

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ВАКЦИН
И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»

На правах рукописи



Фалынскова Ирина Николаевна

**Изучение эффективности противогриппозных препаратов
и вакцин на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей
после гриппозной инфекции**

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Ленева Ирина Анатольевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Грипп, эпидемиология гриппа и осложнений после гриппозной инфекции, вирус гриппа	16
1.1.1 Ущерб, наносимый гриппом	16
1.1.2 Эпидемиология гриппа	17
1.1.3 Вирус гриппа.....	20
1.1.4 Грипп: диагностика, клиническая картина.....	23
1.1.5 Бактериальные осложнения после гриппозной инфекции	24
1.1.6 История исследования вторичной бактериальной пневмонии.....	25
1.1.7 Распространенность вторичной бактериальной инфекции в последние десятилетия	26
1.1.8 Патогенез вторичной бактериальной инфекции	29
1.2 Противогриппозные вакцины	31
1.3 Препараты, применяемые при лечении гриппа	39
1.3.1 Этиотропные препараты.....	40
1.3.2 Интерфероны, индукторы интерферона, иммуномодуляторы.....	48
1.3.3 Антибактериальные препараты	52
1.4 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии на животных.....	55
Заключение	59
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
2.1 Штаммы вируса и бактерий, культуры клеток	60
2.2 Препараты, субстанции и их приготовление.....	62
2.3 Экспериментальные животные	63
2.4 Содержание животных и этические аспекты эксперимента.....	64
2.5 Моделирование экспериментальной вторичной пневмонии мышей, вызванной вирусом гриппа с последующим бактериальным заражением	65

2.6 Изучение эффективности противовирусных и антибактериальных препаратов, а также их комбинации, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	66
2.7 Изучение эффекта вакцинации холодоадаптированным штаммом на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной <i>S. pneumoniae</i> , после гриппозной инфекции	66
2.8 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	67
2.9 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих нейраминидазу вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	68
2.10 Получение легких мышей	68
2.11 Определение титра вируса в легких мышей.....	69
2.12 Определение количества бактерий в носоглоточных смывах и легких мышей	70
2.13 Патоморфологические исследования.....	70
2.14 Исследование антигенной активности вирусоподобных частиц	71
2.15 Статистическая обработка данных	74
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	76
3.1 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии мышей, развивающейся после гриппозной инфекции	76
3.1.1 Изучение патогенности штаммов вируса гриппа А в отношении мышей	76
3.1.2 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с пандемическим штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09	78
3.1.3 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с различными штаммами <i>S. aureus</i>	81
3.1.4 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии при комбинации <i>S. aureus</i> 1986 со штаммами вируса гриппа А разных подтипов	84

3.1.5 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с различными дозами <i>S. pneumoniae</i> и комбинация их с различными штаммами вируса гриппа <i>H1N1</i> ...	85
3.2 Эффективность противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	88
3.2.1 Эффективность противовирусных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной <i>S. aureus</i> , после гриппозной инфекции	89
3.2.2 Эффективность этиотропных противовирусных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной <i>S. pneumoniae</i> , после гриппозной инфекции	95
3.2.3 Сравнение эффективности антибактериальных препаратов различного механизма действия на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной <i>S. aureus</i> , после гриппозной инфекции	97
3.2.4 Эффективность комбинированного применения этиотропных противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	100
3.2.5 Изучение эффективности комбинированного использования индуктора интерферонов тилорона и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	106
3.3 Изучение эффективности противогриппозных вакцин на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	109
3.3.1 Эффект вакцинации живой и инактивированной противогриппозными вакцинами на развитие осложнений и исход заболевания на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной <i>S. pneumoniae</i> после гриппозной инфекции	109
3.3.2 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих белки вируса гриппа, на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	114

3.3.2.1 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	114
3.3.2.2 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих нейраминидазу вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции	127
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	138
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	160
ВЫВОДЫ	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	163
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	164
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Грипп является широко распространённым острым инфекционным заболеванием дыхательных путей, вызываемым вирусом гриппа и относящимся к группе острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), нередко характеризующимся тяжёлым течением. Возбудитель гриппа циркулирует во всём мире, что обуславливает возможность инфицирования лиц любого возраста и социального статуса. В период эпидемий и пандемий гриппа отмечается рост показателей заболеваемости и смертности, при этом наибольшему риску тяжёлого течения и летальных исходов подвержены пожилые люди, дети, беременные женщины, а также пациенты с иммунодефицитными состояниями и хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Существенная доля неблагоприятных исходов гриппозной инфекции связана с развитием вторичных бактериальных осложнений, прежде всего пневмоний, значительно утяжеляющих клиническое течение заболевания и определяющих прогноз. Наиболее частыми этиологическими агентами вторичных бактериальных пневмоний при гриппе являются *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, что подтверждается как клиническими, так и экспериментальными исследованиями [13, 127, 128].

Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодная вакцинация является наиболее эффективным способом профилактики гриппозной инфекции, а при развитии заболевания показано применение этиотропных противовирусных препаратов. К таким препаратам относятся ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир, занамивир), блокаторы М2-каналов вируса гриппа — производные адамантана (амантадин, римантадин), ингибитор слияния умифеновир, ингибитор вирусной полимеразы балоксавир, а также ряд других лекарственных средств. В настоящее время большинство циркулирующих штаммов вируса гриппа устойчивы к адамантанам, что обуславливает

необходимость поиска новых противовирусных препаратов и изучения их эффективности.

В Российской Федерации, помимо препаратов, рекомендованных ВОЗ, в клинической практике используются индукторы интерферона и иммуномодуляторы. В настоящее время разработан и используется широкий перечень лекарственных средств для лечения гриппозной инфекции, как уже зарегистрированных, так и находящихся на различных этапах разработки. Применение этиотропной терапии в ранние сроки заболевания способствует сокращению его продолжительности, уменьшению выраженности клинических симптомов, снижению вирусной нагрузки и сокращению периода выделения вируса из верхних дыхательных путей, а также снижению частоты осложнений, включая пневмонии и летальные исходы. Вместе с тем, большинство клинических исследований, посвящённых оценке эффективности вакцин и противогриппозных препаратов, не были ориентированы на анализ их влияния на развитие вторичных бактериальных осложнений гриппозной инфекции несмотря на то, что снижение частоты постгриппозных пневмоний является одним из ключевых показателей эффективности как вакцинации, так и противовирусной терапии. Противогриппозный иммунитет определяет не только восприимчивость организма к вирусной инфекции, но и формирует условия для развития вторичных бактериальных осложнений. Следовательно, ограничение репликации вируса гриппа может рассматриваться как один из возможных подходов к профилактике вторичных бактериальных суперинфекций, в том числе ассоциированных с *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.

Учитывая значение пневмонии как одной из причин смерти во время пандемического гриппа, возрастающая вероятность возникновения новой пандемии гриппа, связанной с высокопатогенными вирусами птичьего гриппа, подчёркивает необходимость исследования механизмов, лежащих в основе взаимодействия между вирусом гриппа и бактериальными патогенами. Идентификация и исследование этих механизмов могут помочь повысить эффективность профилактики и терапии.

Одним из приоритетных направлений совместного плана действий ВОЗ и ЮНИСЕФ по борьбе с пневмонией является расширение его положений с учётом пневмоний, ассоциированных с острыми респираторными вирусными инфекциями. ВОЗ также подчёркивает необходимость комплексного междисциплинарного подхода к изучению респираторных инфекций, включая разработку новых противовирусных методов терапии; исследование врождённых (как защитных, так и патогенетически значимых) и адаптивных иммунных реакций в патогенезе заболеваний, в том числе роли иммуномодулирующей терапии и вакцин против респираторных вирусов; а также оптимизацию клинического ведения, диагностики и стратегий общественного здравоохранения, особенно в условиях ограниченных ресурсов [58].

В «Программе исследований ВОЗ по гриппу с позиции общественного здравоохранения» также подчёркивается приоритетность научных исследований, направленных на выявление прогностических маркеров тяжёлого течения пневмоний, развивающихся после гриппозной инфекции [227].

В связи с вышеизложенным, разработка модели вторичной бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции, изучение на ней механизмов патогенеза вторичной бактериальной пневмонии, а также оценка эффективности лицензированных и инновационных вакцин, противовирусных и антибактериальных препаратов различных механизмов действия, включая их комбинированное применение, представляются актуальными и обоснованными направлениями исследований.

Степень разработанности темы исследования

Моделирование вторичной бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции, на животных с целью изучения патогенеза тяжёлого течения гриппа началось практически сразу после выделения и идентификации вируса гриппа. Впервые вирус гриппа А был выделен у свиней американским исследователем Ричардом Шоупом в 1931 году. В серии экспериментальных работ

Шоуп показал, что тяжёлое заболевание у животных развивалось только при совместном инфицировании вирусом свиного гриппа и *Haemophilus influenzae*, тогда как изолированное заражение каждым из патогенов не приводило к развитию выраженной патологии [228].

В последующие десятилетия исследования, посвящённые созданию экспериментальных моделей вторичных бактериальных осложнений гриппозной инфекции, активно проводились в различных странах. Так, в работе McHugh и соавторов было показано, что инфицирование мышей адаптированным пандемическим штаммом вируса гриппа усиливает развитие вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus* [54]. McCullers и соавторы продемонстрировали, что как одновременное, так и последовательное заражение мышей штаммом вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и *S. pneumoniae* приводит к выраженному летальному синергизму данных патогенов [174].

Несмотря на то, что экспериментальные модели пневмонии, развивающейся при инфицировании вирусом гриппа А с последующим заражением *S. pneumoniae*, подробно изучены и широко представлены в литературе, количество данных, посвящённых моделированию вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. aureus* после гриппозной инфекции, к началу выполнения данной работы оставалось ограниченным и не было проведено моделирование с использованием штамма, вызвавшего последнюю пандемию 2009 г. Кроме того, отсутствовали исследования, в которых экспериментальные модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппа использовались бы для оценки эффективности вирусоподобных частиц и противовирусных препаратов, применяемых и разрабатываемых в Российской Федерации.

Цель и задачи исследования

Цель исследования: изучение эффективности вакцин и противовирусных препаратов различного механизма действия на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, после гриппозной инфекции.

Задачи исследования:

1. Разработка модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной штаммами вируса гриппа А с последующим заражением *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pneumoniae*.
2. Изучение эффективности противовирусных препаратов с различными механизмами действия и их комбинации с антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции.
3. Изучение эффективности иммунизации вакцинами и вирусоподобными частицами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции.

Научная новизна

На момент начала настоящего исследования впервые была разработана экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей с использованием штамма, вызвавшего последнюю пандемию гриппа 2009 г. Впервые в Российской Федерации модель вторичной бактериальной пневмонии мышей, развивающейся после инфицирования различными штаммами вируса гриппа с последующим заражением *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, использована для изучения патогенеза заболевания и оценки эффективности препаратов и вакцин против гриппозной инфекции и ее осложнений, производимых в Российской Федерации. Впервые на модели вторичной бактериальной инфекции после гриппа была изучена эффективность вирусоподобных частиц.

Теоретическая и практическая значимость работы

Практическая значимость работы заключается в том, что выявленная на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей эффективность вакцин и противогриппозных препаратов с различными механизмами действия

подтверждает возможность использования данной модели для доклинического изучения инновационных лечебных и профилактических средств, разрабатываемых в Российской Федерации и за рубежом. Применяемая модель характеризуется воспроизводимостью получаемых эффектов, что подтверждает её пригодность для сравнительной оценки эффективности лечебных и профилактических подходов другими исследователями. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации дозировок и схем применения препаратов, направленных на профилактику и лечение вторичных бактериальных осложнений гриппозной инфекции.

Теоретическая значимость работы заключается в расширении представлений о патогенезе вирусно-бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции. Использование модели позволило сопоставить эффекты препаратов и вакцин различных механизмов действия на ключевые маркеры вирусной и бактериальной инфекции, а также уточнить роль вирус-индуцированных изменений в формировании бактериальных осложнений. Полученные данные углубляют понимание механизмов взаимодействия вируса гриппа с бактериальными патогенами и могут служить теоретической основой для дальнейших исследований, направленных на оптимизацию терапии гриппозной инфекции и её осложнений.

Методология и методы исследования

Методологической основой диссертационной работы послужил комплексный экспериментальный подход, соответствующий поставленной цели и задачам исследования. На всех этапах работы использовались общенаучные, вирусологические, иммунологические и микробиологические методы исследования. В экспериментальной части применялись методы работы с клеточными культурами и лабораторными животными, а также методы количественной и качественной оценки результатов с использованием статистической обработки данных.

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы, включая планирование экспериментов, работу с вирусами и клеточными культурами, инфицирование, вакцинацию и лечение лабораторных животных, забор органов, титрование вируса гриппа, статистическую обработку и анализ полученных результатов, подготовка публикаций по материалам исследования, выполнены лично автором либо при его непосредственном участии.

Препараты вирусоподобных частиц были сконструированы, наработаны и охарактеризованы Miriam Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna). Морфологическое исследование лёгких мышей выполнено совместно с сотрудниками «НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына» ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского» и ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Работы с культурами *Streptococcus pneumoniae* проводились совместно с сотрудниками лаборатории условно-патогенных бактерий ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, а работы с культурами *Staphylococcus aureus* — совместно с сотрудниками лаборатории условно-патогенных бактерий и лаборатории протективных антигенов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Суммарное личное участие автора в работе составляет не менее девяноста процентов.

Положения, выносимые на защиту

1. Последовательное заражение мышей бактериальными патогенами *S. aureus* и *S. pneumoniae* после инфицирования штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1 или H3N2 приводит к усилению инфекционного процесса.

2. Лечение противовирусными препаратами с различными механизмами действия эффективно на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции.

3. Комбинация противовирусных препаратов с антибактериальными препаратами повышает их эффективность по сравнению с терапией каждым препаратом отдельно.

4. Применение живой интраназальной и инактивированной субъединичной противогриппозных вакцин блокирует развитие бактериальной инфекции в нижних отделах респираторного тракта.

5. Вирусоподобные частицы, содержащие гемагглютинин, обладают иммуногенной активностью в отношении гомологичного штамма, их протективная активность у мышей со вторичной бактериальной пневмонией выше после заражения гомологичным штаммом, чем после заражения гетерологичным штаммом вируса гриппа.

6. Иммунизация комбинацией вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин и нейраминидазу, эффективнее применения препаратов, содержащих каждый вирусный белок отдельно, при вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной инфицированием *S. aureus* или *S. pneumoniae* после заражения гетерологичным штаммом вируса гриппа.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения и выводы диссертационной работы соответствуют п. 11 «Противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц» паспорта научной специальности 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Положения и выводы диссертационной работы являются научно обоснованными. Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных экспериментальных методов исследования, достаточным объёмом экспериментального материала, применением подходящих методов статистической обработки данных, а также сопоставлением полученных результатов с данными отечественной и зарубежной научной литературы.

Апробация диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук была пройдена 22 сентября 2025 года на совместной научной конференции отдела иммунологии и аллергологии и отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (протокол №3).

Внедрение полученных результатов в практику

Основные научные положения, выводы и рекомендации диссертационной работы внесены в учебный курс аспирантов, обучающихся по направлению подготовки 1.5.10. Вирусология в ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, а также внедрены в протоколы доклинических исследований по изучению эффективности препаратов для лечения гриппа ООО «Фармавирон».

Публикации по теме диссертации

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 7 научных статьях в отечественных и зарубежных изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты исследования также представлены в виде тезисов и докладов на международной научной конференции.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 197 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с результатами собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и содержит 22 таблицы. Список литературы включает 274 источник, из которых 51 отечественный и 223 зарубежных.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю И.А. Леновой за научное руководство и помощь в выполнении диссертационной работы, а также всему коллективу лаборатории экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Автор благодарит заведующую лабораторией протективных антигенов Н.А. Михайлову, заведующего лабораторией условно-патогенных бактерий А.В. Поддубикова, директора ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова О.А. Свитич и научного руководителя ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова В.В. Зверева за поддержку и содействие в выполнении работы.

Исследования выполнены в рамках темы НИР лаборатории за 2016–2018 гг. «Изучение патогенеза вторичной бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции, в экспериментальной модели мышей и использование её для оценки лекарственных средств», а также при выполнении работ по соглашению с Российским научным фондом № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями» в сотрудничестве с Университетом природных ресурсов и прикладных наук (Австрия).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Грипп, эпидемиология гриппа и осложнений после гриппозной инфекции, вирус гриппа

1.1.1 Ущерб, наносимый гриппом

Ежегодно регистрируется около 1 миллиарда случаев сезонного гриппа, в том числе 3–5 млн случаев тяжёлых форм заболевания и 290–650 тыс. смертей от респираторных патологий, вызванных вирусами гриппа [9, 90]. Вирусы сезонного гриппа вызывают примерно 4–50 млн клинически выраженных инфекций в странах Европейского союза каждый год, при этом от 15 000 до 70 000 жителей Европы умирают от причин, связанных с заболеванием гриппом [116].

В период с 2002 по 2011 гг. в 28 странах Европейского союза ежегодно от 16 000 до 39 000 смертей от респираторных заболеваний (около 12% от общемирового показателя) были ассоциированы с сезонным гриппом. При этом 88% летальных исходов приходились на лиц в возрасте старше 65 лет [120].

В США с численностью населения около 300 млн человек уровень смертности от гриппа, по данным Центров по контролю и профилактике заболеваний (CDC), колеблется от 16 000 до 56 000 случаев в год.

В период 2023–2024 гг., на территории России заболеваемость гриппом достигла 167 на 100 тыс. населения, и значительно превышало показатели предыдущего года — 38,93 на 100 тыс. населения. Аналогично был повышен в 2,4 раза показатель детской заболеваемости в сравнении с данными за 2022 г., он достигал значения 405,65 на 100 тыс. человек. Частота госпитализаций с диагнозом «грипп» в сезоне 2023–2024 гг. была ниже по сравнению с предыдущим сезоном. Наибольшая доля госпитализированных приходилась на возрастную группу 15–64 лет (40,0%).

1.1.2 Эпидемиология гриппа

Наибольшее эпидемическое значение имеет вирус гриппа А из-за высокой генетической изменчивости, обусловленной антигенным дрейфом и антигенным сдвигом.

Антигенный дрейф — процесс постепенного непрерывного накопления точечных мутаций в участках генома вируса гриппа, кодирующих поверхностные гликопротеины гемагглютинин и нейраминидазу, что приводит к образованию новых вариантов, вызывающих сезонные вспышки.

Антигенный сдвиг (шифт) — процесс реассортации между разными штаммами, приводящий к замене целого гена, кодирующего гемагглютинин или нейраминидазу и приводящий к возникновению нового антигенного подтипа вируса, способного вызвать пандемию [31].

Вирус гриппа А является причиной возникновения заболеваний у млекопитающих и домашней птицы. В естественных резервуарах — у водоплавающих птиц и летучих мышей — инфекция обычно протекает бессимптомно. Однако при межвидовой передаче, вирус способен вызывать эпидемии и пандемии острых респираторных заболеваний у домашних птиц и человека. Циркулирующие среди людей и животных вирусы гриппа А способны обмениваться генетическим материалом в процессе реассортации [268, 271].

Вирус гриппа А стал причиной четырёх пандемий гриппа в XX–XXI веках. Первая пандемия 1918–1920 гг., названная «испанка», была вызвана штаммом, относящимся к подтипу А/Н1N1, в короткий срок поразила около 35 % населения мира людей и унесла 40 млн жизней [31].

Вторая, Азиатская пандемия 1957 г., вызванная вирусом А(Н2N2), унесла жизни 1,5–4 млн человек [121].

Третья, Гонконгская пандемия гриппа 1968–1969 гг., вызванная вирусом А(Н3N2), привела примерно к 2 млн летальных исходов во всём мире [183, 242].

Четвертая пандемия началась со вспышки, вызванной штаммом вируса гриппа А(Н1N1)pdm09, в 2009 г. всего за месяц распространилась на территорию

41 страны [183, 267] и приобрела характер пандемии, в течение которой количество летальных исходов составило около 284 000 человек во всём мире. Антигенный состав вакцин против сезонного гриппа, использовавшихся в 2009 г., не соответствовал новому пандемическому штамму A(H1N1)pdm09.

В настоящее время, наиболее распространены штаммы вируса гриппа А — A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), и штаммы вируса гриппа В, относящиеся к линиям В/Виктория и В/Ямагата [145].

Эпидемический сезон 2023–2024 гг. в России характеризовался напряжённой эпидемиологической ситуацией, обусловленной одновременной циркуляцией вирусов гриппа, SARS-CoV-2 и других возбудителей ОРВИ. На всей территории Российской Федерации доминировал вирус гриппа А, при этом наибольшую активность проявлял подтип A(H3N2), доля которого составила 94,0%; вирусы гриппа В выявлялись лишь в 5,0% случаев [11]. Молекулярно-генетический анализ показал близкородственность циркулировавших штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09 вакцинному штамму, рекомендованному ВОЗ, тогда как популяция вируса гриппа A(H3N2) отличалась гетерогенностью: доля антигенных дрейф-вариантов составила 17,1%. Среди вирусов гриппа В дрейф-варианты выявлялись в 53,8% случаев, что свидетельствует о неполном соответствии циркулировавших штаммов компонентам сезонных вакцин [11].

По данным ВОЗ, в эпидемическом сезоне 2025–2026 гг. циркуляция вирусов гриппа была зарегистрирована во всех зонах передачи, а количество выявленных вирусов гриппа было выше по сравнению с тем же отчетным периодом 2024–2025 годов. В Европе активность гриппа возросла с середины сентября, при этом преобладали вирусы гриппа А. Среди субтипированных вирусов гриппа А преобладали вирусы A(H3N2), а выявление вирусов A(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа В оставалось низким на протяжении всего отчетного периода. С сентября 2025 года были зарегистрированы спорадические случаи зоонозных инфекций гриппа, в большинстве случаев после контакта с инфицированными птицами, свиньями или загрязненной окружающей средой. Были зарегистрированы единичные случаи A(H5N1) в Бангладеш, A(H5N2) в Мексике и A(H5N5) в

Соединенных Штатах Америки. Кроме того, зарегистрированы три случая A(H5N1) в Камбодже. Четырнадцать случаев A(H9N2) и один случай A(H10N3) были зарегистрированы в Китае. Единичные случаи A(H1N1)v и A(H1N2)v были зарегистрированы в Китае, один случай A(H1N2)v – в Соединенных Штатах Америки и один случай A(H3N2)v – в Бразилии [211].

Пандемии могут возникнуть в результате прямой передачи и адаптации к человеку целого вируса птичьего гриппа, как напрямую от дикой водоплавающей птицы, так и через домашнюю птицу, что, предположительно, произошло в 1918 году [212]. В 1997 году высокопатогенный вирус птичьего гриппа H5N1 впервые перешагнул межвидовой барьер и заразил человека. 18 человек заразились новым штаммом птичьего гриппа H5N1 от кур и 6 из них умерли, что привело к почти полному уничтожению птицеводческих хозяйств Гонконга. С 2003 года высокопатогенный птичий грипп H5N1 вновь появился в Юго-Восточной Азии и распространился в Европу. С 2003 по апрель 2007 года в общей сложности было подтверждено 291 случай заболевания человека в 12 странах из Азии, Ближнего Востока и Африки, из которых 172 закончились летальным исходом, что дало общий показатель летальности 59% [181].

Вирус гриппа H5N2, называемый птичьим, может вызывать как бессимптомные заболевания у домашней птицы, так высокопатогенные вспышки, приводящие к выбраковке тысяч голов на птицефабриках. В период с 13 марта по 20 июня 2024 года было зарегистрировано 14 новых случаев заражения людей вирусом птичьего гриппа из Вьетнама (один H5N1, один H9N2), Австралии (один H5N1), США (три H5N1), Китая (два H5N6, три H9N2, один H10N3), Индии (один AH9N2) и Мексики (один смертельный случай AH5N2) [68]. Последний случай стал первым лабораторно подтвержденным случаем заражения человека вирусом птичьего гриппа подтипа A(H5N2). Весной 2024 г. были отмечены случаи заражения коров в США и подтверждены случаи заражения вирусом гриппа A(H5N1) у людей, работавших на молочной ферме. Вирус обнаружен в молоке инфицированных животных, но пастеризация молока и молочных продуктов, даже содержащих вирусную РНК, полностью уничтожала инфекционный вирус. С

каждым годом увеличивается число зарегистрированных случаев межвидовой передачи вируса гриппа от птиц к млекопитающим. К началу 2024 года было зарегистрировано по меньшей мере 50 видов млекопитающих, инфицированных H5N1, в некоторых случаях с массовой смертностью; что свидетельствует о мутациях и адаптации к заражению млекопитающих [204]. В настоящее время случаи инфицирования людей вирусами птичьего гриппа остаются редкими, а передача возбудителя от человека к человеку не зарегистрирована; вместе с тем сохраняется эпидемиологический риск, обусловленный возможным появлением новых вариантов вируса с пандемическим потенциалом [68].

1.1.3 Вирус гриппа

Вирусы гриппа относятся к семейству *Orthomyxoviridae*, включающему в себя несколько монотипных родов, среди которых только вирусы гриппа типов А (*Alphainfluenzavirus*) и В (*Betainfluenzavirus*) являются причиной массовых сезонных заболеваний человека и животных. Вирус гриппа типа А — наиболее эффективный возбудитель острых респираторных вирусных заболеваний в связи с высокой изменчивостью, представляющий собой этиологический фактор для спорадических и массовых случаев возникновения соответствующих заболеваний [170].

Строение вирионов, классификация, изменчивость и носители вируса гриппа. Вирион (инфекционная частица) гриппа имеет чаще всего шарообразную или, реже, нитевидную форму, причем диаметр шаровидных вирусных частиц достигает 80–120 нм [31, 196], а длина нитевидных вирионов составляет приблизительно 300 нм [78]. Капсид вируса гриппа окружен структурированным внешним слоем (оболочкой), представляющим собой липидную мембрану с заякоренными в ней гликопротеинами (гемагглютинин и нейраминидаза) и белком — ионным каналом М2. Под липидной оболочкой вируса располагается обеспечивающая стабильность и жесткость вириона белковая оболочка,

сформированная матричным белком М1. Заякоренный в липидной оболочке гемагглютинин — ключевой белок, обеспечивающий инфицирование клетки. В частности, он обеспечивает прикрепление вируса к клеточной поверхности и слияние вирусной оболочки с мембраной клетки-хозяина [78]. Нейраминидаза — фермент, катализирующий расщепление остатков сиаловой кислоты на поверхности клетки-хозяина и вирусных гликопротеинов. Сиаловая кислота является рецептором для гемагглютинина вируса гриппа. При репродукции вируса, расщепление сиаловой кислоты нейраминидазой обеспечивает не только отделение новообразовавшихся вирусных частиц от клетки-хозяина, но и предотвращение слипания новых вирионов между собой [31, 148]. Белок М2 представляет собой гомотетрамерный белок, формирующий протонные каналы, необходимые для проникновения вирусного генетического материала в цитоплазму клетки-хозяина посредством закисления внутренней части вириона с последующим высвобождением рибонуклеопротеинового комплекса для его транспортировки к ядру инфицируемой клетки [203]. Нуклеокапсид (нуклеиновые кислоты генома и белковая оболочка вируса) представляет собой рибонуклеопротеиновый комплекс, включающий вирусную РНК (8 одноцепочечных сегментов, кодирующих основные вирусные белки), и 4 вирусных белка (NP, PB1, PB2 и PA). Генетический материал вируса гриппа представлен отдельными сегментами, каждый сегмент реплицируется независимо, что обеспечивает вариабельность вирусов с образованием новых гибридных вирусов-реассортантов при одновременном инфицировании клетки двумя различными вирусами гриппа [31].

PB1, PB2 и PA — белки полимеразного комплекса вируса гриппа, обеспечивающие репликацию и транскрипцию вирусного генетического материала в ядре клетки-хозяина. Субъединица PB1, несущая каталитический центр РНК-зависимой РНК-полимеразы и домены, обеспечивающие взаимодействие с субъединицами PB2 и PA при самосборке, представляет собой ключевой элемент РНК-полимеразного комплекса.

NS-белки вируса гриппа (NS1 и NEP/NS2) кодируются восьмым сегментом генома и выполняют регуляторные функции на различных этапах репликационного

цикла. Неструктурный белок NS1 одним из ключевых факторов подавления врождённого иммунного ответа, подавляя индукцию интерферонов I типа и экспрессию противовирусных генов клетки-хозяина. Он участвует в процессинге и экспорте клеточных мРНК, регулирует активность вирусной РНК-полимеразы и экспрессию вирусных генов, оказывает влияние на сигнальные системы клетки [48]. Белок NEP (NS2) участвует в ядерном экспорте рибонуклеопротеиновых комплексов вируса и обеспечивает эффективную сборку и выход вирусных частиц (Рисунок 1).

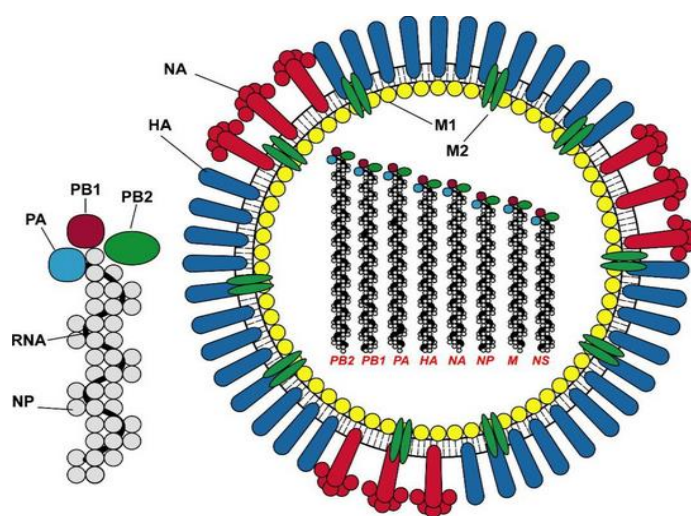


Рисунок 1 — Схематичное изображение вириона вируса гриппа [231]

РНК-полимеразный комплекс вируса гриппа — перспективная мишень для разработки новых противовирусных препаратов вследствие высокой степени консервативности его первичной структуры [235]. В связи с этим создание соединений, способных препятствовать функционированию или взаимодействию друг с другом функционально значимых доменов вирус-специфических белков, например, потенциальных ингибиторов РНК-полимеразы вирусов гриппа А — одно из направлений разработки противогриппозных препаратов [100].

Вирусы гриппа типа А классифицируют согласно подтипам поверхностных белков (гликопротеинов) гемагглютини́на (HA) и нейраминидазы (NA). В настоящее время, описаны 18 антигенных вариантов гемагглютини́на (HA) и 11 антигенных вариантов нейраминидазы (NA) вирусов гриппа А [239].

У водоплавающих птиц, являющихся естественным резервуаром вируса гриппа А, описаны 16 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы. При заражении они реплицируются в кишечном тракте птицы и распространяются преимущественно фекально-оральным путем через воду. Ишь вирусы подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 вызывали пандемии среди людей [268].

1.1.4 Грипп: диагностика, клиническая картина

Грипп — острое респираторное вирусное заболевание, вызываемое вирусом гриппа и характеризующееся преимущественным поражением верхних дыхательных путей. Грипп у человека в виде частого сезонного острого респираторного заболевания сопровождается временной утратой трудоспособности и развитием осложнений, обуславливая значительные социально-экономические потери во всём мире.

Клиническая картина. Вирус гриппа реплицируется в эпителиальных клетках слизистой оболочки респираторного тракта носителя, поражая преимущественно верхние дыхательные пути и бронхи, реже — лёгкие. Среди других острых респираторных вирусных инфекций грипп выделяется коротким инкубационным периодом, выраженной сезонностью, массовым характером вспышек и возможным тяжёлым течением, которое у лиц из групп риска может приводить к летальному исходу [43, 140].

Клинические симптомы гриппа на 1–4-е сутки включают быстрое повышение температуры тела, возникновение слабости, насморка, головокружений, головной боли, горле, мышцах, суставах. На 3–4-й день от начала проявления симптомов больной гриппом наиболее заразен. Выздоровление при неосложнённом течении гриппа обычно наступает через 7–10 дней [11]. Противовирусную терапию назначают сразу после появления первых симптомов, не ожидая подтверждения диагноза лабораторными тестами [11].

Экспресс-диагностику проводят методом иммунохроматографического анализа мазков из носоглотки на вирус гриппа А и В. Вирусные антигены выявляют методом иммуноферментного анализа. Выделение жизнеспособного вируса из носоглоточных смывов проводят в культуре клеток MDCK или в развивающихся куриных эмбрионах с последующей идентификацией вируса в реакции торможения гемагглютинации, а для выявления специфических антител в сыворотке крови используют реакцию нейтрализации. РНК вируса гриппа выявляют методом полимеразной цепной реакции [11, 31, 98].

Наиболее частым осложнением гриппа является пневмония, развивающаяся на 3–4-е сутки заболевания [31, 219]. Кроме того, выделяют респираторные (бронхит, отит), сердечно-сосудистые (перикардит, миокардит, сердечная недостаточность), почечные (нефрит), неврологические (энцефаломиелит, вирусный энцефалит) и другие осложнения [112, 141, 218]. В большинстве случаев вирус гриппа не обладает достаточной вирулентностью для реализации летального исхода, однако при неблагоприятном течении заболевание может приводить к смерти. К группам повышенного риска относятся беременные женщины, новорожденные дети, пожилые и лица с хроническими заболеваниями и иммунодефицитными состояниями [219].

1.1.5 Бактериальные осложнения после гриппозной инфекции

Вирусные инфекции верхних дыхательных путей часто сопровождаются бактериальными осложнениями, причем вторичные бактериальные пневмонии — основная причина смертельных исходов при гриппе [206]. Пневмония — острое заболевание, характеризующееся лихорадкой, синдромом интоксикации, очаговым поражением лёгких с внутриальвеолярной экссудацией и рентгенологически подтверждаемыми инфильтративными изменениями [165].

Клинические и исторические данные свидетельствуют о способности вирусов гриппа вступать в синергическое взаимодействие с рядом бактериальных

патогенов, что обуславливает повышенную восприимчивость организма хозяина к развитию вторичной бактериальной инфекции, протекающей с различной степенью тяжести в зависимости сроков присоединения бактериальной инфекции относительно периода течения гриппа у пациента [241]. Случаи смешанных вирусно-бактериальных инфекций и постгриппозных бактериальных пневмоний особенно часто регистрируются в период гриппозных пандемий [187], когда у значительной части населения отсутствует специфический иммунитет к новому штамму вируса гриппа.

Основными возбудителями бактериальной пневмонии, возникшей после заражения гриппом, являются микроорганизмы *Streptococcus pneumoniae* (род стрептококков) и *Staphylococcus aureus* (род стафилококков), которые представляют собой факультативно-анаэробные грамположительные бактерии. Оба вида бактерий служат причиной заболевания пневмонией, вызывают поражения дыхательных путей, включая некротические формы пневмонии, причем *Streptococcus pneumoniae* представляет собой основной патоген при внебольничной пневмонии, а *Staphylococcus aureus* чаще ассоциирован с тяжёлыми постгриппозными и внутрибольничными пневмониями. *Streptococcus pneumoniae* является возбудителем не только бактериальной пневмонии, но и других опасных для жизни заболеваний таких, как отит, синусит, менингит, а *Staphylococcus aureus* может приводить к кожным инфекциям, остеомиелиту, эндокардиту, сепсису. В течение нескольких десятилетий был зафиксирован рост общей резистентности к антибиотикам, что делает необходимым разработку новых препаратов и терапевтических подходов для лечения пациентов со вторичной бактериальной пневмонией, развившейся после заражения гриппом.

1.1.6 История исследования вторичной бактериальной пневмонии

Одно из первых предположений о способности вирусных инфекций провоцировать развитие бактериальных заболеваний выдвинул французский врач

Р. Т. Х. Лаэннек в 1803 г., а в 1918 г. события пандемии «испанского гриппа» подтвердили данное предположение [206].

В частности, анализ аутопсийных материалов показал, что более 90% образцов лёгочной ткани умерших в период пандемии 1918 г. содержали признаки бактериальной инфекции [86, 187, 188], причем основным возбудителем пневмонии оказался *Streptococcus pneumoniae* (у 44% умерших он обнаруживался в легких, а у 33% в крови) [80, 143]. При исследовании аутопсийных образцов лёгких обнаруживались другие микроорганизмы — *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* и представители рода *Streptococcus* spp. [79, 188].

Анализ аутопсийных материалов Азиатской пандемии 1957 г. выявил признаки бактериальной инфекции в 80% тяжёлых и летальных случаев [127, 186, 210]. По результатам анализа биологических материалов 148 пациентов, погибших во время Азиатской пандемии, бактериальная пневмония являлась причиной 75% летальных исходов, ассоциированных с гриппом, причем при этом *S. aureus* выявлялся в качестве возбудителя в 59% случаев, а *S. pneumoniae* — в 15% [127].

Одним из основных осложнений Гонконгской пандемии гриппа 1968–1969 гг. стала стафилококковая пневмония. Так, среди 129 взрослых пациентов с диагнозом пандемического гриппа пневмония была выявлена в 16% случаев, причём летальность среди них составила около 40% (6% от общего числа заболевших) [128]. При аутопсийном исследовании у 75% умерших были выявлены *S. aureus* или *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.7 Распространенность вторичной бактериальной инфекции в последние десятилетия

В США вторичные бактериальные инфекции, вызванные *Streptococcus pneumoniae* (45%), *Staphylococcus aureus* (32%), *Streptococcus pyogenes* (27%) и *Streptococcus mitis* (9%) наиболее часто сопровождали гриппозные инфекции и являлись причинами летальных исходов (14–46% случаев) во время пандемии

A(H1N1)pdm09 [70, 117, 168, 237]. В исследовании CDC, посвящённом анализу смертности среди молодых пациентов (медианный возраст — 31 год), вторичная бактериальная инфекция была выявлена у 29% умерших; среди них 45% случаев были ассоциированы с *S. pneumoniae* и 33% — с *S. aureus*. У пожилых бактериальная коинфекция — важный фактор заболеваемости и смертности при тяжёлом течении гриппа не только во время пандемий гриппа [80, 117, 186], но и в периоды сезонной циркуляции вируса в межпандемические годы [192].

В масштабном исследовании, проведённом в Испании и включавшем 2901 пациента отделений интенсивной терапии с тяжёлой формой гриппа, бактериальная коинфекция была выявлена у 16,6% больных; при этом её частота увеличилась с 11% в 2009 г. до 23% в 2015 г. [136]. Наличие коинфекции ассоциировалось с более длительным пребыванием пациентов в отделении интенсивной терапии и более высокой внутрибольничной смертностью. Наиболее часто выявляемыми микроорганизмами являлись *Streptococcus pneumoniae*, представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, метициллин-чувствительный и метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, а также *Haemophilus influenzae* [226].

Streptococcus pneumoniae исторически является наиболее частым этиологическим агентом внебольничной пневмонии, бактериального менингита, среднего отита и сепсиса [118, 237]. Пневмококки относятся к микроорганизмам-комменсалам и колонизируют носоглотку у 20–50% здоровых детей и у 8–30% здоровых взрослых [53, 237]. *S. pneumoniae* является наиболее часто выявляемым бактериальным возбудителем у госпитализированных детей с первичной или вторичной внебольничной пневмонией, на его долю приходится 44% всех эпизодов и 54% случаев коинфекции с вирусными патогенами [113].

В 2000 г. около 14 млн случаев острых инфекций нижних дыхательных путей у детей младше 5 лет были ассоциированы с *Streptococcus pneumoniae*, что соответствует 8,6% из примерно 160 млн случаев клинической пневмонии у детей [81]. Вторичная бактериальная пневмония при гриппе особенно часто развивается у пациентов в критическом состоянии, при этом *S. pneumoniae* остаётся наиболее

распространённым бактериальным патогеном, а с течением времени отмечается рост частоты потенциально антибиотикорезистентных штаммов [172].

