

ПАТОГЕНЕЗ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ И ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ПОДТИПАМИ ВИРУСА ГРИППА А, У МЫШЕЙ

Поромов А.А.¹, Махмудова Н.Р.¹, Фалынскова И.Н.¹, Глубокова Е.А.¹, Карташова Н.П.¹, Федякина И.Т.², Свитич О.А.¹, Ленёва И.А.¹

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

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Вторичные бактериальные осложнения после гриппозной инфекции являются основной причиной летальности при гриппе. Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, актуальным является комплексное изучение развития патогенеза вирусно-бактериальной пневмонии, в том числе и на фоне терапии. В настоящем исследовании воспроизведена модель гриппозной инфекции вирусами гриппа А подтипов А/Калифорния/04/2009МА (пандемия H1N1 2009), А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1), Анадырь/177/2009 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2), а также модель сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии последовательным заражением вирусами гриппа и грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*. В работе оценены особенности гриппозной инфекции с учетом самого патогена (подтип вируса, заражающая доза, размножение вируса в легких), состояния организма (выживаемость, средняя продолжительность жизни, изменение веса мышей), его иммунной системы (продукция про- и противовоспалительных цитокинов в легких мышей) в том числе на фоне противовирусной (осельтамивиром) и антибактериальной (цефуроксимом) терапии. Патогенез гриппа А после заражения мышей разными субтипами вируса по показателям смертности животных и титру вируса не различается, однако различается по скорости набора массы и выработке некоторых цитокинов (IL-10, IFN γ , TNF α). В контрольной группе, группах, зараженных вирусами гриппа А, и группе, зараженной бактериями *S. aureus*, гибели животных не наблюдалось. Развитие вторичной бактериальной пневмонии приводило к полной или значительной гибели животных, прирост веса не наблюдался, а концентрации IFN γ и TNF α достигали высоких значений. Среди исследованных вирусов гриппа А наиболее патогенным в модели гриппозной инфекции являлся пандемический штамм А/Калифорния/04/2009МА. Как противовирусная, так и антибактериальная терапия приводили к снижению смертности в модели вторичной бактериальной пневмонии, уменьшению титра вируса в легких и стабилизации потери веса животных по этим показателям группы терапии достоверно не отличались между собой. Уровень

Адрес для переписки:

Поромов Артем Андреевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (495) 674-76-91.
E-mail: poromov@instmech.ru

Address for correspondence:

Poromov Artem A.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow,
Malyy Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (495) 674-76-91.
E-mail: poromov@instmech.ru

Образец цитирования:

А.А. Поромов, Н.Р. Махмудова, И.Н. Фалынскова, Е.А. Глубокова, Н.П. Карташова, И.Т. Федякина, О.А. Свитич, И.А. Ленёва «Патогенез гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированных различными подтипами вируса гриппа А, у мышей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 1. С. 99-110.
doi: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

© Поромов А.А. и соавт., 2020

For citation:

A.A. Poromov, N.R. Makhmudova, I.N. Falynskova, E.A. Glubokova, N.P. Kartashova, I.T. Fedyakina, O.A. Svitich, I.A. Leneva "Influenza virus infection and post-viral bacterial pneumonia pathogenesis induced by different subtypes of influenza virus in mice", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2020, Vol. 22, no. 1, pp. 99-110.
doi: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

DOI: 10.15789/1563-0625-IVI-1840

цитокинов IL-2, IL-10, IFN γ снижался на фоне терапии, при этом в группе, получавшей цефуроксим в большей степени, концентрации IL-10 и IFN γ в легких мышей в группах терапии различались, что может быть связано с механизмами терапевтического действия исследуемых препаратов. Таким образом, противовирусная терапия гриппозной инфекции и комбинированная терапия вирусно-бактериальной пневмонии могут являться эффективным инструментом снижения летальности при гриппе.

Ключевые слова: грипп, *Staphylococcus aureus*, вторичная бактериальная пневмония, осельтамивр, цефуроксим, цитокины

INFLUENZA VIRUS INFECTION AND POST-VIRAL BACTERIAL PNEUMONIA PATHOGENESIS INDUCED BY DIFFERENT SUBTYPES OF INFLUENZA VIRUS IN MICE

Poromov A.A.^a, Makhmudova N.R.^a, Falynskova I.N.^a, Glubokova E.A.^a, Kartashova N.P.^a, Fedyakina I.T.^b, Svitich O.A.^a, Leneva I.A.^a

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Secondary bacterial infections after influenza virus infection further increase morbidity and mortality due to influenza. Despite of seasonal influenza vaccination, antiviral drugs and antibiotics are widely used in viral/bacterial pneumonia therapy. Therefore, further comprehensive study of the infection pathogenesis is relevant. Murine models for influenza virus infection were reproduced with different virus subtypes A/California/04/2009MA (pandemic H1N1 2009), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) and A/Aichi/2/69 (H3N2), Anadyr/177/2009 (H1N1) and for post-influenza bacterial pneumonia caused by the Gram-positive *Staphylococcus aureus*. After the infection occurs, its pathogenic features were detected by daily monitoring the mortality (survival) and morbidity rate (body weight loss) and, in addition, viral pathogenesis also was evaluated by assessing virus replication (viral titer) and humoral immune responses (production of pro- and anti-inflammatory cytokines) in respiratory tract of infected mice including during antiviral (oseltamivir) and antibacterial (cefuroxime) therapy. Mortality and virus titer in the infected mice did not differ significantly between the groups of different influenza A virus subtypes. However, production of cytokines (IL-10, IFN γ , TNF α) and weight gain proved to be different. Mortality of the mice reached 100% after secondary bacterial infection, whereas IFN γ and TNF α levels in mice lung increased reached maximal values in the treated groups. Viral subtype A/California/04/2009MA of influenza A was most pathogenic in mouse model of secondary bacterial pneumonia. Antiviral and antibacterial treatment caused a decrease in mortality, reduced viral titers in lungs, and retain body weight gain of mice. According to these points, the treatment groups did not significantly differ from each other. At the same time, it should be noted that the cytokine production significantly decreased in the treated groups, and IL-10 and IFN γ levels in lungs were different, that may be due to therapeutic mechanisms of these drugs. Thus, antiviral therapy for influenza infection and combination therapy for viral-bacterial pneumonia can be an effective tool to reduce mortality of influenza.

