Медицинская иммунология
2020, Т. 22, № 3,
стр. 473-482
© 2020, СПб РО РААКИ

Оригинальные статьи
Original articles

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2020, Vol. 22, № 3, pp. 473-482
© 2020, SPb RAACI

ВЛИЯНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ И ВАКЦИННЫХ ВАРИАНТОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

Ахматова Н.К.[1], Ртищев А.А.[1], Маркушин С.Г.[1], Костинова А.М.[1], Ахматова Э.А.[1], Столпникова В.Н.[1], Калиниченко Е.О.[1], Шубина И.Ж.[2], Бишева И.В.[1]

[1] *ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*
[2] *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина», Москва Россия*

Резюме. Цель исследования – генерация дендритных клеток из костного мозга мышей (ДК) *in vitro* и оценка влияния вирулентных и аттенуированных вариантов вируса гриппа на созревание ДК.

Для индукции дифференцировки мононуклеаров костного мозга в ДК использовали гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и интерлейкин-4 (IL-4). На 5 сутки инкубации добавляли штаммы вируса гриппа в культуру ДК и дополнительно инкубировали их в течение 2 дней. Оценивали морфологические характеристики ДК, иммунофенотип и экспрессию некоторых Toll-подобных рецепторов (TLR).

На пятый день инкубации ДК приобретали типичные морфологические характеристики. ДК имели большие размеры с эксцентрично расположенным ядром, чаще неправильной формы, многочисленными отростками. На 7 день инкубации в присутствии штаммов вируса гриппа цитоплазма их несколько уплотнялась, ДК приобретали больше отростков, необходимых для межклеточных контактов. В зрелых ДК был повышен уровень экспрессии маркера CD11c, костимуляторных молекул CD80, CD86, CD83 и молекул MHC II. Вирулентные и аттенуированные штаммы вируса гриппа индуцировали различные варианты дифференцировки ДК, включая формирование поверхностных маркеров дифференциации на мембране клеток, экспрессию Toll-подобных рецепторов и костимулирующих молекул.

Мышиные мононуклеары костного мозга могут продуцировать большое количество н-ДК, которые могут созревать в присутствии различных вариантов вируса гриппа. При формировании иммунофенотипа ДК под влиянием исследуемых вариантов вируса гриппа обнаружено в разной степени проявление признаков иммуносупрессии. Аттенуированные варианты U-2 и M-26, полученные с помощью сайт-специфического мутагенеза, при формировании иммунофенотипа ДК обладали сниженной иммуносупресирующей активностью и не уступали холодоадаптированному (ХА) реассортанту по большинству позиций, а по некоторым позициям превосходили его. Данные исследования могут помочь выявить критерии оценки эффективности разрабатываемых вакцин против гриппа *in vitro*.

Ключевые слова: культура клеток, дендритные клетки, морфология, вирулентные и аттенуированные варианты вируса гриппа, маркеры дифференцировки, костимуляторные молекулы, Toll-подобные рецепторы

Адрес для переписки:
Ахматова Нэлли Кимовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
115404, Россия, Москва, ул. Бирюлевская, 1, корп. 3, кв. 25.
Тел.: 8 (919) 776-55-70.
E-mail: anelly@mail.ru

Address for correspondence:
Akhmatova Nelli K.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
115404, Russian Federation, Moscow, Birulevskaya str., 1, bldg 3, apt 25.
Phone: 7 (919) 776-55-70.
E-mail: anelly@mail.ru

Образец цитирования:
Н.К. Ахматова, А.А. Ртищев, С.Г. Маркушин, А.М. Костинова, Э.А. Ахматова, В.Н. Столпникова, Е.О. Калиниченко, И.Ж. Шубина, И.В. Бишева «Влияние вирулентных и вакцинных вариантов вируса гриппа на иммунофенотип дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 473-482. doi: 10.15789/1563-0625-EOV-1869

© Ахматова Н.К. и соавт., 2020

For citation:
N.K. Akhmatova, A.A. Rtishchev, S.G. Markushin, A.M. Kostinova, E.A. Akhmatova, V.N. Stolpnikova, E.O. Kalinichenko, I.Zh. Shubina, I.V. Bisheva "Effect of virulent and vaccine variants of influenza virus on the immunophenotype of dendritic cells generated from murine bone marrow", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 3, pp. 473-482. doi: 10.15789/1563-0625-EOV-1869

DOI: 10.15789/1563-0625-EOV-1869

EFFECT OF VIRULENT AND VACCINE VARIANTS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MURINE BONE MARROW

Akhmatova N.K.[a], Rtishchev A.A.[a], Markushin S.G.[a], Kostinova A.M.[a], Akhmatova E.A.[a], Stolpnikova V.N.[a], Kalinichenko E.O.[a], Shubina I.Zh.[b], Bisheva I.V.[a]

[a] *I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*
[b] *N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The aim of this study was to generate dendritic cells from the bone marrow of mice (DC) in vitro and to assess the effect of virulent and attenuated variants of influenza virus on the maturation of DCs. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin-4 (IL-4) were used in combination, to induce differentiation of mouse bone marrow (BM) mononucleocytes into DCs. On the 5th day, distinct variants of influenza virus were added to the cell culture, and the cells were additionally incubated for 2 days. The morphological characteristics of DCs, immunophenotype of DCs and expression of some Toll-like receptors were evaluated. On the 5th day of incubation. the DCs acquired typical morphological characteristics. DCs were large in size with an eccentrically located nucleous, often irregular in shape, with numerous processes. On the 7th day of incubation with influenza virus variants, their cytoplasm was somewhat denser. DCs acquired more processes, necessary for intercellular contacts. Expression levels of CD11c, a specific marker of BM-derived DCs, and of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80, CD86, and MHC-II were elevated in mature DCs. Virulent versus attenuated strains of the influenza virus induced special variants of DCs differentiation, with respect to expression rates of differentiation markers, as well as expression of Toll-like receptors and costimulatory molecules. Conclusions. The *in vitro* cultured murine mononucleocytes derived from bone marrow can produce a large number of n-DCs, that can mature in the presence of different variants.