В отношении *S. pneumoniae* разработаны два типа вакцин [156], однако метаанализы их эффективности свидетельствуют о низкой способности пневмококковых полисахаридных вакцин предотвращать развитие бактериальных пневмоний у взрослых [109], причём эффективность этих вакцин особенно снижается на фоне гриппозной инфекции [166]. Дополнительной проблемой является рост частоты выявления антибиотикорезистентных штаммов *S. pneumoniae* [217, 224].

Staphylococcus aureus является вторым по значимости бактериальным возбудителем постгриппозной опасной для жизни пневмонии [97, 139, 225, 233]. Если *S. pneumoniae* чаще выявляется у пациентов молодого и среднего возраста (до 20–30%), то вероятность развития стафилококковой пневмонии возрастает у лиц пожилого возраста [36]. У детей с осложнённой пневмонией, *S. aureus* является одним из наиболее частых бактериальных возбудителей, ассоциированных с вирусом гриппа А. Коинфекция сопровождается увеличением частоты госпитализации в отделение интенсивной терапии, необходимостью искусственной вентиляции лёгких, удлинением сроков госпитализации и повышением летальности [142].

Разработка вакцины против *S. aureus* до настоящего времени остаётся нерешённой задачей [235]. Результаты III фазы клинических испытаний вакцинного кандидата V710 (Merck), применявшегося для профилактики стафилококковой инфекции в предоперационный период, выявили повышение смертности среди вакцинированных по сравнению с группой плацебо, что вызвало опасения в отношении безопасности данного подхода [188]. В связи с этим, ограничение первичной гриппозной инфекции и снижение вирусной нагрузки остаются ключевыми стратегиями профилактики вторичных стафилококковых осложнений.

Таким образом, исторические и эпидемиологические данные свидетельствуют о ключевой роли *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus*

aureus в развитии вторичных бактериальных осложнений гриппозной инфекции. Анализ пандемий XX века показывает, что *S. pneumoniae* являлся ведущим этиологическим агентом вторичной бактериальной пневмонии в период пандемии 1918 г., тогда как в более поздних пандемиях 1957 и 1968 гг. доминирующее значение приобрёл *S. aureus*. Изменение основного бактериального патогена, вероятно, было вызвано не только изменчивостью вирусов и особенностями их взаимодействия с иммунной системой, но и увеличением применения антибиотиков.

1.1.8 Патогенез вторичной бактериальной инфекции

Чувствительность к вторичной бактериальной инфекции зависит от нескольких факторов: вирулентности вируса гриппа, состава респираторной микробиоты и особенностей иммунной системы хозяина. Существенную роль в развитии тяжелых бактериальных осложнений играют сопутствующие хронические заболевания, нарушающие регуляцию врожденного иммунного ответа.

Клинико-патологические данные свидетельствуют о том, что индуцированные вирусом гриппа нарушения респираторного эпителия способствуют развитию бактериальной инфекции в верхних и нижних дыхательных путях. Повреждение защитного эпителиального слоя приводит к обнажению компонентов внеклеточного матрикса и элементов базальной мембраны, к которым могут прикрепляться бактерии. Вирус-индуцированные изменения в евстахиевой трубе и легочной ткани усугубляют риск бактериальной суперинфекции, а повышение доступности и проницаемости рецепторов обеспечивает бактериям доступ к обычно стерильным участкам дыхательных путей [177].

Поражая слизистую оболочку респираторного тракта, вирус гриппа:

- подавляет двигательную активность мерцательного эпителия и нарушает клиренс мукоцилиарного аппарата;
- угнетает функцию макрофагов и Т-лимфоцитов;
- снижает хемотаксис нейтрофилов и ингибирует фагоцитарную активность по уничтожению бактерий;
- нейраминидаза вируса гриппа, модифицируя гликопротеины поверхности клеток, может способствовать созданию новых мест для адгезии бактерий [10].

Процессы обструкции мелких дыхательных путей, спровоцированные разрушением сурфактанта и сопровождающиеся увеличением продукции муцинозного секрета в сочетании с фибрином, воспалительным инфильтратом и отёчной жидкостью, создают благоприятную среду для роста бактерий [249]. Функциональная и диффузионная способность легких снижается, а функция ресничек нарушается как вследствие уменьшения частоты их биения, так и из-за потери координации движений [163]. В результате нарушаются важнейшие функции лёгких, включая клиренс бактерий, а также развивается гиперактивность дыхательных путей, что способствует бактериальной колонизации и при наличии предрасполагающих факторов — развитию хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ), хронического бронхита и пневмонии [132].

Механизмы проникновения *Streptococcus pneumoniae* в нижние дыхательные пути остаются недостаточно изученными. Однако установлено, что для эффективной адгезии пневмококка к эпителию необходимы индуцированные вирусом изменения, приводящие к обнажению или активации специфических рецепторов. Помимо адгезинов, используемых бактерией для связывания с этими рецепторами, пневмококк экспрессирует ряд факторов вирулентности, способствующих колонизации и инвазии [174, 177]. Рецепторы могут модифицироваться под действием вирусных или бактериальных ферментов, в том числе нуклеаз и нейраминидаз, отщепляющих терминальные остатки сиаловой кислоты с поверхности клеток. Кроме того, фибрин и фибриноген, откладывающиеся в ходе репаративных процессов после вирусной инфекции, могут служить дополнительными сайтами бактериальной адгезии.

Изменение иммунного ответа за счёт снижения способности организма хозяина элиминировать пневмококк, либо вследствие чрезмерной активации воспалительного каскада, является ещё одним ключевым фактором развития вторичной бактериальной инфекции [177].

Небольшое количество условно-патогенных бактерий, включая *S. pneumoniae* и *S. aureus*, может обнаруживаться в составе микробиоты верхних дыхательных путей человека в отсутствие заболевания [255]. Увеличение доли патогенных штаммов в составе респираторной микробиоты может происходить при ОРВИ в результате нарушения механизмов антибактериальной защиты. Таким образом, вторичные бактериальные инфекции дыхательных путей провоцируются резидентными бактериями [76, 255, 264].

Результаты экспериментов на животных и данные клинических наблюдений свидетельствуют о том, что колонизация дыхательных путей патогенными штаммами бактерий чаще всего провоцируется именно вирусными инфекциями. Так, при последовательном заражении мышей сначала бактериями, а затем вирусом гриппа не происходило развития вторичной бактериальной пневмонии, а при изменении порядка внесения инфекций развивалась тяжелая пневмония с летальным исходом [152].

В настоящее время, данные об эффективности противовирусных препаратов в отношении бактериальных осложнений после гриппа ограничены, поскольку пациенты из групп риска, наиболее подверженные развитию вторичных инфекций, как правило, исключаются из клинических исследований. В связи с этим особую значимость приобретает получение экспериментальных данных.

1.2 Противогриппозные вакцины

Профилактика и лечение гриппозной инфекции рассматриваются как важнейшие стратегии снижения частоты вторичных осложнений гриппа, прежде всего бактериальных пневмоний. В качестве основной меры борьбы с гриппозной

инфекцией ВОЗ рекомендует вакцинацию. Одним из ключевых показателей эффективности вакцинопрофилактики является снижение частоты развития пневмоний и других осложнений после перенесённой гриппозной инфекции.

Противогриппозные вакцины — это медицинские препараты, стимулирующие выработку специфического иммунитета к вирусу гриппа. Вакцинопрофилактика гриппозной инфекции считается наиболее эффективным способом предотвращения заболевания гриппом и развития связанных с ним осложнений.

Вакцины против гриппа разделяют на живые (ЖГВ) и инактивированные. ЖГВ содержат живой ослабленный вирус и вводятся интраназально. ЖГВ характеризуются высокой иммуногенностью, однако, в ряде случаев проявляют повышенную реактогенность, в связи с чем их применение ограничено и их применение не рекомендуется для вакцинации детей младше 3 лет. ЖГВ отличается способ введения, приближенный к естественным путям проникновения вируса, что способствует формированию местного иммунитета за счёт продукции секреторных иммуноглобулинов класса IgA.

Разработка живых гриппозных вакцин в СССР началась в 40-е годы XX века, когда советским вирусологом А.А. Смородинцевым впервые был предложен метод аттенуации вируса гриппа путём многократного пассирования вируса в куриных эмбрионах. В 1960-х годах был предложен другой метод аттенуации вируса гриппа — пассирование при пониженных температурах инкубации, что сделало ЖГВ более безопасными, так как вирусы, адаптированные к пониженной температуре, размножаются преимущественно в верхних дыхательных путях, а не в легких. Ключевым этапом стало создание холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [1]. В 1977 г. Г. И. Александровой была получена ЖГВ путем реассортации дикого вируса с охарактеризованным лабораторным штаммом — донором аттенуации [2].

Клинические испытания вакцинного штамма А/17/Калифорния/66/395 (H2N2) проводимые в 2013–2014 гг., показали его безвредность и хорошую

переносимость, а суммарная иммуногенность штамма A/17/Калифорния/66/395 (H2N2) составила 93% [123].

В России живая интраназальная аллантоисная гриппозная вакцина «Ультравак» производится на основе живых аттенуированных вирусов гриппа типов А и В с 1982 года в лиофилизированной форме. Случаев анафилактических реакций после вакцинации этим препаратом зарегистрировано не было, также показана ее низкая реактогенность [30].

В США одной из наиболее известных ЖГВ являлась вакцина Flumist, производимая компанией MedImmune. Она представляла собой назальный спрей и была впервые лицензирована в США в 2003 году в виде трехвалентной вакцины, а затем в 2012 г. в виде четырехвалентной живой аттенуированной вакцины FluMist Quadrivalent. В сезонах гриппа 2016–2017 и 2017–2018 годов Консультативный комитет по практике иммунизации (ACIP) не рекомендовал использование указанной вакцины, связав это с возможной низкой эффективностью, однако позже, в сезоне 2018–2019 FluMist Quadrivalent снова была рекомендована для вакцинации [262].

К инаktivированным вакцинам относятся цельновиреионные, расщеплённые (сплит-вакцины) и субъединичные. В основе цельновиреионных вакцин находятся инаktivированные высокоочищенные, неразрушенные вирионы вируса гриппа. Сплит-вакцины (например, «Ваксигрип», «Бегривак», «Флюарикс», из отечественных — «Ультрикс» и «ФлюМ») представляют собой разрушенные инаktivированные вирионы и содержат как поверхностные, так и внутренние вирионные белки вируса гриппа.

Субъединичные вакцины (например, «Инфлювак») содержат только два основных поверхностных антигена вируса гриппа — гемагглютинин и нейраминидазу. В России применяют полимер-субъединичные («Гриппол», «Совигрипп»), содержащие иммунологические адъюванты — вещества, усиливающие иммунный ответ на введение антигена. Виросомальные вакцины (например, «Инфлексал V») представляют собой инаktivированные вакцины, созданные на основе субъединичных или сплит-вакцин, в состав которых

включены вирусные липиды и мембранные белки, формирующие виросомы — структуры, имитирующие вирион.

Вакцинопрофилактика — основной метод профилактики гриппа [207], который рекомендован в предэпидемический период людям из групп высокого риска развития осложнений, включая детей дошкольного возраста, пожилых, а также пациентов с хроническими заболеваниями, и группам лиц с повышенным риском инфицирования (медицинские работники, школьники, военнослужащие и др.).

К настоящему моменту показано, что вакцинация против гриппа уменьшает риск развития бактериальных осложнений после ОРВИ. В частности, происходило уменьшение тяжести вторичной бактериальной инфекции и количества случаев летального исхода после иммунизации инаktivированной или живой гриппозными вакцинами на мышинной модели [94, 135].

Исследования среди военнослужащих армии США показали, что вакцинация против гриппа снижала риск стрептококковой инфекции, ассоциированной с *S. pyogenes*, а защитный эффект иммунизации составлял 50–77% [144].

Метаанализ исследований, выполненных в 1967–2011 гг., показал, что вакцины против гриппа обеспечивают умеренную защиту от вирусологически подтверждённого гриппа, однако их эффективность существенно варьирует между сезонами. Эффективность трёхвалентных инаktivированных вакцин была подтверждена в 8 из 12 сезонов в 10 рандомизированных контролируемых исследованиях у взрослых в возрасте 18–65 лет. Живые аттенуированные вакцины оказались эффективными в 9 из 12 сезонов у детей в возрасте от 6 месяцев до 7 лет. Эффективность вакцин против сезонного гриппа в целом оставалась вариабельной, а в ряде сезонов значимой защиты не наблюдалось: 6 (35%) из 17 анализов в 9 исследованиях показали значительную защиту от гриппа, в амбулаторных или стационарных условиях. Эффективность моновалентной вакцины против пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 в пяти обсервационных исследованиях составила в среднем 69% (диапазон 60–93%). Риск заболевания пневмонией и,

предположительно, смертность у пожилых людей после вакцинации против гриппа были снижены [146, 195, 250].

Основным ограничением эффективности противогриппозных вакцин является необходимость выбора вакцинных штаммов за 6–8 месяцев до начала эпидемического сезона, что создаёт риск несоответствия вакцинного штамма циркулирующему вирусу вследствие антигенного дрейфа. Несмотря на более чем 50-летний опыт ВОЗ в прогнозировании доминирующих штаммов, в ряде сезонов наблюдалось существенное расхождение между вакцинным и эпидемическим вирусом. Так, в сезоне 1997–1998 гг. рекомендованный штамм A/Wuhan/359/1995 (H3N2) был заменён производителями в США на A/Nanchang/933/1995 (H3N2), однако доминирующим оказался антигенно дрейфовавший вирус A/Sydney/5/1997 (H3N2), что привело к инфицированию вакцинированных лиц [243]. Аналогичная ситуация наблюдалась в сезоне 2003–2004 гг., когда при рекомендованном штамме A/Panama/2007/1999 (H3N2) доминировал вирус A/Fujian/411/2002 (H3N2) [262]. В настоящее время разработка новых противогриппозных вакцин продолжается, а ВОЗ ежегодно координирует обновление их состава с целью максимального соответствия ожидаемым циркулирующим штаммам вируса.

Для вакцинации в эпидемическом сезоне 2024–2025 гг. в Российской Федерации были рекомендованы инактивированные гриппозные вакцины: четырёхвалентные (Гриппол® Квадривалент, Ультрикс® Квадри, Флю-М® Тетра) и трёхвалентные (Флю-М, Совигрипп, Гриппол® плюс). Для данных вакцин в многочисленных исследованиях была показана высокая эффективность и безопасность. Отмечено, что вакцинация обеспечивает клинически значимую защиту даже в условиях частичного антигенного несоответствия циркулирующих штаммов вируса гриппа вакцинным компонентам [11].

Иммунизация при помощи вакцины, специфичной к циркулирующему в настоящий момент вирусному штамму, является наиболее предпочтительным способом снижения частоты вторичных осложнений гриппа [94, 135, 263]. Однако, результаты метаанализа клинических исследований, охватывающего 47

эпидемических сезонов, указывают на неполную защиту инактивированными противогриппозными вакцинами взрослых (54–73%) даже при антигенном соответствии вакцинного штамма циркулирующему вирусу, а при антигенном несоответствии вакцины уровень защиты понижается [93].

Одним из перспективных направлений вакцинации является использование вирусоподобных частиц (VLPs; англ. virus-like particles) в качестве платформы для разработки противогриппозных вакцин. Вакцины на основе VLPs против гриппа могут производиться в растительных клетках, в бактериальных клетках, клетках млекопитающих [138], или клетках Vero [171]; а также с использованием рекомбинантных бакуловирусных (rBV) систем экспрессии [96]. Особый интерес представляют VLPs, получаемые в клетках насекомых с помощью бакуловирусной системы экспрессии, поскольку данная система позволяет формировать частицы с заданным составом вирусных белков и различными типами их презентации [125, 150].

Вирусоподобные частицы представляют собой молекулярные комплексы, структурно сходные с вирусами, но не обладающие способностью инфицировать вследствие отсутствия вирусного генома. VLPs могут синтезироваться путем экспрессии отдельных структурных белков вируса, которые в процессе самосборки образуют вирусоподобную структуру. Совместная экспрессия нескольких белков вируса гриппа в одной клетке приводит к формированию VLPs, имитирующих организацию и конформацию нативных вирионов, но лишенных генетического материала [266].

Исследования на животных моделях (мыши, хорьки) показали, что иммунизация VLPs усиливает выработку нейтрализующих антител, способствует активации дендритных клеток и индукции врожденного и адаптивного иммунного ответа, что приводит к повышению выживаемости животных [265].

Компания Novavax (США) провела три клинических исследования, направленных на оценку безопасности и иммуногенности вакцины на основе VLPs пандемических штаммов гриппа А H1N1, H5N1 и сезонного гриппа [100]. Опубликованные в 2011 году результаты клинических испытаний фазы II вакцины

против пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 на основе VLPs, свидетельствуют о достаточной переносимости и индуцировании выраженного иммунного ответа с уровнем серопротекции 82–92% у вакцинированных [222]. Ранее, в 2010 году, Novavax представила окончательные результаты клинических испытаний трехвалентной сезонной вакцины на основе VLPs (A(H1N1)pdm09 — A/Brisbane/59/2007, A(H3N2) — A/Brisbane/10/2007, B/Florida/04/2006), проведенных как среди пожилых людей (≥ 60 лет), так и среди здоровых взрослых (18–49 лет). Было показано, что вакцина является безопасной и иммуногенной в обеих возрастных группах. Кроме того, клинические исследования VLPs вакцин против вируса гриппа птиц A(H5N1) продемонстрировали формирование высоких титров нейтрализующих антител и антител, определяемых в реакции ингибирования гемагглютинации [124].

В 2018 году Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний США представил план разработки универсальной вакцины против гриппа, которая могла бы обеспечить 75% защиты от гриппа, сохраняющейся более года, и быть подходящей для всех возрастных групп, однако до сих пор ни одна из вакцин-кандидатов не достигла этих целей. Один из подходов предполагает, что включение большего количества нейраминидазы в вакцины может улучшить их эффективность [260]. Другой подход — это иммунологический импринтинг; влияние предыдущих воздействий, инфекций или вакцинаций на иммунный ответ на новые воздействия. Оптимизация импринтинга в раннем детстве, например, путем вакцинации младенцев культуральной вакциной, могла бы улучшить иммунитет в долгосрочной перспективе [159]. В настоящее время фармкомпании Moderna и Sanofi Pasteur разрабатывают мРНК-вакцины против гриппа [223]. Предварительные данные свидетельствуют о том, что эти вакцины могут стимулировать более сильный клеточный ответ, но они обеспечивают относительно схожий уровень клинической защиты с другими улучшенными вакцинами против гриппа, однако с повышенной реактогенностью, что ограничивает их потенциальную ценность. Дальнейшее улучшение мРНК-вакцин против гриппа может включать в себя выявление составов с пониженной

реактогенностью или включение дополнительных вирусных антигенов, таких как нейраминидаза, для повышения иммуногенности и защиты. Изучаются стратегии добавления множества штаммов в мРНК-вакцину с целью обеспечения более широкой защиты от потенциальных будущих штаммов. Также были протестированы несколько вирусных векторных вакцин против гриппа, например, вакцина VXA-A1.1 в настоящее время находится на II фазе клинических испытаний [111]. Одним из подходов к универсальной вакцинации против гриппа была стимуляция антител против консервативных участков гемагглютинаина. Этого можно достичь путем вакцинации химерными штаммами сезонных вирусов гриппа, в которых иммунодоминантная головная область гемагглютинаина заменена нечеловеческим гемагглютинином, в то время как стебель гемагглютинаина сохраняется. Такой подход усиливает выработку антител к консервативному участку вируса [197].

Вакцинные подходы, ориентированные на консервативные вирусные компоненты, такие как нуклеопротеин, могут обеспечить более широкую и длительную защиту. В отличие от поверхностных белков, подверженных мутациям и быстрой изменчивости, на которые нацелены большинство современных вакцин, нуклеопротеин и другие внутренние вирусные белки высококонсервативны в разных штаммах вируса. Это означает, что вакцины, нацеленные на нуклеопротеин, потенциально могут обеспечить перекрестную защиту от нескольких штаммов, включая те, которые могут быть недостаточно охвачены существующими вакцинами [161]. Защита, обеспечиваемая такими вакцинами, вероятно, в значительной степени опосредована клеточным иммунным ответом, в частности, активацией Т-клеток CD4 и CD8. Следовательно, от этих вакцин не следует ожидать предотвращения первичной инфекции, но они могут изменить течение заболевания, ограничивая репликацию вируса и уменьшая воздействие инфекции. Сосредоточение внимания на консервативных вирусных компонентах, таких как нуклеопротеин, также может обеспечить большую устойчивость к вирусным мутациям и появлению новых вариантов, а также обеспечить более широкую защиту [161].

Повышение эффективности существующих противогриппозных вакцин возможно за счёт сочетания нескольких подходов, включая применение новых адъювантов, увеличение дозы антигена и использование клеточных технологий производства.

Несмотря на то, что создание полностью универсальной вакцины в ближайшие годы маловероятно, поэтапное улучшение существующих вакцинных стратегий и разработка новых может существенно снизить заболеваемость, смертность и частоту госпитализаций, связанных с гриппом [95].

1.3 Препараты, применяемые при лечении гриппа

В дополнение к вакцинации ВОЗ рекомендует применение противогриппозных препаратов. Одним из дополнительных показателей эффективности противовирусной терапии является снижение частоты развития пневмоний и других осложнений после перенесённой гриппозной инфекции.

Препараты, используемые для лечения гриппа, делят на следующие классы:

- этиотропные противовирусные препараты (химиопрепараты);
- интерфероны и индукторы интерферонов, оказывающие опосредованное комбинированное противовирусное и иммуномодулирующее действие;
- симптоматические средства.

Противовирусные препараты могут оказаться единственным доступным средством защиты от гриппа, когда эффективность вакцины снижена или она недоступна. В условиях пандемии или масштабной вспышки заболевания, как это наблюдалось во время пандемии гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009 году, временные ограничения на производство вакцин приводят к тому, что их массовая доступность становится возможной лишь через 4–6 месяцев после появления нового штамма [58]. В подобных условиях противогриппозные препараты приобретают особое значение.

Однако эффективность противовирусной терапии гриппа ограничена рядом факторов, например, необходимостью применения на ранних стадиях заболевания и появлением устойчивых штаммов. При назначении противовирусных препаратов на ранних стадиях заболевания у амбулаторных пациентов наблюдалось уменьшение симптоматических проявлений и частоты возникновения осложнений [126]. Противовирусная терапия заболеваний, вызванных вирусами сезонного гриппа A(H1N1)pdm09 и высокопатогенного птичьего гриппа A(H5N1), у госпитализированных пациентов, сокращала число летальных исходов [64, 130, 257].

1.3.1 Этиотропные препараты

Химиотерапевтические препараты прямого противовирусного назначения нарушают определённые этапы репродукции вирусов. В зависимости от механизма действия их делят на следующие группы:

- ингибиторы функции M2-белка (амантадин, римантадин);
- ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир, занамивир);
- ингибиторы фузии (умифеновир);
- ингибиторы вирусной полимеразы (балоксавир).

Ингибиторы функции M2-белка. Препараты ряда адамантанов (амантадин и римантадин) применяются для лечения гриппа А более 50 лет, однако при терапии римантадином все чаще формируются варианты вируса гриппа А со сниженной или отсутствующей чувствительностью к препарату, а частота выделения резистентных штаммов может достигать 20–40 % [216]. С 2009 года вирусы гриппа, выделяемые от больных, не чувствительны к амантадинам. Адамантаны в настоящее время не рекомендованы ВОЗ и CDC (Центрами по контролю и профилактике заболеваний, США) для профилактики и лечения гриппа в связи с широким распространением устойчивости вирусов сезонного гриппа А [268]. Кроме того, адамантаны не обладают активностью в отношении вирусов гриппа В [62].

Начиная с 2005 года, число случаев резистентности экспоненциально возросло, и с 2005 по 2006 год почти 90,6% штаммов H3N2 и 15,6% штаммов H1N1 были адамантан-устойчивыми [244].

Протонный канал, формируемый M2 белком вируса гриппа А является мишенью для противовирусных препаратов амантадина и римантадина, которые связываются непосредственно с порой канала. Устойчивость к адамантану обусловлена мутацией в гене S31N, кодирующем M2 белок вируса гриппа А, которая обнаруживается более чем в 95% циркулирующих в настоящее время штаммов [238].

Высокопатогенные вирусы гриппа А/H5N1, выделенные у пациентов, заболевших в 1997 г. во время эпидемии в Гонконге, были чувствительны к римантадину, тогда как штаммы, полученные в 2003 г. от пациентов из стран Юго-Восточной Азии, оказались резистентными к данному препарату.

Ингибиторы нейраминидазы. Ингибиторы нейраминидазы в настоящее время — наиболее эффективный и широко применяемый класс противогриппозных препаратов.

Ингибиторы нейраминидазы являются специфическими противовирусными препаратами, которые подавляют активность нейраминидазы вирусов гриппа А и В, связываясь с ее активным центром. Основная роль NA заключается в отщеплении терминальных остатков сиаловой кислоты с поверхности инфицированных клеток, способствующих высвобождению вновь образованных вирионов [60]. Таким образом, ингибиторы нейраминидазы препятствуют выходу вирусных частиц из инфицированных клеток и ограничивают распространение инфекции в ткани хозяина.

Для достижения терапевтического результата пациенту необходимо принимать препараты данной группы на ранней стадии заболевания (первые 48 часов после появления симптомов), что ограничивает их применение в клинической практике [102]. Таким образом, узкое терапевтическое окно и принадлежность препаратов к одному фармакологическому классу существенно ограничивают их клиническое применение [268].

Из четырёх ингибиторов нейраминидазы (осельтамивир, занамивир, перамивир и ланамивир), разработанных к настоящему времени, с сезона гриппа 1999–2000 гг. во всём мире широко применяются два препарата: осельтамивир для перорального применения и ингаляционный занамивир. Осельтамивир является наиболее распространённым ингибитором нейраминидазы и эффективен в отношении вирусов гриппа А, устойчивых к адамантанам [122].

Появление штаммов вируса гриппа, устойчивых к ингибиторам нейраминидазы, представляет угрозу эффективности противовирусной терапии. Аминокислотные замены в структуре нейраминидазы, ассоциированные с лекарственной устойчивостью, снижают аффинность связывания фермента с ингибитором и позволяют вирусу уклоняться от действия препаратов [122].

Устойчивость к осельтамивиру, обусловленная мутацией H274Y в гене NA у вирусов гриппа, относящихся к подтипам H1N1 или H5N1 может возникать как под давлением терапии, так и естественным путём, но на данный момент остается невысокой. У вирусов гриппа, относящихся к подтипу A/H3N2, устойчивость вызывают мутации R292K и E119V. До 2007 г. частота резистентности к осельтамивиру составляла около 0,3% у взрослых и 4% у детей [99]. В сезонах гриппа 2007–2009 гг. была зарегистрирована распространённость устойчивых к осельтамивиру штаммов A/Brisbane/59/2007(H1N1), несущих мутацию H274Y в гене NA. Однако прямой связи между развитием резистентности и применением осельтамивира выявлено не было. После первой волны пандемии 2009 г. и исчезновения штамма A/Brisbane/59/2007(H1N1) уровень устойчивости среди вариантов H1N1pdm09 оставался низким, около 1% [202, 214]. Совокупные данные исследований указывают на частоту резистентности 0,32% у взрослых и 4,1% у детей [66].

По данным ВОЗ, в сезоне 2025–2026 г. из 4 458 вирусов гриппа А(H3N2), исследованных генетическим и/или фенотипическим анализом, два вируса показали признаки сниженной чувствительности к ингибиторам нейраминидазы, оба имели замену NA E119V [211].

Согласно рекомендациям ВОЗ, применение ингибиторов нейраминидазы, перамивира или занамивира, а также увеличенных доз осельтамивира — является основой лечения грипп-ассоциированной пневмонии [107, 110, 131, 133, 269]. Лечение осельтамивиром, как в лабораторных исследованиях с использованием животных моделей [175], так и в клинических исследованиях, демонстрировало эффективность в отношении осложнений и необходимости приема антибиотиков при терапии детей и взрослых [106, 108, 200].

Ингибиторы нейраминидазы уменьшали восприимчивость инфицированных гриппом мышей к вторичной бактериальной пневмонии [175]. Пероральное введение осельтамивира мышам линии BALB/c приводило к снижению вирусной нагрузки в лёгких и повышению выживаемости при инфицировании вирусами гриппа А, относящимися к подтипам H1N1 и H3N2 и вирусом гриппа В.

В клинических исследованиях, терапия осельтамивиром у людей снижала частоту вторичных осложнений и применения антибактериальных препаратов [107]. Ингибиторы нейраминидазы позволяют снизить частоту осложнений со стороны нижних дыхательных путей, госпитализаций и назначения антибиотиков как у лиц младше 65 лет, так и у пожилых пациентов и лиц с хроническими заболеваниями [106]. Снижение частоты бронхитов и уменьшение потребности в назначении антибиотиков было показано как у детей, так и у взрослых [107, 110].

Ингибитор фузии. Одним из приоритетных направлений разработки противовирусных препаратов является ингибирование процесса проникновения вируса гриппа в клетки-мишени. Блокирование данного начального этапа инфекционного процесса потенциально позволяет эффективно предотвратить дальнейшее распространение вируса в организме. К препаратам, ингибирующим слияние вирусной и клеточной мембран, относится, в частности, умифеновир [157].

Умифеновир — широко применяемый в России и Китае противовирусный препарат широкого спектра действия, характеризующийся высоким профилем безопасности и низкой частотой формирования лекарственной устойчивости. Он относится к группе производных индола (гидрохинонов) и ингибирует ранние

стадии вирусной репродукции [27]. Препарат проявляет противовирусную активность в отношении ряда вирусов *in vitro* и *in vivo*.

Умифеновир ингибирует слияние липидной оболочки вируса гриппа с мембранами эндосом, препятствуя освобождению вирусного нуклеокапсида [12, 29, 68].

Вирусоспецифическая мишень умифеновира в цикле репродукции вируса гриппа - поверхностный белок гемагглютинин [83], что было подтверждено исследованиями связывания молекулы умифеновира с гемагглютинином вирусов гриппа подтипов H3N2 и H7N9 [157]. Умифеновир связывается со стеблевым доменом гемагглютинина вируса гриппа, стабилизируя его префузионную конформацию и предотвращая слияние мембраны эндосомы с вирусной оболочкой, что ингибирует проникновение вирусного генома в цитоплазму клетки.

Умифеновир — соединение с индольным ядром, образующим супрамолекулярные комплексы при взаимодействии с ароматическими аминокислотными остатками вирусных гликопротеинов, что препятствует слиянию мембран. Кроме того, препарат может взаимодействовать с липидными компонентами вирусной оболочки, что, вероятно, лежит в основе его противовирусного эффекта [63, 67, 240, 254]. Умифеновир также взаимодействует с фосфолипидами клеточной мембраны [157], влияя на её текучесть и тем самым ингибируя слияние липидных бислоёв мембран [67, 248].

Умифеновир проявляет активность в отношении вирусов гриппа А и В, а также ряда возбудителей острых респираторных вирусных инфекций [75]. Кроме того, он ингибирует репликацию коронавирусов, вируса Коксаки, респираторно-синцитиального вируса, вируса Хантаан, вируса простого герпеса, а также вирусов гепатита В и С [158].

В 2013 году умифеновир был включён ВОЗ в группу противовирусных препаратов прямого действия в международной анатомо-терапевтическо-химической классификации лекарственных средств (АТХ). Включен в рекомендации ВОЗ 2024 года по ведению пациентов с гриппом [91]. Помимо прямого противовирусного эффекта, умифеновир обладает

иммуномодулирующими, интерферон-индуцирующими и антиоксидантными свойствами [153].

Исследования *in vitro* показали, что полумаксимальная ингибирующая концентрация (ИК₅₀) умифеновира составляет 2,5–16 мкг/мл, при этом его ингибирующее действие на репликацию вируса гриппа сопоставимо или превосходит таковое у амантадина, рибавирина и осельтамивира [29, 75]. Умифеновир активен в отношении как амантадин-чувствительных, так и резистентных штаммов вируса гриппа, а также штаммов, устойчивых к осельтамивиру [32].

На модели гриппозной пневмонии мышей, вызванной штаммами вируса гриппа подтипов H1N1, H3N2 и H9N2 применение умифеновира приводило к повышению выживаемости животных и замедлению потери массы тела [25, 153].

Пероральное назначение умифеновира на ранних стадиях гриппа приводит к сокращению продолжительности заболевания и уменьшению выраженности симптомов. В исследовании Киселёва и соавт. показано, что у 23,8% пациентов, получавших умифеновир, полное исчезновение симптомов в течение 60 часов после начала терапии отмечалось в 5,7 раза чаще, чем в группе плацебо [27].

В рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании, опубликованном в 2019 году, включавшем 359 пациентов с гриппом или острыми инфекциями верхних дыхательных путей, было показано, что у пациентов, получавших умифеновир, симптомы заболевания были менее выраженными и более короткими по продолжительности, при сопоставимой частоте побочных эффектов в обеих группах [28].

В рандомизированном двойном слепом исследовании у детей с гриппом и другими ОРВИ, умифеновир приводил к снижению частоты и продолжительности симптомов катаральных симптомов и интоксикации. В группе умифеновира осложнений не регистрировали, тогда как в контрольной группе отмечены случаи септического среднего отита и пневмонии [44].

Умифеновир на протяжении многих лет применяется в России и Китае для профилактики и лечения гриппа, однако штаммы вируса с высокой степенью

лекарственной устойчивости к препарату не были обнаружены. Все изученные штаммы вируса гриппа А, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004–2005 гг., в том числе резистентные к римантадину, были чувствительны к умифеновиру, а в популяции вирусов гриппа В для 43% штаммов чувствительность была ниже, чем для вируса гриппа А [47]. Пандемические штаммы вируса гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2, циркулировавшие в 2008–2009 гг., демонстрировали устойчивость к осельтамивиру и амантадину, но сохраняли чувствительность к умифеновиру [32, 83]. В 2011–2014 годах штаммы вирусов гриппа А и В, в том числе устойчивые к осельтамивиру, а также выделенные во время и после лечения умифеновиром, оказались восприимчивы к умифеновиру [34].

В России умифеновир был включён в перечень включен в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов ЖНВЛС в 2010 году как иммуностимулятор, а в 2011 году переведён в группу противовирусных препаратов. Поскольку умифеновир разработан и производится в Российской Федерации, его выпуск может быть оперативно масштабирован в условиях пандемии, что имеет значение для обеспечения лекарственной безопасности страны.

Результаты многоцентрового неинтервенционного наблюдательного когортного исследования, проведённого в Ленинградской области в эпидемический сезон 2023–2024 гг. и включавшего 1867 амбулаторных пациентов группы высокого риска, продемонстрировали сопоставимое влияние осельтамивира и умифеновира на продолжительность заболевания и частоту бактериальных осложнений при лечении гриппа [65].

Ингибиторы полимераз.

РНК-зависимая РНК-полимераза вирусов гриппа А и В состоит из трёх субъединиц: основного белка полимеразы 1 (PB1), основного белка полимеразы 2 (PB2) и кислого белка полимеразы (PA). Поскольку данный фермент является ключевым элементом репликации вируса гриппа, его рассматривают в качестве перспективной мишени для противовирусной терапии. В настоящее время

разработан ряд ингибиторов полимеразы, нацеленных на каждую из её субъединиц: ингибитор PB1 фавипиравир, ингибитор PB2 пимодивир и ингибитор PA балоксавир [246].

Фавипиравир распознаётся РНК-зависимой РНК-полимеразой как аналог пуринового нуклеозида и встраивается в формирующуюся цепь вирусной РНК в качестве аналога гуанозина и аденозина [247]. Это приводит к прекращению включения гуанозина и аденозина и ингибированию элонгации РНК, осуществляемой субъединицей PB1 [245].

Наиболее перспективным ингибитором полимеразы считается балоксавир марбоксил, связывающийся с доменом эндонуклеазы субъединицы PA и ингибирующий активность кэп-зависимой эндонуклеазы, необходимой для инициации синтеза вирусной мРНК [85]. Балоксавир применяется однократно в течение первых 48 часов после появления симптомов гриппа, что обеспечивает подавление репликации вируса в течение суток и облегчение симптомов через 48 часов.

Балоксавир был одобрен для специфического лечения неосложнённого гриппа у пациентов в США и Японии в 2018 году [246]. Однако в ходе клинических испытаний было показано, что у 2,2% пациентов, получавших балоксавир в исследованиях фазы II, и примерно у 10% участников исследований фазы III происходило формирование устойчивых вариантов вируса гриппа. Развитие резистентности было связано с вариациями в структуре полимеразы, в частности с заменами изолейцина в позиции 38 субъединицы PA (мутации I38T, I38M и I38F) [72].

По данным ВОЗ, в сезоне 2025–2026 г. из 4828 вирусов A(H3N2), исследованных генетическим и/или фенотипическим анализом, девять вирусов показали признаки сниженной чувствительности к балоксавиру: три имели замену PA I38T, три имели замену PA I38I/T, два имели замену PA I38I/M и один имел замену PA E199E/G [211].

1.3.2 Интерфероны, индукторы интерферона, иммуномодуляторы

Одним из направлений терапии и профилактики гриппозной инфекции является применение противовирусных иммуномодулирующих препаратов (интерфероны, индукторы интроферонов), обладающих способностью активировать регуляторные механизмы и иммунную систему организма.

Выделяют два основных пути иммуномодулирующего воздействия препаратов на иммунную систему: специфический — путем вакцинации и активации адаптивного иммунитета, и неспецифический — путем стимуляции врождённого иммунитета [23]. Иммуностимуляторы — это препараты, препятствующие заболеванию организма путём усиления, индукции или восстановления эффекторных функций клеток иммунитета (макрофагов, лимфоцитов, дендритных клеток, NK-клеток), а также в результате сдвига цитокинового баланса в сторону протективных цитокинов [23].

Иммуномодулирующая терапия при помощи интерферонов и их индукторов, как эффективный компонент комплексного лечения гриппа, направлена на смягчение иммунопатологических последствий вирусной инфекции, возникающих при избыточной продукции противовоспалительных цитокинов («цитокиновый шторм») и широко применяется на территории России совместно с этиотропными и симптоматическими средствами.

Интерферон оказывает влияние на процессы синтеза нуклеиновых кислот посредством активации ферментных систем и ингибиторов, блокирующих синтез вирусспецифических белков [15].

Интерферон α (интерферон I типа) — цитокин, который выделяют лейкоциты в ответ на вирусную инфекцию, и который обладает противовирусным, противоопухолевым и иммуномодулирующим действием [272]. Присутствие интерферона α обеспечивало более высокие титры иммуноглобулинов и 100% защиту мышей от заражения вирусом гриппа [259].

Интерферон β представляет собой гликозилированный спиральный цитокин, играющий важную роль в реализации иммунного ответа организма, который также

рассматривают в качестве компонента препарата от вируса гриппа. Введение мышам, зараженным вирусом гриппа, интерферона β привело к усилению выведения вируса и уменьшению легочной эозинофилии в инфицированной легочной ткани [273].

Интерферон- γ представляет собой интерферон II типа и один из основных белковых цитокинов, активирующих клеточный иммунитет (макрофаги, Т-лимфоциты и др.) и способствующих активации неспецифического иммунного ответа, в связи с чем он может быть использован для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ, в том числе в сочетании с интерфероном α [22]. Интерферон- γ , воздействуя на кластер сиаловой кислоты, препятствует репликации вирусных ДНК и РНК, синтезу вирусных белков, сборке новых вирусных частиц [155], и оказывает цитотоксическое действие на инфицированные клетки. Он является провоспалительным цитокином, который продуцируется естественными киллерами (NK-клетками), CD4⁺ Th1-клетками и CD8⁺ цитотоксическими супрессорными клетками.