Keywords: influenza, *Staphylococcus aureus*, secondary bacterial pneumonia, oseltamivir, cefuroxime, cytokine

Введение

Грипп — острое респираторное заболевание, наносящее вред здоровью людей и приводящее к огромным экономическим потерям. Несмотря на широкое внедрение сезонных гриппозных вакцин, противовирусных препаратов и антибиотиков, проблема бактериальных осложнений при гриппе не перестала быть актуальной. Большая часть смертельных исходов от гриппа обусловлена вторичными бактериальными осложнениями, среди которых ведущую роль занимают пневмо-

нии. Показано, что распространенность пневмоний значительно увеличивается после эпидемий гриппа, а достоверное увеличение смертности в результате пневмоний фиксировалось во время пандемий 1918, 1957, 1968 и 2009 годов. Во время последней пандемии, вызванной H1N1 в 2009 г., 25-56% тяжелых форм заболеваний и смертельных исходов были ассоциированы со вторичной пневмонией, из них 14-46% привели к смертельным исходам. В настоящее время ВОЗ ставит задачу снижения пневмоний после гриппозной инфекции как одну из первоочередных [10].

В «Программе исследований ВОЗ по гриппу с позиции общественного здравоохранения» также подчеркивается важность проведения научных исследований постгриппозных осложнений [12].

Патогенез вирусно-бактериальной пневмонии определяет комплексное разнообразие факторов, зависящих как от возбудителей, так и от состояния иммунной системы организма. К настоящему времени имеется ряд исследований, определяющих роль бактериального патогена в этом взаимодействии [14]. При этом в научной литературе значительно меньшее внимание уделено роли вируса в патогенезе вирусно-бактериальной пневмонии, в частности различиям между отдельными подтипами вирусов гриппа, хотя именно он вносит ведущий вклад в возникновение летального синергизма при сочетанном заражении.

Важная роль в развитии инфекции принадлежит самому организму, который реализует свой ответ через иммунную систему. В частности, при нарушении ответа на возбудитель ключевое значение может иметь изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов [4]. Количество и соотношение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов при пневмонии ассоциировано со степенью тяжести воспалительного процесса, с его переходом на системный уровень и с исходом заболевания. Известно, что выраженность интоксикационного синдрома у пациентов с неосложненным течением гриппа в острый период заболевания сопровождается увеличением концентрации TNF α , IL-10, IL-1ra и снижением IFN γ в сыворотке крови. Продолжительность интоксикационного синдрома при гриппе имеет прямую корреляционную связь с увеличением содержания TNF α , IL-6, IL-8, IL-1ra, IL-10 в крови и обратную – с IL-1 β . Тяжелое течение гриппа характеризуется сохранением высокого уровня TNF α , чрезмерно высоким увеличением концентрации IL-6 и нормализацией концентрации IL-1 β , также высоким уровнем IL-1 α и IL-10 при отсутствии IL-4 в системном кровотоке [11, 16, 17]. Продукция провоспалительных цитокинов, а также увеличение количества клеток-продуцентов связаны и с риском развития бактериальных осложнений. Так, Fukuyama и соавт. показали, что увеличение количества легочных макрофагов коррелирует с риском возникновения пневмонии, развившейся при пандемическом гриппе А H1N1 в 2009 году [4]. Таким образом, оценка провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в организме – это один из показателей, характеризующих состояние иммунной системы и ее реакцию на внедрение и размножение патогена (вирусной и/или бактериальной природы), и может служить

потенциальным прогностическим критерием исхода и тяжести заболевания.

Актуально исследование механизмов иммунитета, в частности цитокинового профиля, при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии в моделях *in vivo*. Ранее нами была разработана мышьяная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) и *S. aureus*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами, отмечаемый в эпидемиологических наблюдениях [1]. Как продолжение этой работы проведено изучение патогенеза выявленного синергизма на модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции, вызванной различными вирусами гриппа А, а также осуществлена экспериментальная оценка влияния лекарственных препаратов разного механизма действия в отработанной модели.

Целью данного исследования являлось изучение особенностей патогенеза гриппозной инфекции в экспериментальной вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением различными подтипами вируса гриппа А и грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus*. Изучение патогенеза заключалось в выявлении особенностей гриппозной инфекции с учетом самого патогена (подтип вируса, заражающая доза, размножение вируса в легких), состояния организма (выживаемость, средняя продолжительность жизни, изменение веса), его иммунной системы (продукция про- и противовоспалительных цитокинов). Кроме того, для оценки вклада противовирусной и антибактериальной терапии в патогенез вирусно-бактериальной пневмонии была проведена экспериментальная оценка аспектов действия двух лекарственных препаратов – противогриппозного препарата ингибитора нейраминидазы – осельтамивир и цефалоспоринового антибиотика II поколения широкого спектра действия – цефуроксим.