During evolution of the DC immunophenotype treated with variant influenza viruses, we have found distinct signs of immunosuppression.

The attenuated U-2 and M-26 influenza variants obtained by site-specific mutagenesis upon development of DCs immunophenotype, exhibited a decreased immunosuppressive activity and were not inferior to the cold-adapted (CA) reassortant for the most positions, but exceeded it in some instances. These studies can help to assess the criteria for evaluation the efficiency of in vitro developed influenza vaccines.

Keywords: cell culture, dendritic cells, morphology, influenza virus, virulent and attenuated variants, differentiation markers, Toll-like receptors

Сокращения: ДК – дендритные клетки; н-ДК – незрелые дендритные клетки; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IL-4 – интерлейкин-4; rm – рекомбинантный; TLR – Toll-подобные рецепторы; U-2 и M-26 – аттенуированные варианты вируса гриппа; XA реассортант – холодоадаптированный реассортант; HA – гемагглютинин вируса гриппа; NA – нейраминидаза; ts-мутации – температурочувствительные мутации (ts); FBS – фетальная бычья сыворотка; RBC – Red blood cell (Hypotonic); Lysis Buffer – буфер для лизиса эритроцитов; PBS (Phosphate buffered saline) – натрий-фосфатный буфер; TNFα – фактор некроза опухоли; МКА – моноклональные антитела; PE – фикоэритрин; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; PRRs – паттерн, распознающие рецепторы; PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные структуры.

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее мощными специализированными антигенпрезентирующими клетками. Они рассматриваются как главные инициаторы иммунных реакций в организме. Основными функциями ДК являются: 1) праймирование наивных Т-клеток путем экспрессии специальных костимуляторных поверхностных молекул презентации экзогенных антигенов в контексте молекул MHC I и MHC II данным клеткам; 2) секреция медиаторов, ответственных за лучшее распознавание антигенов рецепторами наивных Т-клеток; 3) секреция провоспалительных цитокинов, способствующих дифференцировке наивных Т-клеток, формированию CD4/CD25 регуляторных (Treg) клеток и Т-хелперных Th17-клеток.

ДК играют важную роль в противоопухолевом и поствакцинальном иммунитете, ДК мож-

но культивировать *in vitro*, а затем использовать в иммунотерапии *in vivo*, и они также могут быть амплифицированы *in vivo* при использовании иммунобиологических препаратов-индукторов цитокинов или других факторов, таких как Flt [14, 15].

Противоопухолевые вакцины на основе ДК как подход к иммунотерапии привлекли большое внимание в биомедицинских исследованиях и признаны одними из наиболее перспективных подходов для целевой противоопухолевой терапии [7, 10, 11, 13, 16].

Специфический характер размножения различных вирусов может изменить репертуар секретируемых данными клетками цитокинов, тем самым меняя вектор поляризации наивных Т-лимфоцитов. В этой связи большой интерес представляют фенотипические изменения ДК, формирующихся под влиянием вирулентных и авирулентных вариантов различных вирусных агентов. В перспективе эти исследования открывают возможность управления иммунной системой путем активации ДК с помощью вакцинных или других иммунобиологических препаратов [1, 4, 7].

В представленной работе мононуклеарные клетки выделяли из костного мозга мышей и индуцировали их дифференцировку в ДК *in vitro* с использованием различных аттенуированных вариантов вируса гриппа. Исследования в этом направлении помогут выявить особенности активации аттенуированными вариантами вируса гриппа одного из важных звеньев врожденного иммунитета, что позволит оценить *in vitro* сравнительную эффективность живых гриппозных вакцин.

Материалы и методы

Экспериментальные животные – инбредные мыши CBA, самцы в возрасте 6-8 недель и массой 18-20 г, приобретенные из питомника «Андреевка» Московской области. Все эксперименты выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Вирусы

В работе исследовали следующие варианты вируса гриппа:

1. Вирулентный генно-инженерный штамм A/WSN/33(H1N1) был получен с помощью трансфекции из плазмид pHW2000 со вставками генов штамма A/WSN/33 (H1N1), любезно предоставленных доктором Вебстером (Мемфис, США).

2. Холодоадаптированный (ХА) реассортант, полученный путем скрещивания ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) и вирулентного штамма A/WSN/33. Реассортант унаследовал 6 «внутренних» генов от ХА штамма-донора и 2 гена, кодирующих поверхностные HA и NA белки от штамма A/WSN/33. Получение ХА реассортанта проводили по ранее описанной стандартной методике [12].

3. Аттенуированный вариант, полученный с помощью обратной генетики путем включения в геном вирулентного штамма A/WSN/33 ts-мутации из PB2 гена ХА штамма A/Краснодар/101/35/59 (H2N2) (Val290Leu) и ts-мутации из PB2 гена ХА штамма A/Ленинград/134/17/57 (мутации из PB2 гена ХА штамма A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) (Val 478 Leu).

4. Аттенуированный вариант U-2, полученный с помощью обратной генетики путем включения в геном аттенуированного варианта AAL добавочной ts-мутации из PB2-гена ХА штамма A/Энн Арбор/6/60 (Asn 265 Ser).

5. Аттенуированный вариант M26, полученный с помощью обратной генетики, содержащий 3 АА замены в PB1-гене (K391E, E581G, E457D), взятых из генома ХА штамма A/Энн Арбор/6/60, одиночную замену в PB2-гене (V290L), взятую из генома ХА штамма A/Краснодар/101/35/59, и АА замену F658A в COOH-домене PA-гена. Биологические свойства исследуемых вариантов вируса гриппа подробно описаны ранее [2, 9].

Выделение мононуклеаров из костного мозга мышей

У мышей C57BL/6 проводили цервикальную дислокацию. Извлекали в стерильных условиях голени и бедра, помещали в среду RPMI-1640 с добавлением 1% FBS. Эпифизы кости отрезали ножницами, вставляли иглу со шприцем в канал и костный мозг под давлением промывали 1 мл среды RPMI-1640 в чашку Петри. Клетки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут, удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали с помощью буфера для лизиса эритроцитов Tris-NH4Cl (RBC). Осаждали клетки центрифугированием, после чего клетки промывали PBS.