Интерфероны III типа (λ) представляют собой последний открытый класс интерферонов. Его рецепторы преимущественно обнаруживаются в эпителиальных клетках, что делает его перспективным терапевтическим агентом, применение которого проходит с уменьшенным количеством побочных эффектов [87]. Применение интерферонов III типа на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09 гриппа с последующим заражением *S. aureus* защищало мышей от потери веса, снижало уровень вирусного нуклеопротеина в легочных гомогенатах и бактериальную нагрузку в легких, а также увеличивало выживаемость, уменьшало бактериальную нагрузку в легких и снижало потерю массы тела [115].

Введение модифицированного интерферона λ в виде аденовирусного вектора увеличивает выживаемость при заражении мышей вирусом гриппа, за счет снижения избытка нейтрофилов в легочных тканях, однако одновременно приводит к увеличению бактериальной нагрузки при суперинфекции

гриппа (бактериальной пневмонии), что вынуждает относиться с осторожностью к применению интерферона λ в качестве противогриппозного препарата [154].

Другим классом иммуномодуляторов, используемых для вирусных инфекций, являются индукторы интерферонов, представляющие собой препараты, провоцирующие выработку интерферонов, стимулируя иммунную реакцию в ответ на появление патогенов в организме.

Введение индуктора интерферона в организм стимулирует выработку интерферонов различными клетками иммунной системы (лейкоциты периферической крови, лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы, гранулоциты) через различные временные периоды после приема в зависимости от конкретного индуктора, при этом существуют индукторы, способные к подобной стимуляции лишь в определенном типе клеток. Индукторы интерферонов, применяемые в клинической практике, должны не только обладать специфической активностью, но и не демонстрировать токсичности [14].

Терапия индукторами интерферонов вызывает синтез оптимального количества эндогенных интерферонов по сравнению с терапией интерферонами. Однократное введение индукторов интерферонов приводит к длительной продукции эндогенных интерферонов. В отличие от экзогенных интерферонов, для которых требуется многократное введение высоких доз, применение индукторов интерферонов позволяет поддерживать эффективные концентрации интерферонов в течение продолжительного времени [16]. Индукторы интерферона подразделяются на синтетические (тилорон, меглюмина акридонацетат) и препараты растительного происхождения (кагоцел). Индукторы интерферонов имеют широкий спектр применения в комплексной терапии не только гриппа, но и других заболеваний, таких как ОРВИ, герпетические инфекции, вирусные гепатиты, энцефалиты, бешенство и др. [16].

При введении в организм индукторы интерферонов вызывают многоплановую активацию иммунной системы (стимуляция продуцирования цитотоксических Т-клеток, макрофагов, антителообразующих В-клеток и др.) путем воздействия на процессы дифференцировки и пролиферации клеток [16].

В составе комплексной терапии ОРВИ в настоящее время широко используют интерферон альфа-2b, вводимый интраназально, и индукторы интерферонов, такие как кагоцел, меглюминаакридонатацетат, оксодигидроакридинилацетат натрия, тилорон, и др. [11].

Одним из первых и наиболее изученных индукторов интерферона является синтетический низкомолекулярный акриданон тилорон. Тилорон стимулирует синтез интерферонов в различных типах лейкоцитов, преимущественно в Т-лимфоцитах. Благодаря низкой молекулярной массе индукция интерферона Т-клетками происходит без участия антиген-презентирующих клеток [220]. Тилорон обладает сродством к рецепторам альвеолярных макрофагов и индуцирует продукцию интерферона в лёгочной ткани [14, 33]. Препарат проявляет активность в отношении вирусов гриппа, риновирусов и аденовирусов [14, 33, 40].

Тилорон относится к индукторам позднего интерферона: пик продукции интерферона наблюдается через 18–24 часа после введения и сохраняется до 48 часов [40, 41]. Гипореактивность интерфероновой системы после его применения сохраняется до 4 суток [41].

Экспериментальные исследования влияния тилорона на динамику уровней IFN- α , IFN- γ и IL-1 β в лёгочной ткани и сыворотке крови мышей с гриппозной пневмонией показали, что препарат снижал вирусную нагрузку на 2–3 lg уже после 1–2 введений, усиливал интерфероновый ответ на ранних стадиях инфекции и подавлял избыточную продукцию интерферонов и провоспалительных цитокинов на поздних стадиях заболевания [104].

Применение интерферонов и их индукторов сопровождается рядом побочных эффектов: они способны подавлять клеточную дифференцировку и пролиферацию. Частое использование этих препаратов может индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов, способствуя развитию воспалительных реакций и обострению хронических или аутоиммунных заболеваний. Длительная экзогенная стимуляция иммунной системы также может приводить к нарушению её функционирования при отмене индукторов интерферонов.

Имеющиеся данные указывают на необходимость дальнейшего изучения роли иммуномодулирующей терапии в улучшении клинических исходов при тяжёлых формах гриппа, в том числе в качестве дополнения к этиотропной терапии или в составе комбинированных терапевтических стратегий. Актуальным представляется комплексное изучение иммуномодуляторов, включая индукторы интерферона, в экспериментальных моделях гриппозной инфекции, осложнённой бактериальной суперинфекцией.

1.3.3 Антибактериальные препараты

Антибиотики и антибактериальные химиотерапевтические препараты представляют собой группу антимикробных средств, применяемых для лечения бактериальных инфекций. Это одна из наиболее динамично развивающихся групп лекарственных средств, поскольку в условиях роста антибиотикорезистентности микрофлоры возникает потребность в постоянном расширении их арсенала. Вместе с тем, по данным антиинфекционной химиотерапии, почти в половине случаев антибактериальные препараты применяются необоснованно [36].

По характеру антимикробного действия антибиотики условно подразделяют на бактерицидные, необратимо связывающиеся с клеточными мишенями и вызывающие гибель чувствительных микроорганизмов (пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, рифампицин, полимиксины и др.), и бактериостатические, ингибирующие рост и размножение микробных клеток (макролиды, тетрациклины, линкозамиды, хлорамфеникол и др.). По спектру активности выделяют антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении одной группы микроорганизмов (грамположительных или грамотрицательных), и препараты широкого спектра, воздействующие на большинство клинически значимых бактериальных патогенов.

Согласно «Практическому руководству по антиинфекционной химиотерапии» [36], препаратами выбора при амбулаторном лечении нетяжёлой

внебольничной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, являются цефуроксим, амоксициллин/клавуланат, доксициклин, а также респираторные фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин). При тяжёлом течении пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* и *S. aureus*, включая случаи лечения в стационарах, рекомендованы следующие схемы: амоксициллин/клавуланат или ампициллин/сульбактам в комбинации с макролидом; цефалоспорины III–IV поколения в сочетании с макролидом; цефотаксим или цефтриаксон в комбинации с макролидом либо респираторный фторхинолон. Согласно клиническим рекомендациям «Грипп у взрослых», пациентам при подозрении на развитие вирусно-бактериальной пневмонии рекомендовано проведение терапии антибактериальными препаратами системного действия (ампициллин, амоксициллин+клавулановая кислота или ампициллин+сульбактам, цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтриаксон), альтернативы — фторхинолоны [10]. Данные рекомендации требуют регулярного обновления, поскольку бактерии вырабатывают устойчивость к всё большему числу антибактериальных препаратов. Так, в первые годы клинического применения пенициллина стафилококки и пневмококки были высокочувствительны к нему, однако уже в первые десятилетия клинического применения пенициллина появились сообщения о развитии устойчивости, прежде всего у стафилококков [274].

Существует мнение, что использование антибиотиков при лечении вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции не обеспечивает значительного снижения частоты летальных исходов [178]. Например, β -лактамы антибиотиков, в частности ампициллин, в ряде случаев не улучшают, а иногда даже ухудшают прогноз заболевания. Одним из возможных механизмов является быстрый лизис бактериальных клеток с высвобождением компонентов клеточной стенки, усиливающих воспалительный ответ в лёгочной ткани и, как следствие, тяжесть поражения [149, 178].

На модели вторичной бактериальной пневмонии у мышей, последовательно заражённых вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) и метициллин-резистентными штаммами *S. aureus* или *S. pneumoniae*, было показано, что лечение

комбинированной схемой антибактериальных препаратов (ванкомицин, неомидин, ампициллин, метронидазол), применявшейся для подавления микробиоты, нарушает локальный иммунитет лёгких. У таких животных наблюдалось усиленное привлечение эозинофилов, повышение бактериальной нагрузки в лёгких, а также увеличение уровней IFN- γ , нейтрофилов, макрофагов и эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже по сравнению с контрольной группой [61]. Клинические исследования у людей также показали, что уровень эозинофилов коррелирует с применением антибиотиков, системным воспалением и неблагоприятными исходами у госпитализированных пациентов [61]. Авторы делают вывод, что применение антибиотиков во время гриппозной инфекции может иметь неблагоприятные последствия, снижая бактериальный клиренс и усугубляя повреждение лёгочной ткани при вторичном бактериальном заражении.

Ряд макролидов, в частности кларитромицин, способен снижать репликацию вируса гриппа и уровень провоспалительных цитокинов [88]. На модели гриппозной инфекции мышей, осложнённой вторичной пневмококковой пневмонией, было показано, что предварительное лечение кларитромицином улучшает выживаемость животных, что связывают с модуляцией иммунного ответа, в том числе со снижением продукции IFN- γ [89].

Использование бактериостатических антибиотиков, в частности ингибиторов синтеза белка (линкозамидов, макролидов, тетрациклинов, стрептограминов), а также некоторых бактерицидных препаратов (аминогликозидов, рифамицинов) может быть более предпочтительным при вторичной бактериальной инфекции, поскольку их применение может сопровождаться меньшим высвобождением провоспалительных компонентов бактериальной клетки по сравнению с β -лактамами антибиотиками, что ослабляет повреждающую воспалительную реакцию [71]. В мышинной модели гриппа A(H1N1) с последующей инфекцией *S. pneumoniae* лечение клиндамицином, а также комбинации клиндамицина или азитромицина с ампициллином значительно улучшали выживаемость и снижали выраженность воспаления по сравнению с монотерапией ампициллином [258].

При постгриппозной инфекции, вызванной метициллин-резистентным *S. aureus*, Bhan и соавт. показали, что лечение линезолидом у мышей снижало воспаление и повреждение лёгочной ткани по сравнению с ванкомицином [167]. В аналогичной модели Liu и соавт. отметили лишь умеренное дополнительное положительное влияние линезолида на снижение потери массы тела по сравнению с ванкомицином и клиндамицином, без значимого улучшения других клинических исходов [103].

Таким образом, исследование действия противовирусных и антибактериальных препаратов, а также их комбинированного применения в экспериментальных животных моделях вторичной бактериальной пневмонии, возникающей как осложнение после гриппозной инфекции, может способствовать оптимизации терапевтических подходов.

1.4 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии на животных

Вакцины и противовирусные препараты проходят *in vivo*-тестирование на животных моделях с целью изучения их фармакокинетики, фармакодинамики, токсичности и терапевтической эффективности перед переходом к клиническим испытаниям. В связи с этим выбор адекватной животной модели для оценки эффективности противовирусных средств против гриппа является критически важным, поскольку именно такие модели обеспечивают получение доклинических данных, лежащих в основе принятия решений о дальнейшем клиническом развитии препаратов. Одной из ключевых задач в исследованиях гриппа остаётся выбор модели, максимально воспроизводящей особенности течения заболевания у человека.

Экспериментальному заражению вирусами гриппа поддаются разные виды животных. Наиболее часто используемыми моделями являются хорьки и мыши. Хорьки обладают высокой восприимчивостью к заражению вирусом гриппа и считаются моделью, наиболее точно воспроизводящей грипп у человека. У хорьков

развиваются клинические симптомы, сходные с таковыми у человека, включая поражение верхних дыхательных путей. Кроме того, они могут инфицироваться вирусами гриппа человека (в том числе штаммами с пониженной вирулентностью) без предварительной адаптации и способны эффективно передавать вирус другим особям. Однако использование хорьков ограничено высокой стоимостью животных и их содержания, низкой доступностью, агрессивным поведением, ограниченной вместимостью клеток, а также этическими аспектами [199].

Помимо хорьков, для исследования гриппа применяют хомяков, морских свинок, хлопковых и серых крыс, кур, рыбки данио, свиней, собак, кошек и приматов [73, 173]. Каждая из животных моделей имеет как недостатки, так и преимущества в зависимости от специфики исследования. К примеру, исследования на приматах, чья физиология наиболее приближена к человеческой физиологии, максимально отражают ситуацию заражения вирусом гриппа человека, однако, являются дорогостоящими и осложняются этическими требованиями [160].

Доступность мышей, их низкая стоимость, разнообразие генетических линий и наличие линий с целевыми генетическими дефектами делают мышь наиболее привлекательной и широко используемой моделью для изучения гриппа несмотря на то, что мыши не являются естественными хозяевами вируса гриппа. Некоторые штаммы вируса гриппа были адаптированы к мышам путём серийных пассажей, тогда как отдельные высокопатогенные вирусы птичьего гриппа способны вызывать заболевание и реплицироваться в дыхательных путях и внелёгочных органах мышей без предварительной адаптации [73].

Для изучения патогенеза, репликации вируса, иммунного ответа хозяина, а также действия противовирусных препаратов и вакцин обычно используют молодых взрослых мышей в возрасте 6–8 недель независимо от пола [173]. При заражении вирусами человеческого гриппа у мышей, как правило, не развиваются типичные для человека симптомы, такие как лихорадка и выраженные респираторные проявления (чихание, ринорея, кашель). Клинические признаки гриппозной инфекции у мышей включают сгорбленную позу, пилоэрекцию,

снижение потребления корма, потерю массы тела и летальный исход. В ряде случаев летальность является основным показателем вирулентности вируса, поскольку другие специфические симптомы выражены слабо. Изменение массы тела остаётся наиболее доступным и количественно измеряемым индикатором прогрессирования заболевания [173].

Моделирование на животных вторичной бактериальной пневмонии, развивающейся после гриппозной инфекции, началось сразу после выделения и идентификации вируса гриппа. Впервые вирус гриппа А был выделен из организма свиньи американским учёным Ричардом Шоупом в 1931 году. В серии экспериментальных работ Шоуп показал, что для развития тяжёлого заболевания у животных необходимо совместное введение вируса свиного гриппа А и *Haemophilus influenzae* [228].

Первое исследование вторичной бактериальной пневмонии на мышах, концептуальная схема которого впоследствии многократно воспроизводилась, было проведено Томасом Фрэнсисом и Мерседес В. де Торрегоса в 1945 году [119]. Авторы показали, что пневмония является результатом введения мышам *H. influenzae*, *S. pneumoniae* и *S. aureus* совместно с адаптированным вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). Было обнаружено, что исход заболевания зависит от дозы инфицирующих агентов и интервала между заражением вирусом и бактериями. Предшествующая гриппозная инфекция усиливала тяжесть вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae* или *S. aureus* [134, 256].

В период 1950–2000 годы проводились исследования по выявлению и изучению препаратов, обладающих противогриппозной активностью, с использованием животных моделей. В частности, при помощи мышинной модели были охарактеризованы такие соединения, как адамантан, рибавирин, занамивир и другие, однако на модели вторичной бактериальной пневмонии таких исследований не было проведено.

McCullers и соавт. в 2000 году исследовали результат одновременного и последовательного заражения мышей вирусом A/Puerto Rico/8/34 и *S. pneumoniae* и выявили выраженный летальный синергизм этих патогенов [174].

Синергетический эффект наблюдался только при последовательном заражении, тогда как при одновременном инфицировании действие патогенов не превышало эффект каждого из них по отдельности.

В 2002 году McCullers и соавт. отметили увеличение выживаемости мышей при предварительном введении противовирусных препаратов с последующим заражением бактериальной инфекцией [178].

В 2012 году в США на модели вторичной бактериальной пневмонии аутбредных мышей, вызванной последовательным заражением вирусом A/California/04/2009 (H1N1) и *S. aureus*, были исследованы иммунологические характеристики и выявлена положительная корреляция между уровнями воспалительных цитокинов IL-6, TNF- α , G-CSF и CXCL10 с вирусной нагрузкой, а также между уровнями IL-1 β , G-CSF, TNF- α и IL-6 с бактериальной нагрузкой [54].

В 2023 году мышинная модель вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) и метициллин-резистентными штаммами *S. aureus* или *S. pneumoniae*, была использована для исследования влияния антибиотиков на врожденную иммунную защиту легких. Было обнаружено, что лечение антибиотиками на данной модели приводит к увеличению количества эозинофилов в легких и ингибированию функции макрофагов, что указывает на возможность увеличения риска возникновения вторичной бактериальной пневмонии [61].

В 2025 году была показана эффективность интерферонов III типа на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09 гриппа с последующим заражением *S. aureus* [115].

Следует отметить, что моделирование вторичной бактериальной пневмонии не проводилось на других животных моделях, кроме мышинной, а имеющийся массив данных остаётся ограниченным.

Исходя из изложенного, можно предположить, что изучение противогриппозных вакцин, противовирусных и антибактериальных препаратов в модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* или *S. aureus* после гриппозной инфекции, способно дать новые сведения о патогенезе

заболевания, механизмах развития осложнений и взаимодействии вирусных и бактериальных патогенов. Данная модель представляет собой перспективный инструмент для экспериментального и доклинического изучения существующих и разрабатываемых препаратов, оптимизации схем и доз терапии, а также для обоснования дизайна клинических исследований, что в конечном итоге способствует совершенствованию стратегии лечения гриппа и его бактериальных осложнений.

Заключение

В обзоре литературы представлены результаты исторических и современных исследований в области профилактики и лечения вторичных бактериальных осложнений после гриппа. Среди средств профилактики рассмотрены живые и инактивированные противогриппозные вакцины, а также вакцины на основе вирусоподобных частиц. Средства лечения представлены противовирусными препаратами с различными механизмами действия, индукторами интерферонов, антибактериальными препаратами и их комбинациями. В обзоре также рассмотрены животные модели, применяемые для доклинического тестирования новых противовирусных препаратов, что представляется особенно актуальным в условиях высокой изменчивости вирусов гриппа и сохраняющейся проблемы бактериальных осложнений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Штаммы вируса и бактерий, культуры клеток

В работе использовали штамм вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09, полученный из Национального центра по гриппу ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Штамм адаптировали к мышам путём пяти последовательных пассажей через лёгкие животных; шестой пассаж проводили на 9-дневных куриных эмбрионах (РКЭ). Титр вирусного стока составлял 10^7 ТЦИД/0,1 мл.

Штаммы вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и A/Aichi/2/69, адаптированные к мышам, получены из музея вирусных штаммов и клеточных культур ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского». Титр вирусного стока составлял 10^7 ТЦИД/0,1 мл.

Реассортант NIBRG-121xp (A/California/04/2009(H1N1)pdm09 × A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), геномная формула 2:6), несущий гены НА и NA пандемического штамма и внутренние гены штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), получен из NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, Великобритания). Титр вирусного стока составлял 10^4 ТЦИД/0,1 мл.

Холодоадаптированный вакцинный штамм A/17/California/2009/38 предоставлен ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева». Штамм получен методом классической реассортации пандемического вируса A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с донором аттенуации A/Ленинград/134/17/57 (H2N2). Реассортант содержит гены PB2, PB1, PA, NP, M и NS донора аттенуации и гены НА и NA пандемического штамма. В процессе селекции штамм сохранил аттенуирующие мутации, характерные для донора, и обладает температурочувствительным и холодоадаптированным фенотипом. Лиофилизированный вакцинный штамм восстанавливали добавлением 1 мл

фосфатно-солевого буфера. Титрование проводили на 9-дневных куриных эмбрионах при температуре 32–33 °С в течение 72 часов.

Все штаммы вируса гриппа пассировали и накапливали в РКЭ, а для заражения животных использовали вируссодержащую аллантоисную жидкость. В экспериментах использовали по одному пулу каждого вирусного штамма; аликвоты хранили при температуре –70 °С.

Бактериальные штаммы *Staphylococcus aureus* №1986, №329 и №884 получены из УНУ «Коллекция НИИВС им. И.И. Мечникова» и хранились в лиофилизированном состоянии. Перед заражением культуры высевали на скошенный питательный агар и инкубировали 18 ч при 37 °С. Концентрацию бактерий определяли по стандарту мутности; полученную суспензию использовали для заражения животных в день приготовления.

Штамм *Streptococcus pneumoniae* штамм №3405, серотип 4 получен из той же коллекции и хранился в лиофилизированном состоянии. Перед экспериментом культуру высевали на агар с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением дефибринированной лошадиной крови и инкубировали 18 ч при 37 °С. Бактериальную суспензию готовили с использованием мутномера и применяли в день приготовления.

Для титрования вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK (эпителиальные клетки почки собаки), полученную из коллекции Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи и размноженную из клеточного банка, хранящегося в жидком азоте. Клетки культивировали при 37 °С в питательной среде Игла MEM с двойным набором аминокислот (БиоЛот, Россия) и L-глутамином (БиоЛот, Россия) и с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Cytiva, США). Титрование вируса гриппа в культуре клеток MDCK проводили без сыворотки, с добавлением 2 мкг/мл ТРСК-трипсина (Sigma-Aldrich, США).

Работу с вирусами и бактериальными штаммами проводили в боксах биологической безопасности класса II с использованием одноразовых расходных материалов.

2.2 Препараты, субстанции и их приготовление

Осельтамивир (Тамифлю, Делфарм Милано, капсулы) [42] приобретали в аптеке и растворяли в дистиллированной воде. Субстанцию умифеновира, предоставленную производителем АО «Отисифарм», растворяли в 1% растворе крахмала. Тилорон (Амиксин, АО «Отисифарм Про», таблетки) [3] приобретали в аптеке и растворяли в дистиллированной воде. Цефуроксим (ОАО «Красфарма», порошок для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения) [45] приобретали в аптеке и растворяли в дистиллированной воде. Ципрофлоксацин (Ципринол, КРКА, таблетки) [46] приобретали в аптеке и растворяли в дистиллированной воде. Клиндамицин (Хемофарм, капсулы) [26] приобретали в аптеке и растворяли в дистиллированной воде.

Концентраты субъединиц (КСЕ) вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 получены при производстве инактивированной субъединичной вакцины против вируса гриппа в ФГУП СПбНИИВС ФМБА России.

Препараты вирусоподобных частиц (VLPs) сконструированы, наработаны и охарактеризованы в Департаменте биотехнологии Университета природных ресурсов и прикладных наук (г. Вена, Австрия). Мириам Клаусбергер разработала технологию получения вакцинного препарата VLPs с помощью бакуловирусного вектора, экспрессирующего вирусоподобные частицы при заражении клеток насекомых Тпао42. В качестве источника геномных последовательностей белков вируса гриппа был использован штамм A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). VLPs были образованы комбинацией ретровирусного Gag-белка и гемагглютиниона или нейраминидазы вируса гриппа, происходящих от штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). Препарат HA-VLPs был наработан в виде очищенного от бакуловируса препарата с содержанием антигена HA 1 мкг/мл. Гемагглютинирующий титр VLPs, определенный в реакции гемагглютинации (РГА), составлял 128 ГАЕ в 0,05 мл.

Дозы всех использованных препаратов указаны из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме. Препараты готовились

непосредственно перед проведением эксперимента. Животным вводили препараты в объеме 200 мкл раствора перорально или внутривентрально.

2.3 Экспериментальные животные

Лабораторных мышей линии BALB/c, самок, массой тела 12–14 г, приобретали в филиале «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России и в биопитомнике ООО «СМК СТЕЗАР».

Животных распределяли по экспериментальным группам методом рандомизации с учётом массы тела таким образом, чтобы индивидуальные значения массы находились в пределах $\pm 10\%$ от среднего значения в соответствующей группе. Каждое животное идентифицировали индивидуальным номером с использованием окрашивания фукорцином. Клетки для содержания животных маркировали с указанием названия исследования, номера экспериментальной группы, наименования препарата и его дозы (или концентрации). В ходе эксперимента ветеринарный врач осуществлял ежедневный контроль клинического состояния животных путём визуального осмотра. Животных с выявленными клиническими отклонениями в экспериментальные группы не включали.

Работу с развивающимися куриными эмбрионами (РКЭ) проводили с использованием 9-суточных эмбрионов, полученных в ООО «Майские просторы» (Московская область) и предварительно овоскопированных для отбора жизнеспособных экземпляров. Заражали в асептических условиях через аллантоисную полость; контрольные эмбрионы инокулировали стерильным физиологическим раствором. Инфицированные РКЭ инкубировали при температуре 37 °C в течение 48–72 ч с ежедневным контролем жизнеспособности. По окончании инкубации аллантоисную жидкость асептически отбирали, осветляли центрифугированием при 1000 об./мин в течение 10 мин (центрифуга Thermo Scientific SL 16R, ротор TX-200) и использовали для последующих

пассажей или определения инфекционного титра вируса. Пассирование вируса гриппа в РКЭ проводили серийно, используя полученный вируссодержащий материал для инфицирования следующего поколения эмбрионов с целью накопления вируса и адаптации штамма. Все работы с инфицированными РКЭ выполняли в условиях лаборатории, соответствующей требованиям биологической безопасности, с использованием боксов биологической безопасности класса II и средств индивидуальной защиты. Обращение с инфекционным материалом, утилизацию отходов и дезинфекцию поверхностей осуществляли в соответствии с требованиями СП 1.3.2322–08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [6].

2.4 Содержание животных и этические аспекты эксперимента

Все исследования с вирусом гриппа, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* проводили не менее чем двумя сотрудниками в соответствии с требованиями СП 1.3.2322–08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [6].

Лабораторных мышей содержали в пластиковых клетках размером 35 × 20 × 15 см по 5–10 особей на клетку в соответствии с действующими нормами размещения, со стерилизованной мелкой древесной стружкой в качестве подстила. В помещении содержания животных поддерживали стандартные условия: температура воздуха 20–24 °С, относительная влажность 45–65%, 12-часовой световой режим (12:12), приточно-вытяжная вентиляция без рециркуляции со сменой воздуха 7–12 объёмов помещения в час. Животных кормили брикетированным полнорационным сухим кормом для лабораторных грызунов в соответствии с утверждёнными нормами; поение осуществляли дистиллированной водой, доступ к пище и воде был свободным.

Содержание мышей и проведение манипуляций проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за

лабораторными животными» [7], а также санитарными правилами СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [39]. Эвтаназию животных проводили в соответствии с требованиями ГОСТ 33219–2014 методом передозировки ингаляционного анестетика изофлурана с последующей дислокацией шейных позвонков [7].

Все эксперименты с животными были одобрены Локальным этическим комитетом ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова (протокол № 12/2025 от 10.09.2025).

2.5 Моделирование экспериментальной вторичной пневмонии мышей, вызванной вирусом гриппа с последующим бактериальным заражением

В предварительных опытах определяли сублетальную и летальную дозу аллантоисного вируса гриппа. Мышей инфицировали интраназально под наркозом различными штаммами вируса гриппа А в одном и том же объеме 0,03 мл вирусосодержащей жидкости на каждую мышь, а титры вируса различались в разных опытах. Через 4 дня после заражения вирусом мышей интраназально инфицировали суспензией *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pneumoniae* в объеме 0,03 мл на каждую мышь, а дозы различались в разных опытах. Наблюдения за животными вели ежедневно, вес учитывали один раз в два дня. Тяжесть инфекции оценивали по выживаемости, изменению массы тела и содержанию патогенов в легких. Изменение массы тела рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах, принимая за 100% массу тела животного перед инфицированием, затем для мышей каждой группы определяли среднее значение изменения массы тела. Животные групп вирусного и бактериального контроля были инфицированы дозами вируса или бактерий в соответствии с экспериментами.

2.6 Изучение эффективности противовирусных и антибактериальных препаратов, а также их комбинации, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Мышей интраназально инфицировали вирусом гриппа, а через 4 дня *S. aureus* или *S. pneumoniae*. Лечение противовирусными препаратами умифеновиром и тилороном начинали за 24 часа до инфицирования, осельтамивиром за 4 часа до инфицирования и продолжали в течение 5 дней. Антибактериальные препараты начинали давать через 3 часа после заражения *S. aureus* или *S. pneumoniae* и продолжали в течение 3 дней.

Дозы препаратов рассчитывали в мг/кг массы тела животных в сутки и вводили внутрижелудочно с помощью зонда в объеме 0,2 мл. Животные контрольной группы были инфицированы вирусом гриппа и бактериями и в качестве лечения получали дистиллированную воду внутрижелудочно в том же объеме.

Использовали следующие критерии оценки эффективности препаратов: клинические признаки (повышение выживаемости и уменьшение снижения массы тела); вирусные характеристики (титр вируса в легких); бактериальные характеристики (количество бактерий в легких).

2.7 Изучение эффекта вакцинации холодоадаптированным штаммом на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции

Мышей рандомизированно распределяли на 3 группы. Животные одной группы были иммунизированы холодоадаптированным вакцинным штаммом A/17/California/2009/38 (живая гриппозная вакцина, ЖГВ), а животные другой группы концентратом субъединиц (КСЕ) вируса гриппа

A/California/04/2009(H1N1)pdm09 по 15 мкл в каждую ноздрю в дозе 6 lg ЭИД50/50 мкл. Животные контрольной группы получали 15 мкл в каждую ноздрю стерильного фосфатно-солевого буфера. Через 21 день проводили заражение животных всех групп сублетальной дозой A/California/04/2009(H1N1)pdm09. Бактериальное заражение животных всех групп *Streptococcus pneumoniae* проводили на 5-й день после вирусного инфицирования в дозе $1,25 \times 10^7$ КОЕ/мл по 15 мкл в каждую ноздрю. Манипуляции с животными проводили интраназально под наркозом диэтиловым эфиром. Наблюдение за животными вели в течение 25 дней со дня инфицирования вирусом. Гибель животных фиксировали ежедневно, взвешивание животных проводили один раз в два дня. Изучение эффекта вакцинации на развитие осложнений на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *Streptococcus pneumoniae*, после гриппозной инфекции, оценивали по увеличению выживаемости, динамике изменения массы тела и содержанию патогенов в легких.

2.8 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Препараты HA-VLPs вводили внутривентрально в объеме 0,2 мл, в 0 и 14 день, через 21 день после второй иммунизации у 3 мышей из каждой группы брали пробы крови для определения антигенной активности методами РТГА и ИФА и интраназально инфицировали 0,03 мл вируссодержащей аллантоисной жидкости вируса гриппа А: гомологичного A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) или антигенно отличного (гетерологичного) реассортантом NIBRG-121хр. Через 4 дня после вирусного заражения у 3 животных из каждой группы отбирали легкие для определения инфекционного титра. На 5-й день после вирусного заражения проводили бактериальное инфицирование *S. pneumoniae* или *S. aureus*. На 8 день после вирусного заражения у 3 животных из каждой группы забирали легкие для

определения инфекционного титра вируса и бактериальной обсемененности. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после вирусного заражения, учитывая выживаемость ежедневно и измеряя массу тела один раз в два дня.

2.9 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих нейраминидазу вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Препараты VLPs вводили однократно, внутривентриально в объеме 0,2 мл. Через 21 день животных интраназально инфицировали штаммом вируса гриппа NIBRG-121хр. Через 4 дня после заражения вирусом у 4 животных из каждой группы извлекали легкие для определения инфекционного титра вируса и эффекта вирусной нейраминидазы. На 5 день после вирусного заражения проводили бактериальное инфицирование. На 7 день после вирусного заражения у 5 животных из каждой группы извлекали легкие для определения инфекционного титра вируса и бактериальной обсемененности.

2.10 Получение легких мышей

В день, определенный в соответствии с дизайном эксперимента, в каждой группе гуманно эвтаназируют 3–5 животных, в стерильных условиях извлекают легкие, промывают, гомогенизируют и ресуспендируют их в 1 мл холодного стерильного фосфатно-солевого буфера. Суспензию осветляют от клеточного дебриса центрифугированием при 2000 g в течение 10 мин, затем отбирают 0,2 мл супернатанта для определения содержания бактерий и инфекционного титра вируса.

2.11 Определение инфекционного титра вируса в легких мышей

Определение инфекционного титра штамма A/California/04/2009(H1N1)pdm09 проводили в культуре клеток MDCK, а штаммов A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), NIBRG-121xp (H1N1) и A/Aichi/2/69(H3N2) в РКЭ.

Для определения инфекционного титра вируса культуру клеток MDCK выращивали в 96-луночных плоскодонных планшетах в минимальной среде Игла MEM в течение 24 часов до полного монослоя. Десятикратными последовательными разведениями каждой пробы инфицировали монослой 4-х лунок и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 48–72 часов до появления признаков ЦПД; титрование проводили в 4 параллелях. После появления признаков ЦПД лунки промывали и фиксировали 10% раствором формальдегида, а затем окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового. Лунки промывали, высушивали и растворяли краситель 96% этиловым спиртом, а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм. Лунки считали положительными, если оптическая плотность в них была меньше оптической плотности в клеточном контроле на 20%.

Инфекционный титр вируса вычисляли по 4 повторам каждой пробы методом предельных разведений Рида и Менча [213] и выражали в lg ТЦИД₅₀/мл, после чего рассчитывали среднее значение титра для проб одной группы.

Для определения инфекционного титра вируса в РКЭ готовили десятикратные последовательные разведения гомогената легких мышей и инокулировали 100 мкл каждого разведения в аллантоисную полость 9-дневных РКЭ. Зараженные яйца инкубировали при 37 °C в течение 48 часов, после чего отбирали 50 мкл аллантоисной жидкости, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. По результатам реакции гемагглютинации определяли количество РКЭ, в которых размножился вирус, и рассчитывали ЭИД₅₀.

2.12 Определение количества бактерий в носоглоточных смывах и легких мышей

Количество *Staphylococcus aureus* определяли, высевая десятикратные последовательные разведения гомогенизированных легких на чашки Петри с питательной средой № 10 (для идентификации *Staphylococcus aureus*) (ФГУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии) и инкубируя в течение 18 часов при температуре 37 °С, а затем считая образовавшиеся колонии.

Количество *Streptococcus pneumoniae* определяли, высевая десятикратные последовательные разведения гомогенизированных легких или носоглоточных смывов на чашки Петри с сердечно-мозговым агаром с добавлением (5%) лошадиной дефибринированной крови. После инкубации в течение 18–24 часов при температуре 37 °С в атмосфере 5,5% CO₂ считали образовавшиеся колонии.

Обсемененность лёгочной ткани или носоглоточных смывов рассчитывали, умножая число выросших колоний на степень разведения и коэффициент, обратный объёму посеянного материала.

2.13 Патоморфологические исследования

Через 6 дней после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе извлекали у трех мышей легкие, которые фиксировали формалином 10% забуференным, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, просматривали в световом микроскопе при различных увеличениях (x10, x40, x100).

Для изучения эффекта на NA-индуцированное расщепление сиаловой кислоты методом лектинового окрашивания гистологические срезы переносили на стекла с полилизинным адгезивом (Thermo Scientific Polysine Slides), депарафинизировали, промывали и затем проводили тепловую демаскировку

в 10 mM цитратном буфере с pH 6,0 + 0,05% Tween-20. После промывки срезы инкубировали с 10% козьей сывороткой в течение 1 часа при 37 °C для предотвращения неспецифической реакции, затем после промывки срезы инкубировали с меченым ФИТЦ лектином, в течение 18 часов при температуре +4 °C. Затем срезы промывали и заключали под покровное стекло с применением в качестве покровной среды Fluorescence mounting medium (DAKO). Анализ гистологических препаратов проводился при помощи микроскопа Axioskop A2 plus (Carl Zeiss, Germany). Анализ интенсивности флуоресценции проводили, используя программное обеспечение ImageJ.

2.14 Исследование антигенной активности вирусоподобных частиц

Для оценки антигенной активности HA-VLPs в сыворотках крови определяли титры сывороточных антигемагглютинирующих антител в РТГА с 4 агглютинирующими единицами соответствующего вирусного антигена по стандартной методике [270]. К серийным двукратным разведениям сывороток мышей добавляли антиген штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), а затем 0,5% суспензию куриных эритроцитов и наблюдали за торможением гемагглютинации: отсутствие гемагглютинации свидетельствовало о наличии антител. Титр определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором отмечали полное торможение гемагглютинации. Для контроля использовали сыворотки неиммунизированных животных.

Титры вирусспецифических иммуноглобулинов классов А и G в сыворотках крови определяли иммуноферментным анализом (ИФА). ИФА проводили с использованием набора реагентов «БиоКит-ИФА» (Е-0007, производитель ЗАО БТК «Биосервис») в соответствии с инструкцией производителя.

В качестве антигенов использовали препарат очищенного рекомбинантного белка HA штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), содержащего HA в концентрации 1 мг/мл, сорбированный на 96-луночные планшеты с плоским дном в течение ночи

при 4 °С. После отмывки в планшеты вносили последовательные двукратные разведения сывороток (100 мкл) иммунизированных и неиммунизированных животных. После инкубации при комнатной температуре в течение 2 часов планшеты вновь отмывали. Затем в каждую лунку добавляли 50 мкл антител к иммуноглобулинам мыши, меченых пероксидазой (#A2304, Sigma) в разведении 1:3000. После инкубации (1 час при комнатной температуре) и отмывки планшеты были обработаны 100 мкл субстрата SIGMAFAST™ OPD (Sigma, USA), реакцию останавливали добавлением 25 мкл 3 М H₂SO₄. Оптическая плотность измеряли при 490 нм на иммунохимическом анализаторе Tecan Infinite M1000 microplate reader. Титр антител определяли как последнее разведение, в котором оптическая плотность образца сыворотки иммунизированной мыши соответствовала следующему условию:

$$ОП_{ср.образца} \geq ОП_{ср. K-} + 3 \sigma, \quad (1)$$

где $ОП_{ср.образца}$ — среднее арифметическое значение для исследуемых образцов одной группы;

$ОП_{ср.K-}$ — среднее арифметическое значение для образцов неиммунизированных мышей в том же разведении.

Далее рассчитывали средний арифметический титр для животных одной группы.

Наличие антител к нейраминидазе определяли двумя методами: с использованием низкомолекулярного субстрата MUNANA [232] и методом иммуноферментного лектин-связанного анализ (ELLA) с использованием высокомолекулярного субстрата фетуина.

Для анализа ингибирования нейраминидазы с использованием низкомолекулярного субстрата MUNANA в планшеты для измерения флуоресценции к двукратным последовательным разведениям сывороток крови (0,05 мл) добавляли двукратные разведения препарата NA–VLPs (0,05 мл), а через 45 мин субстрат (0,1 мл). Через 1 час реакцию останавливали и учитывали

результат на многофункциональном иммунохимическом анализаторе Varioskan Flash (Thermo Scientific) при длинах волн 360 и 448 нм. Измерения проводили в четырех повторах (четыре лунки планшета) и считали среднее значение.

Титр антител определяли как последнее разведение, в котором оптическая плотность образца сыворотки иммунизированной мыши соответствовала следующему условию:

$$ОП_{ср.образца} \geq ОП_{ср. K-} + 3 \sigma, \quad (2)$$

где $ОП_{ср.образца}$ — среднее арифметическое значение для исследуемых образцов одной группы;

$ОП_{ср.K-}$ — среднее арифметическое значение для образцов неиммунизированных мышей в том же разведении.