Материалы и методы

Патогены, клеточные линии

Для моделирования гриппозной инфекции использован адаптированный к мышам штамм вируса H1N1 А/Калифорния/04/2009 пндм 2009 (ATCC, США), штамм Анадырь/177/2009 (H1N1), выделенный от погибшего от пандемического гриппа пациента и полученный из музея ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, эталонные лабораторные штаммы вируса гриппа подтипов А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2), полученные из музея ФГБУ НИИ гриппа им. А. Смородин-

цева МЗ РФ. Для моделирования бактериальной пневмонии использовали штамм *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) из коллекции микроорганизмов НИИВС им. И.И. Мечникова. Для получения живой культуры добавляли 1 мл питательного бульона (ГРМ-бульон) (ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболенск) и инкубировали 4 ч при 37 °С, после чего производили посев. Для титрования вируса использовались клетки почечного эпителия собаки линии MDCK (ATCC, США).

Исследуемые препараты

В экспериментах использовали противогриппозный препарат ингибитор нейраминидазы — осельтамивир (Тамифлю, капсулы, Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд., Швейцария) и цефалоспориновый антибиотик II поколения широкого спектра действия, активный в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. — цефуроксим (Цефуроксим, порошок для приготовления раствора, ОАО «Синтез», Россия). Доза осельтамивира рассчитана согласно методике, описанной в работе Говорковой и соавт. [5]. Для приготовления растворов препараты растворяли в дистиллированной воде перед проведением эксперимента. Дозы осельтамивира и цефураксима готовились и указаны из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме. Дозы препаратов рассчитывали в относительных весовых единицах — мг/кг массы тела животных в сутки. Животным осельтамивир вводили перорально в объеме 200 мкл, цефуроксим вводили подкожно в объеме 200 мкл.

Животные

В работе использовались белые мыши BALB/C, самки, массой 12-14 г, из питомника «Андреевка» (Московская область, Россия). Содержание и работа с животными проводились в соответствии с Процедурами по содержанию лабораторных животных в вивариях, с учетом принципов Надеждающей лабораторной практики.

Модель вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

Для моделирования вирусно-бактериальной пневмонии использована методика, описанная в работе Ленёвой и соавт. [1]. Животные предварительно взвешивались и случайным образом разделялись на группы. Контрольные группы, содержащие по 15 животных, инфицировали под легким наркозом сублетальными дозами вирусов гриппа в дозе 0,5 МЛД50 (50% летальная доза для мышей). На 4-й день после заражения мышей дополнительно инфицировали *S. aureus* в дозе 2×10^7 КОЕ/мл. Инфицированные таким же образом животные были лечены осельтамивиром или цефураксимом (по 40 мышей в группе). Осельтамивир вводили в дозе 10 мг/кг/день за 4 часа до заражения и далее ежедневно в те-

чение 5 дней после инфицирования вирусом гриппа. Цефураксим вводили подкожно в дозе 20 мг/кг/сут. дважды в день со дня бактериального заражения и далее в течение трех суток. Также были сформированы группы вирусных (по 10 животных) и бактериального (5 мышей) контролей, инфицированные такими же дозами и в те же промежутки времени патогенами по отдельности. Кроме того, была сформирована группа интактных неинфицированных животных (5 особей), которые получали ФСБ (фосфатно-солевой буфер) в соответствующие заражению патогенами дни. Динамику веса животных оценивали ежедневно в течение 21 суток.

Получение легких мышей

Для оценки титра вируса в легких на 4-й день после вирусного заражения в каждой группе забивали по 3 мыши и извлекали легкие. Промывали 0,01М раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ, «ЭКОсервис», Россия). Затем гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию очищали от клеточного дербиса центрифугированием при 2000 g в течение 10 минут. 0,1 мл супернатанта отбирали для определения уровня цитокинов, а оставшийся супернатант использовали для замера инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK.

Определение титра вируса в легких мышей

Для определения инфекционного титра вируса клетки MDCK помещали в 96-луночные планшеты по 30 000-35 000 клеток на лунку. Выращивали до полного монослоя в среде MEM («Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Россия) с добавлением 5% фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамина и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл). Перед заражением клетки 2 раза промывали средой MEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из легких (цельный до 10^{-8}) на среде с добавлением (2 мкг/мл). Полученными разведениями заражали монослой 4-х лунок планшета. Инкубировали в течение 72 часов при 37 °С, атмосфера 5% CO₂. Клетки фиксировали раствором формальдегида. Инфекционный титр вируса определяли по методу Рида и Менча и выражали в log₁₀ ТЦИД50/0,1 мл (тканевая цитопатическая инфекционная доза).

Определение уровня цитокинов в биологическом материале

С целью определения уровня цитокинов (IL-2, IL-10, TNF α и IFN γ) из каждой серии экспериментов использовали биологический материал — супернатант легких, от 3 животных из каждой группы. Содержание цитокинов в образцах оценивали с помощью x-MAP-технологии, методом мультиплексного анализа белков на двухлуче-

