыворотке крови в 1.5 раза по сравнению с контрольными мышами, которое сохранялось примерно на том же уровне до 5-го дня эксперимента. Следует отметить, что содержание

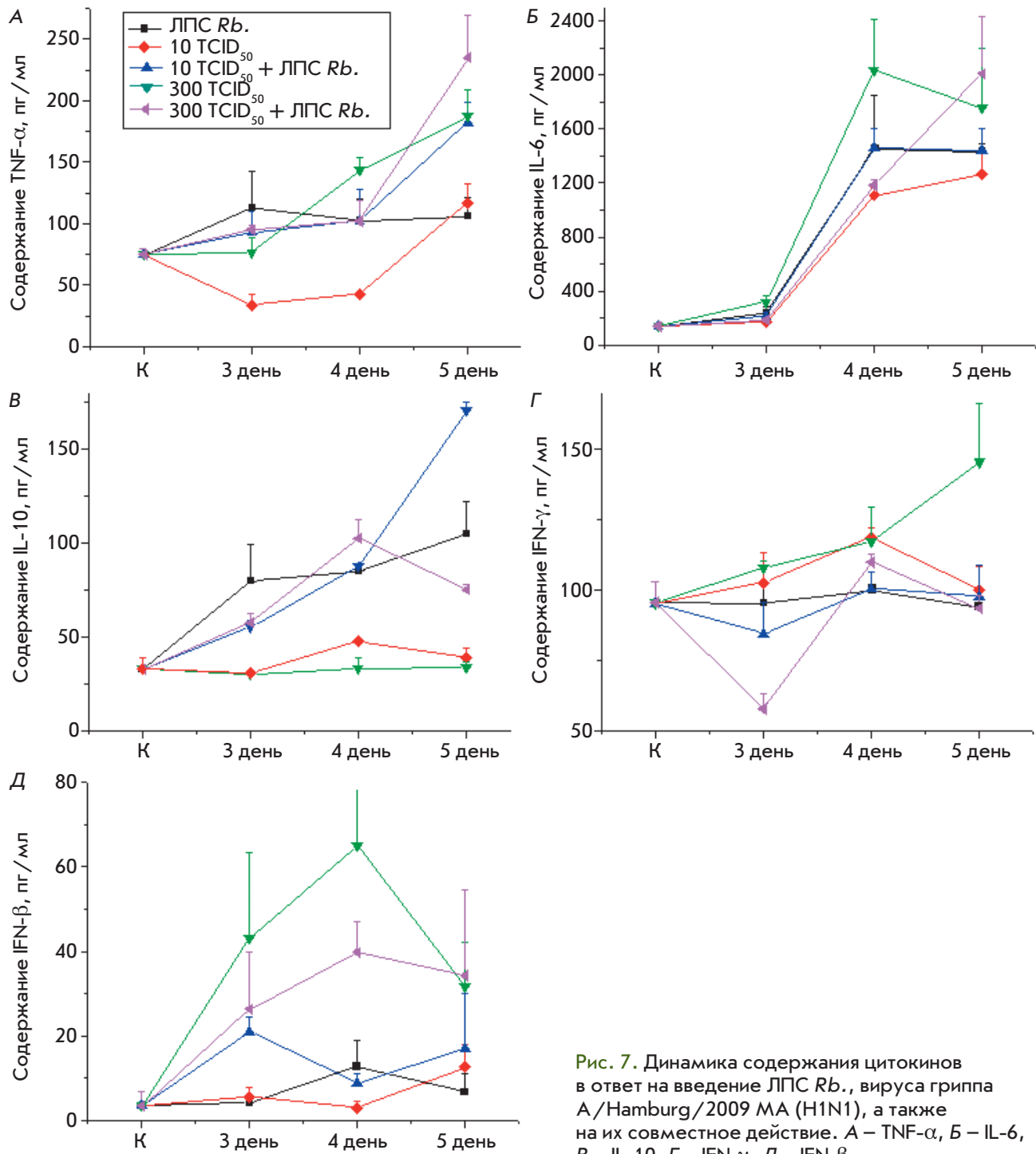


Рис. 7. Динамика содержания цитокинов в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1), а также на их совместное действие. А – TNF-α, Б – IL-6, В – IL-10, Г – IFN-γ, Д – IFN-β

TNF-α в сыворотке контрольных мышей отличалось достаточно высоким значением (74.7 ± 8.7 пг/мл), указывающим на сенсibilизированное состояние животных. Образование TNF-α в крови мышей, инфицированных вирусом гриппа, зависело от дозы вируса и имело положительную динамику в ходе эксперимен-

та. Введение ЛПС *Rb.* инфицированным мышам усиливало продукцию TNF-α в их крови (рис. 7А).