Вторым методом, используемым для определения антител к НА, был иммуноферментный лектин-связанный анализ (ELLA) с использованием высокомолекулярного субстрата фетуина, сорбированного (150 мкл, 50 мкг/мл в 0,1М карбонатном/бикарбонатном буфере pH = 9,5–9,7) на 96-луночном планшете при +4 °C в течение ночи. К двукратным разведениям сывороток добавляли рабочее разведение вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (128 гемагглютинирующих единиц), очищенного ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте сахарозы, и после инкубации при 37 °C в течение 30 мин. пробы переносили на планшеты, покрытые фетуином. После инкубации при 37 °C в течение 2 часов в лунки вносили по 100 мкл меченого пероксидазой лектина арахиса в концентрации 2,5 мкг/мл. Проявление пероксидазной реакции проводилось с добавлением 100 мкл ТМВ субстрата. После остановки ферментативной реакции 1Н серной кислотой результаты считывали на спектрофотометре при $\lambda = 450$ нм. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали фосфатно-солевой буфер (ФСБ), на котором проводились все разведения и рабочее разведение вируса соответственно. Остаточную ферментативную активность НА в присутствии анти-НА антител рассчитывали по формуле:

$$\text{Активность} = \frac{\text{ОПобразца} - \text{ОПфсб}}{(\text{ОПВК} - \text{ОПфсб})} \times 100\%, \quad (3)$$

где ОП_{вк} — среднее значение оптической плотности в лунках вирусного контроля;

ОП_{фсб} — среднее значение оптической плотности в лунках отрицательного контроля (ФСБ);

ОП_{образца} — значение оптической плотности исследуемого образца.

2.15 Статистическая обработка данных

Значения количественных переменных представлены как средняя (М) ± стандартное отклонение (SD) или в виде медианы с верхним и нижним квартилем. Значения качественных переменных представлены в виде процента (%).

Количественные данные перед статистическим анализом оценивали на нормальность распределения с применением критерия Шапиро–Уилка. В связи с малым объёмом выборок и отсутствием нормального распределения для межгруппового сравнения количественных показателей, представленных в виде среднего значения со стандартным отклонением (количество бактерий в гомогенате легких), использовали непараметрические критерии Манна–Уитни (для двух групп) или Краскела–Уоллиса (для трех и более групп). При выявлении статистически значимых различий в случае множественных сравнений выполняли апостериорный множественный анализ по Данну с поправкой Бонферрони.

Расчет титра вируса в легких проводили методом предельных серийных разведений Рида и Менча [213] и выражали в lg ТЦИД₅₀/мл. Различие титров считали биологически значимым при различии ≥ 2 lg ТЦИД₅₀/мл [38].

Анализ выживаемости проводили методом Каплан–Мейера, с построением кривых выживаемости для каждой экспериментальной группы. В качестве события

учитывали гибель животного; время наблюдения выражали в сутках от момента инфицирования. Сравнение кривых выживаемости между группами осуществляли с использованием лог-рангового критерия (Mantel–Cox) с использованием онлайн-калькулятора <https://astatsa.com/LogRankTest>.

Статистическую обработку морфометрических данных проводили в программе «Statistica 8.0» после проверки нормальности. Распределение вариационных рядов оценивали методом Колмогорова–Смирнова. Анализ характера распределения вариационных рядов методом Колмогорова–Смирнова показал необходимость применения непараметрических методов. Количественные данные представлены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха (25-й и 75-й процентиля). Различия между независимыми группами оценивали с помощью критерия Краскела–Уоллиса. При выявлении статистически значимых различий выполняли множественные попарные сравнения средних рангов (пост-хок тест Данна). Построение графиков проводили в программе MS Office Excel 2016.

Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Схемы экспериментов были подготовлены с использованием платформы для научных иллюстраций BioRender [74].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии мышей, развивающейся после гриппозной инфекции

Вторичные бактериальные пневмонии — основная причина смертельных исходов после гриппа [206]. Исследования посмертных образцов легких людей, умерших в 2009 году от пандемийного гриппа H1N1 показали, что у 29% были бактериальные осложнения, 32% из которых были вызваны *S. aureus*, а 45% были представлены *Streptococcus pneumoniae* [114]. *S. aureus* и *S. pneumoniae* — бактерии, относящиеся к группе условно-патогенных микроорганизмов, естественных обитателей организма животного или человека, вызывающих заболевания при резком снижении общего или местного иммунитета. При инфицировании вирусом гриппа происходит повреждение эпителия дыхательных путей, что делает его уязвимым для бактериального заражения. Поэтому в качестве бактериальных агентов для моделирования вторичной бактериальной пневмонии у мышей нами были выбраны *S. aureus*, и *S. pneumoniae*.

3.1.1 Изучение патогенности штаммов вируса гриппа А в отношении мышей

Перед разработкой экспериментальной модели была исследована восприимчивость мышей линии BALB/с к инфицированию различными штаммами вируса гриппа, относящимися к двум подтипам, H1N1 и H3N2. Этот этап был необходим, поскольку мыши не являются естественными хозяевами вирусов гриппа и в природных условиях не участвуют в их циркуляции. В связи с этим требовалось оценить способность используемых вирусных штаммов вызывать продуктивную инфекцию у животных и определить наиболее подходящие варианты для дальнейших исследований.

Исследуемые штаммы подтипа H1N1:

- A/California/04/2009(H1N1)pdm09 — пандемический, исходный;
- A/California/04/2009(H1N1)pdm09 — пандемический, адаптированный к мышам;
- A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) — лабораторный штамм, адаптированный к мышам;
- реассортант — NIBRG-121xp (H1N1) (A/California/04/2009(H1N1)pdm09 X A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (2:6) (PA), содержащий поверхностные белки HA и NA от A/California/04/2009(H1N1)pdm09, а внутренние белки от A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1).

Штамм подтипа H3N2: A/Aichi /2/69 (H3N2), адаптированный к мышам.

Адаптацию вируса гриппа к мышам — процесс, при котором вирус приобретает способность эффективно размножаться в организме — проводили путем последовательного пассирования вируса через лёгкие мышей.

Для каждого вируса определяли летальную дозу (МЛД₅₀), выраженную в ТЦИД₅₀. Мышей заражали различными штаммами, а через 4 дня после инфицирования отбирали легкие для определения титра вируса. Снижение массы тела фиксировали в течение 14 дней после заражения (Таблица 1).

Таблица 1 — Выживаемость, титр вируса в легких (среднее значение $\pm$ SD) и изменение массы тела при заражении различными штаммами вируса гриппа А мышей

Штаммы вируса гриппа	Доза заражения, ТЦИД ₅₀	Выживаемость, %	Изменение массы тела, %	Титр вируса в легких, lg ТЦИД ₅₀ /мл
A/California/04/2009(H1N1)pdm09 исходный	10 ⁷	100	–8	не выявлено
A/California/04/2009(H1N1)pdm09 адаптированный	10 ^{1,5}	0	–23	6,5 $\pm$ 0,5 (6; 7; 6,5)
A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)	10 ^{1,5}	0	–22	6,3 $\pm$ 0,8 (6,5; 5,5; 7,0)
NIBRG-121xp (H1N1)	10 ^{2,5}	90	–10	5,0 $\pm$ 0,5 (5,5; 4,5; 5,0)
A/Aichi /2/69 (H3N2)	10 ^{2,5}	0	–25	5,3 $\pm$ 0,6 (6; 5; 5)

Проведенные исследования показали, что инфицирование эталонными вирусами A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и A/Aichi/2/69 (H3N2) приводило к потере массы тела на 22–25% и активной репродукции вируса в легких животных. Инфицирование реассортантом также приводило к потере массы тела животных и размножению вируса в легких.

Пандемический исходный штамм A/California/04/2009(H1N1)pdm09 без адаптации к мышам не вызывал гибели животных, что сопровождалось отсутствием выявления вируса в легких при титровании. После адаптации путем 5 последовательных пассажей через легкие мышей был получен патогенный вариант A/California/04/2009(H1N1)pdm09, адаптированный к мышам, вызывающий потерю массы тела на 23% и репродукцию вируса в легких.

Таким образом, для дальнейшего моделирования были отобраны адаптированные штаммы вируса гриппа: A/California/04/2009(H1N1)pdm09, A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), NIBRG-121xp (H1N1) и A/Aichi/2/69(H3N2), которые не различались по летальной активности у мышей (Таблица 1), но представляли разные подтипы вируса гриппа или различались по биологическим свойствам в пределах одного подтипа.

3.1.2 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с пандемическим штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09

Моделирование вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции было начато с использованием штамма гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09, вызвавшего пандемию 2009 года, ввиду его высокой клинической значимости и доказанной роли в развитии тяжелых вирусно-бактериальных осложнений. Кроме того, пандемический штамм A(H1N1)pdm09 обладал способностью эффективно инфицировать мышей и вызывать развитие гриппозной пневмонии, что делает его удобным объектом для начала моделирования бактериальных осложнений [134, 256].

На первом этапе разработки модели мы исследовали влияние последовательности заражения при использовании сублетальной дозы (0,5 МЛД₅₀) адаптированного пандемического штамма вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 в комбинации со *S. aureus* 1986 или *S. pneumoniae* на развитие вторичной пневмонии.

Одну группу мышей инфицировали A/California/04/2009(H1N1)pdm09, а через 4 дня *S. aureus* 1986 или *S. pneumoniae*, другую группу, наоборот, сначала *S. aureus* 1986 или *S. pneumoniae*, а через 4 дня A/California/04/2009(H1N1)pdm09. Животных контрольных групп, инфицировали только A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus* 1986 или *S. pneumoniae*.

В группах мышей, зараженных вирусом или *S. aureus* отдельно, все животные остались живы в течение всего эксперимента, а гибель в группе мышей, инфицированных *S. pneumoniae*, составила 10%. В группе, в которой бактериальное заражение предшествовало вирусному, выжило 80–90% животных. 0–10% выживаемости отмечали в группе, зараженной *S. aureus* или *S. pneumoniae* после A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (Таблица 2, Рисунки 2–3). Титр вируса и содержание бактерий в легких также были выше при последовательном бактериальном заражении после вирусного.

Таблица 2 — Выживаемость, титр вируса и содержание бактерий в легких мышей (среднее значение $\pm$ SD) при различной последовательности заражения A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus* 1986 или *S. pneumoniae*

Группы	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgKOE/мл
	Жив/общ	%		
A/California/04/2009(H1N1)pdm09	10/10	100	1,6 $\pm$ 0,2 (1,5; 1,8; 1,6)	не выявлено
<i>S. aureus</i> 1986	10/10	100	не выявлено	0,7 $\pm$ 0,1 (0,8; 0,7; 0,7)
A/California/04/2009(H1N1)pdm09 + <i>S. aureus</i>	1/10	10	4,8 $\pm$ 0,4 (5,0; 4,4; 5,1)	3,5 $\pm$ 0,5 (4; 3,5; 3)
<i>S. aureus</i> + A/California/04/2009(H1N1)pdm09	9/10	90	2 $\pm$ 0,5 (1,5; 2; 2,5)	0,9 $\pm$ 0,1 (0,9; 0,9; 1)
<i>S. pneumoniae</i>	9/10	90	не выявлено	1,7 $\pm$ 0,3 (1,5; 2; 1,5)
A/California/04/2009(H1N1)pdm09 + <i>S. pneumoniae</i>	0/10	0	4,3 $\pm$ 1 (4; 3,5; 5,5)	8,2 $\pm$ 0,3 (8,6; 8,5; 8,3)

Продолжение таблицы 2

Группы	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgКОЕ/мл
	Жив/общ	%		
<i>S. pneumoniae</i> + A/California/04/2009(H1N1)pdm09	8/10	80	1,8±0,3 (1,5; 2; 2)	1,9±0,4 (1,5; 2; 2,2)

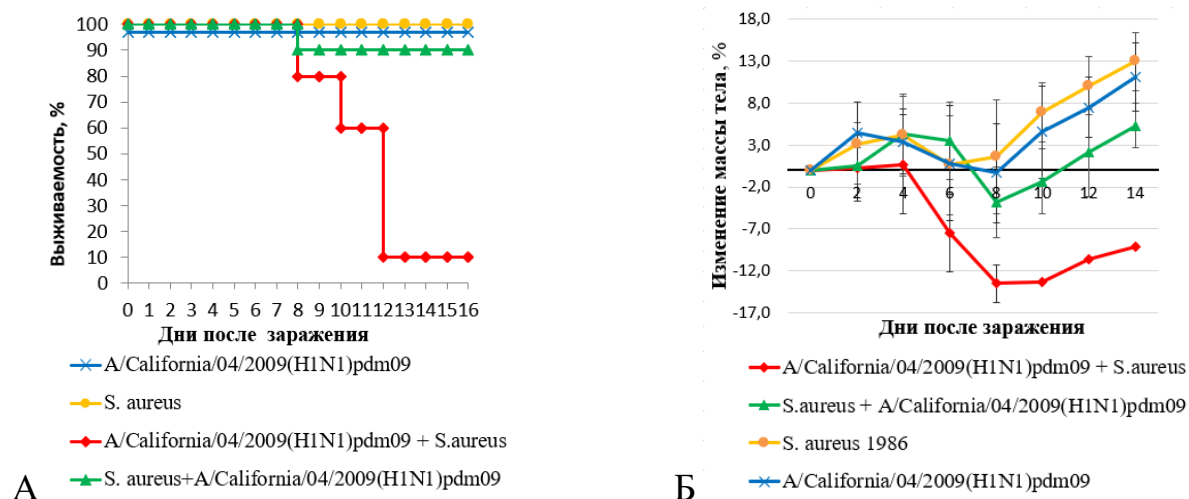


Рисунок 2 — Выживаемость (А) и изменение массы (Б) тела мышей при различной последовательности заражения A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus* 1986

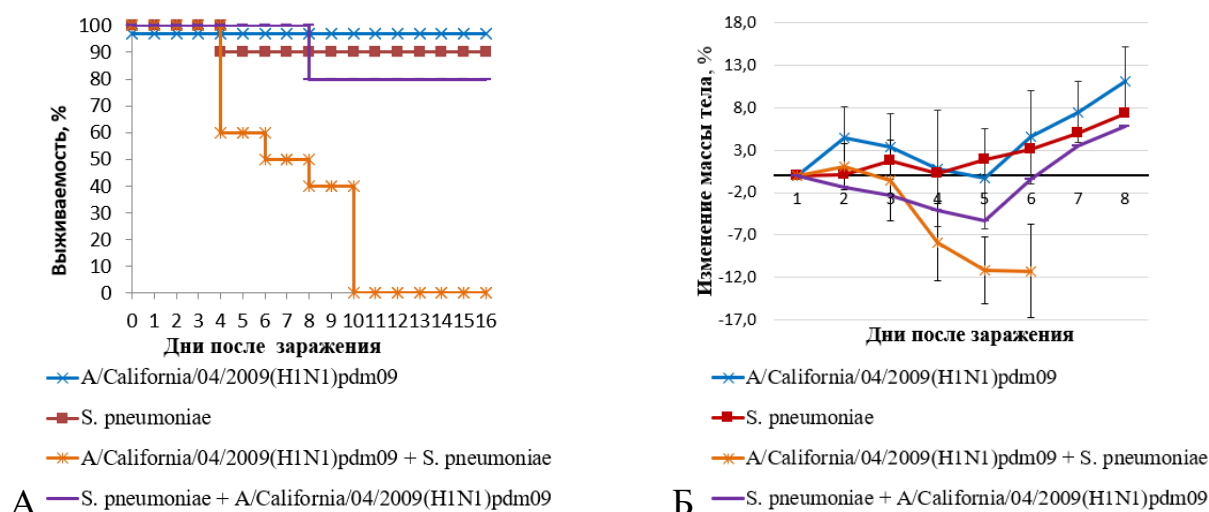


Рисунок 3 — Выживаемость (А) и изменение массы тела мышей (среднее значение ± SD) (Б) при различной последовательности заражения A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. pneumoniae*

Таким образом, установлено, что вторичная бактериальная пневмония развивалась только при последовательном заражении животных, когда бактериальная инфекция следовала за вирусной. При обратной последовательности инфицирования развитие пневмонии не наблюдалось, что указывает на ключевую роль вируса гриппа в патогенезе вторичной бактериальной пневмонии. Последовательное заражение сопровождалось выраженным вирусно-бактериальным синергизмом, проявлявшимся снижением выживаемости животных, более значительной потерей массы тела и увеличением содержания вируса и бактерий в лёгких по сравнению с соответствующими показателями у животных, инфицированных только одним из патогенов.

3.1.3 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с различными штаммами *S. aureus*

После подтверждения восприимчивости мышей к последовательному заражению штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus* 1986 представлялось целесообразным оценить и другие штаммы вируса гриппа и *S. aureus* и выбрать оптимальные комбинации, поскольку их биологические свойства могут существенно различаться. Сравнительное изучение нескольких штаммов позволяло определить, насколько особенности вируса влияют на формирование вторичной бактериальной пневмонии, и выбрать наиболее подходящий вариант для дальнейшего моделирования бактериальных осложнений после гриппа.

На данном этапе мы моделировали вторичную бактериальную пневмонию, используя три штамма *S. aureus*: вакцинный *S. aureus* 1986, а также *S. aureus* 884 и *S. aureus* 329 и три штамма вируса гриппа А: A/California/04/2009(H1N1)pdm09, A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), реассортант NIBRG-121xp (H1N1).

Заражение живыми культурами *S. aureus* проводили в одинаковых дозах 2×10^9 КОЕ/мл, а для вируса гриппа использовали сублетальные заражающие дозы

(0,5 МЛД₅₀). В группах мышей, зараженных вирусом или бактериями отдельно, все животные остались живы в течение всего эксперимента (Таблица 3). Гибель отмечали только в группах, зараженных штаммами *S. aureus* после инфицирования всеми штаммами вируса гриппа, за исключением вакцинного штамма *S. aureus* №1986, вызывающего гибель животных только при заражении A/California/04/2009(H1N1)pdm09.

Гибель всех мышей и наибольшее снижение массы тела наблюдали в группе, инфицированной A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) с последующим заражением *S. aureus* № 884, а при индуцировании бактериальной пневмонии штаммом *S. aureus* № 329 выживаемость была выше. При заражении реассортантом NIBRG-121хр с последующим инфицированием *S. aureus* № 329 или *S. aureus* № 884 наибольшая смертность (80%) наблюдалась при заражении штаммом *S. aureus* № 884, а при заражении штаммом *S. aureus* № 329 погибло 70% животных.

Титр вируса и содержание бактерий в гомогенате легких животных при заражении каждым из патогенов отдельно были ниже, чем при последовательном инфицировании. Однако, при заражении вакцинным штаммом *S. aureus* №1986, титр вируса и содержание бактерий были выше только при предварительном инфицировании штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09, что соответствовало данным о выживаемости животных (Таблица 3).

Таблица 3 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий (среднее значение $\pm$ SD) в легких мышей, последовательно инфицированных различными штаммами вируса гриппа и *S. aureus*

Штамм вируса гриппа	Штамм <i>S. aureus</i>	Выживаемость, %		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgКОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
A/California/04/2009 (H1N1)pdm09	1986	2/10 (p = 0,000011)	20	5,2 $\pm$ 0,3 (5,0; 5; 5,5) p = 0,07	3,5 $\pm$ 0,5 (4; 3,5; 3) p = 0,08
	329	1/10 (p = 0,000001)	10	5,2 $\pm$ 0,2 (4,9; 5,3; 5,3) p = 0,07	4,0 $\pm$ 0,5 (4,0; 3,5; 4,5) p = 0,2

Продолжение таблицы 3

Штамм вируса гриппа	Штамм <i>S. aureus</i>	Выживаемость, %		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgKOE/мл
		Жив./общ.	%		
A/California/04/2009 (H1N1)pdm09	884	2/10 ($p = 0,000011$)	20	4,9±0,2 (5,0; 4,7; 5,1) $p = 0,07$	3,1±0,2 (3,1; 2,9; 3,3) $p = 0,05$
	Без бакт.	10/10	100	1,8±0,4 (1,5; 1,8; 2,2)	не выявлено
A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)	1986	10/10	100	2,5±0,5 (2,5; 3; 2) $p=0,81$	0,5±0,5 (0,5; 1; 0,1) $p=0,175$
	329	2/10 ($p = 0,000011$)	20	5,2±0,3 (5; 5; 5,5) $p=0,09$	2,9±0,8 (2,3; 2,5; 3,8) $p=0,97$
	884	0	0	5,3±0,7 (5,3; 6,0; 4,6) $p=0,08$	4±0,5 (4,0; 3,5; 4,5) $p=0,05$
	Без бакт.	10/10	100	1,2±0,6 (1; 1,8; 0,7)	не выявлено
Реассортант NIBRG-121xp	1986	10/10	100	2,3±0,3 (2,5; 2,5; 2) $p=0,39$	0,5±0,4 (0,5; 0,9; 0,2) $p=0,175$
	329	3/10 ($p<0,05$)	30	4,8±0,7 (4; 5; 5,3) $p=0,39$	2,9±0,7 (2,2; 3; 3,5) $p=0,46$
	884	2/10 ($p = 0,000011$)	20	4,7±0,8 (3,8; 5; 5,4) $p=0,39$	3,0±0,6 (3; 3,6; 2,5) $p=0,05$
	Без бакт.	10/10	100	0,8±0,8 (0; 0,8; 1,5)	не выявлено
Без вирусного заражения	1986	10/10	100	не выявлено	0,7±0,1 (0,8; 0,7; 0,7)
	884	10/10	100	не выявлено	1,2±0,3 (1,0; 1,5; 1,0)
	329	10/10	100	не выявлено	0,9±0,3 (0,7; 0,7; 1,2)

Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания бактерий в гомогенате легких животных контрольной (без вирусного заражения) и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

На основании полученных данных для дальнейшего моделирования вторичной бактериальной пневмонии выбрали штаммы *S. aureus* №1986 в сочетании с A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus* № 884 в сочетании с A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) или NIBRG-121xp в дозе 2×10^9 KOE/мл.

3.1.4 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии при комбинации *S. aureus* 1986 со штаммами вируса гриппа А разных подтипов

Анализ заболеваемости и смертности от гриппозной инфекции во время эпидемий и пандемий выявил закономерность: штаммы вируса гриппа подтипа H3N2 обладают большей вирулентностью, чем штаммы вируса гриппа подтипа H1N1. На основании ранее полученных данных, для следующего этапа моделирования вторичной пневмонии выбрали штамм *S. aureus* 1986, два штамма вируса гриппа А подтипа H1N1 A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и один штамм вируса гриппа подтипа H3N2 A/Aichi/2/69(H3N2). Животных инфицировали дозами вируса, развитие заболевания у мышей, но не приводящими к смертельным исходам (0,5 МЛД₅₀/0,1мл), далее животных инфицировали *S. aureus* 1986 в дозе 2×10^{10} КОЕ/мл, также не вызывающей гибели мышей. Заражение штаммами вируса гриппа разных подтипов А, A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и A/Aichi/2/69(H3N2), вызывало незначительную потерю веса, но не приводило к гибели. При заражении только штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09, погибло 20% животных, а потеря веса и титр вируса в легких были выше, чем у животных, зараженных двумя другими штаммами. После заражения всеми штаммами вируса гриппа в первые 4 дня не наблюдалось различия в состоянии животных и потере их веса.

Заражение *S. aureus* привело к полной гибели животных в группах, инфицированных предварительно штаммами A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Aichi/2/69(H3N2), а предварительное заражение A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) не приводило к гибели мышей (Таблица 4).

Таблица 4 — Выживаемость, уменьшение массы тела и титр вируса (среднее значение $\pm$ SD) в легких животных, зараженных штаммами вируса гриппа А различных подтипов, с последующим заражением *S. aureus* 1986

Штамм вируса гриппа	<i>S. aureus</i>	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл
		Жив./общ.	%	
A/California/04/2009 (H1N1)pdm09	С бакт.	0/10	0	6,0 $\pm$ 0,4 (6; 6; 6; 6,5; 5,5) p=0,01
	Без бакт.	8/10 p=0,000011	80	1,8 $\pm$ 0,3 (2; 1,5; 1,5; 1,8; 2)
A/Puerto Rico/8/34/ RG (H1N1)	С бакт.	10/10	100	3 $\pm$ 0,5 (2,5; 2,5; 3; 3,3; 3,5) p=0,15
	Без бакт.	10/10	100	2,5 $\pm$ 0,4 (3; 2,5; 2; 2,5; 2,5)
A/Aichi/2/69(H3N2)	С бакт.	0/10	0	5,0 $\pm$ 0 (5,0; 5,0; 5,0; 5,0; 5,0) p=0,01
	Без бакт.	10/10	100	2,8 $\pm$ 0,7 (3,3; 2,0; 3,2; 2,8; 2,8)
Без вирусного заражения	+	10/10	100	не выявлено

Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения титров вируса гриппа в гомогенате легких с бактериальным и без бактериального заражения использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таким образом, признаки пневмонии были выражены при инфицировании штаммами A/California/04/2009(H1N1)pdm09, адаптированным к мышам, и A/Aichi/2/69(H3N2), с последующим заражением *S. aureus* 1986, что соответствует эпидемиологическим данным пандемии 2009 г.

3.1.5 Моделирование вторичной бактериальной пневмонии с различными дозами *S. pneumoniae* и их комбинация с различными штаммами вируса гриппа H1N1

Инфицирование сублетальными дозами (0,5 МЛД₅₀/0,1мл) штаммов вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09, A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и их реассортанта NIBRG-121хр, приводило к развитию инфекционного процесса

у мышей, не завершающегося летальными исходами. Введение живых культур *S. pneumoniae*, в двух дозах ($12,5 \times 10^6$ и 25×10^6 КОЕ/мл) вызывало гибель 20 и 40% животных соответственно.

Заражение *S. pneumoniae*, последовавшее за заражением штаммами вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 или A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), в обеих дозах вызывало полную гибель мышей. После заражения реассортантом NIBRG-121хр, полную гибель животных регистрировали при заражении *S. pneumoniae* только в дозе 25×10^6 КОЕ/мл, снижение заражающей дозы до $12,5 \times 10^6$ КОЕ/мл приводило к выживанию 25% мышей.

Титр вируса при заражении тремя исследуемыми штаммами отдельно был на 2-3 lg ТЦИД50 ниже, чем при комбинированном заражении. Несмотря на гибель животных во всех группах, зараженных *S. pneumoniae* после заражения вирусом гриппа, размножение вируса в легких животных, инфицированных A/California/04/2009(H1N1)pdm09, было выше, чем в группах, зараженных A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и NIBRG-121хр. Содержание бактерий в высеве из гомогената легких при комбинированном последовательном заражении было почти в 100 раз выше, чем при заражении обеими дозами *S. pneumoniae* отдельно (Таблица 5).

Таблица 5 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий (среднее значение $\pm$ SD) в легких мышей при комбинированном последовательном заражении двумя дозами *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, вызванной разными штаммами вируса гриппа H1N1

Штамм вируса гриппа	Доза <i>S. pneumoniae</i> , КОЕ/мл	Выживаемость, %		Титр вируса в легких, lg ТЦИД50	Количество бактерий в легких, lg КОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
A/California/04/2009 (H1N1)pdm09	$12,5 \times 10^6$	0/10	0	$4,0 \pm 2,0$ (4; 2; 6) $p > 0,05$	$8,5 \pm 0,2$ (8,6; 8,5; 8,3) $p > 0,05$
	25×10^6	0/10	0	$4,5 \pm 2,3$ (4,5; 2; 6,5) $p > 0,05$	$8,9 \pm 0,1$ (9; 9; 8,8) $p > 0,05$
	Без бакт.	10/10	100	$1,8 \pm 0,4$ (2; 1,4; 2,1)	Не выявлено

Продолжение таблицы 5

Штамм вируса гриппа	Доза <i>S. pneumoniae</i> , КОЕ/мл	Выживаемость, %		Титр вируса в легких, lg ТЦИД ₅₀	Количество бактерий в легких, lg КОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)	12,5x10 ⁶	0/10	0	2,7±0,3 (2,4; 3; 2,8) p>0,05	8,6±0,2 (8,7; 8,7; 8,4) p>0,05
	25x10 ⁶	0/10	0	3,7±0,8 (2,8; 4,2; 4) p>0,05	8,6±0,6 (8,7; 8; 9,1) p>0,05
	Без бакт.	10/10	100	1,5±0,5 (1,5; 2; 1) p>0,05	Не выявлено
NIBRG-121xp	12,5x10 ⁶	2/10 p=0,00001	20	2,3±0,3 (2,5; 2,5; 2) p>0,05	8,2±0,2 (8; 8,4; 8,3)
	25x10 ⁶	0/10	0	3,2±1,0 (2,3; 3,1; 4,2) p>0,05	8,2±0,1 (8,1; 8,1; 8,3)
	Без бакт.	10/10	100	1,0±1,0 (1; 2; 0)	Не выявлено
Без вирусного заражения	12,5x10 ⁶	8/10	80	Не выявлено	6,7±0,6 (6,1; 6,7; 7,2)
	25x10 ⁶	6/10	60	Не выявлено	7,9±0,3 (7,8; 8,1; 8)
Примечание: кривые выживаемости между контрольной (без бактериального заражения) и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной (без бактериального заражения) и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Исходя из проведенного исследования, для моделирования вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции была выбрана доза *S. pneumoniae* 25x10⁶ КОЕ/мл.

Таким образом, разработана и охарактеризована модель вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции, вызванной последовательным заражением штаммами вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), относящимися к подтипу H1N1, а также их реассортантом NIBRG-121xp, штаммом A/Aichi/2/69(H3N2), относящемуся к подтипу H3N2, и двумя бактериальными патогенами, *S. aureus* и *S. pneumoniae*. Показано, что коинфекция обоими

патогенами приводила к утяжелению инфекционного процесса, сопровождавшемуся повышением летальности и увеличением вирусной и бактериальной нагрузки в легких по сравнению с соответствующими показателями у животных, инфицированных каждым из патогенов отдельно по аналогичной схеме и в эквивалентных дозах.

Материалы раздела 3.1 опубликованы в [21, 35, 37, 50].

3.2 Эффективность противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Ранее в экспериментальных моделях было показано, что прием противовирусных препаратов снижает риск развития пневмоний после гриппозной инфекции [175, 229]. Поэтому для исследования нами были выбраны следующие препараты: этиотропные препараты прямого противовирусного действия - широко применяемые в клинической практике осельтамивир [42] и умифеновир [4], а также препарат, относящийся к иммуномодуляторам, действие которых направлено на различные мишени — индуктор интерферона тилорон [3]. В качестве антибактериальных препаратов были выбраны: цефуроксим [45], относящийся к цефалоспорином, действующий бактерицидно, нарушая синтез клеточной стенки бактерий; ципрофлоксацин [46], относящийся к фторхинолонам, подавляющий бактериальную ДНК-гиразу; и клиндамицин [26], относящийся к линкозамидам, ингибирующий синтез в бактериях путём связывания с 50S-субъединицей бактериальных рибосом.

3.2.1 Эффективность противовирусных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus*, после гриппозной инфекции

В клинических исследованиях при терапии противогриппозными препаратами было продемонстрировано снижение частоты развития вторичных бактериальных пневмоний после перенесённой гриппозной инфекции. Наличие разработанной экспериментальной модели позволило поставить задачу по изучению эффективности двух этиотропных противовирусных препаратов с различными механизмами действия и различными вирусными мишенями — ингибитора нейраминидазы осельтамивира и ингибитора слияния умифеновира. Эффективность терапии противовирусными препаратами различного механизма действия на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей была изучена в нескольких опытах. Для двух экспериментов с одинаковым дизайном мы выбрали этиотропные препараты осельтамивир и умифеновир, применяемые перорально. Комбинированное последовательное заражение A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (10^5 ТЦИД₅₀/0,1 мл) и *S. aureus* 1986 (2×10^9 КОЕ/мл) к последнему дню наблюдения вызвало гибель 90–94% мышей; снижение массы тела отмечали с 5 дня после заражения вирусом, оно достигло 15–18% к 9–11 дням. Терапия умифеновиром в дозе 60 мг/кг защищала от гибели 33–44% животных. Применение осельтамивира в дозе 20 мг/кг было более эффективным и защищало от гибели половину животных. Лечение и осельтамивиром, и умифеновиром препятствовало потере массы тела животных по сравнению с контрольной группой, не получавшей лечения (Рисунки 4–5, Таблица 6).

Результаты исследований легких показали, что при терапии обоими противовирусными препаратами, осельтамивиром и умифеновиром, титр вируса в посевах из гомогената легких был ниже титра вируса в легких контрольных животных. Лечение осельтамивиром в 100 раз снижало количество бактерий в легких.

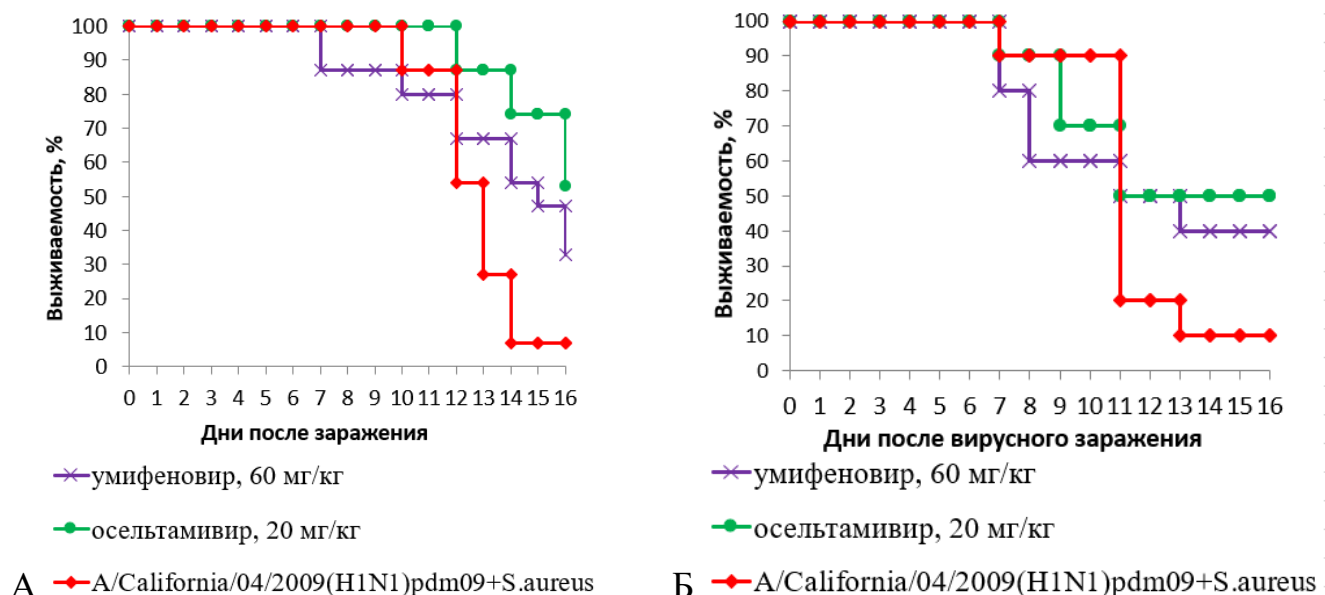


Рисунок 4 — Выживаемость мышей при лечении этиотропными противовирусными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции (А — первый опыт, Б — второй опыт)

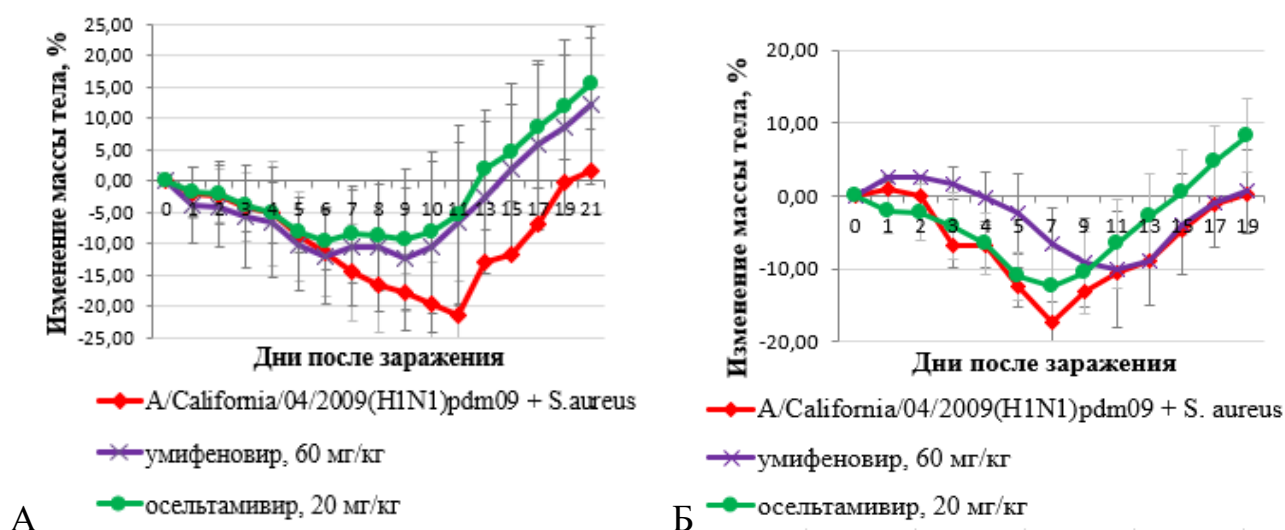


Рисунок 5 — Изменение массы тела мышей (среднее значение $\pm$ SD) при лечении этиотропными противовирусными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции (А — первый опыт, Б — второй опыт)

Таблица 6 — Выживаемость мышей, титр вируса и количество бактерий в легких мышей (среднее значение $\pm$ SD), при лечении противовирусными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

	Препарат	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД50/0,1 мл	Количество бактерий, КОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
I опыт	Осельтамивир, 20 мг/кг	8/15 ($p=0,004$)	53,3	0 $\pm$ 0	3,4 $\pm$ 0,2 (3,1; 3,5; 3,4; 3,3; 3,5) $p<0,01$
	Умифеновир, 60 мг/кг	5/15 ($p=0,013$)	33,3	2,6 $\pm$ 0,5 (2; 3; 2; 3; 3) $p=0,01$	5,2 $\pm$ 0,2 (5,4; 4,9; 5,2; 5,2; 5,3) $p=0,11$
	Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/15	7	6,2 $\pm$ 0,4 (6; 6; 6; 6; 7)	5,6 $\pm$ 0,1 (5,5; 5,6; 5,7; 5,6; 5,5)
II опыт	Осельтамивир, 20 мг/кг	5/10 ($p=0,054$)	50	1 $\pm$ 0,6 (2; 0,5; 1; 1; 0,5) $p<0,01$	3,1 $\pm$ 0,2 (2,9; 3,1; 3,3; 3; 3) $p=0,03$
	Умифеновир, 60 мг/кг	4/9 ($p=0,098274$)	44,4	2,1 $\pm$ 0,2 (2,5; 2; 2; 2; 2) $p=0,01$	5,8 $\pm$ 0,2 (5,6; 5,9; 5,9; 6; 5,7) $p=0,8$
	Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/10	10	6 $\pm$ 0 (6; 6; 6; 6; 6)	5,8 $\pm$ 0,2 (5,5; 5,6; 5,7; 6; 6)

Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Изучение эффективности индуктора интерферонов тилорона на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей было проведено в трех экспериментах (Рисунок 6), отличающихся заражающей дозой вируса: высокой ($10^{4,2}$ ТЦИД50/0,1 мл), средней (10^4 ТЦИД50/0,1 мл) и низкой (10^3 ТЦИД50/0,1 мл), при одной дозе *S. aureus*, 2×10^9 КОЕ/мл.

Высокая инфицирующая доза вируса при последовательной коинфекции обоими патогенами приводила к гибели 93% животных к окончанию периода наблюдения. Снижение массы тела регистрировали, начиная с 5-х суток после инфицирования вирусом; максимальная потеря массы достигала 15–18% к 9–11-м суткам эксперимента. Применение тилорона (перорально и внутрибрюшинно), а также осельтамивира (перорально) не сопровождалось снижением летальности и выраженности потери массы тела; указанные показатели не отличались от таковых в контрольной группе.