Индукция ДК костномозгового происхождения

Клетки суспензировали в среде RPMI-1640 с 10% FBS и распределяли в 24-луночные планшеты из расчета 1×10^6 клеток/мл/лунку. В культуру вносили по 20 нг/мл GM-CSF и 10 нг/мл IL-4 (Biosource, США). Клетки культивировали в CO_2-инкубаторе при 37 °C, 5% CO_2. Через 12 ч производили замену культуральной среды с добавлением GM-CSF и IL-4 (в тех же концентрациях) для удаления неприкрепленных клеток и клеточного дебриса. На 5-й день в культуру вносили исследуемые штаммы вируса грип-

па (50 мкл/мл среды, 10^5 ЭИД). В качестве позитивного контроля использовали TNFα (20 нг/мл, Biosours, США). На 7 сутки оценивали иммунофенотип полученных клеток.

Морфологические характеристики клеток

Морфологические изменения клеток наблюдались каждый день под инвертированным оптическим фазово-контрастным микроскопом. Клетки собирали на 7-й день, промывали PBS и центрифугировали при 900 об/мин в течение 5 минут. Клетки фиксировали 2% глутаровым альдегидом в течение 2 ч при 4 °С и дважды промывали PBS. Окрашивали эозин-азуром по Романовскому–Гимзе.

Световую, фазово-контрастную микроскопию и фотографирование клеток проводили с помощью системы AxioVision 4 (фирмы Carl Zeiss, Германия).

Оценку иммунофенотипа ДК осуществляли методом проточной цитометрии на приборе Cytomix FC-500 (Beckman Coulter, США) с применением моноклональных антител (МКА) (eBiosciences, США), меченных флуорохромом, к определяемому маркеру. Клетки собирали через 5 и 7 дней, промывали PBS и делили на несколько фракций по 5×10^5 клеток/100 мкл. Каждый образец измеряли трехкратно. PE- и FITC-меченные антитела добавляли в суспензию до конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали 30 минут при 4 °С в темноте. Клетки дважды промывали PBS и анализировали на проточном цитометре. В качестве контроля использовали FITC-меченные изотипы IgG. Популяцию дендритных клеток и их подтипов выделяли с применением негативной селекции по линейным маркерам CD3, CD14, CD19 и позитивной селекции по маркерам MHCII, CD11c, CD123. Зрелость подтипов дендритных клеток оценивали по экспрессии на них поверхностных маркеров – CD34, CD83, CD80, CD86, MHCII.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10. Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия рассматривались как значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты

Морфологическое исследование

От каждой мыши получали приблизительно от $2,5 \times 10^7$ до $3,5 \times 10^7$ костномозговых мононуклеаров, которые прилипали к чашке через 3-4 часа. При инвертированной фазово-контрастной микроскопии было выявлено, что после 24 ч инкубации культуры клеток в присутствии рекомбинантных мышиных гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (rm GM-CSF) и интерлейкина-4 (rmIL-4) некоторые клетки прилипали к чашке, а другие находились во взвешенном состоянии в культуральной среде (фазово-контрастная микроскопия). Колонии начали появляться через 72 часа, при этом возрастало как количество клеток, образующих колонии, так и объем клеток. На 5-й день появлялись плавающие клетки с дендритными выпячиваниями. На 6-ой день суспендированные клетки начали собираться в колонии, а дендриты удлинялись. После 24-часовой инкубации (7-е сутки культивирования ДК) с исследуемыми вирусными вариантами колонии рассеивались, клетки приобретали многочисленные отростки и равномерно распределялись в среде (рис. 1). Клетки, прилипшие к покровным стеклам, при культивировании в плоскодонных планшетах имели крупные размеры, овальную или неправильную вуалевидную форму, эксцентрично расположенное ядро с многочисленными инвагинациями, на поверхности клеток располагались многочисленные длинные, тонкие, иногда ветвящиеся отростки (рис. 2).

Анализ фенотипа ДК с помощью проточной цитометрии

На 5-й день инкубации в культуре клеток костномозгового происхождения в умеренном количестве обнаруживались (50,14%) $CD11c^+$ клетки. Уровень клеток с экспрессией поверхностного маркера CD34 достигал 48%, что свидетельствовало о формировании незрелых ДК (н-ДК). Культура клеток также содержала пул макрофагов, экспрессирующих маркер $CD14^+$ (45,64%), наряду с адгезивными молекулами CD38/CD14 (36,88%). Содержание клеток с молекулами антигенного представления MHC-II и костимулирующими молекулами CD80, CD86, CD80/CD86 было низким (соответственно, 36,9; 36,46; 22,24 и 17,78%). В культуре н-ДК в следовых количествах обнаруживались зрелые ДК – CD11c/CD83 (4,88%), с маркером активации CD83/MHC II – всего лишь в 5,02%.

На 7-й день (2-й день культивирования клеток в присутствии вариантов вируса гриппа) иммунофенотип клеток менялся в сторону зрелых ДК. В культуре снижалось содержание количества $CD14^+$ клеток, в особенности под воздействием штамма М-26 (25,32%) которое было сопоставимо с действием классического индуктора созревания TNFα (26,32%). Снижалась численность клеток с экспрессией маркера адгезии CD38/CD14 (более выраженная у WSN-ДК – 14,66% и TNFα-ДК – 15,96%). Что касается клеток, экспрессирующих адгезивные молекулы ($CD38^+$), то наблюдалось снижение количества ДК, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN, и повышалось количество ДК, инфицированных вариантами U-2, M-26 и TNFα ($p < 0,05$). Количество ДК, стимулированных другими варианта-