вом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein System, Bio-Rad, США). Анализ проводили в соответствии с протоколом производителя в 96-луночных планшетах Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Assay. В каждую лунку планшета добавляли по 50 мкл суспензии полистироловых гранул размером 5,5 мкм, входящих в набор тест-системы. Планшет дважды промывали 100 мкл буфером Bio-Plex. Добавляли в лунки согласно дизайну планшета по 50 мкл исследуемых образцов и стандартов. После инкубации при покачивании в шейкере закрытого алюминиевой фольгой планшета (850 об/мин в течение 30 минут) его трижды промывали 100 мкл буфера. Затем в каждую лунку планшета добавляли по 25 мкл антицитоклиновых антител, входящих в набор тест-системы. Процедуру повторяли, добавляя по 50 мкл смеси для детекции. Далее планшет трижды промывали 100 мкл буфера, входящего в комплект реагентов для проведения анализа, и добавляли по 125 мкл флуоресцентной метки, входящей в набор тест-системы. Анализ оптической плотности проводили при помощи программы Bio-Plex Manager Software 6.1.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета RStudio (версия 1.0.143). Для количественных показателей результат представлен в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) или медианы с указанием 95% двухстороннего доверительного интервала (CI), для качественных в виде доли или процентов с указанием 95% двухстороннего CI. В графиках данные представлены в виде значения \pm стандартная ошибка (SE). Для межгрупповых сравнений количественных показателей использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для множественных сравнений использовался тест Тьюки. Для оценки динамики веса и выживаемости мышей использовали нелинейную четырехпараметрическую логистическую регрессию (пакет “drc2”) и построение кривых выживаемости методом Каплана–Мейера (пакет “survival”). Множественные сравнения выживаемости животных между группами проведены с использованием Log-Rank test [6], поправка на множественные сравнения проведена по [2]. При использовании статистических процедур различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Патогенез летальной вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после гриппозной инфекции различными вирусами гриппа

Для моделирования использовались сублетальные заражающие дозы (0,5 МЛД₅₀)

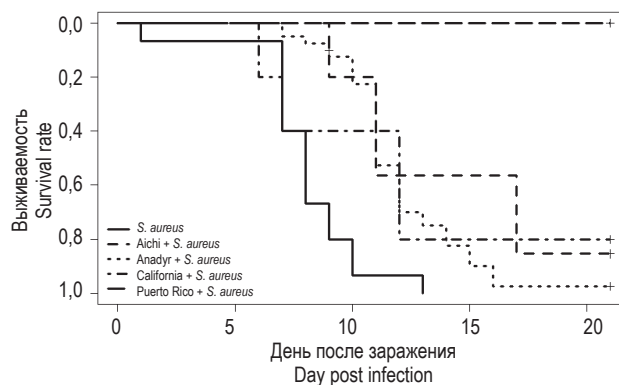


Рисунок 1. Выживаемость животных на фоне гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее (кривые дожития, построенные по методу Каплана–Мейера)

Figure 1. Survival rates in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia (Kaplan–Meier curves)

вирусов гриппа: трех подтипа H1N1 A/Калифорния/04/2009МА (California), A/Пуэрто-Рико/8/34 (Puerto Rico), A/Анадырь/177/2009 (Anadyr) и одного подтипа H3N2A/Аичи/2/69МА (Aichi). Моделирование гриппозной инфекции проводилось в четырех экспериментальных группах по 10 животных и 5 животных в контрольной – без заражения. Моделирование вирусно-бактериальной пневмонии проводили в четырех экспериментальных группах и в группе *S. aureus* без вирусного заражения. Общее количество животных в экспериментальных группах – 15, в группе *S. aureus* 5 животных.

Несмотря на клинические признаки болезни, а также потерю веса, в группах мышей, зараженных отдельно вирусами или *S. aureus*, все животные остались живы в течение всего периода наблюдения (табл. 1), в группе, зараженной только вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009, наблюдалась 10% гибель животных (рис. 1). Титр вируса в легких животных, инфицированных вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 и А/Аичи/2/69 был несколько выше, чем в группах, инфицированных А/Пуэрто Рико /8/34 и А/Анадырь/177/2009 (H1N1), однако различия не являются значимыми (табл. 1).

В отличие от групп вирусного контроля в группах, зараженных последовательно *S. aureus*, после инфицирования вирусами наблюдалась полная или значительная гибель мышей (рис. 1). Процент смертности и потеря веса в группах зависели от штамма вируса (рис. 2, 3). Полная гибель животных с наибольшей потерей веса наблюдалась в группах, инфицированных вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 и А/Аичи/2/69МА. Определение титра вируса в легких животных

ТАБЛИЦА 1. ВЫЖИВАЕМОСТЬ, СРЕДНЯЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ И ВИРУСНЫЙ ТИТР ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ ГРИППА ТИПА А И ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

TABLE 1. SURVIVAL RATE, LIFE EXPECTANCY AND VIRAL TITER IN MOUSE MODELS FOR INFLUENZA A VIRUS INFECTION AND POST-VIRAL BACTERIAL PNEUMONIA

Группа Group	Животных в группе Animals per group	Выживаемость ² Survival rate ²	Титр вируса ³ Viral titre ³	Средняя продолжительность жизни (дней) ⁴ Mean of life expectancy (days) ⁴
Контроль Control	5	100%	–	> 21
<i>S. aureus</i>	10	100%	–	> 21
А/Калифорния/04/2009(H1N1) A/California/04/2009(H1N1)	10	90% (50,8-98,6)	4,2±1,1	> 21
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> A/California /04/2009 + <i>S. aureus</i>	40 ¹	2,5 (0,1-11,3)	> 6,0	11 (11-12)
А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1) A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	10	100%	3,80±0,58	> 21
А/Пуэрто-Рико/8/34 + <i>S. aureus</i> A/Puerto Rico/8/34 + <i>S. aureus</i>	15	20% (4,8-42,4)	5,1±1,5	12 (6-12)
А/Анадырь/177/2009 (H1N1) A/Anadyr/177/2009 (H1N1)	10	100%	3,0±0,0	> 21
А/Анадырь/177/2009 + <i>S. aureus</i> A/Anadyr/177/2009 + <i>S. aureus</i>	15	14,5% (2,3-37,0)	4,6±0,2	11 (9-17)
А/Аичи/2/69(H3N2) A/Aichi/2/69(H3N2)	10	100%	4,1±1,5	> 21
А/Аичи/2/69 + <i>S. aureus</i> A/Aichi2/69 + <i>S. aureus</i>	15	0%	3,9±2,4	8 (7-9)
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Осельтамивир A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Oseltamivir	40	60% (43,2-73,3)	1,89±1,30	20 (14- > 21)
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Цефуроксим A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Cefuroxime	40	45% (29,3-59,9)	1,0±1,0	13 (11- > 21)