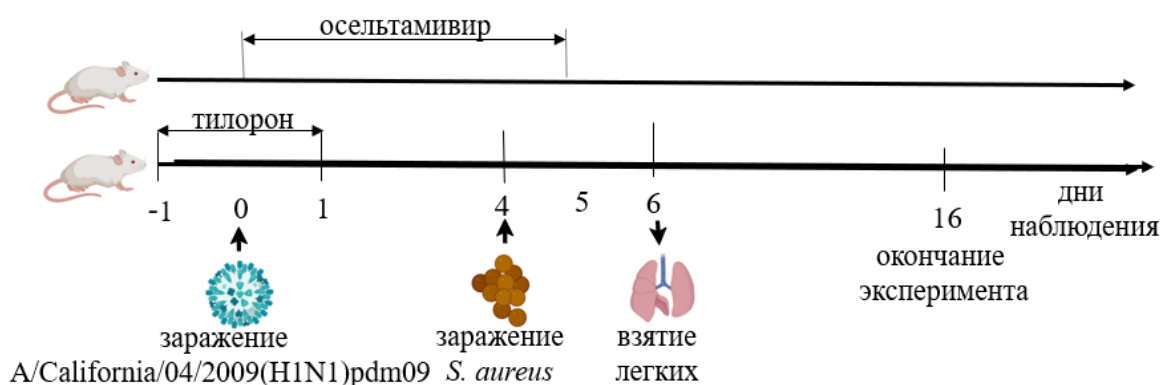


Рисунок 6 — Схема эксперимента по изучению эффективности тилорона при трех заражающих дозах на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

После получения данных об отсутствии терапевтического эффекта препаратов в модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции в последующем эксперименте инфицирующую дозу вируса снизили до 10^4 ТЦИД₅₀/0,1 мл. В контрольной группе к 8-м суткам после вирусного инфицирования летальность составила 90%; у выживших животных после указанного срока отмечали постепенное восстановление массы тела.

При снижении инфицирующей дозы эффективность терапии всеми препаратами повышалась. Пероральное введение тилорона обеспечивало выживаемость 50% животных, тогда как внутрибрюшинное введение приводило к полной защите от гибели. Применение осельтамивира сопровождалось увеличением выживаемости до 80%.

Данные о содержании обоих патогенов в легочной ткани соответствовали данным выживаемости: терапия тилороном сопровождалась снижением вирусного титра на 3–4 lg и уменьшением бактериальной обсемененности гомогенатов легких по сравнению с нелеченой контрольной группой.

При дальнейшем снижении инфицирующей дозы вируса до 10^3 ТЦИД₅₀/0,1 мл летальность в контрольной группе нелеченых животных составила 67%. Пероральное введение тилорона обеспечивало выживаемость 89% животных, тогда как внутрибрюшинное введение тилорона и пероральное применение осельтамивира предотвращали летальные исходы в экспериментальных группах, подавляли репликацию вируса и снижали бактериальную обсемененность легочной ткани (Таблица 7, Рисунок 7).

Таблица 7 — Выживаемость, титр вируса и содержание бактерий в легких мышей при разных способах введения тилорона и различных заражающих дозах вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей

Группа	Препарат	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /0,1 мл	Содержание бактерий, lg КОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
Высокая доза (10 ^{4,2} ТЦИД ₅₀ /0,1 мл)	Тилорон, п/о, 30 мг/кг	2/15 (p=0,55)	13	6,7±0,6 (7; 6; 7)	5,5±0,1 (5,5; 5,4; 5,7)
	Тилорон, в/б 10 мг/кг	4/15 (p=0,15)	27	6,3±0,6 (7; 6; 6)	5,3±0,2 (5,5; 5,08; 5,3)
	Осельтамивир, п/о, 20 мг/кг	5/15 (p=0,07)	33	6,3±0,6 (7; 6; 6)	5,5±0,6 (5,53; 5,45; 5,56)
	Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/15	7	7±0 (7; 7; 7)	5,6±0,1 (5,54; 5,65; 5,7)
Средняя доза (10 ⁴ ТЦИД ₅₀ /0,1 мл)	Тилорон, п/о, 30 мг/кг	5/10 (p=0,05)	50	4,0±0,5** (4; 3,5; 4,5)	5,2±0,1 (5,1; 5,1; 5,3)
	Тилорон, в/б, 10 мг/кг	10/10 (p=0,001)	100	3,2±0,3** (3; 3,5; 3)	3,3±0,1** (3,3; 3,3; 3,4)
	Осельтамивир, 20 мг/кг	8/10 (p=0,001)	80	3,2±0** (3; 3; 3)	3,5±0,1** (3,4; 3,5; 3,5)
	Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/10	10	6,7±0,6 (7; 7; 6)	5,7±0,1 (5,7; 5,7; 5,7)
Низкая доза (10 ³ ТЦИД ₅₀ /0,1 мл)	Тилорон, п/о 30 мг/кг	8/9 (p=0,01)	89	не выявлено	не выявлено
	Тилорон, в/б, 10 мг/кг	9/9 (p=0,001)	100	не выявлено	не выявлено
	Осельтамивир, 20 мг/кг	10/10 (p=0,001)	100	не выявлено	не выявлено
	Контроль A/California/04/2009(H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	3/9	33	5,8±0,3 (5,5; 6; 6)	4,5±0,1 (4,4; 4,5; 4,5)

Примечание: * — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

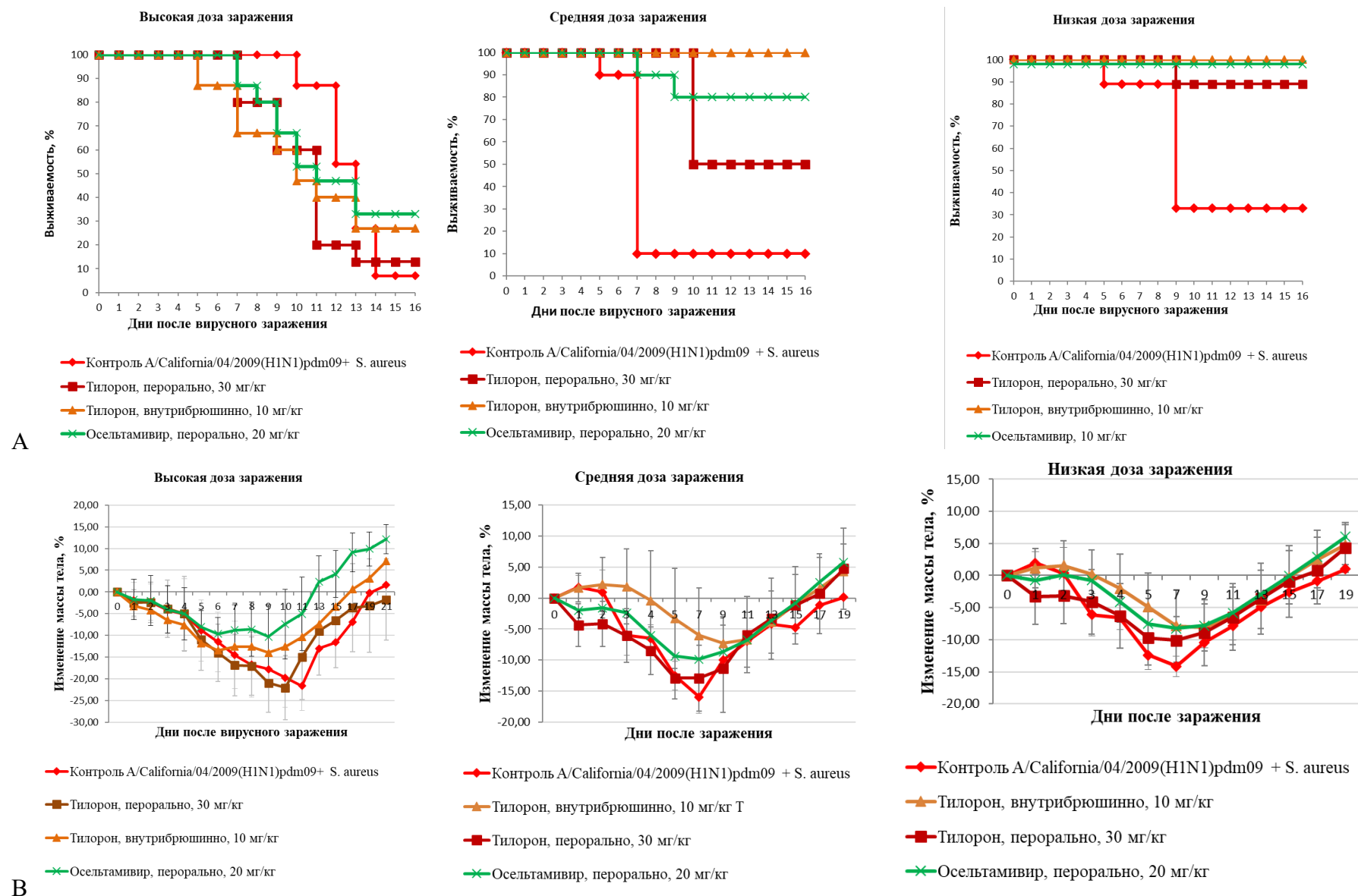


Рисунок 7 — Выживаемость (А) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (В) мышей при терапии тилоронем при высокой, средней и низкой заражающей дозе вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Полученные данные свидетельствуют о терапевтической активности тилорона на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной инфицированием вирусом гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *S. aureus*. Эффект препарата регистрировали как при пероральном, так и при внутрибрюшинном введении, при этом внутрибрюшинное применение было эффективнее; выраженность терапевтического действия возрастала по мере снижения инфицирующей дозы вируса. Применение тилорона сопровождалось повышением выживаемости животных, уменьшением потери массы тела и снижением вирусной нагрузки в легких.

В исследованиях, выполненных на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной вирусной инфекцией с последующим интраназальным инфицированием *Staphylococcus aureus*, установлена терапевтическая эффективность противовирусных препаратов, различающихся по механизму действия. Применение препаратов сопровождалось повышением выживаемости, уменьшением потери массы тела, а также снижением вирусной и бактериальной нагрузки в легочной ткани по сравнению с показателями в контрольной группе.

Материалы раздела 3.2.1 опубликованы в [50, 51].

3.2.2 Эффективность этиотропных противовирусных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции

Следующий этап исследований был направлен на оценку эффективности противовирусных препаратов осельтамивира и умифеновира на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции, вызванной другим бактериальным агентом, *S. pneumoniae*.

S. pneumoniae ($2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл), введенный мышам, уже инфицированным вирусом A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (10^5 ТЦИД₅₀/0,1 мл), привел к полной

гибели животных к 8-му дню после заражения. Терапия умифеновиром в дозе 60 мг/кг/день защищала от гибели 80% мышей. Сходные результаты отмечали в группе, получавшей осельтамивир в дозе 20 мг/кг. Данные о выживаемости согласовывались с динамикой массы тела животных. В контрольной группе наблюдалась средняя потеря 23% от исходной массы на 7 день. В группах, получавших осельтамивир и умифеновир, все мыши были защищены от потери массы тела (Рисунок 8).

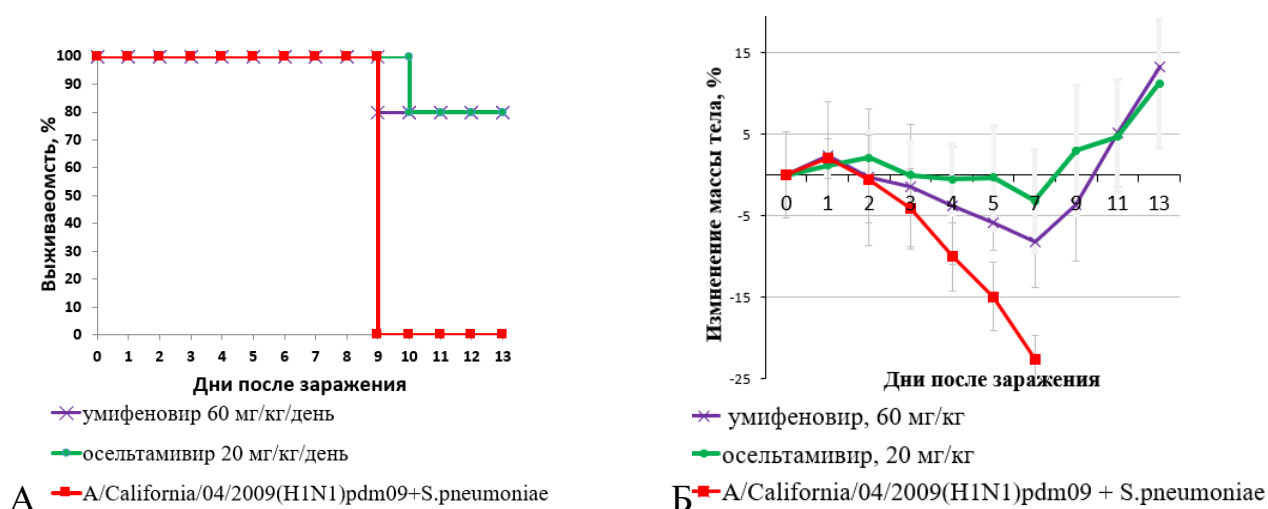


Рисунок 8 — Выживаемость и изменение массы тела мышей (среднее значение $\pm$ SD) при лечении осельтамивиром и умифеновиром на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции

Данные о выживаемости соответствовали данным об обсеменённости лёгких обоими патогенами. Лечение умифеновиром в дозе 60 мг/кг снижало титр вируса на 3 log у всех животных, а также приводило к снижению количества бактерий в легких (Таблица 8).

Таблица 8 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий в легких при лечении вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, противовирусными препаратами осельтамивиром и умифеновиром

Группы	Выживаемость		Исследования легких	
	Жив./общ.	%	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgКОЕ/мл
Умифеновир, 60 мг/кг	8/10 (p=0,000011)	80	2,3±0,4 (3; 2; 2; 2,5; 2) p=0,02	6,4±0,2 (6,5; 6,5; 6,5; 6,5; 6) p=0,01
Осельтамивир, 20 мг/кг	8/10 (p=0,000011)	80	2,1±0,2 (2; 2; 2; 2; 2,5) p=0,01	6,7±0,3 (7; 7; 6,5; 6,5; 6,5) p=0,04
Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S. pneumoniae</i>	0/10	0	5,3±0,4 (6; 5,5; 5; 5; 5)	8,9±0,1 (9; 8,9; 8,7; 8,8; 9)
Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.				

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что разработанная модель может быть использована для изучения эффективности противовирусных препаратов на вторичную бактериальную пневмонию, вызванную *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции.

3.2.3 Сравнение эффективности антибактериальных препаратов различного механизма действия на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus*, после гриппозной инфекции

При вторичной бактериальной пневмонии, осложняющей гриппозную инфекцию, эффективность антибактериальной терапии ниже, чем при пневмонии, вызванной только бактериальным возбудителем. По данным некоторых исследований [225], спектр эффективности при этих двух пневмониях различается в зависимости от механизма действия антибактериальных препаратов. Препаратами выбора в этом случае наиболее часто являются антибиотики

амоксциллин и азитромицин, а также цефалоспорины и фторхинолоны (ципрофлоксацин).

В настоящее время, одной из проблем лечения бактериальных инфекций является снижение чувствительности к антибактериальным препаратам, поэтому, важным критерием выбора терапии служат данные о чувствительности возбудителя к антибиотикам. Предварительные исследования выявили, что используемый нами штамм *S. aureus* 1986 резистентен к амоксициллину и азитромицину, а к цефазолину выявлена частичная резистентность.

Для исследования были выбраны следующие антибактериальные препараты различного механизма действия: цефуроксим подкожно, клиндамицин внутривенно и ципрофлоксацин перорально в дозах 20, 90 и 50 мг/кг соответственно. Терапию антибиотиками начинали через 3 часа после заражения *S. aureus*, далее 1 раз в день на протяжении 3 дней.

Цефуроксим – антибактериальный и бактерицидный препарат широкого спектра действия, полусинтетический цефалоспориновый антибиотик II поколения, относящийся к цефалоспорином, бактерицидное действие которого обусловлено нарушением синтеза клеточной стенки бактерий [45]. Ципрофлоксацин — противомикробный препарат широкого спектра действия из группы фторхинолонов, ингибирующий ДНК-гиразу бактерий, что приводит к нарушению репликации ДНК и синтеза клеточных белков бактерий [46]. Клиндамицин — полусинтетический антибиотик группы линкозамидов, обладающий узким спектром бактериостатической и бактерицидной активности против неспорообразующих анаэробов и грамположительных кокков [26]. Клиндамицин ингибирует синтез белков в бактериях путём связывания с 50S-субъединицей бактериальных рибосом.

В контрольной группе, к 17 дню после вирусного заражения погибло 9 из 10 животных, инфицированных вирусом гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (10^5 ТЦИД₅₀/0,1 мл) с последующим заражением *S. aureus* 1986 (2×10^9 КОЕ/мл), а снижение массы тела было максимальным на 11 день наблюдения, достигая почти 30%. Хотя терапия антибактериальными препаратами ципрофлоксацином и

цефуроксимом защищало от гибели 30% животных, наблюдаемые эффекты не были статистически значимы. Тем не менее, лечение этими препаратами снижало титр вируса в легких. Кроме того, лечение всеми антибактериальными препаратами уменьшало содержание бактерий в легких по сравнению с контрольной группой. Наиболее эффективным из антибактериальных препаратов оказался ингибитор синтеза белка клиндамицин, снижающий смертность животных на 50% и уменьшающий потерю ими веса. Хотя лечение клиндамицином было наиболее эффективно по клиническим признакам, оно в наименьшей степени снижало размножение бактерий в легких по сравнению с другими изученными препаратами (Рисунок 9, Таблица 9).

Таблица 9 — Выживаемость, титры вируса и количество бактерий в легких (среднее значение $\pm$ SD) при лечении антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Группы	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл	Количество бактерий, lgKOE/мл
	Жив./общ.	%		
Цефуроксим, 20 мг/кг	3/10 (p=0,29)	30	4,3 $\pm$ 0,3 (4,5; 4,5; 4,3; 4; 4) p=0,06	1,8 $\pm$ 0,3 (2; 2; 2; 1,5; 1,5) p<0,01
Клиндамицин, 90 мг/кг	5/10 (p=0,05)	50	4 $\pm$ 0 (4; 4; 4; 4; 4) p=0,01	2,3 $\pm$ 0,3 (2,5; 2,5; 2; 2,5; 2) p=0,01
Ципрофлоксацин, 50 мг/кг	3/10 (p=0,29)	30	4,6 $\pm$ 0,5 (5; 5; 5; 4; 4) p=0,2	1,6 $\pm$ 0,2 (2; 1,5; 1,5; 1,5; 1,5) p<0,01
Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/10	10	5,7 $\pm$ 0,4 (6; 6; 6; 5; 5,5)	8,3 $\pm$ 0,3 (8; 8; 8,4; 8,5; 8,7)
<i>Примечание:</i> кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.				

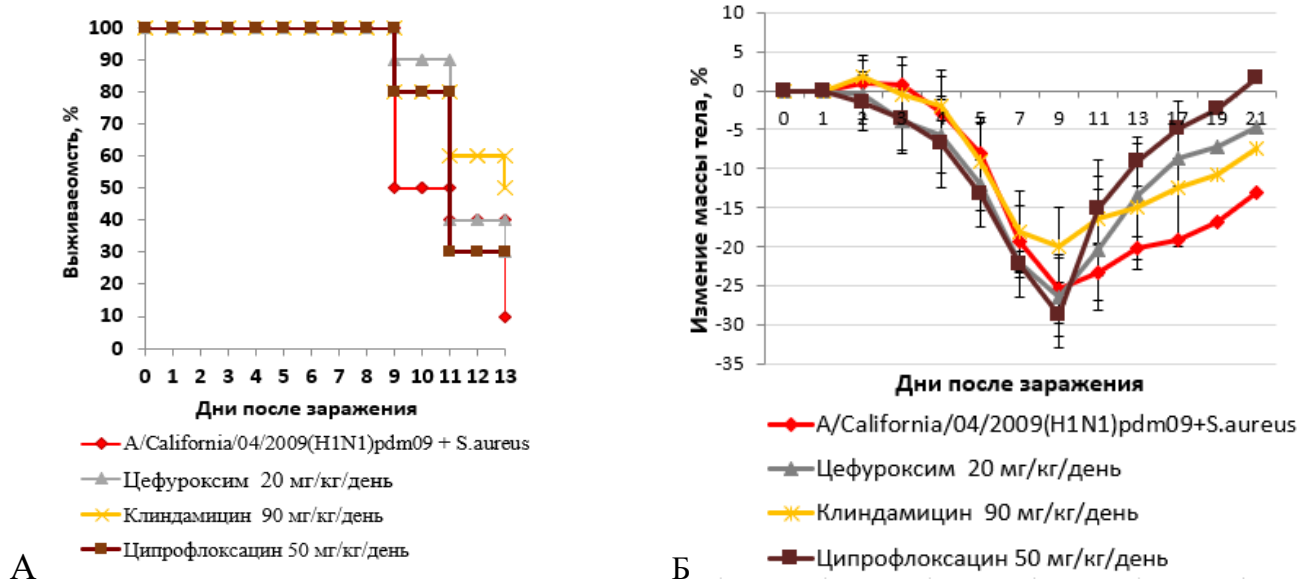


Рисунок 9 — Выживаемость (А) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (Б) мышей при лечении противовирусными и антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

3.2.4 Эффективность комбинированного применения этиотропных противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Одним из способов лечения гриппа тяжелого течения, отягощённого бактериальной инфекцией, является добавление к противовирусным препаратам антибактериальных, в первую очередь макролидов, цефалоспоринов и их сочетание. Последние применяют, если бактериальная инфекция вызвана *S. pneumoniae* или *S. aureus* [226].

Была изучена эффективность комбинированного применения антибактериальных препаратов с этиотропными противовирусными препаратами различного механизма действия, для которых на нашей модели уже была выявлена эффективность.

В первом опыте изучения комбинации противовирусного препарата осельтамивира (20 мг/кг) с антибиотиком цефуроксимом (20 мг/кг) было показано, что лечение обоими препаратами отдельно увеличивало выживаемость и

препятствовало снижению массы тела. Однако наиболее эффективной была комбинированная последовательная терапия противовирусным препаратом осельтамивиром и антибактериальным препаратом цефуроксимом, защищающая от гибели 80% животных. В контрольной группе, в которой мыши были инфицированы A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (10^5 ТЦИД₅₀/0,1 мл) и *S. aureus* (2×10^9 КОЕ/мл), выживаемость составила 7%. Данное лечение препятствовало снижению массы тела и полностью подавляло размножение патогенов в легких (Рисунок 10, Таблица 10).

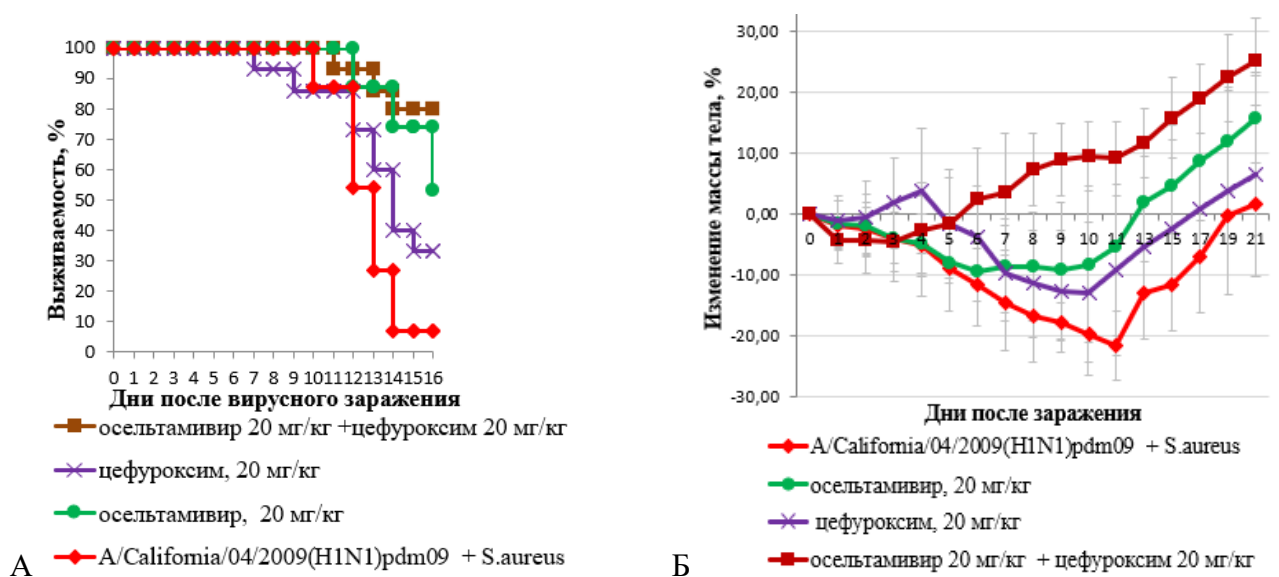


Рисунок 10 — Выживаемость (А) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (Б) мышей при лечении комбинацией противовирусного и антибактериального препарата на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, после гриппозной инфекции

Таблица 10 — Выживаемость, титр вирусов и содержание бактерий в легких (среднее значение $\pm$ SD) при лечении комбинацией противовирусного и антибактериального препарата на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus*, после гриппозной инфекции

Препарат	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀	Количество бактерий, КОЕ/мл
	Жив./общ.	%		
Осельтамивир, 20 мг/кг	8/15 (p=0,004)	53	не выявлено	3,4 $\pm$ 0,4 (3; 3; 3,5; 3,5; 4) p=0,21
Цефуроксим, 20 мг/кг	5/15 (p=0,071)	33	3,4 $\pm$ 0,4 (3; 2; 2; 2,5; 2,5) p=0,01	0,8 $\pm$ 0,3 (1; 1; 1,2; 0,5; 0,5) p<0,01

Продолжение таблицы 10

Препарат	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД50	Количество бактерий, КОЕ/мл
	Жив./общ.	%		
Осельтамивир 20 мг/кг + цефуроксим 20 мг/кг	12/15 ($p < 0,01$)	80	не выявлено	не выявлено
Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	1/15	7	6,5±0,4 (6,5; 6,5; 6,5; 6; 7)	6,6±0,4 (7; 7; 6,5; 6,5; 6)
Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.				

Результаты лабораторных исследований легких показали, что наиболее эффективное комбинированное лечение осельтамивира и цефуроксимом полностью подавляет размножение обоих патогенов в легких животных.

На следующем этапе изучали комбинированное применение противовирусных препаратов разного механизма действия с антибиотиками. Дозы препаратов, используемых в эксперименте: осельтамивир — 20 мг/кг, умифеновир — 60 мг/кг, цефуроксим — 20 мг/кг/день, клиндамицин 90 мг/кг/день, ципрофлоксацин — 50 мг/кг/день.

В контрольной группе к 11 дню после вирусного погибли все животные, инфицированные последовательно A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (10^5 ТЦИД50/0,1 мл) и *S. aureus* 1986 (2×10^9 КОЕ/мл), снижение массы тела в группе было максимальным на 9 день наблюдения, достигая 23–25% (Рисунки 12–13, Таблица 11). Лечение противовирусными и антибактериальными препаратами отдельно защищало 41–75% животных, снижало потерю их веса и увеличивало среднюю продолжительность жизни, при этом наиболее эффективным из всех применённых препаратов оказался ципрофлоксацин.

Комбинирование противовирусных препаратов с каждым из антибактериальных препаратов привело к усилению их эффективности, все комбинации полностью предотвращали гибель животных и снижение их веса. Изучение легких животных подтвердило полученные результаты. Хотя при

лечении каждым препаратом отдельно титр вируса в легких был ниже титра вируса у контрольных животных, инфицированных *S. aureus* после вируса гриппа, это снижение не было статистически значимо. Терапия противовирусными препаратами не оказывала влияния на содержание бактерий в легких животных, а при лечении антибактериальными препаратами оно было снижено примерно в 100 раз. Применение комбинаций как осельтамивира, так и умифеновира со всеми изученными антибактериальными препаратами полностью защищало животных от гибели, приводило к полному подавлению размножения вируса в лёгких и очищению лёгких от бактерий (Таблица 11, Рисунки 12–13).

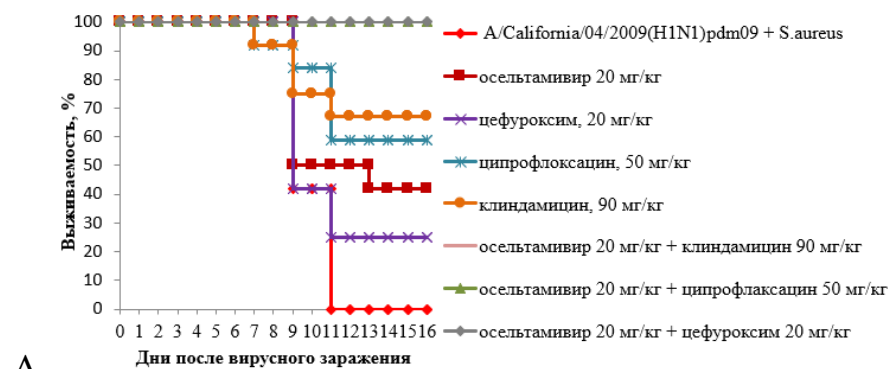
Комбинированное лечение противовирусными препаратами с антибактериальными на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей было эффективнее, чем лечение каждым препаратом отдельно.

На модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus* или *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, были изучены противовирусные препараты различного механизма действия, антибактериальные препараты и их комбинации. Показано, что комбинирование противовирусных препаратов с антибактериальными было эффективнее, чем лечение каждым препаратом отдельно. Комбинированная терапия полностью защищала животных от гибели, снижала потерю веса, приводила и к полному подавлению размножения вируса в легких и их очищению от бактерий.

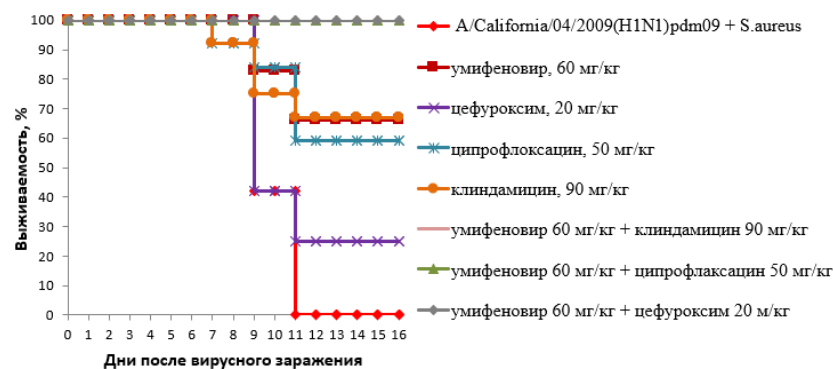
Материалы раздела 3.2.4 опубликованы в [35].

Таблица 11 — Выживаемость, титр вирусов и содержание бактерий в легких (среднее значение $\pm$ SD) при лечении комбинацией противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus*, после гриппозной инфекции

Противов. препарат	Антибактериальный препарат	Выживаемость, %		Титр вируса, lg ТЦИД50	Количество бактерий, КОЕ/мл
		Жив./общ.	%		
Без противовирусного препарата	Цефуроксим, 20 мг/кг	3/12 (p=0,068603)	25	5,0 $\pm$ 0,4 (5,5; 5; 4,5; 5; 5) p=0,1	3,2 $\pm$ 0,2 (3,2, 3,5; 3,4; 3; 3) p=0,03
	Ципрофлоксацин, 50 мг/кг	7/12 (p=0,000725)	58	4,3 $\pm$ 0,3 (4,5; 4; 4,5; 4; 4,5) p=0,8	3,2 $\pm$ 0,2 (3,5, 3; 3,3; 3; 3,3) p=0,02
	Клиндамицин, 90 мг/кг	8/12 (p=0,000112)	66	3,5 $\pm$ 0,4 (4; 3,5; 3; 3,5; 3,5) p=0,1	4,4 $\pm$ 0,3 (4,4; 4; 4,8; 4,5; 4,5) p=0,3
Осельтамивир, 20 мг/кг	Цефуроксим, 20 мг/кг	12/12	100	0; 0; 0	не выявлено
	Ципрофлоксацин, 50 мг/кг	12/12	100	0; 0; 0	не выявлено
	Клиндамицин, 90 мг/кг	12/12	100	0; 0; 0	не выявлено
	Без антибакт. препарата	5/12 (p=0,01)	42	2,1 $\pm$ 0,2 (2; 2; 2; 2; 2,5) p<0,01	3,2 $\pm$ 0,3 (3; 3,5; 3,5; 3; 3) p=0,01
Умифеновир, 60 мг/кг	Цефуроксим, 20 мг/кг	12/12	100	0;0;0	не выявлено
	Ципрофлоксацин, 50 мг/кг	12/12	100	0;0;0	не выявлено
	Клиндамицин, 90 мг/кг	12/12	100	0;0;0	не выявлено
	Без антибакт. препарата	8/12 (p<0,01)	67	2,3 $\pm$ 0,4 (3; 2; 2; 2,5; 2) p<0,01	3,1 $\pm$ 0,2 (3, 3; 3,5; 3; 3,2) p=0,02
Контроль A/California/04/2009(H1N1)pdm09+ <i>S.aureus</i>		0/12	0	6,5 $\pm$ 0 (6,5; 6,5; 6,5; 6,5; 6,5)	5,4 $\pm$ 0,3 (5,5; 5,7; 5,7; 5,3; 5)
Примечание: кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.					

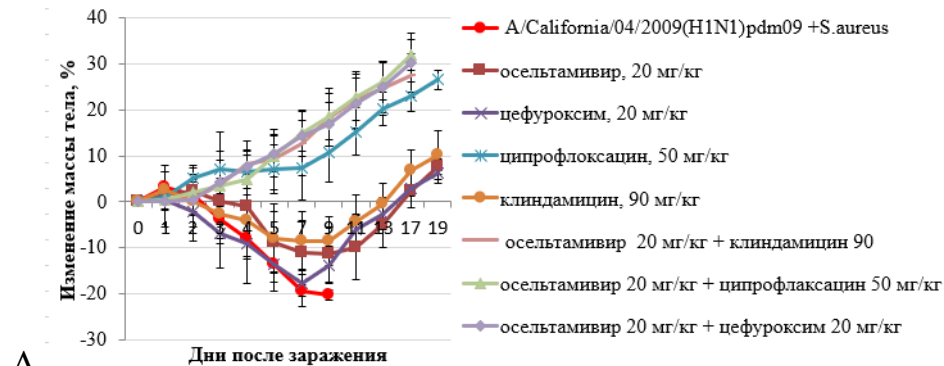


А

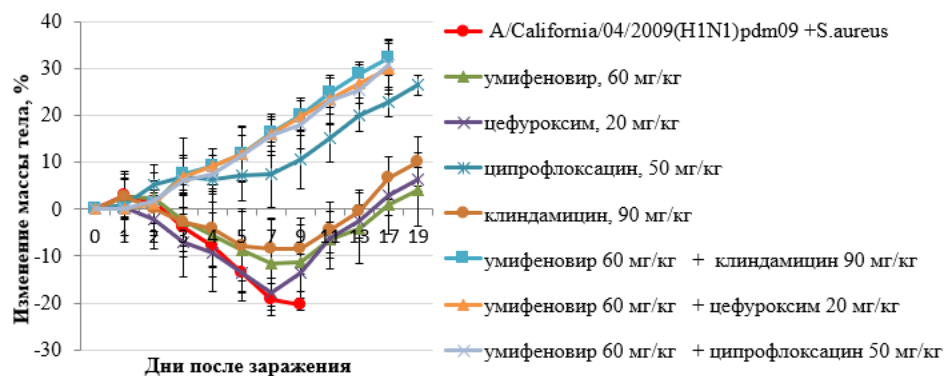


Б

Рисунок 12 — Выживаемость мышей при лечении комбинацией осельтамивира (А) и умифеновира (Б) с антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции



А



Б

Рисунок 13 — Изменение массы тела мышей (среднее значение $\pm$ SD) при лечении комбинацией осельтамивира (А) и умифеновира (Б) с антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

3.2.5 Изучение эффективности комбинированного использования индуктора интерферонов тилорона и антибактериальных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Для исследования комбинированного действия тилорона с антибактериальными препаратами на модели вторичной пневмонии мышей после гриппозной инфекции выбрали заражающую дозу 10^4 ТЦИД₅₀/0,1 мл, так как именно на ней пероральное применение тилорона показало эффективность при 90% гибели животных контрольной группы. В качестве контрольного препарата был применен осельтамивир в дозе 10 мг/кг. Доза тилорона была 15 мг/кг.

Для исследования были выбраны два антибактериальных препарата, различающихся механизмом действия: в качестве антибиотика, к которому была выявлена чувствительность исследуемого штамм *S. aureus* №1986, цефуроксим (относится к цефалоспорином) в дозе 20 мг/кг, а в качестве антибиотика, к которому была выявлена резистентность, амоксициллин (относится к пенициллинам) в дозе 20 мг/кг (Рисунок 14).

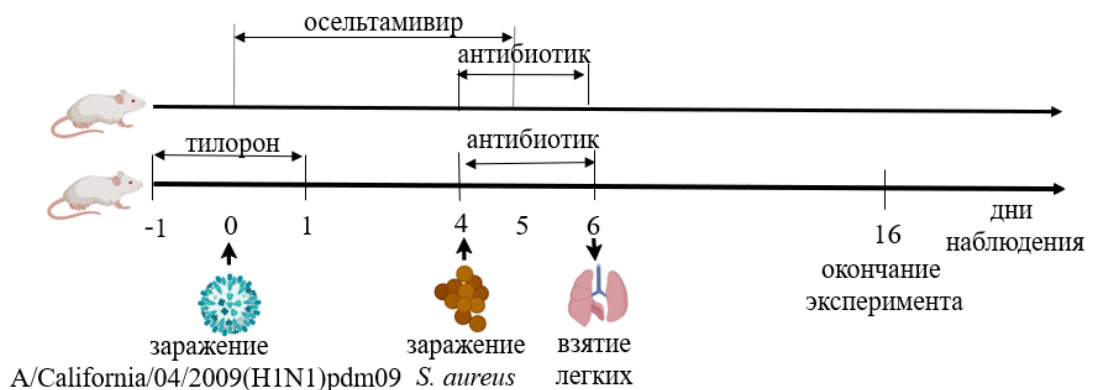


Рисунок 14 — Схема эксперимента по изучению эффективности тилорона и его комбинации с антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции

В контрольной группе нелеченных мышей к 9 дню все мыши погибли. Применение как противовирусных, так и антибактериальных препаратов отдельно

повышало выживаемость не более, чем на 20%, не препятствовало снижению массы тела и не влияло на размножение вируса в легких. Также монотерапия противовирусными препаратами не оказывала влияния на содержание бактерий в легких. Как и ожидалось, амоксициллин, к которому была выявлена устойчивость используемого штамма *S. aureus*, не оказывал влияния на содержание бактерий в легких. Кроме того, применение комбинации тилорона или осельтамивира с амоксициллином не оказывало влияние на выживаемость мышей и размножение патогенов в легких животных.

Напротив, применение цефуроксима в этом же опыте, к которому *S. aureus* был чувствителен, снижало количество бактерий в 100 раз, а его комбинация с тилороном или осельтамивиром увеличивала выживаемость до 80-100%, полностью предотвращала снижение их массы тела, что свидетельствует об аддитивном характере обеих комбинаций. Обе комбинации также полностью подавляли размножение вируса и бактерий в легких. (Таблица 12, Рисунок 15).