Динамика синтеза IL-6 во всех вариантах опыта была сходной. Уровень IL-6 значительно возрастал (от 1000 до 2000 раз) к 4-му дню эксперимента. У инфицированных мышей продукция IL-6 зависела

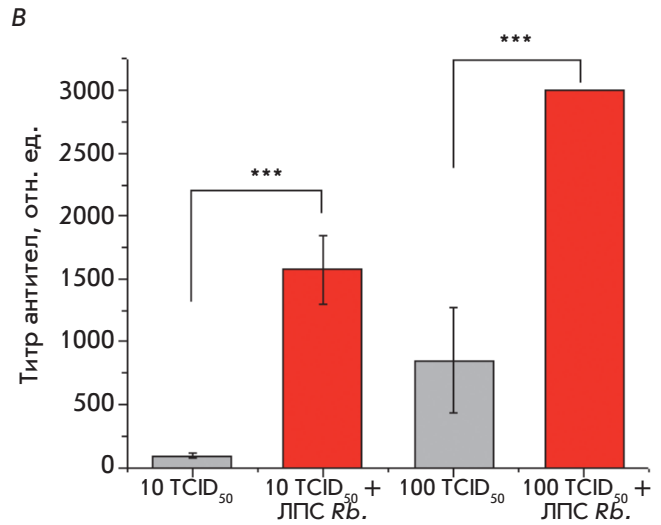
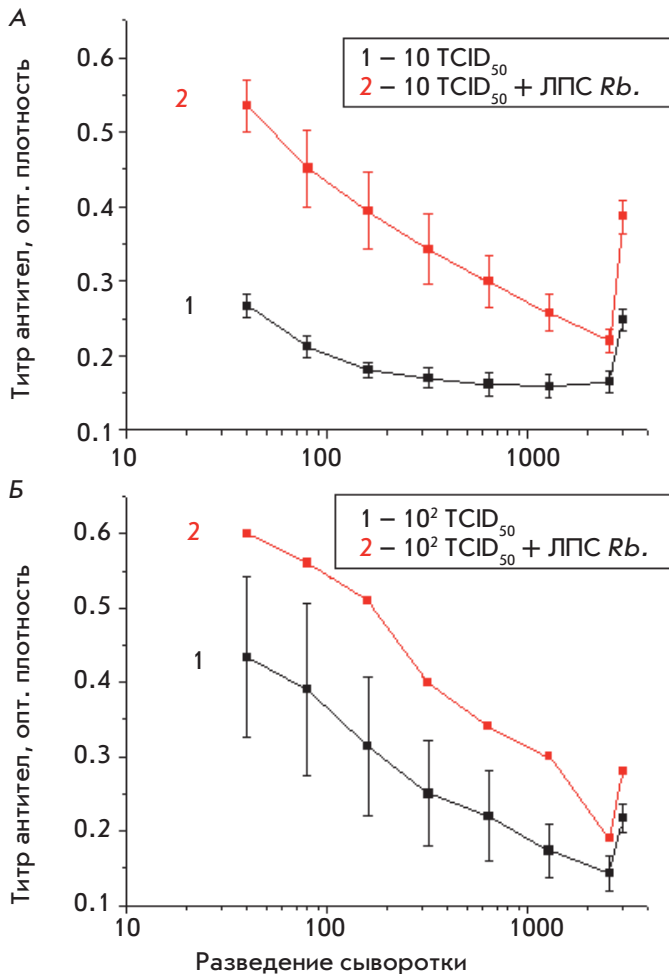


Рис. 8. Влияние ЛПС Rb. на уровни антител к вирусу гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) в сыворотке мышей, выживших к 14-му дню опыта. А – доза вируса 10 TCID₅₀; Б – доза вируса 10² TCID₅₀; В – титр антител в отн. ед. *** $p < 0.001$

от дозы вируса. Содержание IL-6 в ответ на введение ЛПС Rb. было сравнимым с содержанием у мышей, инфицированных вирусом гриппа. Введение ЛПС Rb. инфицированным мышам незначительно усиливало выработку IL-6 к 5-му дню эксперимента (рис. 7Б).