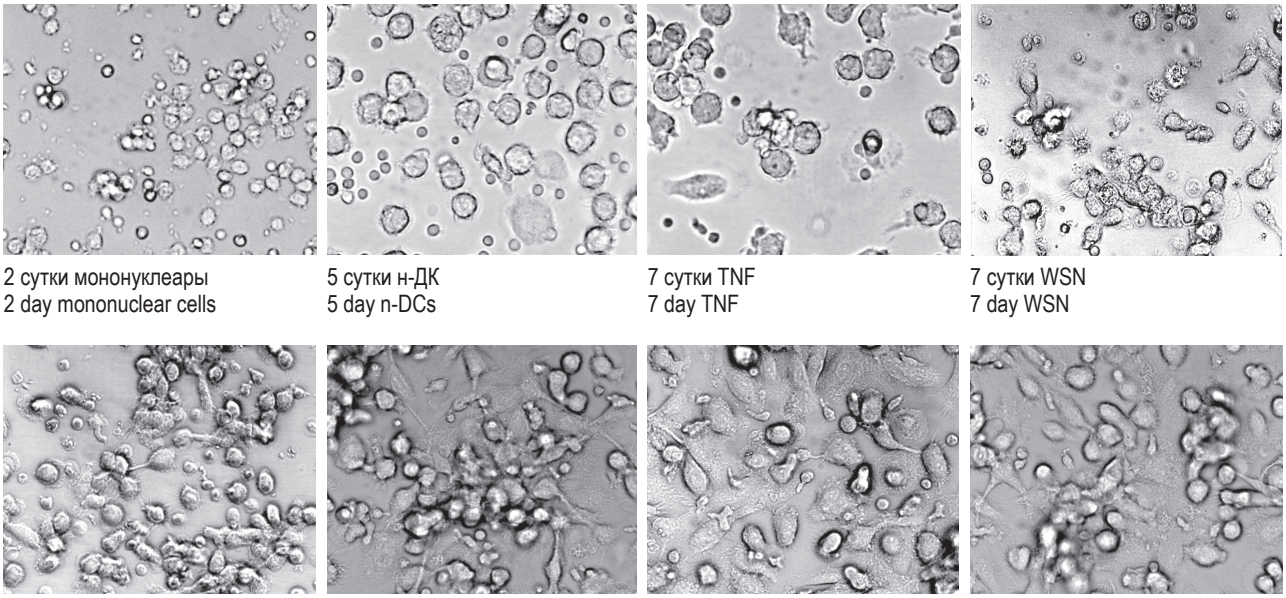

Рисунок 1. Дендритные клетки, генерированные из костномозговых предшественников мышей

Примечание. Фазово-контрастная микроскопия (×400).

Figure 1. Dendritic cells generated from bone marrow precursors of mice

Note. Phase contrast microscopy (×400).

ми, не претерпевало существенных изменений (табл. 1).

У ДК, стимулированных отдельными вирусными вариантами, снижалась экспрессия маркеров незрелости CD34. При этом в культуре ДК, стимулированных XA реассортантом, это снижение было минимальным (37,14%) по сравнению с ДК, активированными другими вариантами вируса гриппа. Резкое снижение маркеров незрелости CD34 наблюдалось у ДК, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33 (12,4%) и вариантом AAL-2 (9,82%). Отмечено наибольшее содержание ДК с маркерами адгезии среди клеток, инфицированных аттенуированными вариантами U-2 (38,62%) и M-26 (34,52%). При этом число TNFα-ДК (66,14%) было более чем в 2 раза выше н-ДК. В то же время в культуре повышалось содержание активированных клеток, экспонирующих MHC II класса, в особенности под воздействием AAL-2 и вирулентного штамма WSN (соответственно, 70,32 и 61,18%) по сравнению с н-ДК (36,9%) и TNFα-ДК (47,08%).

Под действием вирусных вариантов в культуре отмечалось повышение количества ДК с костимулирующими молекулами CD80, CD86 и двойными позитивными маркерами CD80/CD86 (табл. 2). Уровни CD80 и CD86 более существенно ($p < 0,05$) повышались под воздействием вирулентного штамма WSN и аттенуированного варианта AAL-2 (соответственно, в 1,51; 1,43 раза и 2,5; 2,27 раза), но уступали активности

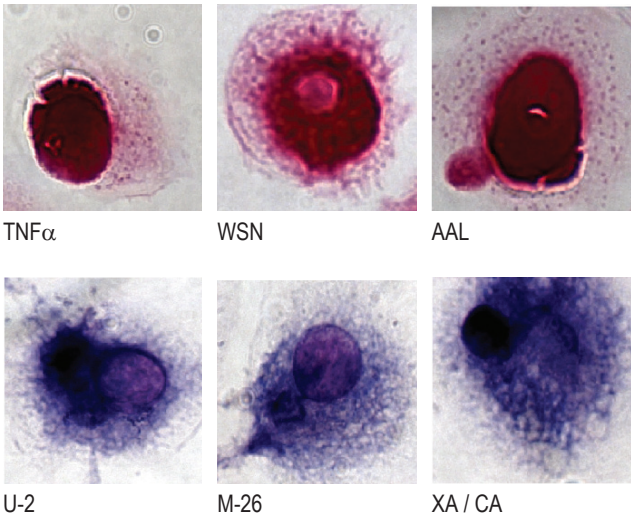

Рисунок 2. Дендритные клетки, генерированные из костномозговых предшественников мышей, в культуре, активированной GM-CSF и IL-4 (7-е сутки инкубации) + индукторы созревания

Примечание. Микрофотография дендритных клеток, прилипших к покровным стеклам. Окраска фуксином Циля (верхний ряд) и эозин-азуром по Романовскому–Гимзе (нижний ряд). Ок. 10, об. 100.

Figure 2. Dendritic cells generated from bone marrow precursors of mice in a culture activated by GM-CSF and IL-4 (day 7 of incubation) + maturation inducers

Note. Micrograph of dendritic cells adhering to coverslips. Staining with fuchsin Ziel (top row) and eosin azure according to Romanowsky–Giemsa (bottom row). 10 ×100.