Таблица 12 — Влияние комбинации противовирусных и антибактериальных препаратов на выживаемость, титры вирусов и бактерий в легких при лечении вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. aureus* после гриппозной инфекции

Группа	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /0,1 мл	Содержание бактерий, lg КОЕ/мл
	Жив./общ.	%		
Амоксициллин, п/о, 20 мг/кг	0/10	0	6,5±0,5 (7; 6,5; 6)	5,54±0,06 (5,53; 5,49; 5,61)
Цефуроксим, п/о, 20 мг/кг	2/10 (p=0,150)	20	5,0±0,5 (5,5; 5,0; 4,5)	3,37±0,18* (3,17; 3,53; 3,4)
Осельтамивир, п/о, 10 мг/кг	2/10 (p=0,150)	20	5,7±0,3 (5,5; 5,5; 6)	5,7±0,14 (5,86; 5,64; 5,61)
Тилорон, п/о, 15 мг/кг	2/10 (p=0,150)	20	6,3±0,6 (7; 6; 6)	5,52±0,11 (5,54; 5,4; 5,61)
Осельтамивир, п/о, 20 мг/кг + цефуроксим, п/о, 20 мг/кг	10/10	100	— (не выявлено)	— (не выявлено)
Осельтамивир, п/о, 20 мг/кг + амоксициллин, п/о, 20 мг/кг	2/10 (p=0,150)	20	5,8±0,3 (5,5; 6; 6)	5,62±0,05 (5,72; 5,67; 5,62)
Тилорон, п/о, 15 мг/кг + цефуроксим, п/о, 20 мг/кг	8/10 (p=0,001)	80	— (не выявлено)	— (не выявлено)
Тилорон, п/о, 15 мг/кг + амоксициллин, п/о, 20 мг/кг	2/10 (p=0,150)	20	6,2±0,3 (6; 6; 6,5)	5,5±0,11 (5,5; 5,58; 5,68)

Продолжение таблицы 12

Группа	Выживаемость		Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /0,1 мл	Содержание бактерий, lg КОЕ/мл
	Жив./общ.	%		
Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S.aureus</i>	0/10	0	6,7±0,6 (7; 7; 6)	5,5±0,1 (5,54, 5,65; 5,7)

Примечание: * — $p < 0.05$. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

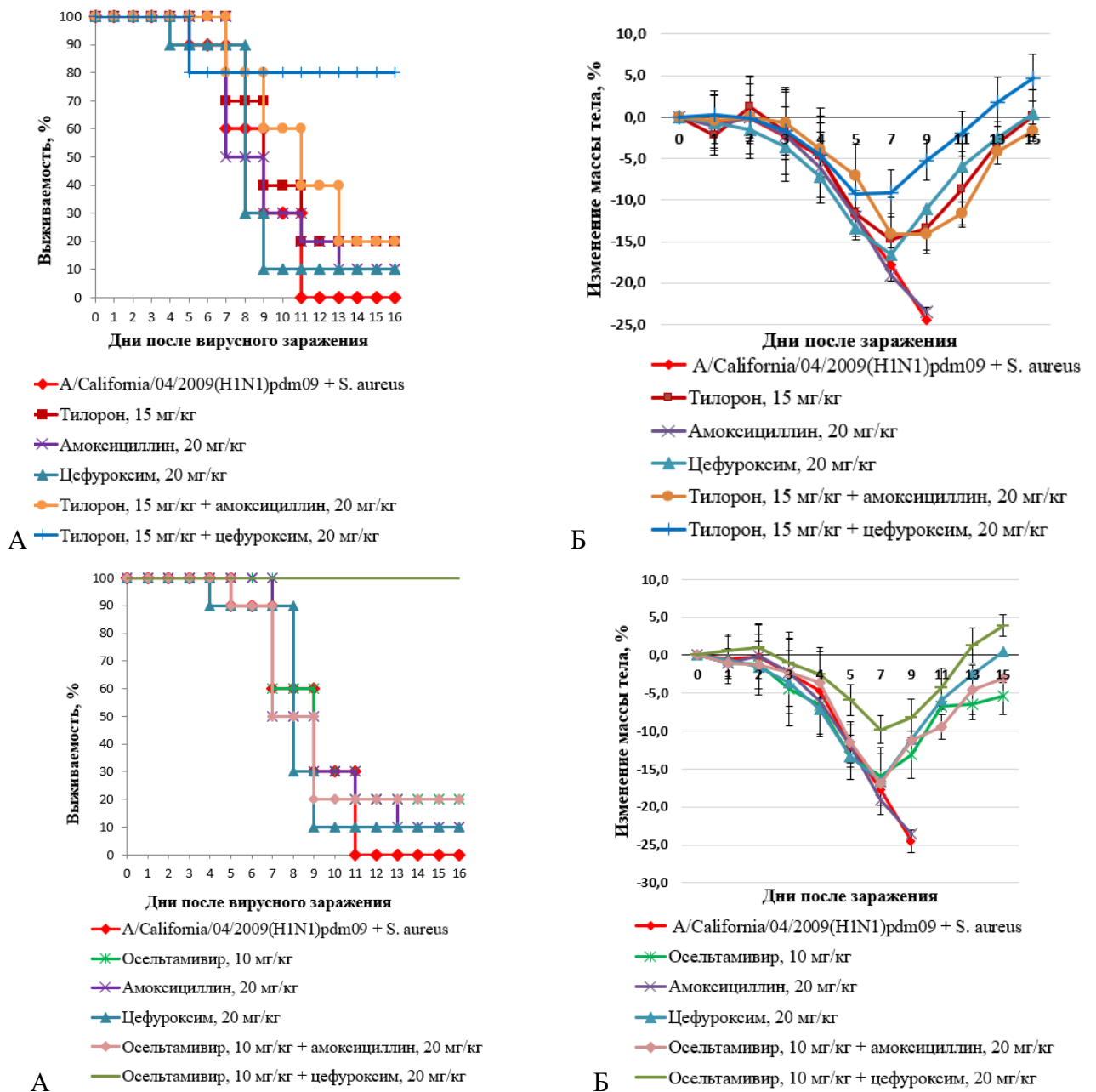


Рисунок 15 — Выживаемость мышей (А) и изменение массы тела (В) при лечении тилоронем и осельтамивиром на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции у мышей

Таким образом, комбинированная терапия тилороном с антибактериальным препаратом цефуроксимом была эффективнее, чем терапия каждым препаратом отдельно. Комбинация тилорона с цефуроксимом позволила снизить дозу тилорона, увеличив при этом эффективность.

Материалы раздела 3.2.5 опубликованы в [50].

3.3 Изучение эффективности противогриппозных вакцин на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

3.3.1 Эффект вакцинации живой и инактивированной противогриппозными вакцинами на развитие осложнений и исход заболевания на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции

В последние годы все более широкое распространение в мире получают живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ). Несмотря на преимущества современных живых гриппозных вакцин (ЖГВ), таких как высокая эффективность, способность формировать перекрёстную защиту против антигенно дрейфующих вариантов вируса гриппа, а также возможность неинвазивного интраназального введения, вопросы их безопасности и влияния на течение вторичных бактериальных инфекций продолжают оставаться предметом дискуссии [17]. Опасения вызывает, в частности, факт, что гриппозная инфекция может способствовать увеличению количества бактерий в назофарингеальном тракте животных и человека, повышая риск инфицирования бактериальными патогенами верхнего и нижнего респираторных трактов с дальнейшим развитием заболевания [59, 193]. Это вызывает вопрос о потенциальной опасности, поскольку интраназальная иммунизация живой гриппозной вакциной также может приводить к усилению бактериального роста в назофарингеальном тракте с последующей трансмиссией в лёгкие [184].

С использованием разработанной модели был изучен возможный провоцирующий эффект интраназального введения живой вакцины на основе холодаадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа A/17/California/2009/38 на развитие вторичной бактериальной инфекции и исход заболевания при заражении сублетальной дозой *S. pneumoniae* после инфицирования вирусом гриппа в сравнении с инактивированной вакциной. Животные одной экспериментальной группы были вакцинированы живой противогриппозной вакциной, а другой — субъединичной вакциной; животных контрольной группы вакцинировали стерильным фосфатно-солевым буфером. В качестве ЖГВ использовали холодаадаптированный вакцинный штамм вируса гриппа A/17/California/2009/38, а в качестве инактивированной — концентрат субъединиц (КСЕ) вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (моновакцина H1N1). Через 21 день проводили заражение сублетальной (10^5 ТЦИД₅₀/0,1 мл) дозой A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *S. pneumoniae* (25×10^6 КОЕ/мл), что приводило к развитию эффекта вирусно-бактериального синергизма. (Рисунок 16).

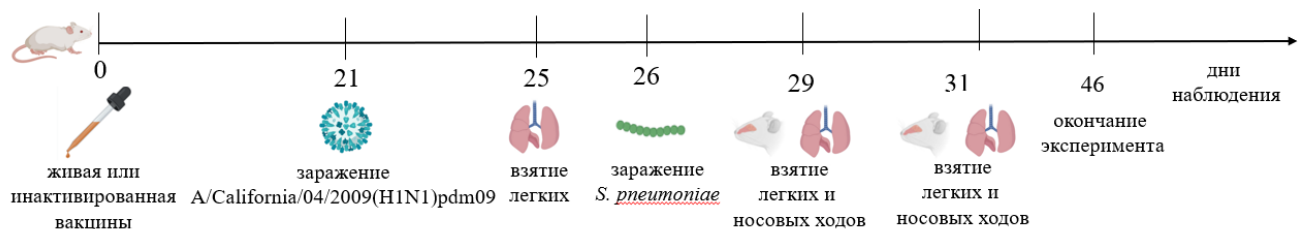


Рисунок 16 — Схема эксперимента по изучению эффекта вакцинации живой и инактивированной противогриппозными вакцинами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

При изучении эффекта вакцинации живой и инактивированной противогриппозными вакцинами на развитие осложнений и исход заболевания на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, установлено, что в группе мышей, заражённых вирусом гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *S. pneumoniae*, наблюдалась полная гибель животных.

Все животные, предварительно вакцинированные обеими исследуемыми вакцинами и заражённые затем вирусом гриппа и *S. pneumoniae*, выжили (Рисунок 17).

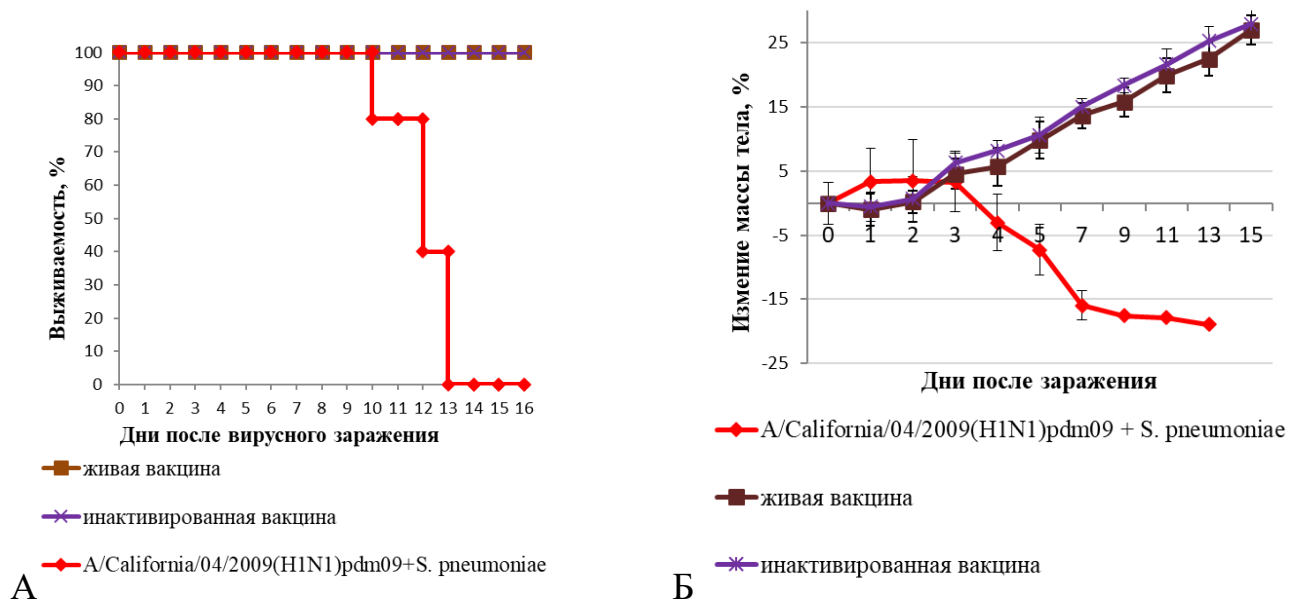


Рисунок 17 — Выживаемость (А) и изменение массы тела (Б) мышей, иммунизированных живой и инактивированной гриппозными вакцинами и последовательно инфицированных вирусом гриппа и *S. pneumoniae*

В группах мышей, вакцинированных холодоадаптированным вакцинным штаммом вируса гриппа A/17/California/2009/38 или концентратом субъединиц (КСЕ) штамма вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (моновакцина H1N1) масса тела не снижалась, наблюдался стабильный набор в течение всего эксперимента. Контрольная группа невакцинированных животных продемонстрировала стабильную потерю массы тела на протяжении всего эксперимента, что свидетельствует о наличии патологического процесса (Рисунок 18).

Титр вируса в легких в контрольной группе был $4,5 \pm 2,3$ lg ТЦИД₅₀/мл, в то время как в образцах легких, полученных от животных, вакцинированных обеими вакцинами, выделения вируса из лёгких мышей не наблюдали.

Бактериальную обсемененность в носоглоточных смывах и лёгких у мышей определяли на 3-и и 5-е сутки после инфицирования культурой *S. pneumoniae*. Рост количества колоний в лёгких на 3-и сутки в образцах всех исследуемых групп был

в диапазоне от 3-5 lg КОЕ50/мл (Таблица 13). В группах, иммунизированных обоими вакцинными препаратами, отмечено снижение количества бактерий из носовых смывов по сравнению с группой контроля. Так, в группе мышей, иммунизированных как ЖГВ, так и инактивированной вакциной, количество колоний составило $3,6 \pm 0,2$ и $3,2 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл соответственно, а в контрольной группе $4,7 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл.

На 5-е сутки после бактериального заражения материал носовых смывов и гомогенатов лёгких, полученный от групп животных, иммунизированных обеими вакцинами, не имел признаков бактериального роста. При этом, в образцах гомогенатов лёгких, полученных от животных контрольной группы, наблюдалось увеличение бактериальной обсеменённости на 2 lg КОЕ/мл по сравнению с показателями 3-х суток, что свидетельствует о развитии вторичной бактериальной пневмонии в нижних дыхательных путях. Одновременно во всех группах на 5-е сутки наблюдалась элиминация *S. pneumoniae* из верхнего респираторного тракта. Несмотря на высокую бактериальную обсеменённость носовых смывов и легких животных бактериями, при иммунизации обеими вакцинами на 3 день была высока, у мышей, иммунизированных холодоадаптированным штаммом ЖГВ, размножение вируса в легких не наблюдалось, что позволяет сделать вывод о том, что вакцинация холодоадаптированным штаммом вируса гриппа не способствует усилению бактериальной инфекции (Таблица 13).

На модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной последовательным заражением штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. pneumoniae*, изучен эффект интраназальной вакцины холодоадаптированного аттенуированного штамма вируса гриппа A/17/California/2009/38 и инактивированной вакцины, представляющей собой концентрат субъединиц вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (моновакцина H1N1), на развитие и исход заболевания. Показано, что вакцины предотвращали развитие инфекции в нижних отделах респираторного тракта, а применение живой вакцины не усиливало бактериальную инфекцию.

Материалы раздела 3.4.1 опубликованы в [5].

Таблица 13 — Выживаемость, титр вируса и содержание бактерий (среднее значение $\pm$ SD) в дыхательных путях мышей при вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, при иммунизации холодаадаптированным штаммом вируса гриппа и инактивированной вакциной

Группы	Выживаемость, %		Титр вируса в легких, lgТЦИД50/мл		Обсеменённость <i>S. pneumoniae</i> после бактериального заражения, lgКОЕ/мл			
					гомогенат легких		носовые смывы	
	Жив./общ.	%	4 д.в.* / 0 д.б.**	7 д.в. / 3 д.б.	7 д.в. / 3 д.б.	11 д.в. / 5 д.б.	7 д.в. / 3 д.б.	11 д.в. / 5 д.б.
Контроль A/California/04/2009 (H1N1)pdm09 + <i>S. pneumoniae</i>	0/10	0	4,5±2,3 (5,3; 2; 6,3)	6,2 ± 2,3 (7,5; 7,5; 3,5)	4,6 ±0,2 (4,5; 4,8; 4,5)	6,1±0,2 (6; 6; 6,3)	4,7±0,1 (4,6; 4,7; 4,8)	0
Живая вакцина	10/10	100	0	0	4,4±0,1 (4,5; 4,5; 4,3) p>0,05	0	3,6±0,2 (3,7; 3,7; 3,4) p>0,05	0
Инактивированная вакцина	10/10	100	0	0	4,3±0,2 (4,5; 4,3; 4,2) p>0,05	0	3,2±0,1 (3,2; 3,2; 3,3) p>0,05	0

Примечание: *д.в. — день от вирусного заражения; **д.б. — день от бактериального заражения. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

3.3.2 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих белки вируса гриппа, на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Противогриппозные вакцины способны предотвращать вторичные бактериальные инфекции за счёт подавления первичной вирусной инфекции. Однако их ограниченная перекрёстная протективная активность не обеспечивает защиту от антигенно отличающихся штаммов вируса гриппа, что способствует развитию трудно поддающихся терапии бактериальных осложнений и обуславливает необходимость постоянного обновления вакцин.

Один из инновационных подходов к вакцинации — использование вирусоподобных частиц (VLPs), представляющих собой копию вирусной оболочки, не содержащую генетического материала и используемую в качестве платформы для разработки противогриппозных вакцин. Такие вакцины благодаря скорости изготовления могут решить проблему своевременного появления вакцин против быстро мутирующего вируса гриппа. Кроме того, использование VLPs может помочь выявить роль отдельных белков в патогенезе инфекции.

3.3.2.1 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Гемагглютинин вируса гриппа — поверхностный белок, играющий ключевую роль в прикреплении вируса к клеткам респираторного эпителия назофарингеального тракта. В данном эксперименте мы изучали VLPs, несущие гемагглютинин (НА). Заражение проводили штаммами вируса гриппа, как антигенно идентичным (гомологичное заражение), так и антигенно отличным (гетерологичное заражение) от вируса, входящего в состав VLPs, что имитирует

ситуацию несовпадения циркулирующих штаммов с вакцинными. Для бактериального заражения использовали *S. pneumoniae* и *S. aureus* №884.

Препараты вирусоподобных частиц были сконструированы, наработаны и охарактеризованы Miriam Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna). Была разработана технология получения вакцинного препарата VLPs с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего вирусоподобные частицы при заражении клеток насекомых Tnao42, при этом источником геномных последовательностей белков вируса гриппа служил штамм A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). Исследуемые VLPs были образованы комбинацией ретровирусного Gag белка и HA вируса гриппа (далее HA-VLPs), полученного на основе штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). HA-VLPs были наработаны в виде очищенного от инфекционного бакуловируса препарата с содержанием антигена HA 1 мкг/мл.

В предварительных экспериментах было установлено, что иммунизация животных VLPs на основе Gag ретровируса без гемагглютинина (HA) вируса гриппа не приводила к появлению титра антител, специфичных к антигенам вирусам гриппа. Поэтому в дальнейших экспериментах для иммунизации, в качестве контрольного препарата, использовался стерильный фосфатный солевой буферный раствор (ФСБ).

Для изучения эффекта вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин вируса гриппа, исследовали антигенную и протективную активность HA-VLPs, а также влияние на патоморфологические характеристики лёгких мышей.

Изучали антигенную и протективную активность одной дозы препаратов HA-VLPs 0,05 мкг/мышь, при двух схемах вакцинации: однократной (1X) и двукратной (2X). Препараты HA-VLPs и используемый в качестве плацебо ФСБ вводили в объеме 0,2 мл внутривентрально. На 14-й день после первой иммунизации мышей повторно вакцинировали препаратами VLPs, за исключением животных контрольных групп, которым вводили стерильный ФСБ. Через 21 день после второй иммунизации у 3 мышей из каждой группы брали пробы крови для определения антигенной активности в реакции торможения гемагглютинации

(РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА). В этот же день мышей инфицировали интраназально (объем 0,03 мл, доза 0,5 МЛД50/мл) вирусосодержащей аллантоисной жидкостью штаммами вируса гриппа А: гомологичным A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (100×10^7 ЭИД50/0,1 мл) или антигенно отличным (гетерологичным) реассортантом NIBRG-121xp (A/California/04/2009(H1N1)pdm09 X A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (2:6), содержащего поверхностные белки HA и NA от вируса A/California/04/2009(H1N1)pdm09 (1000×10^7 ЭИД50/0,1 мл), а внутренние белки от A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). На 4 сутки после вирусного заражения 3 животных из каждой группы эвтаназируют, у них забирали легкие и определяли инфекционный титр вируса путем титрования гомогенатов тканей в аллантоисной полости 9-дневных РКЭ. На 5 день после вирусного заражения мышей инфицировали в объеме 0,05 мл интраназально *S. pneumoniae* №3405 в дозе $2,5 \times 10^7$ КОЕ/мл или *S. aureus* №884 в дозе 2×10^{10} КОЕ/мл. В группах вирусного и бактериального контроля животных инфицировали отдельно соответствующими дозами вирусов или бактерий в те же промежутки времени и в тех же дозах, что и при комбинированном заражении. На 8 сутки после вирусного заражения у 3 животных из каждой группы отбирали легкие, для определения инфекционного титра вируса и бактериальной обсемененности. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после вирусного заражения, измеряя массу тела один раз в два дня (Рисунок 18).

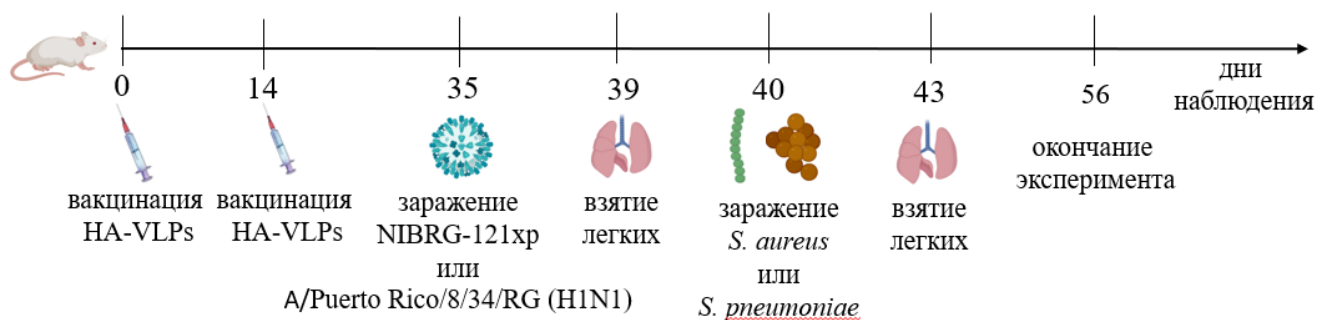


Рисунок 18 — Схема опыта по изучению антигенной и протективной активности HA-VLPs

Защитную (протективную) активность HA-VLPs оценивали по увеличению выживаемости, динамике изменения массы тела и содержанию патогенов в легких (титра вируса в легких на 4 и 8 дни после вирусного заражения, а содержание бактерий на 8 день).

Изучение иммуногенной активности HA-VLPs на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции. Для оценки иммуногенной активности в сыворотках крови определяли титры сывороточных антигемагглютинирующих антител РТГА с 4 агглютинирующими единицами соответствующего вирусного антигена.

Наличие антительного ответа в сыворотке крови в реакции РТГА (функциональные антитела) и ИФА с определением общего количества специфических IgG к HA вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) или гетерологичного штамма NIBRG-121xp (H1N1) показало, что препараты VLPs, обладали способностью стимулировать выработку сывороточных антител, специфичных к HA гомологичного вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), но не вызывали индукцию антительного ответа, определяемого в РТГА, к гетерологичному штамму (Таблица 14). Увеличение кратности вакцинации увеличивало выработку антител. Результаты ИФА подтверждали выводы, сделанные при постановке РТГА (Таблица 14).

Таблица 14 — Антигенная активность вирусоподобных частиц HA-VLPs при различной кратности вакцинации

Препарат, схема введения	Средний титр антител		
	РТГА*		ИФА **
	A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)	NIBRG-121xp)	A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)
HA-VLPs 0,5 мкг/мышь (1х)	35,6	<10	270
HA-VLPs 0,5 мкг/мышь (2х)	71,3	<10	810
Примечание: * средний арифметический титр антител к HA соответствующих вирусов, определенный в реакции торможения геагглютинации (РТГА); ** средний арифметический титр антител к HA вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), определенный методом ИФА; в каждой группе исследовали 5 сыворотки от 5 животных.			

Таким образом, препарат VLPs обладал иммуногенностью в отношении гомологичного штамма и не вызывал продукцию антител по отношению к гетерологичному штамму.

Изучение протективной активности HA-VLPs на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции. Эксперименты по определению протективной (защитной) активности VLPs проводились с использованием одно- и двукратных схем иммунизации. Было показано, что препарат HA-VLPs в дозе 0,05 мкг/мышь обеспечивал полную защиту мышей от заражения гомологичным вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и последующей суперинфекции бактериальными агентами *S. pneumoniae* и *S. aureus* независимо от кратности вакцинации. Животные были защищены от потери массы тела и размножения вирусных и бактериальных агентов в легочной ткани. При заражении гетерологичным вирусным штаммом NIBRG-121хр иммунизация мышей HA-VLPs приводила только к частичному защитному эффекту. Так, однократная вакцинация обеспечивала 13% выживаемость мышей после суперинфекции *S. pneumoniae*, а двукратная иммунизация повышала выживаемость животных до 25%. При этом двукратная иммунизация имела способствовала снижению бактериального роста в легких мышей, практически не влияя на вирусную репродукцию, потенцируемую бактериальной суперинфекцией. При проведении бактериального заражения *S. aureus* после инфекции вирусом NIBRG-121хр защитный эффект был более выражен, достигая 57% по сравнению с 25% в группе не вакцинированных животных. Результаты, свидетельствующие о протективной активности препаратов в отношении вторичной бактериальной инфекции, представлены в Таблицах 15–18 и на Рисунках 19–20.

Таблица 15 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий в легких при вакцинации HA-VLPs на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции гомологичным вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)

Вакцинация	Выживаемость, %		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество <i>S. pneumoniae</i> , lg КОЕ/мл
	Жив./общ.	%	4 сут.*	8 сут. *	
1X	10/10	100	0	0	0
2X	10/10	100	0	0	0
Контроль A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	0/10	0	3,6±0,3 (3,6; 3,3; 3,8)	8,2±0,3 (8,2; 7,9; 8,5)	7,8±0,6 (8; 7,2; 8,3)

Примечание: *после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 16 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий в легких при вакцинации HA-VLPs на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции гомологичным вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)

Вакцинация	Выживаемость, %		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество <i>S. aureus</i> , lg КОЕ/мл
	Жив./общ.	%	4 сут.*	8 сут. *	
1X	10/10	100 ($p=0,002$)	0	0	0
2X	10/10	100 ($p=0,002$)	0	0	0
Контроль A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + <i>S. aureus</i>	3/10	30	3,6±0,3 (3,6; 3,3; 3,9)	6,7±0,8 (6; 7,5; 6,5)	2,7±0,4 (2,7; 2,3; 3)

Примечание: *после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 17 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий в легких при вакцинации HA-VLPs, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции вирусом NIBRG-121xp (H1N1)

Вакцинация	Выживаемость, %		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество <i>S. pneumoniae</i> , lgKOE/мл
	Жив./общ.	%	4 сут.*	8 сут. *	
1X	1/8	13 (p=0,37)	3,3±0,8 (3,5; 4; 2,5) p>0,05	6,2±0,3 (6; 6,5; 6) p>0,05	2,2±0,5 (1,7; 2,2; 2,6) p=0,05
2X	2/8	25 (p=0,18)	3,0±0 (3; 3; 3) p>0,05	5,0±0 (5; 5; 5) p>0,05	0
Контроль NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S.pneumoniae</i>	0/8	0	3,8±0,8 (3,5; 4,7; 3,2)	5,3±0,5 (4,7; 5,6; 5,5)	7,8±0,7 (7,8; 8,5; 7,2)
Примечание: *после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Таблица 18 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий (среднее значение ± SD) в легких при вакцинации HA-VLPs, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции вирусом NIBRG-121xp (H1N1)

Вакцинация	Выживаемость, %		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество <i>S. aureus</i> , lgKOE/мл
	Жив./общ.	%	4 сут.*	8 сут. *	
1X	2/8	25 (p=1)	3,3±0,8 (3,3; 3,5; 4) p>0,05	6,0 (6; 6; 6) p>0,05	2,7±0,3 (2,5; 2,7; 3) p>0,05
2X	4/8	50 (p=0,33)	3,0±0 (3; 3; 3) p>0,05	6,3±0,5 (6; 6; 6,8) p>0,05	2,5±0,5 (2; 2,5; 3) p>0,05
Контроль NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. aureus</i>	2/8	25	3,8±0,8 (3; 4; 4,5)	6,2±0,3 (6; 6; 6,5)	3,0±0 (3; 3; 3)
Примечание: *после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Данные по протективной активности коррелировали с результатами изучения иммуногенности препарата, проведенными с использованием реакции торможения

гемагглютинации РТГА и ИФА. Препараты HA-VLPs обладали способностью стимулировать выработку сывороточных антител специфичных к HA гомологичного вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), но не вызывали индукцию антительного ответа, определяемого в РТГА, к гетерологичному штамму.

Таким образом, препарат VLPs обладал высоким защитным потенциалом в отношении гомологичного штамма, а в отношении гетерологичного штамма его эффективность была значительно ниже (Рисунки 19–20).

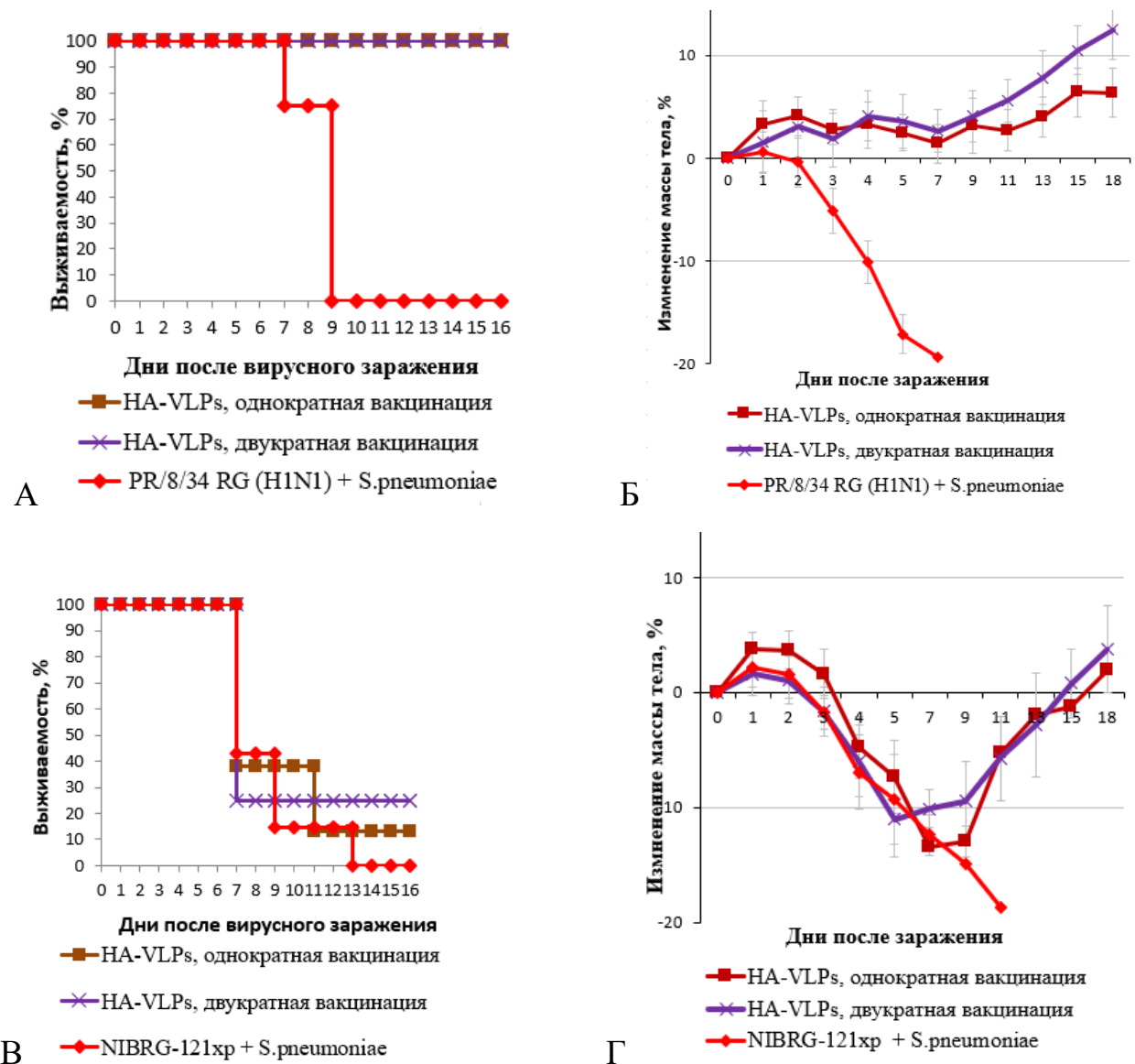


Рисунок 19 — Влияние вакцинации HA-VLPs на выживаемость (А, В) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (Б, Г) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae*, после инфицирования гомологичным A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (А, Б) и гетерологичным NIBRG-121xp (H1N1) (В, Г) вирусами гриппа

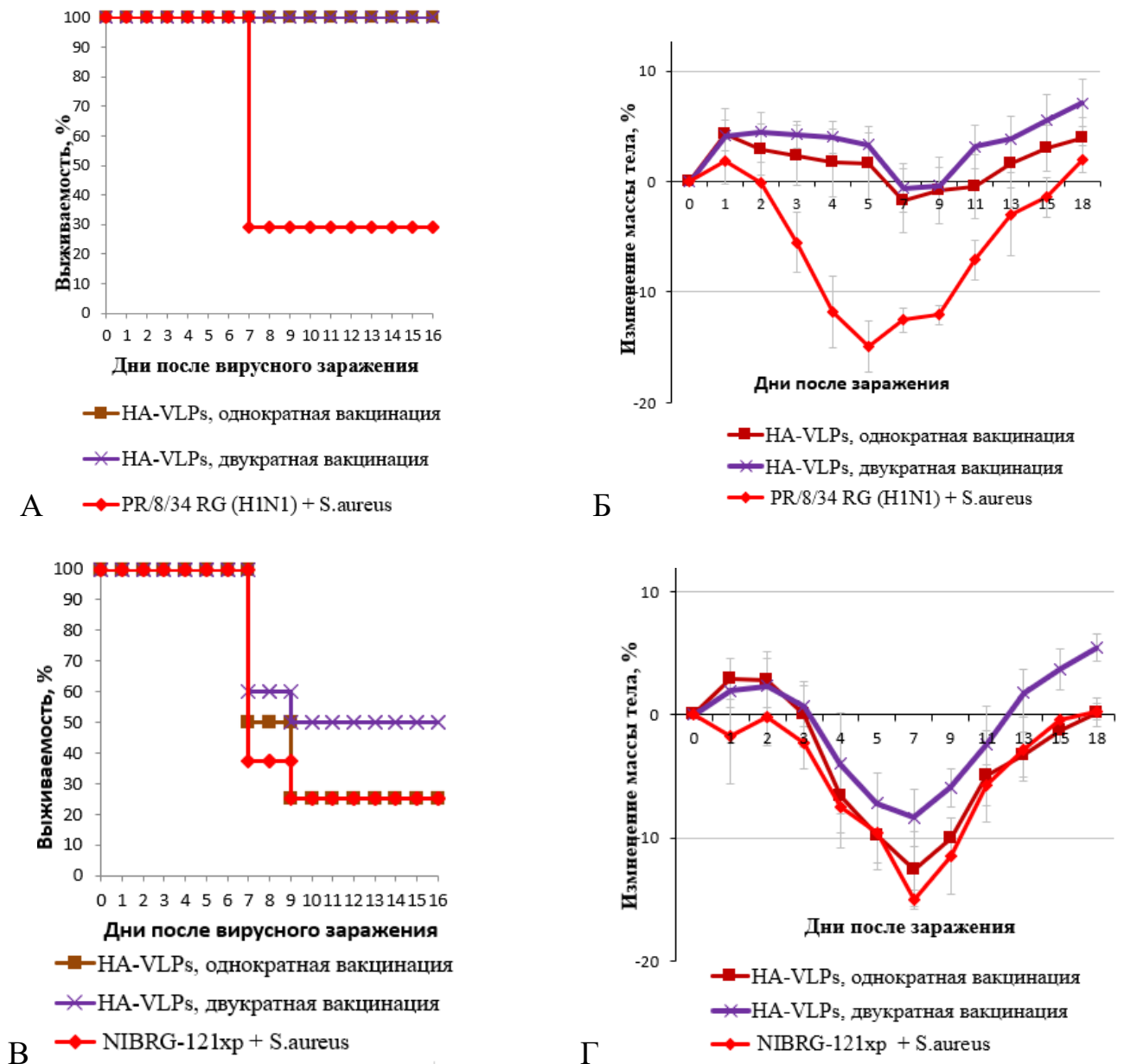


Рисунок 20 — Влияние вакцинации HA-VLPs на выживаемость (А, В) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (Б, Г) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после инфицирования гомологичным A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (А, Б) и гетерологичным NIBRG-121xp (H1N1) (В, Г) штаммами вируса гриппа

Эффект вакцинации препаратами VLPs на патоморфологические характеристики лёгких на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции. Исследования, в том числе экспериментальные, посвящённые изучению эффекта вакцинации на развитие вторичных бактериальных пневмоний после гриппозной инфекции, ограничены. Особенно малочисленны патоморфологические исследования,

отражающие состояние лёгких и патологический процесс в них, а также изучение их взаимосвязи с остальными маркерами заболевания. Так, в исследовании, проведённом Y. Desheva и соавт., использование живой противогриппозной вакцины у животных, инфицированных вирусом гриппа с последующим заражением *S. pneumoniae*, позволило сохранить морфологическую структуру лёгких и уменьшило, хотя и не предотвращало полностью, их повреждение [190]. Поэтому в данном эксперименте была исследована взаимосвязь патоморфологических изменений лёгких с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания при вакцинации VLPs. Для исследования отбирали легкие невакцинированных мышей и мышей, однократно вакцинированных HA-VLPs, а затем инфицированных A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae* или NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*.

Полученные на 6-й день после вирусного заражения лёгкие мышей фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина, выполняли гистологическую проводку и изготавливали срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологические изменения лёгких оценивали количественно по относительной площади очагов воспаления, которые представляли собой очаги бронхопневмонии и микроабсцессы.

При морфологическом исследовании лёгких неинфицированных интактных мышей патологических изменений не выявлено: просветы бронхов были свободны, эпителиальная выстилка бронхов не нарушена; альвеолы различных размеров и форм; межальвеолярные перегородки тонкие, их сосуды и капилляры неравномерно полнокровные.

При исследовании в лёгких всех инфицированных мышей были выявлены очаги бронхопневмонии (Рисунки 21–22). В просветах бронхов, локализованных в зонах пневмонических очагов, определялся экссудат из нейтрофилов и небольшого числа макрофагов; эпителиальная выстилка бронхов была очагово нарушена; в стенках бронхов и прилежащем к ним респираторном отделе наблюдали воспалительную инфильтрацию из нейтрофилов и небольшого количества макрофагов и лимфоцитов. Несмотря на перечисленные изменения, степень их

выраженности у инфицированных животных различалась в зависимости от штамма вируса и предварительной вакцинации HA-VLPs. Влияние двух штаммов вируса гриппа на морфологические изменения в лёгких различалось. У животных контрольной группы при инфицировании A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, выявлены наиболее тяжёлые и распространённые воспалительные изменения, представляющие собой обширную очаговую пневмонию. Кроме того, у 3 из 5 животных были выявлены множественные микроабсцессы. В контрольной группе мышей, при инфицировании A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae* относительная площадь воспалительных очагов была такой же, однако в отличие от животных, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, единичные микроабсцессы выявлены только у одного животного.