Из полученных результатов видно, что вирусная инфекция вызывает дозозависимую индукцию синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-6, возрастающую со временем. Эти цитокины вырабатываются, в основном, моноцитами и макрофагами в ответ как на бактерии, так и на вирусы, с использованием независимых путей передачи сигнала с привлечением разных поверхностных и внутриклеточных рецепторов, но одних и тех же адаптерных белков и транскрипционных факторов. Данные по индукции синтеза TNF- α и IL-6 показывают, что введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа, усиливало провоспалительный ответ их иммунных клеток (рис. 7А, Б). Это усугубляло состояние животных, о чем свидетельствуют данные по выживаемости и изменению веса (рис. 5, 6).

Введение мышам ЛПС Rb. вызывало повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10, превышающего к 5-му дню исходный уровень в 3 раза. Вирус гриппа, независимо от дозы, не влиял на выработку противовоспалительного цитокина IL-10. Введение ЛПС Rb. инфицированным мышам независимо от дозы вируса практически не влияло на индукцию синтеза IL-10 по сравнению с введением только ЛПС Rb. (рис. 7В). Иммунорегуляторный цитокин IL-10 – ключевой компонент системы, регулирующей чрезмерные иммунные ответы подавлением экспрессии провоспалительных цитокинов, таких, как TNF- α , IL-6 и IL-1 [22, 23]. Уровни продукции IL-10 в ответ на ЛПС значительно выше, чем при вирусной инфекции [24, 25]. Полученные результаты указывают на повышение уровня IL-10 в ответ на введение ЛПС Rb. как здоровым, так и инфицированным вирусом гриппа мышам. Это может свидетельствовать о том, что ЛПС Rb. способствует усилению противовоспалительных ответов клеток (рис. 7В).