классического индуктора (TNFα). Аналогичная картина наблюдалась и в отношении двойных позитивных маркеров CD80/CD86, где активность WSN и AAL-2 была более высокой по сравнению с другими изучаемыми препаратами. Что касается маркера CD83, то все штаммы индуцировали созревание ДК, в особенности M-26, U-2 и AAL-2 (повышение численности CD83-экспрессирующих клеток в 7,63; 7,24 и 6,64 раза соответственно, $p < 0,01$) по сравнению с н-ДК. Эти штаммы превосходили активность TNFα ($p < 0,05$).

Соответственно. по мере созревания ДК активнее экспонировали активационный маркер – молекулу антигенного представления MHCII. Больше всего отмечалось повышение количества ДК, содержащих данный маркер среди клеток, инфицированных вирулентным штаммом A/WSN/33 и аттенуированным вариантом AAL-2- (27, 28 и 25,62% против 5%-н-ДК, $p < 0,01$). Однако все вирусные варианты уступали активности классического индуктора созревания TNFα ($p < 0,05$).

Таким образом, добавление в среду культивирования ДК вариантов вируса гриппа вызывало созревание ДК, что подтверждается снижением в культуре численности макрофагов, клеток, экспрессирующих маркер клеточной незрелости CD34, повышением уровня клеток с экспрессией адгезивных CD38, костимулирующих CD80/CD86 молекул и молекул терминальной дифференцировки CD83. Однако процесс созревания ДК отличался значительной вариабельностью. Следует особо отметить снижение числа CD38-позитивных клеток, а также снижение клеток с экспрессией маркера терминальной дифференцировки под влиянием вирулентного штамма A/WSN/33, что указывает на наличие иммуносупрессирующей активности у данного вируса. Аттенуированные варианты U-2 и M-26 не обладали такой активностью. XA реассортант в меньшей степени влиял на снижение уровня $CD38^+$ экспрессирующих ДК. С другой стороны, AAL-2 и A/WSN/33 обладали высоким активирующим влиянием на число $MHCII^+$, $CD80/CD86^+$ ДК.

Среди н-ДК был выявлен максимальный уровень экспрессии TLR2, TLR4 и TLR9 (табл. 3). В культуре н-ДК, AAL-2-ДК, M-26-ДК определялось большее количество клеток с экспрессией TLR2 (26,34; 25,4; 24,6% соответственно) по сравнению с клетками, стимулированными вирулентным штаммом A/WSN/33, XA-реассортантом и TNFα (соответственно, 21,3; 16,7; 20,2%, $p < 0,05$).

Под воздействием всех вирусных вариантов снижалось число TLR4-экспрессирующих клеток. Активность штаммов была сопоставимой, но TNFα активнее воздействовал на $TLR4^+$ ДК, способствуя максимальному снижению их численности (с 48 до 20,68%).

В отношении TLR9 наблюдалась следующая картина: высокие уровни экспрессии этого рецептора на н-ДК (31,3%) под воздействием штаммов вируса гриппа существенно снижались практически до уровня TNFα-ДК (18,9%, $p < 0,05$) и даже ниже. Особенно интенсивное снижение экспрессии TLR9 наблюдалось в ДК под влиянием вирулентного штамма A/WSN/33 и варианта AAL-2.

То есть в культуре н-ДК выявлялся существенно больший уровень TLR-экспрессирующих клеток, который по мере созревания ДК снижался.

Обсуждение

Изучение иммунофенотипических и морфологических свойств клеток, полученных из предшественников костного мозга мышей в присутствии GM-CSF и IL-4, показало, что на пятые сутки культивирования формировались незрелые дендритные клетки, которые в большом количестве экспрессировали маркер CD34.

Зрелость ДК определяется совокупностью морфологических, иммунофенотипических и функциональных параметров [5].

ДК при применении в качестве индукторов созревания исследуемых вирусных агентов приобретали типичную морфологическую характеристику зрелых клеток – имели многочисленные разветвленные отростки на поверхности, необходимые для контакта с окружающими клетками, в частности для эффективного представления антигена Т-лимфоцитам, овальную форму с эксцентрично расположенным ядром, чаще неправильной формы, с хроматином.

Изучение иммунофенотипа ДК показало, что исследуемые варианты вируса гриппа способствовали дифференцировке ДК, поскольку вызывали снижение численности незрелых клеток. Однако исследуемые вирусы обладали различными биологическими свойствами и, как следствие, индуцировали разнообразные варианты дифференцировки ДК, включая формирование CD-маркеров, появление костимулирующих молекул, экспрессию Toll-подобных рецепторов.

Начальный этап гриппозных инфекций сопровождается супрессией иммунной системы. Вакцинные варианты вируса гриппа также обладают иммуносупрессирующим действием [1, 3]. Этим во многом объясняется низкая эффективность живых гриппозных вакцин при иммунизации лиц пожилого возраста. Молекулярные механизмы иммуносупрессирующего действия вируса гриппа не исследованы. Полученные нами данные свидетельствуют о заметной ингибиции числа клеток с маркерами адгезии, необходимыми для прикрепления к клеткам-мишеням (CD38, CD38/CD14), под влиянием инфицирования