Примечание. ¹ – с учетом группы животных, включенных в эксперимент по оценке действия лекарственных препаратов; ² – доля живых особей через 21 сутки после заражения (95% CI); ³ – log₁₀ TCID_{50/0,1}; по 3 животных из каждой экспериментальной группы; среднее значение ± SD; ⁴ – медиана (95% ДИ).

Note. ¹, included mice embedded in antivirals effectiveness evaluation experiment; ², rate of alive mice after 21 day post infection (95% CI); ³, log₁₀ TCID_{50/0,1}; n = 3 per experimental group, mean±SD; ⁴, median (95% CI).

выявило, что размножение вирусов при заражении ими отдельно во всех случаях было достоверно ниже, чем при комбинированном заражении (табл. 1). Наиболее высокий титр вируса наблюдался в группах мышей, инфицированных *S. aureus*, после заражения их пандемическими вирусами гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и А/Анадырь/177/2009 (H1N1).

Эффективность противовирусной и антибактериальной терапии

Полученные в первой серии опытов результаты указывают на пандемический штамм А/Калифорния/04/2009(H1N1) как обладающий наиболее сильными факторами патогенности. По этой причине для дальнейшего изучения влияния на патогенез вирусно-бактериальной пневмонии противовирусной и антибактериальной терапии для индуцирования инфекции был выбран вирус гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1). Терапия противовирусным препаратом осельтамивиром в дозе 10 мг/кг/день снижала гибель животных до 40% (рис. 4), увеличивая среднюю продолжительность жизни в 2 раза по сравнению с инфицированными нелечеными животными (табл. 1). На фоне терапии антибактериальным препаратом цефуроксимом гибель животных в среднем наступала раньше по сравнению с группой животных, леченных осельтамивиром, средняя продолжительности жизни была меньше, составляя в среднем 13 дней, 11 дней у нелеченых контрольных животных. Выживаемость в группах животных, получавших цефуроксим не отличалась от таковой в группе животных, леченных осельтамивиром ($p = 0,3$, Log-Rank test), при этом выживаемость в этих группах была достоверно выше, чем в группе инфицированных нелеченых животных ($p < 0,001$, Log-Rank test). Вес тела мышей в группе терапии антибиотиком цефуроксимом не отличался от контрольной группы, а в группе терапии осельтамивиром был выше в среднем на 20% к 21 дню после заражения (рис. 5). Данные по клиническим признакам заболевания коррелировали с данными вирусологического изучения легких. Титр вируса в группе животных с вторичной бактериальной пневмонией, леченных осельтамивиром или цефуроксимом, был значительно ниже титра вируса по сравнению с нелечеными животными (табл. 1).

Содержание цитокинов в легких

На моделях сублетальной гриппозной инфекции и летальной вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции показано, что различные штаммы вирусов гриппа индуцируют продукцию цитокинов в легких (табл. 2). В нашем исследовании были выбраны IL-2 и IFN γ (отвечают за пролиферацию Т-лимфоцитов, клеточный адаптивный иммунитет), провоспалитель-

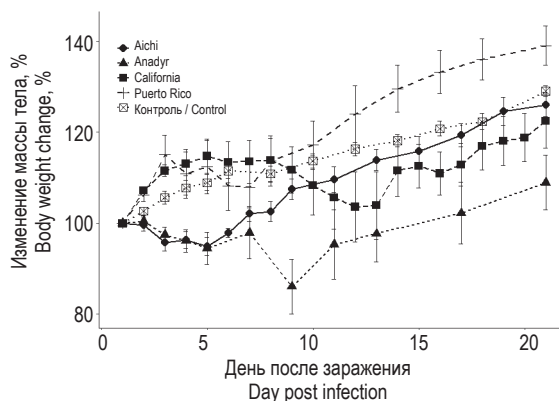


Рисунок 2. Изменение относительной массы тела мышей на фоне гриппозной инфекции (M±SE)

Figure 2. Relative mice body weight change in mouse models for influenza A virus infection (M±SE)

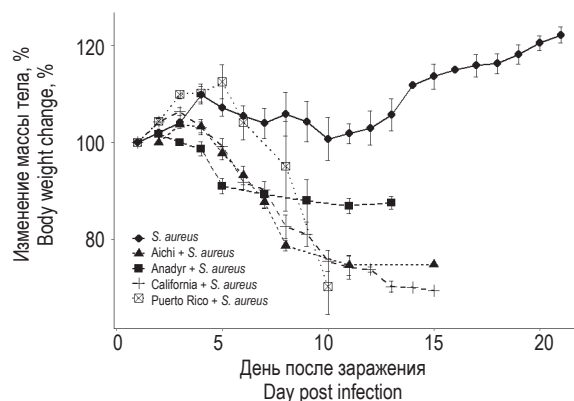


Рисунок 3. Изменение относительной массы тела на фоне гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее (M±SE)