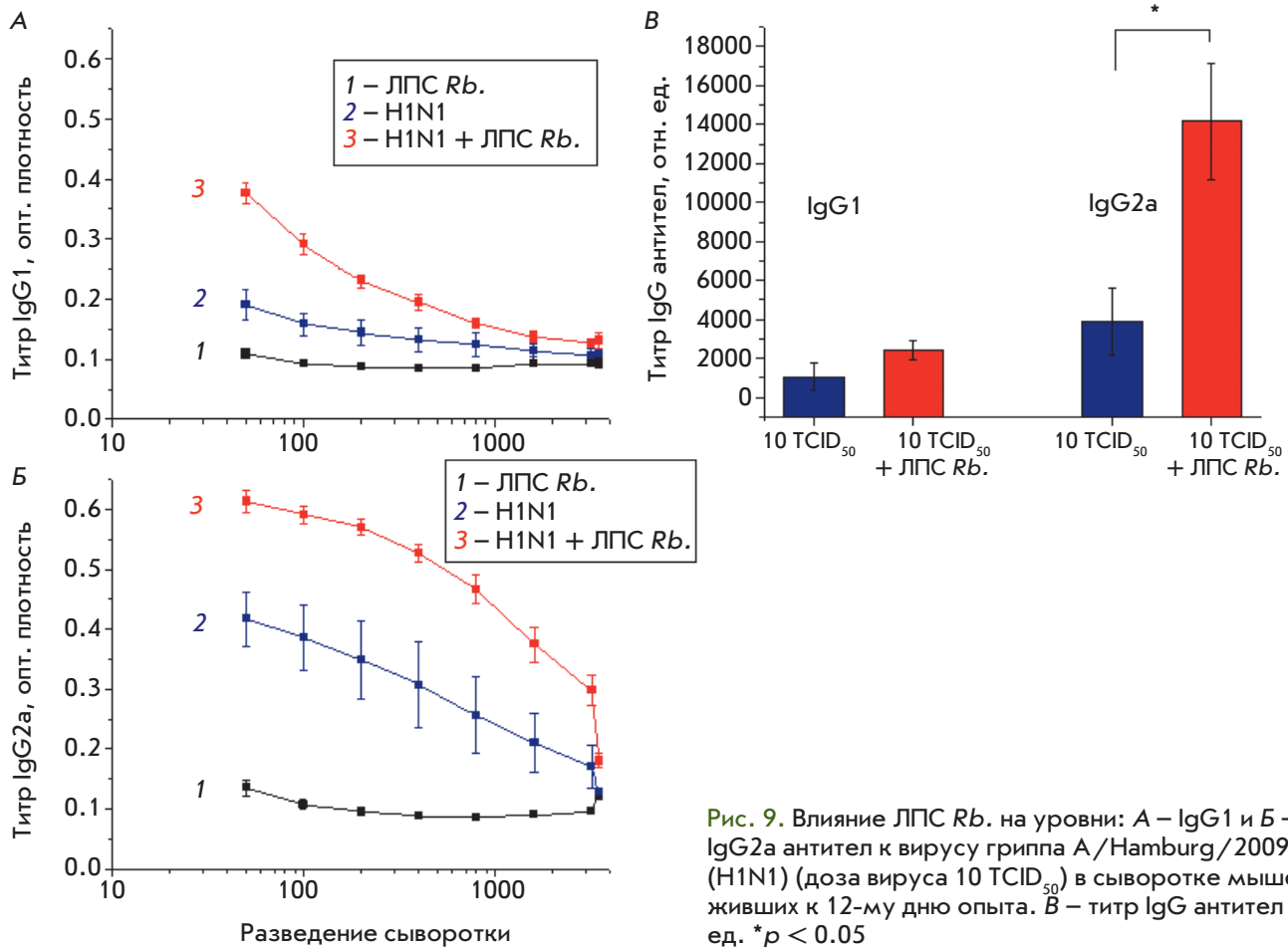


Рис. 9. Влияние ЛПС Rb. на уровни: А – IgG1 и Б – IgG2a антител к вирусу гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) (доза вируса 10 TCID₅₀) в сыворотке мышей, выживших к 12-му дню опыта. В – титр IgG антител в отн. ед. **p* < 0.05

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии продукции IFN- γ в ответ на введение мышам ЛПС Rb. Вирус гриппа дозозависимо увеличивает содержание IFN- γ в крови мышей. Более того, дополнительное введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа H1N1, снижало выработку IFN- γ в их крови (рис. 7Г).

Не влияя на выработку IFN- γ , ЛПС Rb. вызывал к 4 дню эксперимента увеличение продукции IFN- β в 4 раза по сравнению с контрольным уровнем. На 5 день содержание IFN- β снижалось до исходного уровня. Содержание IFN- β в ответ на инфицирование вирусом H1N1 в дозе 10 TCID₅₀ возрастало к 5 дню эксперимента в 3 раза. Вирус гриппа в дозе 300 TCID₅₀ значительно усиливал индукцию IFN- β к 4 дню (в 16 раз) по сравнению с исходным значением. Введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным 10 TCID₅₀ вируса гриппа, усиливало, а в дозе 300 TCID₅₀ снижало содержание цитокина по сравнению с мышами, инфицированными только вирусом гриппа (рис. 7Д).

Полученные результаты показали, что количества IFN- γ и IFN- β , синтезируемые при использованной

схеме введения ЛПС Rb., были недостаточны для эффективной противовирусной защиты против исследуемых штаммов вируса.

IFN- β , входящий в состав вакцины против гриппа, действует как мощный адъювант и способствует индукции синтеза IgG2a и IgA, обеспечивая защиту от заражения. Образование IgG2a антител, характерное для ответа на вирусную инфекцию, оказывает защитное и нейтрализующее действие против вирусов гриппа. В ходе вирусной инфекции экспрессия IFN типа I и генерация IgG2a антител являются взаимосвязанными событиями биологической значимости для последующего защитного иммунитета [26].

Действие существующих вакцин против инфекции вирусами гриппа основано, главным образом, на индукции синтеза нейтрализующих антител в ответ на вирусный HA [27]. Определение уровня антител на HA вируса гриппа H5N1 в сыворотке мышей, показало, что чем выше заражающая доза вируса, тем выше титр антител в сыворотке инфицированных животных. Дополнительное введение ЛПС Rb. мы-

шам, зараженным вирусом гриппа H5N1, приводило к достоверному росту титра антител ($p < 0.001$) в сыворотке крови (рис. 8).

Определение уровней IgG1 и IgG2a антител в ответ на инфицирование вирусом гриппа H1N1 показало, что титры IgG2a значительно выше, чем IgG1 во всех группах животных. Введение ЛПС Rb. статистически значимо увеличивало уровень IgG2a в сыворотке по сравнению с мышами, инфицированными вирусом гриппа без дополнительного введения ЛПС Rb. ($p < 0.05$) (рис. 9).

Врожденный иммунный ответ имеет решающее значение в борьбе с вирусами и играет ключевую роль в индукции и регуляции адаптивных иммунных ответов. По этой причине TLR-лиганды рассматриваются в качестве потенциальных адъювантов для включения в вакцинные препараты. Предполагается, что одновременная доставка TLR-лиганда и представляющего интерес антигена более эффективна, чем вакцинация смесью адъюванта и антигена [28, 29].