По данным морфометрического исследования, в группе мышей, вакцинированных HA-VLPs и инфицированных гомологичным вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления была минимальной (Таблица 19, Рисунки 21–22), этот показатель был статистически значимо меньше, чем в остальных группах. Тем не менее, у части мышей в этой группе выявлены очаги бронхопневмонии, и у одного животного обнаружены микроабсцессы.

Напротив, в группе мышей, вакцинированных HA-VLPs и инфицированных гетерологичным вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления статистически значимо не отличалась от таковой в контрольных невакцинированных группах, при инфицировании вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) или вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) с последующим инфицированием *S. pneumoniae*. У всех мышей в лёгких выявлена очаговая бронхопневмония, а у части — множественные микроабсцессы. В этой группе относительная площадь очагов воспаления в лёгких была статистически значимо больше, чем у мышей, инфицированных A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae* с предварительной вакцинацией HA-VLPs (Таблица 19).

Таблица 19 — Эффект вакцинации HA-VLPs на относительную площадь очагов воспаления в лёгких мышей

Экспериментальные группы		Относительная площадь очага воспаления			
Инфицирование	Вакцинация	Valid N	Медиана	L 25%*	U 75%*
A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-VLPs	22	33,79	19,94	46,91
	Без вакцинации	14	59,34	50,86	73,86
A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-VLPs	19	47,55	19,62	89,82
	Без вакцинации	20	70,56	23,56	89,58
Экспериментальные группы		Сравнение площади очага воспаления			
Инфицирование	Вакцинация	A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>		A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	
		HA-VLPs	Без вакцинации	HA-VLPs	Без вакцинации
A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-VLPs	—	0,005	0,017	0,004
	Без вакцинации	0,005	—	0,911	—
A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-VLPs	0,017	0,911	—	0,986
	Без вакцинации	0,004	0,986	0,984	—

Примечания: L 25% — нижний квартиль; U 75% — верхний квартиль.
 * критерий Краскела-Уоллиса с последующими множественными сравнениями по Данну, различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ (с учетом поправки Бонферрони).

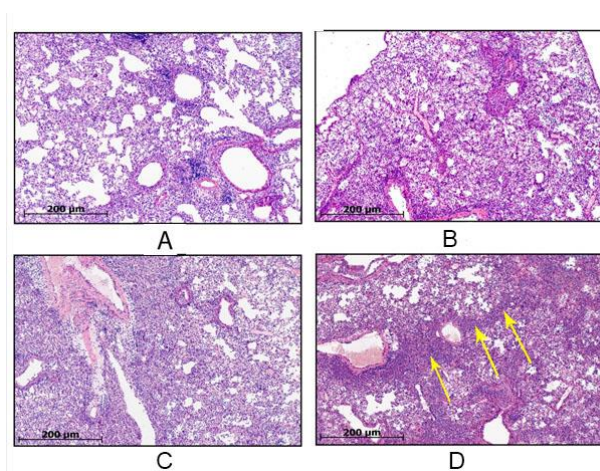


Рисунок 21 — Морфологические изменения в лёгких мышей (увеличение $\times 200$, окраска гематоксилином и эозином). А — очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, единичные микроабсцессы; В — очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких; С — обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких, микроабсцессы; D — обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, множественные микроабсцессы (указаны стрелкой)

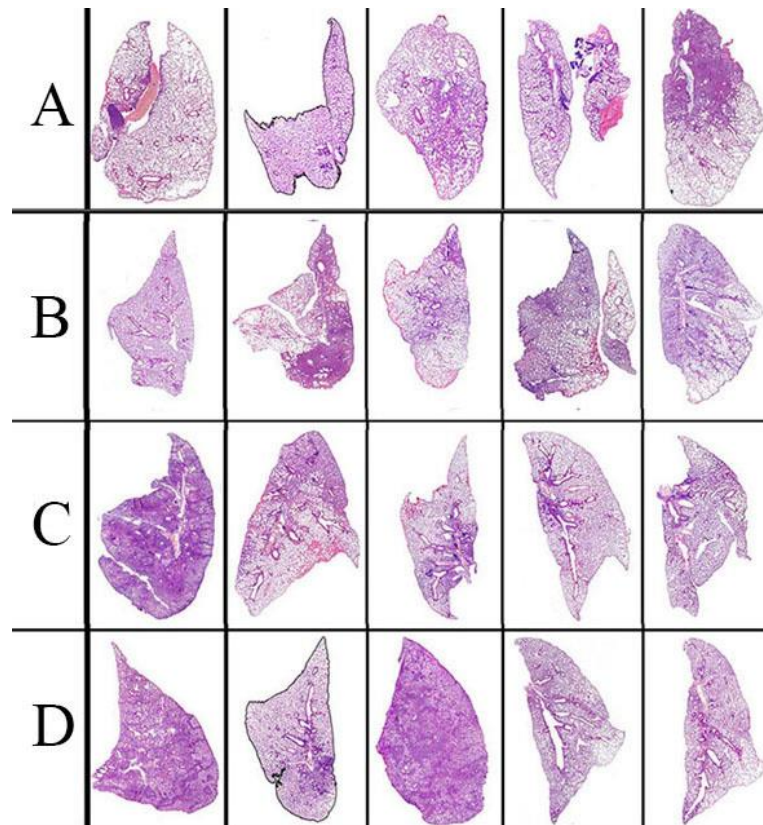


Рисунок 22 — Воспалительная инфильтрация в лёгких мышей. А — лёгкие мышей, вакцинированных HA-VLPs, инфицированных A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae*; В — лёгкие мышей, инфицированных A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) + *S. pneumoniae*; С — лёгкие мышей, вакцинированных HA-VLPs, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*; D — лёгкие мышей, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*

Полученные в нашем исследовании патоморфологические данные совпадают с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания. Показано, что иммунизация HA-VLPs предотвращала репродукцию гомологичного вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), и, как следствие, способствовала снижению бактериальной нагрузки *S. pneumoniae* и статистически значимо уменьшала площади очагов воспаления и воспалительной инфильтрации в лёгких мышей после бактериального заражения. Патоморфологические исследования лёгких показали, что, хотя относительная площадь очагов воспаления в лёгких мышей после бактериального заражения в этой группе была наименьшей по сравнению с другими, тем не менее выявлялись очаги бронхопневмонии и микроабсцессы. Данная патология развивалась при низких титрах бактериальной нагрузки и, по-видимому, была связана с прямым

повреждающим действием бактериальной инфекции. Иммунизация HA-VLPs не защищала мышей от репродукции вируса A/NIBRG-121хр и не предотвращала провоцирующее действие гетерологичной гриппозной инфекции на развитие бактериальной пневмонии с высокими показателями микробной нагрузки.

Таким образом, разработанная экспериментальная модель позволяет изучать влияние вакцинации VLPs, содержащими гемагглютинин, на клинические, вирусологические, микробиологические и патоморфологические маркеры заболевания.

Материалы раздела 3.4.2 опубликованы в [18, 24, 49, 198, 208, 253].

3.3.2.2 Изучение эффекта вирусоподобных частиц, содержащих нейраминидазу вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции

Следующий этап работы был направлен на исследование возможности коррекции иммунного ответа путем добавления NA к HA с использованием вирусоподобных частиц (VLPs), несущих гриппозные антигены в сочетании с капсидным белком негриппозной природы. Исследование было проведено на уже разработанной экспериментальной модели стафилококковой и пневмококковой бактериальной пневмонии у мышей после гриппозной инфекции, имитирующей ситуацию несоответствия вакцины и циркулирующего гриппозного штамма. Применение данной модели у животных, иммунизированных комбинациями препаратов VLPs в различных количественных соотношениях, позволит выявить индивидуальную роль вирусных антигенов HA и NA в развитии протективного иммунного ответа против вторичной бактериальной инфекции, а также установить оптимальные количественные параметры присутствия этих антигенов в составе будущих гриппозных вакцин.

Изучение протективной активности коктейля VLPs, содержащего гемагглютинин (HA-VLPs) и нейраминидазу (NA-VLPs) на экспериментальной модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции. Целью этой части исследования стало изучение протективной активности коктейля VLPs, содержащего белки вируса гриппа гемагглютинин (HA-VLPs) и нейраминидазу (NA-VLPs), при различных соотношениях компонентов у иммунизированных животных на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. aureus* или *S. pneumoniae* после гриппозной инфекции, вызванной только гетерологичным штаммом NIBRG-121хр.

Перед началом исследований мышей, самок линии BALB/с массой тела 12–14 г, распределяли по группам рандомизированно, количество животных в каждой группе было подобрано таким образом, чтобы для исследования выживаемости и контроля веса оставалось не менее 10 мышей.

Для иммунизации (однократно, внутрибрюшинно, в объеме 0,2 мл) использовали приготовленные непосредственно перед введением растворы, содержащие как коктейль вирусоподобных частиц (HA-VLPs + NA-VLPs) с различным содержанием в нем NA-VLPs, так и каждый компонент (HA-VLPs или NA-VLPs) отдельно. Коктейли VLPs готовили смешиванием двух видов частиц непосредственно перед введением. Содержание белков в 0,2 мл препаратов (на одну мышь) было следующее:

- HA-VLPs — 100 нг;
- NA-VLPs — 20 нг;
- коктейль HA-VLPs 100 нг + NA-VLPs 0,8 нг (низкая доза);
- коктейль HA-VLPs 100 нг + NA-VLPs 4 нг (средняя доза);
- коктейль HA-VLPs 100 нг + NA-VLPs 20 нг (высокая доза).

Животным контрольных групп вместо препаратов VLPs вводили по 0,2 мл стерильного ФСБ в соответствующие иммунизации сроки.

Через 21 день после вакцинации животных интраназально инфицировали вирусосодержащей аллантоисной жидкостью антигенно отличного штамма вируса гриппа NIBRG-121хр в объеме 0,03 мл (0,5 МЛД₅₀/мл, 1000х10⁷ ЭИД₅₀/0,1 мл).

Через 4 дня после заражения вирусом у 4 животных из каждой группы извлекали легкие для определения инфекционного титра вируса и эффекта вирусной нейраминидазы на эпителий легких гистологическим методом. На 5-й день после вирусного заражения оставшихся мышей инфицировали в объеме 0,03 мл интраназально *S. pneumoniae* №3405 в дозе 25×10^6 КОЕ/мл или *S. aureus* №884 в дозе 2×10^{10} КОЕ/мл. На 7-е сутки после вирусного заражения (3-й день после бактериального заражения) у 5 животных из каждой группы забирали легкие для определения инфекционного титра вируса путем титрования гомогенатов тканей на развивающихся куриных эмбрионах и бактериальной обсемененности. Наблюдение за животными проводили в течение 21 дня после вирусного заражения (Рисунок 23).

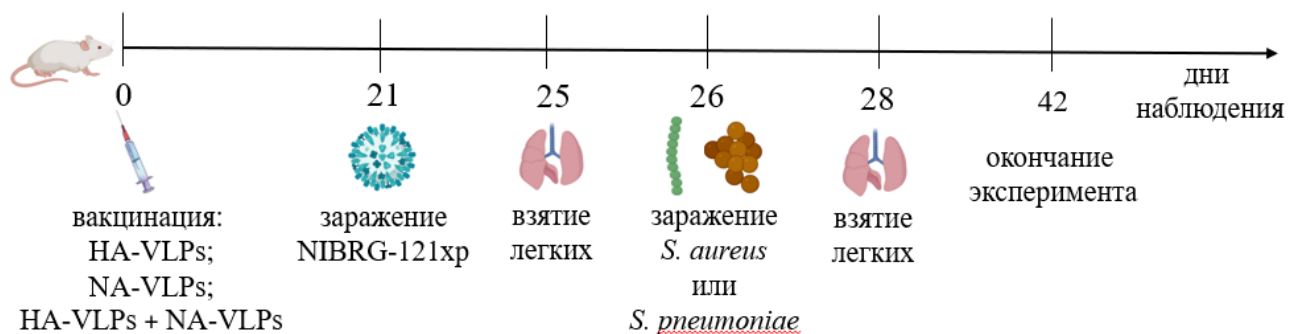


Рисунок 23 — Схема исследования антигенной и протективной активности VLPs, содержащих гемагглютинин и нейраминидазу

Изучение протективной активности препаратов HA-VLPs или их комбинации с NA-VLPs, взятыми в различных соотношениях, показало, что в контрольной группе невакцинированных животных, инфицированных соответствующими вирусами и бактериями (NIBRG-121xp + *S. pneumoniae*; NIBRG-121xp + *S. aureus*) наблюдалась полная гибель животных при снижении массы тела, при этом размножение вируса и бактерий в лёгких было наиболее интенсивным среди всех изученных групп. Данные, полученные при вакцинации VLPs, были сходны при инфицировании обоими бактериальными патогенами, *S. pneumoniae* и *S. aureus*. Полная гибель с большой потерей веса наблюдалась при вакцинации VLPs, содержащими только нейраминидазу (NA-VLPs), при последующем заражении

гетерологичным вирусом NIBRG-121хр и каждым из бактериальных патогенов. Несмотря на заражение гетерологичным вирусом, вакцинация VLPs, содержащими только гемагглютинин (HA-VLPs), защищала 40% животных от гибели, снижала потерю ими массы тела и размножение вируса и бактерий в легких при последующем заражении как *S. pneumoniae*, так и *S. aureus*. Коктейль VLPs с низким содержанием NA (HA-VLPs + NA-VLPs 0,8 нг) защищал 30% животных, увеличение содержания частиц с NA в коктейле приводило к увеличению выживаемости и при самом высоком из изученных содержании частиц с NA (HA-VLPs + NA-VLPs 20 нг) защита животных от гибели, снижение потери массы тела и подавление размножения патогенов в их легких были максимальными и превышали таковые у всех групп животных, инфицированных гетерологичным вирусом с последующей бактериальной инфекцией как *S. pneumoniae*, так и *S. aureus* (Таблицы 20–21, Рисунки 24–25).

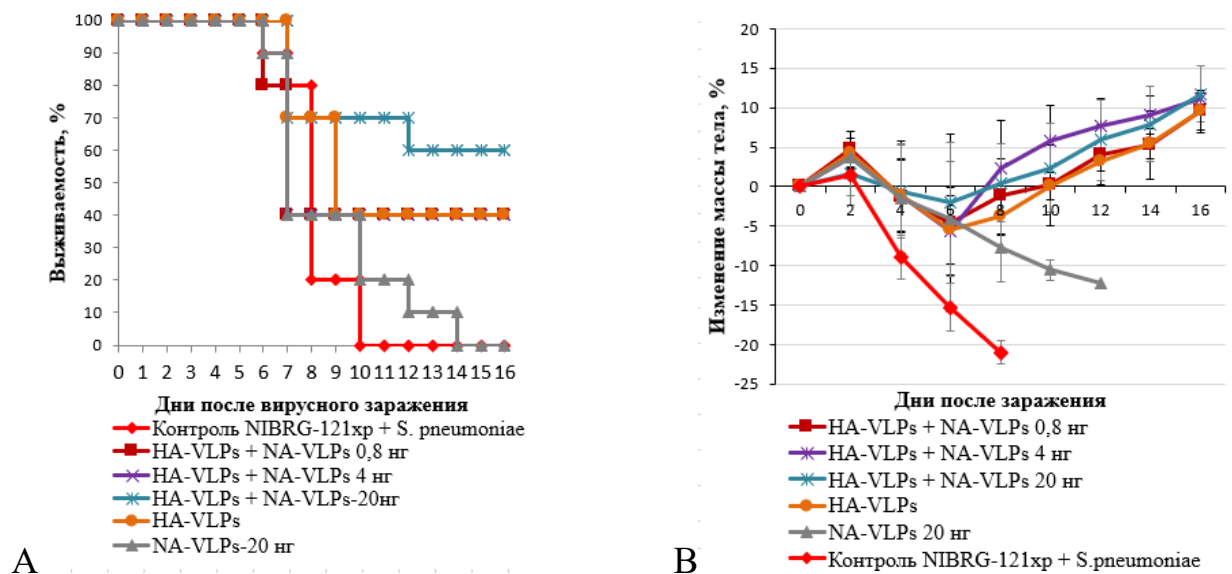


Рисунок 24 — Влияние вакцинации коктейлем HA-VLPs + NA-VLPs в разных дозах и каждым компонентом коктейля отдельно на выживаемость (А) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (В) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. pneumoniae*, после инфицирования гетерологичным NIBRG-121хр (H1N1) вирусом гриппа

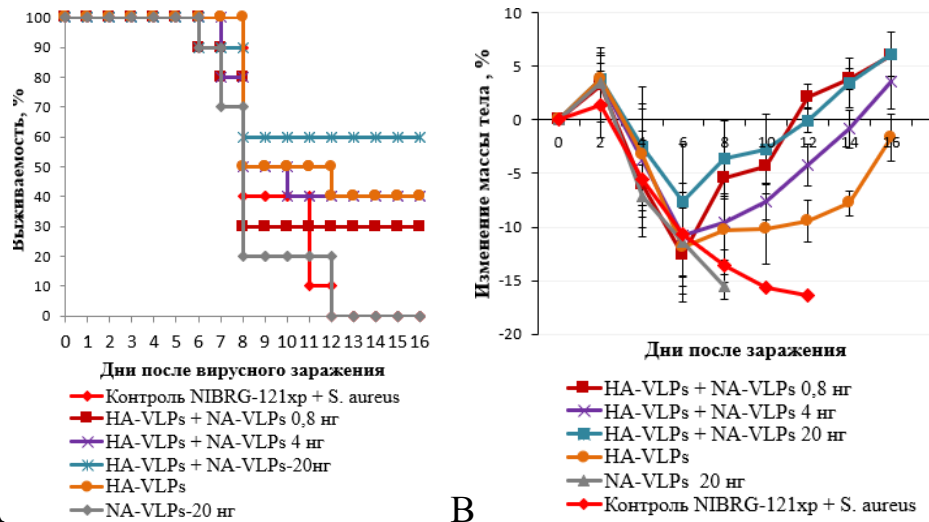


Рисунок 25 — Влияние вакцинации коктейлем HA-VLPs + NA-VLPs в разных дозах и каждым компонентом коктейля отдельно на выживаемость (А) и изменение массы тела (среднее значение $\pm$ SD) (В) животных на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus*, после инфицирования гетерологичным NIBRG-121xp (H1N1) вирусом

Таблица 20 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий (среднее значение $\pm$ SD) в легких при иммунизации VLPs с HA и NA, а также их коктейля на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae* после инфицирования гетерологичным вирусом NIBRG-121xp (H1N1)

Группа	Выживаемость		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество бактерий в легких, lg КОЕ/ml 7 сут
	Выж./общ.	%	4 сут. *	7 сут. *	
HA-VLPs + NA-VLPs 0,8 нг	3/10 (p=0,065)	30	5,4 $\pm$ 0,5 (5; 6; 5; 5,5) p=1	7,2 $\pm$ 1,1 (8; 8; 8; 6; 6) p>0,05	4,7 $\pm$ 0,3 (4,3; 4,5; 4,8; 4,5; 5) p=1
HA-VLPs + NA-VLPs 4 нг	4/10 (p=0,024)	40	5,5 $\pm$ 0,6 (5; 6; 6; 5) p=1	6,8 $\pm$ 1,1 (8; 8; 6; 6; 6) p>0,05	2,8 $\pm$ 2,5 (4,3; 0; 4,6; 4,9; 0) p=0,1
HA-VLPs + NA-VLPs 20нг	6/10 (p=0,001)	60	4,3 $\pm$ 0,5 (4; 5; 4; 4) p=0,02	6,4 $\pm$ 0,6 (7; 7; 6; 6; 6) p>0,05	1,7 $\pm$ 2,4 (4; 0; 4,6; 0; 0) p=0,01
HA-VLPs	4/10 (p=0,024)	40	4,8 $\pm$ 1 (4; 5; 4; 6) p=0,2	7,2 $\pm$ 0,8 (8; 7; 6; 7; 8) p>0,05	2,5 $\pm$ 2,3 (0; 4; 4,1; 4,3; 0) p=0,01
NA-VLPs 20 нг	0/10	0	6,3 $\pm$ 0,5 (7; 6; 6; 6) p=1	7 $\pm$ 1 (6; 6; 8; 7; 8) p>0,05	4,7 $\pm$ 0,6 (5,1; 4,3; 4,5; 4; 5,6) p=0,8
Контроль NIBRG-121xp + <i>S. pneumoniae</i>	0/11	0	6,5 $\pm$ 0,6 (7; 6; 7; 6)	7,8 $\pm$ 0,5 (7; 8; 8; 8; 8)	8,4 $\pm$ 0,9 (7; 8,9; 8,7; 8,8)

Примечание: * после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Таблица 21 — Выживаемость, титр вируса и количество бактерий (среднее значение $\pm$ SD) в легких при иммунизации VLPs с HA и NA, а также их коктейля на модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после инфицирования гетерологичным вирусом NIBRG-121xp (H1N1)

Группа	Выживаемость		Титр вируса в легких животных, lg ЭИД _{50/0.1ml}		Количество бактерий в легких, lg КОЕ/ml, 7 сут
	Выж./общ.	%	4 сут. *	7 сут. *	
HA-VLPs + NA-VLPs 0,8 нг	3/10 (p=0,065)	30	5,4 $\pm$ 0,5 (5; 6; 5; 5,5) p=1	6,2 $\pm$ 0,4 (7; 6; 6; 6; 6) p=0,4	4,7 $\pm$ 0,5 (4,4; 4,5; 5; 4; 5,4) p=1
HA-VLPs + NA-VLPs 4 нг	4/10 (p=0,025)	40	5,5 $\pm$ 0,6 (5; 6; 6; 5) p=1	6,4 $\pm$ 1,1 (8; 5; 6; 6; 7) p=0,4	3,5 $\pm$ 1,9 (4,4; 4,4; 4,5; 0; 4) p=0,3
HA-VLPs + NA-VLPs 20 нг	6/10 (p=0,002)	60	4,3 $\pm$ 0,5 (4; 5; 4; 4) p=0,02	5 $\pm$ 1 (6; 5; 4; 6; 4) p<0,01	1 $\pm$ 1,4 (3; 0; 2; 0; 0) p<0,01
HA-VLPs	4/10 (p=0,025)	40	4,8 $\pm$ 1 (4; 6; 4; 5) p=0,2	7 $\pm$ 1 (8; 8; 7; 6; 6) p=1	1,8 $\pm$ 1,7 (0; 3; 3,2; 3; 0) P=0,01
NA-VLPs 20 нг	0/11 --	0	6,3 $\pm$ 0,5 (6; 6; 7; 6) p=1	6,2 $\pm$ 0,5 (6; 6; 7; 6; 6) p=0,2	4,3 $\pm$ 0,7 (5,3; 4; 4,5; 4; 3,5) p=1
Контроль NIBRG-121xp + <i>S. aureus</i>	0/11 --	0	6,5 $\pm$ 0,6 (5,8; 6,5; 6,5; 7,2)	7,8 $\pm$ 0,5 (8; 8; 8; 7; 8)	5,6 $\pm$ 0,5 (6; 6; 5,5; 4,7; 5,7)
Примечание: * после заражения вирусом. Кривые выживаемости между контрольной и экспериментальными группами сравнивали с использованием лог-рангового критерия, для сравнения содержания вируса и бактерий в гомогенате легких животных контрольной и экспериментальных групп использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Определение антигенной активности препаратов HA-VLPs или их комбинации с NA-VLPs. При изучении иммунного ответа после однократной иммунизации мышей препаратами HA-VLPs или их комбинацией с NA-VLPs, взятыми в различных соотношениях (NA-VLPs 20 нг, NA-VLPs 4 нг и NA-VLPs 0,8 нг), в сыворотке крови в реакции РТГА были выявлены различные титры функциональных антител к гомологичному вирусу A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1). Наивысшие титры обнаруживались в группе мышей, иммунизированных монопрепаратом HA-VLPs. Иммунизация коктейлем с нейраминидазным антигеном приводила к снижению титра анти-гемагглютинирующих антител. В то же время, данные ИФА показали близкие по значениям показатели IgG ответа к HA во всех группах. Ожидаемо, ни в одной из экспериментальных групп в РТГА не

было выявлено антител к гетерологичному штамму NIBRG-121xp (Таблица 22). Определение иммунного ответа к NA гомологичного вируса A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) (H1N1) путём реакции ингибирования ферментативной активности нейраминидазы с использованием низкомолекулярного субстрата MUNANA не выявило индукцию антител к NA ни в одной из групп, что совпадает с данными исследователей о возможности использования этого субстрата только для выявления моноклональных антител. Использование высокомолекулярного субстрата в ELLA позволило выявить в сыворотке крови антитела к NA только у животных, вакцинированных NA-VLPs. При использовании коктейля VLPs с NA и NA антигенами индукция антител к NA не была выявлена, а увеличение содержания в NA-VLPs в коктейле не приводило к увеличению образования антител. Данные ИФА антительного ответа к NA не противоречили результатам, полученным в функциональном тесте ингибирования нейраминидазной активности (Таблица 22).

Таблица 22 — Изучение антигенной активности HA-VLPs и NA-VLPs, а также их коктейля (HA-VLPs + NA-VLPs) после однократной вакцинации у мышей

Группы	Титр антител к HA			Титр антител к NA		
	РТГА*		ИФА**	Ингибирование нейраминидазной активности		ИФА**
	A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1)	NIBRG-121xp		MUNANA ****	ELLA ****	
HA-VLPs + NA-VLPs 0,8 нг	< 10	<10	800	<10	<10	350
HA-VLPs + NA-VLPs 4 нг	< 10	<10	650	<10	<10	500
HA-VLPs + NA-VLPs -20нг	30±12	<10	450	<10	<10	900
HA-VLPs	60±23	<10	425	<10	<10	175
NA-VLPs -20 нг	10±0	<10	200	<10	35±10	881
Контроль	<10	<10	50	<10	<10	150

Примечание: *средний арифметический титр антител к гемагглютинуину соответствующих вирусов, определенный в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), ** средний арифметический титр антител к гемагглютинуину или нейраминидазе вируса, определенный иммуноферментным методом (ИФА); *** средний арифметический титр антител к нейраминидазе вируса, определенный с использованием субстрата MUNANA **** средний арифметический титр антител к нейраминидазе вируса, определенный методом ELLA.

Таким образом, было показано, что добавление нейраминидазного компонента в вакцинный препарат может приводить к продукции антител, интерферирующих с антителами, выявляемыми в реакции РТГА, а наличие анти-НА антител может ингибировать нейтрализующую активность НА-специфичных антител.

Исследование эффекта вирусной нейраминидазы на эпителий легких животных с использованием гистологического и гистохимического окрашивания перед проведением бактериального заражения. Для оценки повреждения легочной ткани при вирусной инфекции у иммунизированных и контрольных мышей было проведено гистологическое исследование с применением окраски гематоксилином/эозином (Н/Е), а также гистохимическое исследование, направленное на оценку интенсивности связывания лектина с клетками легкого.

Детекция связанного лектина, меченого ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат), в неповрежденных участках легких определялась преимущественно в межалвеолярных перегородках. Высокие значения интенсивности флуоресценции отмечались в областях с выраженным воспалением, а интенсивность флуоресценции в исследованных образцах коррелировала со степенью тяжести патологии легких. Полученные значения интенсивности флуоресценции для исследованных групп представлены на Рисунках 26–27. В группе интактных неинфицированных мышей интенсивность флуоресценции была самой низкой — 5,1. Мыши, иммунизированные буферным раствором и зараженные вирусом NIBRG-121хр, демонстрировали наивысший уровень связывания лектина — 28,2. Иммунизация мышей коктейлем НА-VLPs + NA-VLPs 20 нг при последующем заражении гетерологичным вирусом приводила к существенному снижению сигнала связывания лектина (15,6). Неожиданным результатом явился низкий показатель флуоресценции в группе животных, иммунизированных только НА-VLPs — 10,0. Несмотря на то, что индукция антител к НА наблюдалась при вакцинации VLPs, содержащими только НА, вакцинирование VLPs, содержащими такое же количество белков, но в коктейле (НА-VLPs + NA-VLPs 20 нг), при

заражении мышей гетерологичным вирусом приводила к снижению расщепления нейраминовой кислоты, обусловленного активностью NA, что выражалось в примерно одинаковом значительном уменьшении сигнала флуоресценции по сравнению с контролем (Рисунок 26).

Полученные с использованием окрашивания лектином количественные гистохимические данные были полностью подтверждены гистологическим изучением легких с окрашиванием Н/Е (Рисунки 26–27). У невакцинированных животных контрольной группы, зараженных гетерологичным вирусом NIBRG-121хр, выявлялись тяжелые повреждения ткани легких, характеризовавшиеся развитием выраженной бронхопневмонии, очаговой неравномерно выраженной альвеолярной эмфиземы с участками расширения и выраженного ателектаза легочной ткани. В группах животных, вакцинированных коктейлем VLPs, а также компонентами коктейля в отдельности, с последующим заражением гетерологичным вирусом NIBRG-121хр степень выраженности и площадь повреждений ткани легких были ниже, чем в группах невакцинированных животных. Отмечались очаговый слабо и умеренно выраженный некрозы бронхиального и бронхиолярного эпителия, с развитием бронхиолита, смешанноклеточная, преимущественно мононуклеарная, инфильтрация интерстициальной ткани, слабо и умеренно выраженный альвеолит и периваскулит. При этом, у мышей, вакцинированных VLPs, содержащими только один белок (НА-VLPs или NA-VLPs) была отмечена неравномерная выраженность патологии и были выявлены участки, гистологическое строение лёгочной ткани которых приближалось к норме: определялась умеренная альвеолярная эмфизема и незначительные очаговые геморрагии, без признаков некротических и воспалительных повреждений.

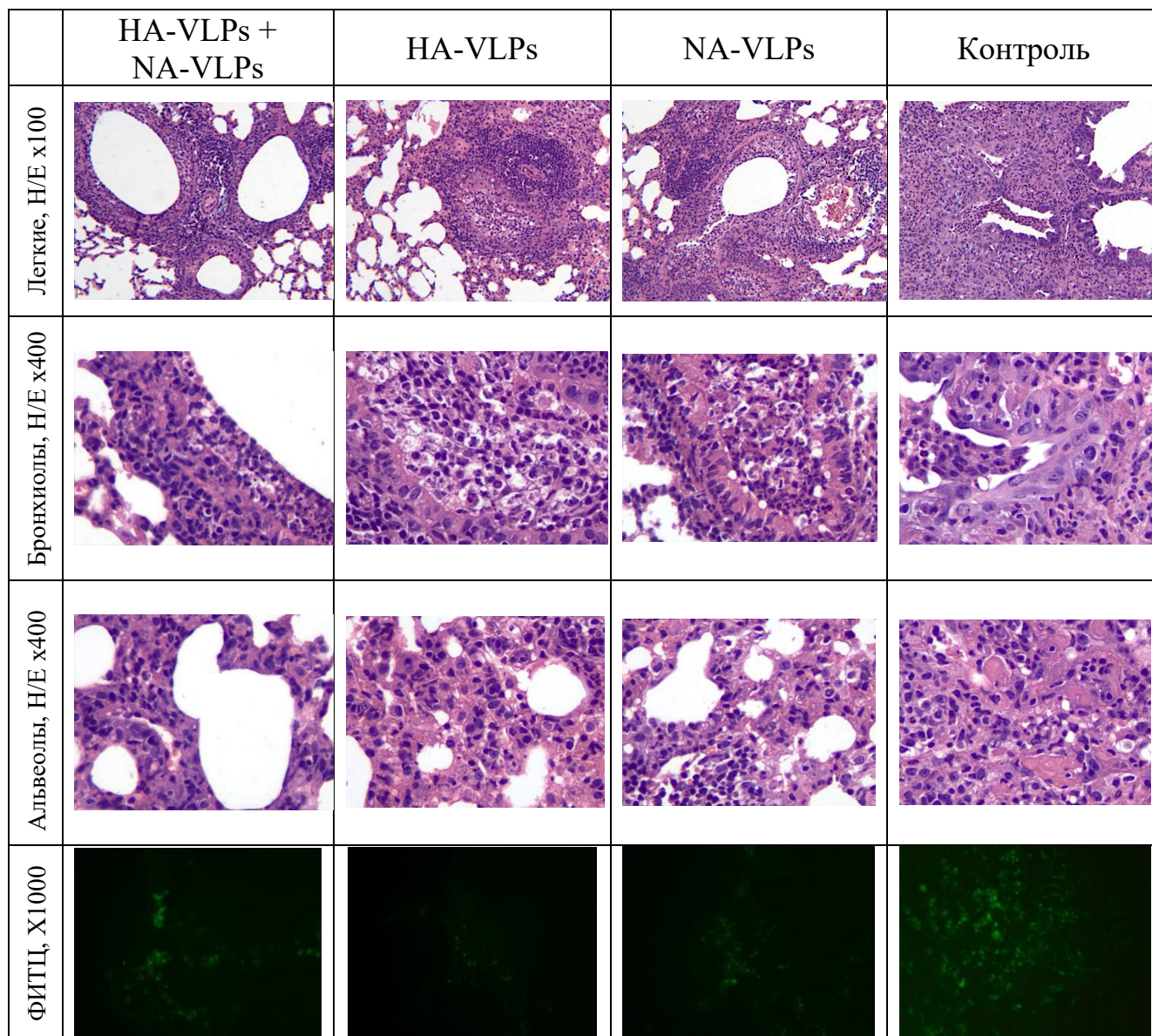


Рисунок 26 — Состояние легочной ткани при окрашивании гематоксилином/эозином и при гистохимическом исследовании

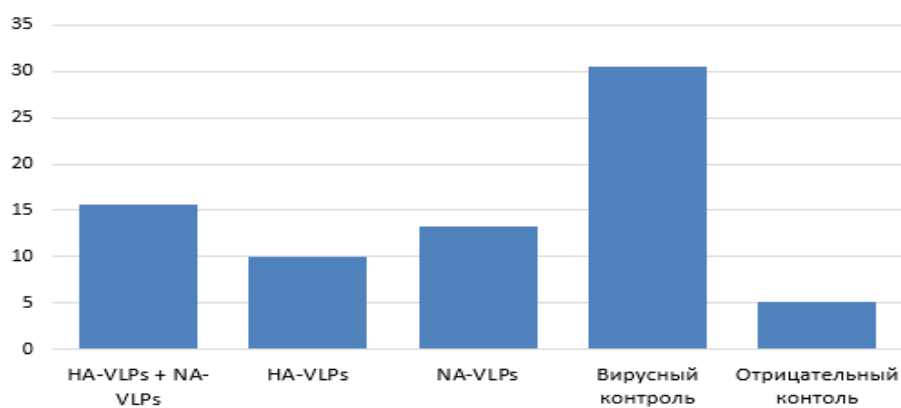


Рисунок 27 — Интенсивность флуоресценции при гистохимическом исследовании состояния легких мышей, иммунизированных VLPs и зараженных NIBRG-121xp

Таким образом, при гистологическом исследовании ткани легких мышей наиболее тяжелые повреждения были выявлены у невакцинированных животных, в то время как степень выраженности патологии и объем пораженных тканей в вакцинированных группах с последующим заражением гетерологичным вирусом NIBRG-121хр были значительно ниже. Гистологическое состояние легких мышей, вакцинированных коктейлем VLPs, содержащим HA и NA, с последующим заражением этим же вирусом, практически соответствовало норме (Рисунки 26–27).

В отличие от данных, полученных при изучении антигенной активности, гистохимические данные соответствовали данным о протективной активности VLPs, содержащих HA-VLPs или NA–VLPs, а также коктейля VLPs, содержащего HA-VLPs и NA-VLPs в различных количественных соотношениях, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *S. aureus* или *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции.

Материалы раздела 3.4.3 опубликованы в [19, 20, 209].

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Грипп часто сопровождается развитием осложнений со стороны дыхательной системы, среди которых внебольничные пневмонии занимают ведущее место и относятся к числу наиболее тяжёлых последствий заболевания. Установлено, что вторичные бактериальные пневмонии — причина значимой доли летальных исходов, ассоциированных с гриппом [242, 251]. В периоды пандемий смертность от гриппа и его осложнений возрастает и затрагивает, в первую очередь, группы риска, включая лиц пожилого возраста, детей, беременных женщин, а также пациентов с иммунодефицитными состояниями и хроническими заболеваниями сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Результаты многочисленных экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о том, что физические и физиологические изменения макроорганизма, индуцированные вирусом гриппа, повышают восприимчивость хозяина к развитию вторичной бактериальной инфекции [136, 147, 152, 164, 177]. Наиболее частыми этиологическими агентами вторичных пневмоний при гриппе являются *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, между которыми и вирусом гриппа описан выраженный летальный синергизм. Несмотря на то, что в литературе предложен ряд механизмов, объясняющих взаимодействие вирусных и бактериальных патогенов, включая повреждение эпителия дыхательных путей и нарушение врождённого иммунного ответа [215], данные о вкладе отдельных подтипов вируса гриппа в развитие бактериальной суперинфекции остаются фрагментарными. В этой связи детальное изучение патогенетических механизмов вирусно-бактериального взаимодействия представляется необходимым для обоснования новых терапевтических и профилактических подходов.

С учётом изложенного, в настоящей работе была разработана модель вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции, основанная на последовательном заражении вирусами гриппа и бактериальными патогенами. Вирус гриппа был представлен штаммами

A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), а также их реассортантом NIBRG-121xp, относящимися к подтипу H1N1, и штаммом A/Aichi/2/69(H3N2), представляющий другой подтип вируса гриппа А — H3N2. Выбор указанных штаммов был обусловлен эпидемиологическими данными: пандемический штамм A/California/04/2009(H1N1)pdm09 вызывал пандемию 2009 года, а штаммы подтипа H3N2 доминировали в сезоны с высокой смертностью и частотой вторичных бактериальных пневмоний [189, 230]. Кроме того, был использован классический лабораторный штамм A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), широко применяемый в экспериментальной вирусологии и характеризующийся выраженным повреждающим действием на эпителий лёгких, сопровождающимся потерей массы тела и летальностью животных при относительно низких инфекционных дозах [249].

Для моделирования бактериальной суперинфекции использовали *S. aureus* и *S. pneumoniae*, которые, согласно данным патологоанатомических исследований, являлись основными бактериальными агентами, выявляемыми в посмертных образцах лёгких пациентов, умерших от пандемического гриппа 2009 года. Таким образом, созданная модель позволяет воспроизводить ключевые клинικο-патогенетические особенности вирусно-бактериальной пневмонии, наблюдаемой у человека.

На разработанной модели был выявлен выраженный летальный синергизм между вирусом гриппа и бактериальными патогенами. Совокупность полученных данных позволила установить различия в течении и исходах пневмоний, вызванных как моноинфекцией (вирусом гриппа, *S. aureus* или *S. pneumoniae*), так и их сочетанием. Показано, что ассоциация вируса гриппа с *S. aureus* и *S. pneumoniae* приводит к увеличению смертности экспериментальных животных, более выраженной потере массы тела, сокращению продолжительности жизни, усилению репликации вируса и бактерий, а также увеличению сроков элиминации патогенов из лёгочной ткани по сравнению с моноинфекцией. Вторичная бактериальная пневмония развивалась только при последовательном заражении животных, когда бактериальная инфекция следовала за вирусной. При обратной

последовательности инфицирования развитие пневмонии не наблюдалось, что указывает на ключевую роль вируса гриппа в патогенезе вторичной бактериальной пневмонии. Полученные результаты согласуются с данными, представленными ранее другими исследователями [174].

Кроме того, было установлено, что вторичное бактериальное заражение на фоне предшествующей вирусной инфекции, сопровождается замедлением клиренса как вирусных, так и бактериальных патогенов из лёгких. Эти данные свидетельствуют о том, что вирус гриппа способствует размножению *S. aureus* и *S. pneumoniae*, вероятно, за счёт нарушения барьерной функции респираторного эпителия и модуляции локального иммунного ответа.