Figure 3. Relative mice body weight change in mouse models for post-viral bacterial pneumonia (M±SE)

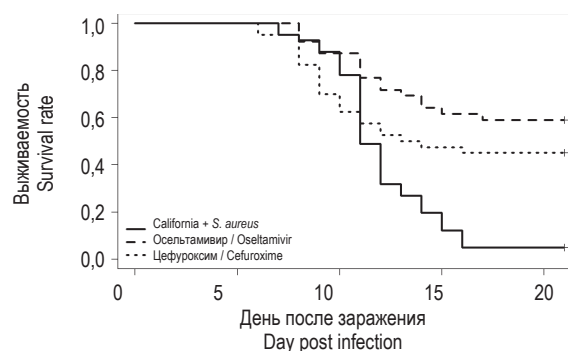


Рисунок 4. Выживаемость животных при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее на фоне терапии противовирусным (осельтамивир, 10 мг/кг/сут.) и антибактериальным (цефуроксим, 40 мг/кг/сут.) препаратами (кривые дожития, построенные по методу Каплана–Мейера)

Figure 4. Survival rates in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia during treatment with antiviral (oseltamivir, 10 mg/kg/day) and antibacterial (cefuroxime, 40 mg/kg/day), Kaplan–Meier curves

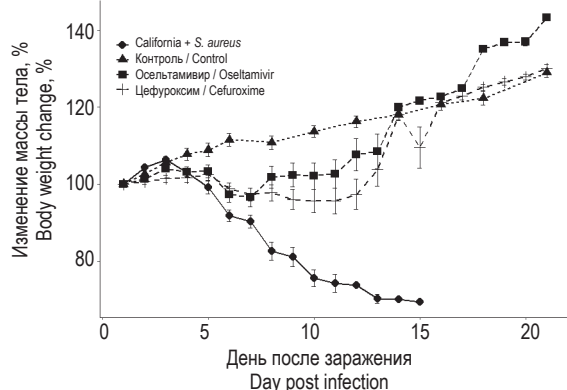


Рисунок 5. Изменение относительной массы тела животных при гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии после нее на фоне терапии противовирусным (осельтамивир, 10 мг/кг/сут.) и антибактериальным (цефуроксим, 40 мг/кг/сут.) препаратами (M±SE)

Figure 5. Relative body weight change in mouse models for influenza A virus infection and post-viral bacterial pneumonia during treatment with antiviral (oseltamivir, 10 mg/kg/day) and antibacterial (cefuroxime, 40 mg/kg/day) drugs, M±SE

тельный цитокин TNF α и противовоспалительный цитокин IL-10.

Показано, что концентрация в легких IL-2 в группах гриппозной инфекции была в 2-3 раза выше, чем в группе сравнения. В случае с бактериальной пневмонией концентрация цитокина статистически значимо не различалась для разных штаммов вируса гриппа. Исключение наблюдали только в случае А/Анадырь/177/2009, где концентрация IL-2 в 5 раз снижалась после заражения *S. aureus*.

Концентрация IFN γ , одного из противовирусных цитокинов, была значительно выше во всех исследуемых группах лабораторных животных с гриппозной инфекцией относительно контрольных значений (в 16,8 – 34 раза). После инфицирования *S. aureus* показатель IFN γ статистически значимо не изменялся в случае совместного инфицирования штаммами А/Калифорния/04/2009(H1N1) и А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1). В случае других штаммов вируса гриппа наблюдали разнонаправленный эффект: так, в случае А/Анадырь/177/2009 (H1N1) после инфицирования стафилококком определяли достоверное снижение продукции IFN γ в легких в 4 раза, в то время как А/Аичи/2/69(H3N2) – увеличение в 3 раза. Полученный неоднозначный эффект можно объяснить тем, что интерфероны являются значимыми цитокинами, направленными против вирусной инфекции. Вероятно, различные штаммы вируса гриппа могут по-разному влиять на выработку IFN, что, скорее всего, генетически опосредованно.

По содержанию TNF α особенно выделяется группа Пуэрто-Рико/8/34(H1N1), где его содержание достигает $319,50 \pm 75,06$ мкг/мл, для этой группы также характерно высокое содержание IL-10 и IFN γ в легких животных. Показатель TNF α при инфицировании *S. aureus* увеличивался более чем в два раза, при этом показатель IL-10 снижается. Таким образом, выявлено изменение цитокинового профиля в легких мышей под действием вируса гриппа и *S. aureus*.

Уровень цитокинов IL-2, IL-10, IFN γ снижается на фоне терапии, при этом в группе, получавшей цефуроксим в большей степени, значительно увеличивается содержание в легких TNF α при бактериальном заражении и далее, на фоне терапии, достигает максимальных значений в группе, получавшей цефуроксим.

Обсуждение

Моделирование гриппозной инфекции и осложнений после нее обусловлено комплексом множества сложных взаимодействий, обусловленных как генетическими особенностями организма-хозяина, связанными с устойчивостью или чувствительностью к инфекции [15], так и особенностями вируса гриппа. Данное исследование направлено на изучение патогенеза в экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции, индуцированной вирусами гриппа А с различными патогенетическими свойствами, среди которых можно выделить, например, штамм Калифорния, связанный с пандемией 2009 года, или штамм Анадырь, патогенез которого у человека связан с развитием вирусной пневмонии.