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, M±SD, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 1. EFFECT OF VACCINE STRAINS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MOUSE BONE MARROW, M±SD, Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Маркеры клеток Cell markers	**Количество клеток** Number of cells (%)						
	н-ДК* n-DCs*	**WSN°**	**AAL-2•**	**U-2¤**	**M-26^**	**XA[a]** CA[a]	**TNFα**
CD14	45,64±3,77 45,5 (45-47,8) # ^ ° • ¤ [a]	38,66±2,11 38,6 (37,0-40,3) # ^	38,94±1,6 39,2 (37,6-39,8) # ^	35,24±2,08 35,1 (33,4-37,3) * # ^	25,32±2,06 25,4 (23,5-27,2) * ° • ¤ [a]	34,58±2,33 34,8 (32,4-36,7) * # ^	26,32±1,83 26,3 (24,7-28,0) * ° • ¤ [a]
CD38/CD14	36,88±3,23 36,9 (33,8-40,0) # ^ ° • ¤ [a]	14,66±1,72 14,9 (13,3-15,7) * ^ ¤	17,78±1,9 17,8 (16,3-19,4) * ^ ¤	29,28±2,14 29,1 (27,4-31,2) * # ° • [a]	25,04±2,56 25,4 (22,5-27,3) * # ° • [a]	17,92±2,09 17,9 (16,1-19,7) * ^ ¤	15,96±1,73 15,7 (15,6-17,3) * ^ ¤ [a]
CD34	48,02±2,53 47,2 (46,0-50,4) # ^ • ¤ [a]	12,4±1,99 12,8 (10,5-13,8) * ^ ¤ [a]	9,82±0,93 9,7 (9,2-10,5) * ^ ¤ [a]	28,46±1,68 28,2 (27,0-30,1) * # • [a]	26,22±1,76 26,3 (24,8-27,3) * # • [a]	37,12±1,8 37,5 (35,5-38,6) * # ^ • ¤	8,52±1,71 9,1 (7,2-9,6) * ¤ [a]
CD11c	50,14±2,8 50,2 (47,7-52,5)	51,92±3,35 51,5 (49-55)	52,42±3,61 52,9 (49,0-55,8)	51,68±3,98 51,5 (48,0-55,4)	52,22±3,75 51,6 (49,0-55,8)	51,86±4,28 51,6 (48-56)	51,36±8,28 53,6 (49,3-57,9)
CD38	30,5±3,02 30,9 (27,5-33,0) # ° • ¤	20,78±2,4 20,7 (18,5-23,0) * # ^ • ¤ [a]	31,18±3,72 31,7 (27,7-34,5) # °	38,62±3,13 38,6 (35,7-41,5) * # ° [a]	34,52±2,08 34,5 (32,6-36,5) # ° •	31,38±2,16 31,7 (29,3-33,3) # °	66,14±3,8 66,4 (62,6-69,3) * ^ ° • ¤ [a]
MHC II	36,9±2,09 37 (35,0-38,6) # ^ ° • ¤ [a]	61,18±3,97 61,4 (57,3-65,0) * # ^ ¤ [a]	70,32±5,04 70,3 (65,6-74,9) * # ^ ¤ [a]	49,86±2,48 49,6 (47,6-52,2) * ° •	51,92±3,85 51,6 (48,3-55,7) * •	46,34±3,28 46,2 (43,2-49,3) * ° •	47,08±3,59 46,7 (44,0-50,5) * ° •

Примечание. * # ^ ° • ¤ [a] – p < 0,05 – достоверность различий между исследуемыми группами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. * # ^ ° • ¤ [a]Є, p < 0.05, significance of differences between study groups (Mann–Whitney U test).

вирулентным штаммом A/WSN/33. Вирулентный штамм A/WSN/33 также ингибировал число клеток, экспрессирующих маркер терминальной дифференцировки CD83, CD83/MHCII, который является более надежным показателем зрелости клеток. Вакцинные варианты U-2, M-26 практически не оказывали ингибирующего действия на экспрессию маркера CD83, в то время как XA реассортант обладал слабым ингибирующим действием. Можно предположить, что сниженная экспрессия маркера адгезии CD38 и маркера терминальной дифференцировки CD83 является частью молекулярного механизма, ответственного за иммуносупрессирующее действие вируса гриппа. Популяция ДК без индуктора созревания, экспрессирующая маркер CD38, составила лишь 4,72%, а внесение вакцинных вариантов U-2 и M-26 увеличивало численность созревших клеток до 34% и выше.

Процессу распознавания отводится важная роль в иммунологической защите, так как только отобранные посредством специфических рецепторов антигены могут быть презентированы и элиминированы в процессе иммунного ответа. Именно такие распознающие рецепторы (PRRs) передают сигналы для активации клеток о высвобождении каскада цитокинов [8]. К таким молекулам относят Toll-рецепторы, распознающие PAMPs (патоген-ассоциированные молекулярные структуры), присутствующие как на живых микробных клетках, так и их компонентах [6]. Около 26,3% незрелых ДК экспрессировали на своей поверхности TLR2 и около 48% TLR4. В процессе созревания под влиянием вирусных вариантов в различной степени снижалась численность TLR2-, TLR4- и TLR9-позитивных клеток. Особенно интенсивно снижение экспрессии TLR9 наблюдалось в ДК под влиянием вирулент-

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ, M±SD, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 2. EFFECT OF VACCINE STRAINS OF INFLUENZA VIRUS ON THE IMMUNOPHENOTYPE OF DENDRITIC CELLS GENERATED FROM MOUSE BONE MARROW, M±SD, Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