Из полученных результатов видно, что введение мышам ЛПС Rb. способствует продукции IFN- β (рис. 7Д), а в крови мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа, контролирует его уровень. IFN- β способствует выработке антител клетками приобретенного иммунитета [26]. Результаты данной работы также показывают, что дополнительное введение ЛПС Rb. приводит к выработке антител в крови животных, инфицированных вирусом гриппа А (рис. 8, 9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы показано, что нетоксичный природный ЛПС Rb. способствует выработке иммуномодулирующего цитокина IFN- β как при самостоятельном введении, так и на фоне заражения штаммами вируса гриппа А/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и А/Hamburg/2009 MA (H1N1), а также способствует образованию антител на HA этих штаммов в крови инфицированных животных. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Potts A., Cottrell S., Johnston J., Reynolds A., Gunson R., Thompson C., et al. // *Euro Surveill.* 2016. V. 21. № 13. P. 30179.
2. McLean H.Q., Thompson M.G., Sundaram M.E., Kieke B.A., Gaglani M., Murthy K., Piedra P.A., Zimmerman R.K., Nowalk M.P., Raviotta J.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2015. V. 211. № 10. P. 1529–1540.
3. Finberg R.W., Wang J.P., Kurt-Jones E.A. // *Rev. Med. Virol.* 2007. V. 17. № 1. P. 35–43.
4. Kawai T., Akira S. // *Immunity.* 2011. V. 34. № 5. P. 637–650.
5. Yang H., Antoine D.J., Andersson U., Tracey K.J. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 93. № 6. P. 865–873.
6. Sakabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Takano R., Nidom C.A., Le M.Q., Nagamura-Inoue T., Horimoto T., Yamashita N., Kawaoaka Y. // *J. Gen. Virol.* 2011. V. 92. № 6. P. 1428–1434.
7. Leung Y.H., Nicholls J.M., Ho C.K., Sia S.F., Mok C.K., Valkenburg S.A., Cheung P., Hui K.P., Chan R.W., Guan Y., et al. // *J. Gen. Virol.* 2014. V. 95. № 9. P. 1870–1879.
8. Shirey K.A., Lai W., Scott A.J., Lipsky M., Mistry P., Pletneva L.M., Karp C.L., McAlees J., Giannini T.L., Weiss J., et al. // *Nature.* 2013. V. 497. № 7450. P. 498–502.
9. Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J.M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., et al. // *Science.* 1999. V. 285. № 5425. P. 248–251.
10. Alleva L.M., Budd A.C., Clark I.A. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 2. P. 1454–1459.
11. Liu Q., Zhou Y., Yang Z. // *Cell Mol. Immunol.* 2016. V. 13. № 1. P. 3–10.
12. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010 г.
13. Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 3. С. 401–409.
14. Warren H.S., Fitting C., Hoff E., Adib-Conquy M., Beasley-Topliffe L., Tesini B., Liang X., Valentine C., Hellman J., Hayden D., Cavaillon J.M. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 2. P. 223–232.
15. Munford R.S. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 2. P. 175–177.
16. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.Р. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
17. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
18. Shirey K.A., Lai W., Patel M.C., Pletneva L.M., Pang C., Kurt-Jones E., Lipsky M., Roger T., Calandra T., Tracey K.J., et al. // *Mucosal Immunology.* 2016. V. 9. № 5. P. 1173–1182.
19. Mogensen T.H., Paludan S.R. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. № 1. P. 131–150.
20. Lai C., Wang X., Yang P. // *Clin. Microbiol.* 2014. V. 3. № 3. P. 147–149.
21. Betakova T., Kostrovova A., Lachova V., Turianova L. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. V. 23. № 18. P. 2616–2622.
22. Williams L., Bradley L., Smith A., Foxwell B. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 1. P. 567–576.
23. Saraiva M., O'Garra A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 3. P. 170–181.
24. Yu X., Zhang X., Zhao B., Wang J., Zhu Z., Teng Z., Shao J., Shen J., Gao Y., Yuan Z., Wu F. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. P. e28680.
25. Blok D.C., van der Sluijs K.F., Florquin S., de Boer O.J., van't Veer C., de Vos A.F., van der Poll T. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e58191.
26. Proietti E., Bracci L., Puzelli S., Di Pucchio T., Sestili P., De Vincenzi E., Venditti M., Capone I., Seif I., De Maeyer E., et al. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 1. P. 375–383.
27. Cox R.J. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013. V. 9. № 2. P. 405–408.
28. Blander J.M., Medzhitov R. // *Science.* 2004. V. 304. P. 1014–1018.
29. Blander J.M. // *Trends Immunol.* 2007. V. 28. № 1. P. 19–25.