Инфицирование различными вирусами гриппа позволило выявить ряд различий в протекании и исходе пневмоний, вызванных как отдельно вирусами гриппа или *S. aureus*, так и их сочетанием. Показано, что заражение животных вирусами приводило к их размножению в легких в высоких титрах, а дальнейшее присоединение бактериальной пневмонии сопровождалось значительной потерей веса и гибелью животных. Сравнительное изучение вирусов подтипа H1N1 в экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции позволило выделить пандемический вирус А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) как наиболее вирулентный. Данный факт показывает, что пандемический штамм А/Калифорния/04/2009МА обладает более сильными факторами патогенности, повреждающими антибактериальную активность системы врожденного иммунитета, чем вирус А/Пуэрто Рико /8/34. Одним из таких факторов может являться минорный белок PB1-F2, обладающий проапоптотической функцией в от-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ЛЕГКИХ ЖИВОТНЫХ, М±SD, мкг/мл (n = 3)

TABLE 2. CYTOKINE LEVELS IN LUNG HOMOGENATES, M±SD, mg/ml (n = 3)

Группа Group	IL-2	IL-10	IFN γ	TNF α
Контроль Control	4,84±1,51	6,36±0,26	4,92±1,05	29,70±9,29
А/Калифорния/04/2009(Н1N1) A/California/04/2009(H1N1)	12,3±5,8*	63,5±52,7*	170,8±65,0*	46,0±12,4
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> A/California /04/2009 + <i>S. aureus</i>	12,50±4,53*	44,0±24,0*	153,6±71,3*	125,8±129,0
А/Пуэрто-Рико/8/34(Н1N1) A/Puerto Rico/8/34(H1N1)	9,92±8,28	55,3±28,6*	146,8±80,1*	319,5±75,0*
А/Пуэрто-Рико/8/34 + <i>S. aureus</i> A/Puerto Rico/8/34 + <i>S. aureus</i>	9,4±13,8	18,0±23,8	132,6±176,2	144,1±132,4
А/Анадырь/177/2009 (Н1N1) A/Anadyr/177/2009 (H1N1)	15,0±2,9*	27,3±12,8*	92,6±88,6*	40,3±18,6*
А/Анадырь/177/2009 + <i>S. aureus</i> A/Anadyr/177/2009 + <i>S. aureus</i>	3,62±1,11	4,57±2,46	22,6±5,0*	239,3±103,6*
А/Аичи/2/69(Н3N2) A/Aichi/2/69(H3N2)	9,14±2,19*	20,0±20,1	83,7±12,3*	69,8±30,3
А/Аичи/2/69 + <i>S. aureus</i> A/Aichi2/69 + <i>S. aureus</i>	7,80±6,16	31,3±28,9	247,4±357,6*	343,7±420,1
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Осельтамивир A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Oseltamivir	9,56±4,00	23,0±12,3*	52,6±26,7*	94,7±51,5*
А/Калифорния/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Цефуроксим A/California/04/2009 + <i>S. aureus</i> + Cefuroxime	5,68±1,30	13,30±2,10*	12,3±2,7*	147,1±152,5*

Примечание. * – значимые различия от группы контроля, U-критерий Манна–Уитни.

Note. *, indicates significant difference from control, Mann–Whitney U-test.

ношении фагоцитирующих лейкоцитов и способностью провоцировать вторичные бактериальные осложнения [7, 8], первичная структура белка которого отличается у взятых в эксперимент лабораторного и пандемического штаммов [8]. Эти данные коррелируют с клиническими данными, полученными Caini S. и соавт. [3]. Метаанализ 47 клинических исследований выявил, что при одновременной социркуляции вирусов гриппа

А(Н1N1)р, А(Н3N2) и В в постпандемический период именно подтип А(Н1N1)р был несколько чаще ассоциирован с осложнениями в виде вторичной бактериальной пневмонии, использованием искусственной вентиляции легких, а также смертельными исходами.

Кроме того, сходную с вирусом А/Калифорния/04/2009 (пндм Н1N1 2009) МА вирулентность в модели вторичной бактериальной пнев-

мнии проявил штамм вируса гриппа подтипа H3N2 A/Аичи/2/69 МА (H3N2). Возможным объяснением этого факта может быть то, что оба штамма были адаптированы к мышам путем серийного пассирования в легких животных, что, как известно, увеличивает патогенность вируса у мышей.

В настоящее время данные клинических испытаний эффективности противовирусных препаратов по вторичным осложнениям после гриппа ограничены, в частности по причине того, что пациенты групп риска (например, дети, пожилые люди, пациенты с сопутствующими заболеваниями), в наибольшей степени подверженные вторичной инфекции, как правило, из этих исследований исключены. С другой стороны, антибиотики клинически эффективны при бактериальной пневмонии, однако при вторичной бактериальной пневмонии, являющейся осложнением гриппозной инфекции, летальность все еще довольно высока даже на фоне применения антибиотиков. Примером этому могут служить антибиотики ампициллинового ряда, которые, несмотря на хороший бактериостатический эффект, часто не улучшают, а иногда и ухудшают прогноз сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии. Причиной этому является лизис стенок бактерий, приводящий к высвобождению их фрагментов, активирующих воспалительный процесс в легких, что в конечном итоге нередко усиливает тяжесть заболевания [9]. В связи с вышесказанным особую важность приобретает получение экспериментальных данных об эффекте противовирусной и антибактериальной терапии на разработанной модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Для данных исследований был выбран наиболее патогенный вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) МА, что отражает эпидемиологические наблюдения по увеличению постгриппозных пневмоний и их тяжести в период пандемии 2009 года. Показано, что применение противогриппозного препарата – ингибитора нейраминидазы осельтамивира или антибиотика цефалоспоринового ряда улучшало исходы инфекции, снижая как смертность

животных, так и титр вируса в легких и увеличивая среднюю продолжительность их жизни. При этом можно отметить, что при одинаковой выживаемости средняя продолжительность жизни при введении антибиотиков была меньше, чем при приеме осельтамивира. В группе, леченной цефуроксимом, гибель животных происходила в первые дни после присоединения бактериальной инфекции.