Маркеры клеток Cell markers	**Количество клеток** Number of cells (%)						
	н-ДК* n-DCs*	**WSN°**	**AAL-2•**	**U-2¤**	**M-26^**	**XA[a]** CA[a]	**TNFα[#]**
CD80	36,46±1,75 36,5 (35,3-37,9) ° • ¤ ^ #	55,22±2,87 55,5 (53,3-57,2) * ¤ ^ a #	52,44±2,74 52,5 (50,1-54,9) * ^ a #	47,04±2,08 47,8 (45,2-48,4) * a #	43,58±2,08 43 (42,3-44,5) * ° • #	40,3±2,47 40,2 (38,5-42,5) ° • ¤ #	65,3±2,78 65,3 (63,0-67,6) * ° • ¤ ^ a
CD86	22,24±2,08 22,5 (20,2-24,0) ° • ¤ ^ a #	45,66±2,5 45,2 (43,6-48,0) * a #	50,58±3,71 50,9 (47,0-53,8) * ¤ a #	39,58±2,96 39,5 (36,8-42,2) * • a #	45,28±2,92 45,8 (42,5-47,8) * a #	37,9±2,94 37,8 (35,6-40,2) * ° • ^ #	68,48±3,53 68,9 (65,5-71,3) * ° • ¤ ^
CD80/ CD86	17,78±1,58 17,8 (17,5-19,0) • ¤ ^ a #	35,14±2,87 35,7 (32,3-37,7) * • ¤ ^ a #	43,76±2,98 43,3 (42,0-46,5) * ¤ ^ a #	27,66±2,92 27,8 (25,3-30,0) * • #	23,62±2,01 23,8 (22,3-25,0) * • #	22,78±2,08 22,8 (21,0-24,7) • #	56,34±3,85 57,6 (52,5-59,4) * • ¤ ^ a
CD11c/ CD83	4,88±0,33 4,9 (4,6-5,1) ° • ¤ ^ a #	21,48±2,35 21,4 (19,3-23,7) * • ¤ ^ a	32,4±2,25 32,4 (30,3-34,5) * ° #	35,36±2,24 35,1 (33,4-37,4) * ° #	37,24±1,97 37 (35,7-39,0) * ° a #	30,32±3,61 30,6 (27,0-33,7) * ° ^	25,6±2,16 25,4 (23,7-27,6) * ° • ¤ ^
CD83	4,72±0,35 4,7 (4,5-4,9) ° • ¤ ^ #	22,46±2,48 22,8 (20,1-24,7) * • ¤ ^ a #	33,34±1,96 33,3 (30,3-36,4) * °	34,32±1,96 34,4 (32,5-36,0) * ° a	37,34±3,67 35,8 (35,5-39,9) * ° a	27,42±2,45 27,5 (25,0-29,7) * ¤ ^ #	38,84±3,03 38,7 (36,0-41,8) * ° a
CD83/ MHC II	5,02±0,63 5 (4,5-5,6) ° • ¤ ^ a #	12,78±2,46 12,9 (10,5-14,9) * • ^ a #	25,62±2,23 25,8 (23,4-27,6) * ° #	27,28±2,12 27 (25,5-29,2) * °	20,68±2,27 20,7 (18,5-22,9) * ° ¤ #	22,08±2,18 22,1 (20-24) * ° #	32,26±2,94 32,6 (29,5-34,9) * ° • ¤ ^ a

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА НА ЭКСПРЕССИЮ TLRs ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК, ГЕНЕРИРОВАННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ , M±SD, Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 3. EFFECT OF INFLUENZA VACCINE STRAINS ON THE TLRs EXPRESSION OF MOUSE BONE MARROW DERIVED DENDRITIC CELLS, M±SD, Me ($Q_{0.25}$-$Q_{0.75}$)

TLRs	**Количество клеток** Number of cells (%)						
	н-ДК* n-DCs*	**WSN°**	**AAL-2•**	**U-2¤**	**M-26^**	**XA[a]** CA[a]	**TNFα[#]**
TLR2	26,34±1,84 26,2 (24,8-27,9) ° a #	21,28±2,16 21 (19,4-23,3) *	25,42±1,9 25 (23,9-27,2) a	23,24±2 23,1 (21,5-25,0) a	24,6±1,88 24,8 (23-26) a	16,72±2,1 16,7 (14,8-18,6) * • ¤ ^	20,18±2,04 20 (18,4-22,0) *
TLR4	48±2,1 48 (46-50) ° • ¤ ^ a	28±2,27 27,9 (26,4-30,0) * #	29,86±2,7 29,9 (27,3-32,3) * #	32,86±2,82 32,3 (30,4-35,6) * #	30,86±2,51 30,9 (8,5-33,0) * #	30,22±2,04 30 (28,5-32,0) * #	20,68±2,1 20,5 (19,0-22,6) * ° • ¤ ^ a
TLR9	31,28±2,06 31 (29,5-33,2) ° • ¤ ^ a #	10,42±2,03 10,6 (8,5-12,3) * #	9,88±2,22 10,2 (8.0-11,9) * #	15,26±1,9 15 (13,6-17,0) * •	14,44±2 14,4 (12,6-16,2) * •	13,8±2,28 13,9 (11,6-15,8) *	18,92±2,2 18,8 (17-21) * ° •

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

ного штамма A/WSN/33 и варианта AAL2. Интересно отметить, что под влиянием вариантов вируса гриппа в ДК наблюдается параллельное снижение экспрессии исследуемых TLRs и повышение экспрессии маркера MHC II. Можно предположить, что по мере созревания ДК снижается возможность распознавания лигандов, но повышается способность к антигенной презентации уже процессированного антигена.

Заключение

В данной работе мы попытались провести сравнительное исследование влияния классических живых гриппозных вакцин на основе ХА реассортантов и вакцинных вариантов, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза, на иммунофенотип ДК, генерированных из костного мозга мышей. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что сайт-специфические мутанты U-2 и M-26 сходны в этом отношении с ХА реассортантом по всем исследуемым позициям, а по некоторым позициям превосходят его. Исключением является мутант AAL-2, имеющий 2 аминокислотные замены в PB2-белке, который по своему влиянию на фенотип ДК был более сходным с вирулентным штаммом A/WSN/33. Такое поведение мутанта AAL-2 объясняется крайне низкой генетической стабильностью, что было показано с помощью «стресс-теста» (Kost и соавт., будет опубликовано). Это обстоятельство еще раз подчеркивает важную роль генетической стабильности для живых гриппозных вакцин. Полученные нами данные показывают, что детальный анализ различных вакцинных вариантов на формирование фенотипа иммунокомпетентных клеток может выявить критерии оценки эффективности разрабатываемых вакцин против гриппа.

Также наши исследования показали возможность получения из костномозговых предшественников мышей зрелых ДК при использовании в качестве индуктора созревания ДК экспериментальных вакцинных вариантов вируса гриппа. Эти данные расширяют представление о механизмах взаимодействия макро- и микроорганизма и вносят вклад как в прикладную вакцинологию и иммунологию, так и в фундаментальную науку.

Список литературы / References

1. Ахматова Н.К., Маркушин С.Г., Кривцов Г.Г., Акопова И.И., Коптяева И.Б. Сравнительное изучение адъювантных свойств препаратов хитозана при парентеральной иммунизации инактивированной гриппозной вакциной // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2011. № 3. С. 42-53. [Akhmatova N.K., Markushin S.G., Krivtsov G.G., Akopova I.I., Koptyaeva I.B. A comparative study of the adjuvant properties of chitosan preparations during parenteral immunization with an inactivated influenza vaccine. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prevention, 2011, no. 3, pp. 42-53.* (In Russ.)]