Количество и соотношение противовоспалительных и провоспалительных цитокинов при бактериальной пневмонии определяют тяжесть воспалительного процесса, его переход на системный уровень и прогноз заболевания [13]. В наибольшей степени гриппозная инфекция и бактериальная пневмония проявляются в индукции синтеза $IFN\gamma$, концентрация которого увеличивается в 20-60 раз по сравнению с контролем. Однако можно выделить группы А/Анадырь/177/2009, в которых содержание противовирусного $IFN\gamma$ характеризуется крайне низкими значениями, а содержание провоспалительного $IL-2$, высокими, можно предположить, что такой ответ организма приводит к развитию вирусной пневмонии и высокой летальности.

Значительная индукция противовоспалительного $IL-10$, подавляющего активность макрофагов и $Th1$ -клеток, в большей степени наблюдается на фоне гриппозной инфекции.

Использование данной модели позволяет получить дополнительные данные путем сопоставления эффектов, которые оказывают препараты различных механизмов действия на маркеры течения сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии (клинические, вирусологические и иммунологические) и которые могут быть использованы для разработки стратегии терапии вирусно-бактериальной пневмоний. В частности, полученные результаты показывают, что ранняя противовирусная или комбинированная терапия гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии может являться инструментом снижения летальности при гриппе. С другой стороны, оказываемый противовирусной терапией эффект позволит снизить объемы применения антибактериальных препаратов.

Список литературы / References

1. Ленева И.А., Леонова Е.И., Махмудова Н.Р., Фалынскова, И.Н. Федякина И.Т., Зверев В.В. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии // Вопросы вирусологии, 2015. Т. 60, № 5. С. 27-31. [Leneva I.A., Leonova E.I., Makhmudova N.R., Falynskova I.N., Fedyakina I.T., Zverev V.V., Mikhailova N.A. Experimental model of secondary bacterial pneumonia after influenza. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2015, Vol. 60, no. 5, pp. 27-31. (In Russ.)]
2. Benjamini Y., Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.*, 1995, Vol. 57, no. 1, pp. 289-300.
3. Caini S., Kroneman M., Wieggers T., El Guerche-Seblain C., Paget J. Clinical characteristics and severity of influenza infections by virus type, subtype, and lineage: A systematic literature review. *Influenza Other Respir Viruses*, 2018, Vol. 12, no. 6, pp. 780-792.

4. Fukuyama S., Kawaoka Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, no. 4, pp. 481-486.
5. Govorkova E.A., Leneva I.A., Goloubeva O.G., Bush K., Webster R.G. Comparison of efficacies of RWJ-270201, zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, Vol. 45, no. 10, pp. 2723-2732.
6. Harrington D. Linear rank tests in survival analysis. *Encyclopedia of biostatistics*, 2005. 6100 p.
7. Iverson A.R., Boyd K.L., McAuley J.L., Plano L.R., Hart M.E., McCullers J.A. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 6, pp. 880-888.
8. Kamal R.P., Alymova I.V., York I.A. Evolution and Virulence of Influenza A Virus Protein PB1-F2. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, Vol. 19, no. 1, E96. doi: 10.3390/ijms19010096.
9. Karlström Å., Boyd K.L., English B.K., McCullers J.A. Treatment with protein synthesis inhibitors improves outcomes from secondary bacterial pneumonia following influenza. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 199, no. 3, pp. 311-319.
10. Legand A., Briand S., Shindo N., Brooks W.A., de Jong M.D., Farrar J., Aguilera X., Hayden F.G. Addressing the public health burden of respiratory viruses: the Battle against Respiratory Viruses (BRaVe) Initiative. *Future Virol.*, 2013, Vol. 8, no. 10, pp. 953-968.
11. Raj R.S., Bonney E.A., Phillippe M. Influenza, immune system, and pregnancy. *Reprod. Sci.*, 2014, Vol. 21, no. 12, pp. 1434-1451.
12. Shindo N. Making progress on the WHO public health research agenda for influenza. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2013, Vol. 7, Suppl. 2, pp. 1-3.
13. Sladkova T., Kostolansky F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virol.*, 2006, Vol. 50, no. 3, pp. 151-162.
14. Smith M.W., Schmidt J.E., Rehg J.E., Orihuela C.J., McCullers J.A. Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comp. Med.*, 2007, Vol. 57, no. 1, pp. 82-89.
15. Srivastava B., Błażejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., Gruber A.D., Schughart K. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, no. 3, e4857. doi: 10.1371/journal.pone.0004857.
16. Teijaro J.R. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, Vol. 386, pp. 3-22.
17. van Reeth K. Cytokines in the pathogenesis of influenza. *Vet. Microbiol.*, 2000, Vol. 74, no. 1-2, pp. 109-116.

Авторы:

Поромов А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Махмудова Н.Р. — к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Глубокова Е.А. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Poromov A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Makhmudova N.R., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Falynskova I.N., Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Glubokova E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Virology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Федякина И.Т. — ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Ленёва И.А. — д.б.н., заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

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

Fedyakina I.T., Leading Research Associate, Laboratory of Virus Ecology, N. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 02.08.2019

Отправлена на доработку 22.10.2019

Принята к печати 03.12.2019

Received 02.08.2019

Revision received 22.10.2019

Accepted 03.12.2019