2. Кост В.Ю., Ртищев А.А., Минтаев Р.Р., Акопова И.И., Лисовская К.В., Маркушин С.Г. Изучение биологических свойств аттенуированных вариантов штамма A/WSN/33 вируса гриппа, полученных с помощью сайт-специфического мутагенеза PB2-гена // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии, 2019. № 2. С. 68-76. [Kost V.Yu., Rtischev A.A., Mintaev R.R., Akopova I.I., Lisovskaya K.V., Markushin S.G. Study of the biological properties of attenuated variants of strain A/WSN/33 of the influenza virus obtained using site-specific mutagenesis of the PB2 gene. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology 2019, no. 2, pp. 68-76.* (In Russ.)]

3. Маркушин С.Г., Гендон Ю.З., Кривцов Г.Г., Акопова И.И., Сухно А.С., Переверзев А.Д. Повышение иммуногенности живой холодоадаптированной гриппозной вакцины с помощью адъюванта // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунобиологии, 2010. № 5. С. 29-34. [Markushin S.G., Gendon Yu.Z., Krivtsov G.G. , Akopova I. I. , Sukhno A.S., Pereverzev A.D. Increasing the immunogenicity of a living cold-adapted influenza vaccine using an adjuvant. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology, 2010, no. 5, pp. 29-34.* (In Russ.)]

4. Bicback K., Breer C., Nanan R., Ter Meulen V., Schneider-Schulies S. Expansion of human gamma/delta T cells *in vitro* is different ially regulated by the measles virus glycoproteins. *J. Gen Virol., 2003, Vol. 84, no. 5, pp. 1179-1188.*

5. Dalod M., Chelbi R., Malissen B., Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity atranscriptional programming. *EMBO J., 2014, Vol. 33, no. 10, pp. 1104-1116.*

6. Dowling J.K., Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin. Transl. Immunology, 2016, Vol. 5, no. 5, e85.* doi: 10.1038/cti.2016.22.

7. Jiang P.L., Lin H.J., Wang H.W., Tsai W.Y., Lin S.F., Chien M.Y., Liang P.H., Huang Y.Y., Liu D.Z. Galactosylated liposome as a dendritic cell-targeted mucosal vaccine for inducing protective anti-tumor immunity. *Acta Biomater., 2015, Vol. 11, pp. 356-367.*

8. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol., 2010, Vol. 11, pp. 373-384.*

9. Kost V.Y., Koptyaeva I.B., Akopova I.I., Tsfasman T.M., Rtishchev A.A., Lisovskaya A.V., Markushin S.G. Investigation of efficiency of site-specific mutants of the influenza virus in homological and heterological control infection. *ECronicon Microbiology J., 2017, Vol. 12, no. 5, pp. 232-242.*

10. Lin W., Chen Y.L., Jiang L., Chen J.K. Reduced expression of chemerin is associated with a poor prognosis and a lowed infiltration of both dendritic cells and natural killer cells in human hepatocellular carcinoma. *Clin. Lab., 2011, Vol. 57, pp. 879-885.*

11. Paul W.E. Fundamental Immunology, 6th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1603 p.

12. Polezhaev F.I. Conditions for production of thermosensitive attenuated influenza virus recombinants. *Acta Virologica, 1978, Vol. 22, pp. 263-269.*

13. Rosalia R.A., Cruz L.J., van Duikeren S., Tromp A.T., Silva A.L., Jiskoot W., de Gruijl T., Löwik C., Oostendorp J., van der Burg S.H., Ossendorp F. CD40-targeted dendritic cell delivery of PLGA-nanoparticle vaccines induce potent anti-tumor responses. *Biomaterials, 2015, Vol. 40, pp. 88-97.*

14. Wang H.L., Xu H., Lu W.H., Zhu L., Yu Y.H., Hong F.Z. *In vitro* and *in vivo* evaluations of human papillomavirus type 16 (HPV16)-derived peptide-loaded dendritic cells (DCs) with a CpG oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) adjuvant as tumor vaccines for immunotherapy of cervical cancer. *Arch. Ginecol. Obstet., 2014. Vol. 289, pp. 155-162.*

15. Wang W., Li J., Wu K., Azhati B., Rexiati M. Culture and identification of mouse bone marrow-derived dendritic cells and their capability to induce T-lymphocyte proliferation. *Med. Sci. Monit., 2016, Vol. 22, pp. 244-250.*

16. Zheng C., Yu G., Wang H., Tang A., Geng P., Zhang H., Zhu Z., Li F., Xie X. Meta-analysis of chemotherapy and dendritic cells with cytokine-induced killer cells in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med., 2015, Vol. 8, pp. 14527-14537.*

Авторы:

Ахматова Н.К. *— д.м.н., заведующая лабораторией механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Ртищев А.А. *— младший научный сотрудник лаборатории генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Маркушин С.Г. *— д.б.н., заведующий лабораторией генетики РНК-содержащих вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Костинова А.М. *— младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Ахматова Э.А. *— младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Столпникова В.Н. *— к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Калиниченко Е.О. *— младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Шубина И.Ж. *— д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина», Москва, Россия*

Бишева И.А. *— младший научный сотрудник лаборатории механизмов регуляции иммунитета ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия*

Authors:

Akhmatova N.K., *PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Rtishchev A.A., *Junior Research Associate, RNA Virus Genetics Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Markushin S.G., *PhD, MD (Biology), Head, RNA Virus Genetics Laboratory, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Kostinova A.M., *Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Akhmatova E.A., *Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Stolpnikova V.N., *PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Kalinichenko E.O., *Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Shubina I.Zh., *PhD, MD (Biology), Leading Reseach Associate, Laboratory of Cellular Immunity, N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russian Federation*

Bisheva I.A., *Junior Research Associate, Laboratory of Immunity Regulation Mechanisms, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation*

Поступила 02.10.2019
Отправлена на доработку 03.12.2019
Принята к печати 14.03.2020

Received 02.10.2019
Revision received 03.12.2019
Accepted 14.03.2020