К другим причинам развития осложнений после гриппа относится иммуносупрессивное действие вируса гриппа, который угнетает функцию макрофагов и Т-лимфоцитов; снижает хемотаксис нейтрофилов и ингибирует их фагоцитарную активность в отношении бактерий [10]. Важную роль в иммуносупрессии играет неструктурный белок NS1, основная функция которого заключается в противостоянии интерферон-опосредованным механизмам противовирусной защиты и взаимодействии со множеством клеточных факторов [48].

Полученные нами результаты соответствуют данным McNugh и соавт., которые в своих исследованиях использовали модель последовательного заражения аутбредных мышей вирусом гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus*. У животных, инфицированных только *S. aureus*, регистрировалась относительно низкая бактериальная нагрузка в лёгких, тогда как при коинфекции отмечалось значительное увеличение количества бактериальных колоний. Кроме того, у коинфицированных мышей была выявлена статистически значимая корреляция между выраженностью потери массы тела и уровнем бактериальной нагрузки [54].

Полученные нами данные также согласуются с результатами McCullers и соавт., которые изучали последствия одновременного и последовательного инфицирования мышей вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) и

S. pneumoniae. Авторами был продемонстрирован выраженный летальный синергизм указанных патогенов, проявлявшийся исключительно при последовательном заражении животных. При одновременном инфицировании развитие патологического процесса не превышало по тяжести эффектов, наблюдаемых при инфицировании каждым из патогенов по отдельности [174].

Установлено, что летальный синергизм развивается лишь в том случае, если инфекция вируса гриппа предшествует бактериальной инфекции на несколько дней (в нашем исследовании — 4 дня, в работе McCullers и соавт. — 7 дней). Данный временной интервал указывает на то, что индуцированные вирусом гриппа изменения в организме экспериментальных животных создают условия, предрасполагающие к развитию тяжёлой бактериальной инфекции и сепсиса. К таким изменениям относятся подавление иммунного ответа, повреждение респираторного эпителия с обнажением компонентов базальной мембраны, а также повышение экспрессии клеточных рецепторов, способствующих адгезии и инвазии пневмококка, опосредованное цитокиновым ответом хозяина [174].

Концепция о ведущей роли вирус-индуцированного повреждения эпителия дыхательных путей в усилении бактериальной колонизации подтверждается экспериментальными исследованиями с использованием адаптированного к мышам штамма вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) [119, 174, 178]. Данный штамм вызывает выраженное повреждение эпителия лёгких, сопровождающееся потерей массы тела и гибелью животных при относительно низких инфицирующих дозах [249]. Показано, что у мышей, вторично инфицированных *S. pneumoniae* после заражения вирусом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), бактериальная нагрузка в лёгких значительно возрастает [59]. В то же время, использование неадаптированных штаммов вируса гриппа с низким патогенным потенциалом, не вызывало выраженных структурных повреждений трахеобронхиального дерева, однако бактерии длительно персистировали в лёгочной ткани [252].

Таким образом, разработанная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции позволяет изучать механизмы синергического

взаимодействия вируса гриппа и бактериальных патогенов, имеющие прямое отношение к развитию вторичной бактериальной пневмонии у человека, которая вносит существенный вклад в структуру избыточной смертности в периоды эпидемий гриппа.

Своевременное применение противовирусных препаратов способствует снижению тяжести и продолжительности гриппозной инфекции. Однако высокая генетическая вариабельность вируса гриппа и способность к формированию лекарственной устойчивости определяют актуальность разработки и экспериментальной оценки новых противовирусных средств. У невакцинированных пациентов применение противогриппозных препаратов нередко является единственным способом повлиять на риск развития вторичных бактериальных осложнений.

Разрабатываемые противовирусные препараты проходят скрининг эффективности *in vitro*, за которым обязательно следует *in vivo* тестирование на животных моделях для изучения эффективности лекарств перед клиническими испытаниями. Таким образом, выбор животной модели для оценки эффективности противовирусных средств имеет принципиальное значение, поскольку позволяет получить доклинические данные, служащие основанием для принятия решения о переходе к клиническим испытаниям.

Препараты, применяемые для лечения гриппа, подразделяют на этиотропные средства прямого противовирусного действия, интерфероны и их индукторы, обладающие опосредованным противовирусным и иммуномодулирующим эффектами, а также симптоматические препараты. Этиотропные противовирусные средства, в зависимости от мишени воздействия на репродуктивный цикл вируса гриппа, включают ингибиторы функции М2-белка, ингибиторы нейраминидазы, ингибиторы фузии и ингибиторы вирусной полимеразы.

С учётом ранее полученных экспериментальных данных, свидетельствующих о снижении риска развития постгриппозной пневмонии на фоне противовирусной терапии [175, 229], в настоящем исследовании были выбраны препараты, воздействующие на различные стадии репродукции вируса гриппа: ингибитор

нейраминидазы осельтамивир и ингибитор фузии умифеновир. Кроме того, учитывая широкое применение в Российской Федерации препаратов с опосредованным механизмом действия, в исследование был включён синтетический низкомолекулярный индуктор интерферонов — тилорон.

Пероральное применение умифеновира обеспечивало защиту от гибели около трети животных, тогда как терапия осельтамивиром — около половины животных, последовательно зараженных штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и *S. aureus*. Оба препарата препятствовали снижению массы тела и способствовали уменьшению вирусной и бактериальной нагрузки в лёгких. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, показавших, что терапия осельтамивиром снижает частоту развития вторичной бактериальной пневмонии и замедляет прогрессирование уже сформировавшейся инфекции даже при отсроченном начале лечения, несмотря на то, что текущие рекомендации по применению осельтамивира предполагали использование его только в первые 48 часов после появления клинических симптомов [175, 180].

Анализ клинических исследований ингибиторов нейраминидазы указывает на сходные тенденции. Показано, что применение осельтамивира у детей и взрослых ассоциировано со снижением частоты вторичных осложнений гриппа, включая отит, синусит и пневмонию, а также с уменьшением потребности в антибиотикотерапии [200]. В то же время эффективность адамантановых препаратов в отношении профилактики вторичных бактериальных осложнений не была подтверждена [185]. Вопрос о влиянии позднего начала противовирусной терапии на развитие вторичных осложнений у человека остаётся недостаточно изученным.

Эффективность индуктора интерферонов тилорона в модели вторичной бактериальной пневмонии оказалась дозо- и режим-зависимой. При высокой инфицирующей дозе вируса ни тилорон, ни осельтамивир не оказывали значимого влияния на выживаемость животных и бактериальную нагрузку, что, вероятно, обусловлено выраженным иммунодепрессивным эффектом тяжёлой вирусной

инфекции. При снижении инфицирующей дозы эффективность терапии существенно возрастала: при средней дозе вируса внутрибрюшинное введение тилорона обеспечивало полную выживаемость животных и приводило к снижению титра вируса и количества *S. aureus* в лёгких по сравнению с контролем, а пероральное введение тилорона демонстрировало менее выраженный результат.

Тилорон, являясь низкомолекулярным синтетическим индуктором интерферонов, оказывает многокомпонентное воздействие на вирус-индуцированный патогенез. Индукция эндогенных интерферонов α , β , γ и λ , активация макрофагов, НК-клеток и Т-лимфоцитов способствуют ограничению репликации вируса гриппа и восстановлению барьерной функции респираторного эпителия. В условиях вторичной бактериальной инфекции такая модуляция иммунного ответа снижает вирусную нагрузку и тем самым создаёт условия для повышения эффективности антибактериальной терапии. Ранее на сходной модели было показано, что интраназальное введение ИФН- λ сопровождается уменьшением бактериальной нагрузки в лёгких и снижением выраженности клинических проявлений, что согласуется с полученными нами данными [115].

Выявленные различия могут быть объяснены особенностями фармакокинетики и механизмов действия препаратов. Эффективность индукторов интерферона ограничена реактивностью иммунной системы и временем достижения пиковых уровней продукции интерферона, которые при пероральном применении тилорона формируются в течение 4–24 часов. В отличие от этого, препараты прямого противовирусного действия характеризуются более быстрым достижением терапевтических концентраций (1,5 часа для умифеновира и 2–3 часа для осельтамивира), что может определять их преимущество в условиях острого инфекционного процесса.

Несмотря на накопленные экспериментальные и клинические данные, роль индукторов интерферона при гриппозной инфекции остаётся предметом дискуссии. Существенное ограничение накладывает выраженная вариабельность интерферонового ответа в зависимости от возраста пациентов, иммунного статуса, времени начала терапии и тяжести заболевания. Интерферон-опосредованная

модуляция иммунного ответа может оказывать разнонаправленное влияние на течение вирусной инфекции и развитие вторичных бактериальных осложнений. Показано, что при тяжёлых формах гриппа, сопровождающихся выраженным интерфероновым дисбалансом, дополнительная стимуляция продукции интерферонов может быть как потенциально протективной, так и, напротив, способствовать усилению иммунопатологических реакций. С одной стороны, снижение вирусной нагрузки и восстановление функций врождённого иммунитета потенциально ограничивают бактериальную суперинфекцию; с другой — интерфероны I типа способны подавлять фагоцитарную активность и снижать эффективность антибактериальной защиты. Это особенно значимо в контексте инфекций, вызванных *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, наиболее часто ассоциированных с постгриппозной пневмонией.

Следующий этап исследований был направлен на изучение эффективности противовирусных препаратов на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции, вызванной другим бактериальным агентом — *Streptococcus pneumoniae*. При полной гибели животных в контрольной группе, терапия осельтамивиром и умифеновиром приводила к увеличению выживаемости до 80%, а также к уменьшению потери массы тела и снижению вирусной и бактериальной нагрузки в лёгких.

Полученные данные согласуются с результатами сходного по дизайну исследования McCullers (2004), в котором все мыши, получавшие лечение осельтамивиром, выживали. Наблюдаемые различия между результатами могут быть объяснены использованием в указанной работе другого штамма вируса гриппа — A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), обладающего иными патогенными свойствами и профилем взаимодействия с бактериальной инфекцией [175].

Экстраполяция доклинических данных подтверждается результатами клинических исследований. Показано, что лечение осельтамивиром детей, инфицированных вирусом гриппа, приводит к снижению частоты развития острого среднего отита и уменьшению потребности в антибиотикотерапии [200]. У взрослых пациентов противовирусная терапия снижала частоту вторичных

осложнений и применение антибиотиков [108]. Данные клинических исследований ингибиторов нейраминидазы свидетельствуют об их способности снижать частоту осложнений со стороны нижних дыхательных путей, госпитализаций и назначения антибиотиков у пациентов различных возрастных групп, включая лиц старше 65 лет и пациентов с хроническими заболеваниями [106, 130, 131].

Таким образом, модель вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной заражением штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим инфицированием *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pneumoniae*, может быть использована в качестве экспериментальной платформы для оценки и оптимизации противовирусной терапии в условиях развития вторичных бактериальных осложнений.

Несмотря на значительное расширение арсенала антибактериальных средств, бактериальная пневмония остаётся одной из ведущих причин смертности во всём мире [176]. После демонстрации эффективности пенициллина при лечении пневмококковой пневмонии, β -лактамы длительное время рассматривались в качестве препаратов выбора. В рекомендациях Американского общества инфекционных заболеваний и Американского торакального общества по лечению внебольничной пневмонии у взрослых рекомендуются β -лактамы в качестве окончательной терапии пневмококковой пневмонии, включая ту, которая осложняет грипп [129]. Клиническими рекомендациями «Грипп у взрослых», разработанными НАСИБ им. В. И. Покровского и утверждёнными в 2022 г., пациентам при подозрении на развитие вирусно-бактериальной пневмонии рекомендовано проведение терапии антибактериальными препаратами системного действия (ампициллин, амоксициллин+клавулановая кислота или ампициллин+сульбактам, цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефтриаксон), альтернативы — фторхинолоны [10]. Однако появление клинически значимой резистентности *S. pneumoniae* к пенициллину и цефалоспорином третьего поколения существенно ограничило эффективность данной стратегии, особенно при тяжёлых инвазивных формах инфекции, например, пневмококкового менингита и, реже, септического артрита. Эти данные подчёркивают, что при

постгриппозной пневмонии исключительно антибактериальный подход не способен существенно повлиять на исход заболевания, тогда как контроль вирусной репликации на ранних этапах инфекции является ключевым фактором профилактики тяжёлых бактериальных осложнений.

Следующим этапом работы стало изучение эффективности антибактериальных препаратов различного механизма действия на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *Staphylococcus aureus*, после гриппозной инфекции, индуцированной штаммом вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09.

Ранее McCullers и соавторы выдвинули концепцию, согласно которой традиционная терапия вторичной бактериальной пневмонии может быть субоптимальной в условиях комбинированной вирусно-бактериальной инфекции. В их исследованиях мыши, инфицированные вирусом гриппа и *Streptococcus pneumoniae*, не выживали, несмотря на лечение ампициллином — β -лактамным антибиотиком, приводившим к эффективной элиминации бактерий из лёгких [175]. Аналогичную клиническую проблему ранее отмечали Louria и соавторы, предположившие, что у пациентов, коинфицированных вирусом гриппа и *S. aureus*, тяжёлые пневмонии плохо поддаются антибиотикотерапии вследствие усиления вирусной пневмонии бактериальным компонентом [241].

Для настоящего исследования были выбраны антибактериальные препараты, относящиеся к различным фармакологическим группам: цефуроксим (цефалоспорины II поколения), клиндамицин (линкозамиды) и ципрофлоксацин (фторхинолоны). Использование двух основных рекомендованных препаратов — азитромицина и амоксициллина — оказалось невозможным, поскольку исследование антибиотикорезистентности выявило устойчивость используемого штамма *Staphylococcus aureus* к данным соединениям.

Применение ципрофлоксацина и цефуроксима оказывало умеренное защитное действие, проявлявшееся в снижении потери массы тела, а также уменьшении вирусной и бактериальной нагрузки в лёгких, однако не приводило к значимому увеличению выживаемости животных. Наиболее выраженный эффект

был отмечен при лечении клиндамицином, которое почти в два раза увеличивало выживаемость мышей, несмотря на менее выраженное снижение бактериальной колонизации лёгочной ткани. Сходные по данным были получены McCullers и соавторами, показавшими, что лечение ампициллином снижает бактериальную нагрузку в лёгких, но не улучшает выживаемость животных, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) с последующим заражением *S. pneumoniae*. Авторы пришли к выводу, что вирус гриппа формирует у организма хозяина патологическое физиологическое состояние, при котором одной лишь элиминации бактериального патогена недостаточно для выздоровления.

Полученные результаты могут быть интерпретированы с позиций современной концепции иммунопатогенеза тяжёлых инфекций, согласно которой для разрешения инфекции и выживания организма необходим сбалансированный противо- и провоспалительный ответ [77]. Антибактериальные препараты выбора, эффективные при лечении бактериальной пневмонии, не всегда эффективны в отношении вторичной бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции. Примером этого могут служить ампициллины, которые часто не улучшают, а иногда и ухудшают исход вторичной бактериальной пневмонии. Причиной этому может являться быстрый лизис бактерий при использовании β -лактамных антибиотиков, приводящий к высвобождению патоген-ассоциированных молекулярных паттернов, распознаваемых врождённой иммунной системой, что сопровождается выраженным воспалительным всплеском [179]. В условиях гриппозной инфекции, характеризующейся уже активированным и зачастую дисрегулируемым воспалительным ответом, дополнительная стимуляция воспаления может усугублять повреждение лёгочной ткани.

В этой связи особый интерес представляют нелитические антибиотики, такие как клиндамицин и макролиды, воздействие которых сопровождается меньшим высвобождением провоспалительных факторов, включая пневмолизин, липотейхоевую кислоту и бактериальную ДНК [194]. Показано, что макрофаги, экспонированные пневмококками в присутствии клиндамицина, продуцируют значительно меньше TNF- α и оксида азота по сравнению с воздействием

β-лактамных антибиотиков [201]. Экспериментальная проверка данной гипотезы на модели вторичной бактериальной пневмонии после гриппа, выполненная Karlstrom и соавторами, продемонстрировала, что мыши могут быть клинически излечены при применении ингибиторов синтеза белка, таких как клиндамицин или азитромицин, но не выживают при терапии агентами, активными в отношении клеточной стенки, например ампициллином [258].

Одним из клинически обоснованных подходов к лечению тяжёлых форм гриппа, осложнённых бактериальной инфекцией, является добавление антибактериальных препаратов к противовирусной терапии, поэтому на следующем этапе мы исследовали комбинированное действие этиотропных противовирусных и антибактериальных препаратов на модели вторичной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus*, после гриппозной инфекции, индуцированной штаммом A/California/04/2009(H1N1)pdm09.

Исследование комбинаций этиотропных противовирусных препаратов (осельтамивира и умифеновира) с антибактериальными средствами (цефуроксимом, клиндамицином и ципрофлоксацином) показало, что добавление антибиотиков к противовирусной терапии существенно усиливало общий терапевтический эффект. Все исследованные комбинации полностью предотвращали гибель животных и ограничивали потерю массы тела. При этом применение только противовирусных препаратов не оказывало статистически значимого влияния на бактериальную нагрузку в лёгких, тогда как включение антибактериальной терапии приводило к снижению количества бактерий более чем в 100 раз. Комбинированное лечение сопровождалось также полным подавлением репликации вируса в лёгочной ткани.

Сочетание индуктора интерферонов тилорона с цефуроксимом, к которому исследуемый штамм *S. aureus* был чувствителен, демонстрировало выраженный аддитивный эффект, проявлявшийся в полной защите животных от гибели, подавлении репликации вируса и элиминации бактериального патогена из лёгких. В противоположность этому, комбинация тилорона с амоксициллином, к которому возбудитель был резистентен, не обладала терапевтической эффективностью, что

указывает на важность адекватного подбора антибактериального компонента в условиях вирусно-бактериальной коинфекции.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, McCullers (2004) показал, что комбинированная терапия осельтамивиром и ампициллином обеспечивает полную выживаемость мышей, последовательно инфицированных *Streptococcus pneumoniae* после заражения вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Эти данные подтверждают принципиальное значение подавления вирусной репликации для эффективного контроля бактериальной суперинфекции [175].

В настоящем исследовании противовирусная и антибактериальная терапия были протестированы отдельно, а затем вместе на мышинной модели вторичной бактериальной пневмонии. Гипотеза о том, что комбинированная терапия как противовирусным, так и антибактериальным препаратом будет эффективна, была проверена с помощью экспериментального проекта, имитирующего ожидаемое клиническое течение заболевания у человека, у которого развилась вторичная бактериальная пневмония после гриппа.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что инфицирование вирусом гриппа ускоряет прогрессирование бактериальной пневмонии за счёт подавления защитных механизмов хозяина до формирования полноценного адаптивного иммунного ответа. Противовирусная терапия модифицирует данный патогенез, замедляя развитие пневмонии и создавая временное «терапевтическое окно», в течение которого антибактериальные препараты способны эффективно элиминировать бактериальный патоген.

Разработанная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции была валидирована клиническими, микробиологическими и вирусологическими методами и использована для оценки эффективности противовирусных и антибактериальных препаратов, а также их комбинаций. Полученные результаты подтверждают ключевую роль вируса гриппа в развитии бактериальных осложнений на течение вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. aureus* и *S. pneumoniae*.

Тяжёлая вторичная бактериальная пневмония, развивающаяся на фоне гриппозной инфекции, нередко характеризуется неблагоприятным течением и ограниченной эффективностью терапии, что обуславливает актуальность стратегий, направленных на её профилактику.

Профилактика гриппозной инфекции рассматривается как основной способ предупреждения как самого заболевания, так и ассоциированных с ним осложнений, включая вторичную бактериальную пневмонию. Это особенно значимо в условиях отсутствия вакцины против *Staphylococcus aureus*, ограниченной способности пневмококковых вакцин предотвращать вирус-индуцированные инфекции нижних дыхательных путей и роста антибиотикорезистентности бактериальных патогенов. Показано, что применение инактивированных противогриппозных вакцин приводит к снижению частоты госпитализаций и смертности от гриппа и пневмонии [105], а использование конъюгированных пневмококковых вакцин уменьшает риск бактериальных осложнений, ассоциированных с вирусной инфекцией [169].

На протяжении последних десятилетий вакцинация остаётся основным средством профилактики сезонного и пандемического гриппа [207]. При этом эффективность противогриппозных вакцин традиционно оценивается по способности предотвращать клинические проявления гриппа или летальные исходы, тогда как их потенциал в подавлении летального вирусно-бактериального взаимодействия остаётся недостаточно изученным. Основным ограничением вакцинации является необходимость регулярного обновления вакцинных штаммов в связи с антигенным дрейфом и спорадическими антигенными сдвигами вируса гриппа.

Важным этапом разработки и оценки профилактических средств является их *in vivo* тестирование на экспериментальных моделях, позволяющих изучать не только иммуногенность и протективную активность противогриппозных вакцин, но и их влияние на развитие осложнений.

В последние годы возрастающий интерес вызывают живые аттенуированные гриппозные вакцины (ЖГВ), однако их применение ограничено рядом факторов.

Ряд экспериментальных и клинических исследований показал, что репликация вируса гриппа может способствовать увеличению бактериальной колонизации назофарингеального тракта, в частности *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*, повышая риск последующей бактериальной инфекции дыхательных путей [59, 193]. В этой связи высказывались опасения, что интраназальная иммунизация ЖГВ потенциально может усиливать бактериальную нагрузку в верхних дыхательных путях с последующей трансмиссией в лёгкие [184].

Для оценки данного риска в настоящем исследовании было проведено сравнительное изучение живой аттенуированной вакцины на основе холодаадаптированного штамма A/17/California/2009/38 и инактивированной субъединичной вакцины (концентрат субъединиц штамма A/California/04/2009(H1N1)pdm09), на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *Streptococcus pneumoniae* после гриппозной инфекции.

Иммунизация обеими вакцинами обеспечивала полную защиту животных от гибели и предотвращала потерю массы тела, а также полностью подавляла репликацию вируса в лёгких. Отсутствие бактериальной колонизации лёгких у животных, иммунизированных ЖГВ, объясняется невозможностью репликации холодаадаптированного вируса в нижних отделах респираторного тракта, что препятствует формированию условий, благоприятных для развития бактериальной пневмонии. Таким образом, заражение холодаадаптированным штаммом вируса гриппа не приводило к усилению бактериальной инфекции и развитию пневмонии.

Полученные экспериментальные данные согласуются с результатами клинических и эпидемиологических исследований, свидетельствующих о высокой профилактической эффективности и безопасности ЖГВ [8, 82, 92]. Для сравнения, исследование M. S. Chaussee и соавторов продемонстрировало неполную защиту от вторичной инфекции *Streptococcus pyogenes* после двух иммунизаций с соответствующей инактивированной или живой вакцинами с использованием модели одинаковой летальной суперинфекции [135]. Однако такое сравнение не позволяет судить об эффективности различных типов вакцин, поскольку виды и

штаммы бактерий различаются по своей способности вызывать вторичную бактериальную пневмонию [149].

Невысокая реактогенность ЖГВ свидетельствует об отсутствии остаточной вирулентности, а иммунизация, как правило, не сопровождается развитием осложнений со стороны дыхательных путей. Вместе с тем, несмотря на высокую иммуногенность, в настоящее время ЖГВ применяются ограниченно и уступают инаktivированным вакцинам, что подчёркивает необходимость дальнейшего совершенствования вакцинных стратегий.

Несмотря на высокую эффективность, инаktivированные вакцины также требуют дальнейшего совершенствования. Существенным ограничением остаётся и традиционная система производства вакцин на основе развивающихся куриных эмбрионов, связанная с антигенными изменениями вируса при адаптации, производственными рисками и ограниченной универсальностью. Производство противогриппозных вакцин в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) ограничено штаммами, способными эффективно реплицироваться в данной системе. Некоторые штаммы, например высокопатогенный вирус гриппа птиц H5N1, вызывают гибель эмбрионов [221]. При пассировании вакцинных штаммов в РКЭ возможно возникновение антигенных изменений, приводящих к снижению эффективности вакцины. Вакцина может быть опасна для людей с аллергией на куриные яйца. Рекомендации по вакцинным штаммам должны быть сделаны за 6–8 месяцев до начала производства вакцины, а за это время доминирующий штамм может измениться. Однако, низкая перекрестная протективная активность существующих гриппозных вакцин не позволяет препятствовать инфекции, вызываемой отличными в антигенном отношении от вакцинных штаммов вариантами вируса гриппа, которые вызывают вторичные бактериальные осложнения. Поэтому изучение иммунного ответа в условиях несовпадения вакцинного и циркулирующего штаммов вируса гриппа представляет особую актуальность. Учитывая все недостатки традиционной вакцины на основе РКЭ, разрабатывают альтернативные методы производства вакцин, среди которых вакцины против гриппа на основе вирусоподобных частиц.

Вирусоподобные частицы (VLPs) представляют собой один из современных и перспективных подходов к созданию вакцин против вируса гриппа, позволяющий индуцировать направленный иммунный ответ без риска развития продуктивной инфекции. В настоящей работе была изучена антигенная и протективная активность VLPs, несущих поверхностные белки вируса гриппа, в контексте развития вторичной бактериальной пневмонии у мышей, индуцированной гриппозной инфекцией с последующим заражением *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*.

Для получения вакцинного препарата была разработана технология конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего вирусоподобные частицы при инфицировании клеток насекомых линии High Five™ (*Trichoplusia ni*). Полученные VLPs (HA-VLPs) использовались для иммунизации животных, после чего проводили заражение как гомологичным, так и антигенно отличным штаммом вируса гриппа, что моделировало ситуацию несоответствия вакцинного и циркулирующего штаммов.

В связи с тем, что современные гриппозные вакцины стандартизируются исключительно по содержанию гемагглютиниона, важным являлось определение достаточности иммунного ответа, направленного только против гемагглютиниона, для ограничения развития вторичных бактериальных осложнений при гомологичном и гетерологичном вирусном заражении.

На первом этапе исследования была оценена антигенная и протективная активность HA-VLPs, а также влияние вакцинации на патоморфологические изменения в лёгких мышей. Иммунизация HA-VLPs индуцировала выраженный сывороточный антителный ответ к гомологичному штамму, выявляемый в реакциях РТГА и ИФА, при этом антитела к гетерологичному штамму не обнаруживались. Эти результаты соответствуют данным о возможности вызывать эффективный иммунитет вакцин на основе VLPs в отношении гриппа, как на мышах, так и на людях [56, 57, 162].

Оценка протективной активности показала, что HA-VLPs обеспечивали полную защиту животных от заражения гомологичным штаммом вируса гриппа

независимо от кратности иммунизации. В случае гетерологичного заражения защитный эффект был выражен значительно слабее и возрастал при увеличении числа иммунизаций. При этом двукратная вакцинация HA-VLPs при заражении гетерологичным штаммом демонстрировала тенденцию к снижению бактериальной нагрузки в лёгких, практически не влияя на репродукцию вируса. Таким образом, препарат HA-VLPs обладал высоким защитным потенциалом в отношении гомологичного штамма, а в отношении гетерологичного штамма его эффективность была значительно ниже. Если подобные исследования на модели гриппозной пневмонии мышей были ожидаемы, то при моделировании вторичной бактериальной инфекции такие результаты были получены впервые.

Патоморфологический анализ подтвердил данные вирусологических и микробиологических исследований. Однократная иммунизация HA-VLPs сопровождалась уменьшением площади воспалительных очагов и инфильтрации в лёгких при инфицировании гомологичным штаммом, а при инфицировании гетерологичным штаммом выраженность воспалительных изменений у вакцинированных животных не отличалась от таковой в контрольных группах.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунитет, направленный исключительно против HA вируса гриппа, может быть достаточным для предотвращения летальности при гомологичном заражении и ассоциированной вторичной бактериальной инфекции, однако оказывается недостаточным при инфицировании антигенно расходящимися штаммами вируса гриппа. Однократная иммунизация ограничивала репликацию вируса, что, в свою очередь, позволило полностью предотвратить бактериальную колонизацию на второй день после бактериальной инокуляции, тогда как у невакцинированных животных бактерии сохранялись. Постгриппозные осложнения, вызванные *S. aureus*, могут быть смягчены адекватным иммунитетом против HA, вызванным высокоиммуногенным препаратом HA-VLPs, экспрессируемым клетками насекомых. Наши результаты также предполагают, что иммунитет против HA не следует рассматривать как единственный профилактический метод борьбы с гриппом и постгриппозными бактериальными инфекциями.

Преодоление штаммоспецифичности традиционных вакцин против гриппа до сих пор является серьезной проблемой в вакцинологии против гриппа. Вирусоподобные частицы рассматриваются как привлекательная платформа, способная обеспечить более широкие или более сбалансированные иммунные ответы, в отличие от других вакцин [57, 150]. Однако в нашем исследовании иммунитет против НА был недостаточен для защиты иммунизированных мышей от вторичной бактериальной инфекции при вирусном заражении антигенно отличающимся штаммом гриппа H1N1. В отличие от наших результатов, Zurli и соавторы смогли продемонстрировать значительную защиту от вторичной инфекции *S. aureus* после гетерологичной инфекции вируса A/California/04/2009(H1N1)pdm09 при использовании субъединичной вакцины на основе штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) [205].

Исследования с применением VLPs, селективно экспрессирующих различные белки вируса гриппа, могут позволить выявить потенциал консервативных антигенов вируса гриппа и создать теоретическую базу для создания рекомбинантных гриппозных вакцин с широким спектром действия, эффективных в отношении дрейф-вариантов вируса гриппа. С целью преодоления штаммоспецифичности НА-опосредованного иммунитета было важно оценить, улучшит ли включение нейраминидазы в состав VLPs перекрестный защитный потенциал. Помимо иммунитета на основе НА, НА-специфический иммунный ответ уже продемонстрировал способность ограничивать тяжесть протекания болезни и смертность в модели суперинфекции *S. pneumoniae*, что было показано Huber и соавт., в то время как ингибирование активности нейраминидазы было полезным при лечении бактериальной пневмонии после гриппа [94, 175].

В настоящее время, в США на стадии доклинической разработки находится рекомбинантная вакцина N1-MPP на основе нейраминидазы [55]. Антигенный дрейф НА часто происходит медленнее и несовместимо с антигенным дрейфом НА, что может обеспечить потенциальную защиту в случае несоответствия НА в сезонной вакцине циркулирующему вирусу, а изменения штамма НА в составе вакцины могут потребоваться лишь раз в несколько лет. Кроме того, вакцины на

основе NA могут обеспечивать потенциальную перекрестную защиту от новых подтипов гриппа А, таких как H5N1 или H9N2 [190]. Вакцина на основе NA содержит агонист TLR7/8 (Toll-подобные рецепторы 7 и 8, играющие ключевую роль в распознавании вируса гриппа иммунной системой человека) и представлена в виде мукоадгезивной формулы, улучшающей мукозальный иммунный ответ. При интраназальном введении мышам вакцина вызывала образование антител IgG в сыворотке крови, антител IgA в носовой полости и антител в бронхоальвеолярной жидкости, а также индуцировала мукозальный иммунный ответ в различных слизистых тканях [182].

Восприимчивость ко вторичной бактериальной инфекции связана как с факторами вирусного происхождения, так и с особенностями врожденного иммунитета организма. Один из поверхностных ферментов вируса гриппа, нейраминидаза (NA), может способствовать прикреплению бактерий к поверхности респираторного эпителия, стимулируя экспрессию клеточных рецепторов, вовлеченных в адгезию бактерий. Современные гриппозные вакцины стандартизированы только по содержанию белка гемагглютинина (HA), в то время как количество других вирусных антигенов, присутствующих в инактивированных вакцинах, определяется их естественным содержанием в вирионах вируса гриппа. Это приводит к тому, что NA антиген может находиться в недостаточном количестве. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что нейраминидаза вируса гриппа способствует повышению чувствительности организма к бактериальной суперинфекции. Тем не менее, данный белок практически игнорируется как компонент разрабатываемых и выпускаемых гриппозных вакцин, а исследования роли иммунного ответа к этому антигену в регуляции восприимчивости организма к бактериальной суперинфекции после гриппозной инфекции практически отсутствуют [94]. Поэтому следующий этап работы был направлен на исследование возможности коррекции иммунного ответа путем увеличения пропорции NA по отношению к содержанию HA с использованием вирусоподобных частиц (VLPs), несущих гриппозные антигены в сочетании с капсидным белком негриппозной природы.

При изучении иммунного ответа после вакцинации мышей препаратами НА-VLPs или их комбинацией с NA-VLPs в сыворотке крови в реакции РТГА были выявлены титры антител к гомологичному вирусу, и не было выявлено антител к гетерологичному штамму NIBRG-121xp.

Для оценки влияния вирусной нейраминидазы на эпителий легких было проведено гистологическое исследование с применением окраски гематоксилином/эозином, а также гистохимическое исследование. В контрольной группе наблюдался наивысший уровень связывания лектина, тогда как вакцинация коктейлем НА-VLPs + NA-VLPs приводила к существенному снижению интенсивности его связывания. Гистохимические данные были подтверждены гистологическими: у невакцинированных животных контрольной группы выявлялись тяжелые повреждения ткани легких, а у животных, вакцинированных коктейлем VLPs, повреждения ткани лёгких были менее выраженными.

Включение нейраминидазного компонента в состав экспериментальных VLPs приводило к частичному повышению выживаемости животных при гетерологичном вирусном заражении и снижению бактериальной нагрузки в лёгких, однако иммунный ответ только к НА не обеспечивал полной защиты. Наиболее выраженный протективный эффект наблюдался при использовании комбинированного вакцинного препарата с нейраминидазным компонентом.

Совокупность полученных результатов позволяет заключить, что иммунный ответ к гемагглютнину играет ведущую роль при защите от вторичной бактериальной суперинфекции, спровоцированной инфекцией гетерологичным, по отношению к вакцинному препарату, штаммом вируса гриппа. Иммунный ответ, направленный исключительно против НА, несмотря на положительное влияние на снижение бактериальной нагрузки, не обеспечивал повышение выживаемости у животных, однако добавление НА в состав экспериментальной вакцины способствовало снижению летальности при гетерологичном вирусном заражении. Обогащение вакцинного препарата нейраминидазным компонентом приводило к частичному улучшению его кросс-протективных свойств, но для расширения кросс-протективных свойств вакцины необходимо включение дополнительных,

более консервативных антигенов вируса гриппа. Использование вирусоподобных частиц, экспрессирующих несколько вирусных белков, представляет собой перспективную платформу для разработки рекомбинантных гриппозных вакцин, способных эффективно ограничивать вирусную репликацию и снижать риск развития тяжёлых вирусно-бактериальных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе разработана и охарактеризована экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной двумя штаммами вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), относящимися к одному подтипу H1N1, а также их реассортантом NIBRG-121хр и двумя бактериальными патогенами, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, на которой выявлен синергизм вируса гриппа и бактерий, выражающийся в увеличении смертности мышей и потере веса, уменьшении продолжительности жизни, усилению размножения обоих патогенов в легких при комбинированном заражении по сравнению с заражением каждым патогеном в отдельности.

На данной модели показана эффективность применения противогриппозных препаратов прямого противовирусного действия, иммуномодулятора, антибактериальных препаратов и их комбинации с противовирусными препаратами, выражающаяся в увеличении выживаемости, уменьшении потери массы тела и снижении содержания патогенов в лёгких. Была исследована эффективность иммунизации живой и инактивированной гриппозными вакцинами, а также препаратами вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин и нейраминидазу.

Полученные в ходе работы результаты показывают, что экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции может быть использована для исследования патогенеза инфекции, а также для оценки эффективности противовирусных и вакцинных препаратов различного механизма действия. Полученные результаты расширяют понимание механизмов взаимодействия вирусных и бактериальных возбудителей при вторичных инфекциях респираторного тракта и позволяют определить эффективные стратегии профилактики и терапии таких осложнений.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и охарактеризована экспериментальная модель вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной штаммами вируса гриппа A/California/04/2009(H1N1)pdm09 и A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1) подтипа H1N1, их реассортантом NIBRG-121хр, а также штаммом A/Aichi/2/69(H3N2) подтипа H3N2, и двумя бактериальными патогенами, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Выявлен синергизм вирусов гриппа и бактерий, выражающийся в увеличении смертности мышей и потери ими массы тела, усилении размножения обоих патогенов в легких при комбинированном заражении по сравнению с моноинфекцией.

2. Этиотропные противовирусные препараты умифеновир и осельтамивир, а также индуктор интерферонов тилорон были эффективны на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной заражением A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *Staphylococcus aureus* или *Streptococcus pneumoniae*.

3. Комбинированное лечение умифеновиром, осельтамивиром и тилороном с антибактериальными препаратами цефуроксимом, клиндамицином и ципрофлоксацином было эффективнее, чем лечение каждым препаратом отдельно на модели вторичной бактериальной пневмонии, вызванной заражением A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *Staphylococcus aureus*.

4. Иммунизация мышей живой (холодоадаптированный аттенуированный штамм A/17/California/2009/38 (H1N1)) и инактивированной гриппозной вакцинами (концентрат субъединиц A/California/04/2009(H1N1)pdm09) блокирует бактериальную инфекцию в нижних отделах респираторного тракта у мышей со вторичной бактериальной пневмонией, вызванной инфицированием A/California/04/2009(H1N1)pdm09 с последующим заражением *Streptococcus pneumoniae*.

5. Вирусоподобные частицы, содержащие гемагглютинин вируса гриппа, обладают иммуногенной активностью в отношении гомологичного штамма A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), а протективная активность этих частиц у мышей со вторичной пневмонией, индуцированной *Streptococcus pneumoniae* или *Staphylococcus aureus* после заражения гомологичным штаммом A/Puerto Rico/8/34/RG (H1N1), выше, чем после заражения гетерологичным штаммом A/NIBRG-121xp (H1N1).

6. Иммунизация комбинацией вирусоподобных частиц, содержащих гемагглютинин и нейраминидазу, эффективнее, чем вакцинация каждым из компонентов по отдельности, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, индуцированной *Streptococcus pneumoniae* или *Staphylococcus aureus* после заражения гетерологичным штаммом вируса гриппа A/NIBRG-121xp (H1N1).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в ходе исследования сведения могут быть использованы для оптимизации доз и схем лечения осложнений после гриппа при разработке дизайна клинических исследований.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АО — акционерное общество
- АТХ — анатомо-терапевтическо-химическая классификация лекарственных средств
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ГОСТ — государственный стандарт
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖГВ — живая гриппозная вакцина
- ЖНВЛС — жизненно необходимые и важнейшие лекарственные средства
- ИК₅₀ — полумаксимальная ингибирующая концентрация
- ИФА — иммуноферментный анализ
- КОЕ — колониеобразующие единицы
- КСЕ — концентрат субъединиц
- мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
- НИР — научно-исследовательская работа
- ОАО — открытое акционерное общество
- ОРВИ — острые респираторные вирусные инфекции
- РКЭ — развивающийся куриный эмбрион
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- РТГА — реакция торможения гемагглютинации
- СО₂ — диоксид углерода (углекислый газ)
- СП — свод правил
- СССР — Союз Советских Социалистических Республик
- ТЦИД — тканевая цитопатическая инфекционная доза
- ФИТЦ — флуоресцеин изотиоцианат
- ФСБ — фосфатно-солевой буфер
- ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких
- ЦПД — цитопатическое действие вируса
- ЭИД — эмбриональная инфекционная доза

ЮНИСЕФ — Детский фонд Организации объединенных наций

CDC — Centers for Disease Control and Prevention, центры по контролю и профилактике заболеваний в США

HA — гемагглютинин

MDCK — клетки почек собаки Мадина-Дарби

NA — нейраминидаза

PA — кислый белок полимеразы

PB1 — полимеразный основной белок 1

PB2 — полимеразный основной белок 2

VLPs — вирусоподобные частицы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова, Г. И. Живая вакцина против гриппа / Г. И. Александрова, А. И. Климов. – Санкт-Петербург : Наука, 1994. – 150 с. – ISBN 5-02-025988-8.
2. Александрова, Г. И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа / Г. И. Александрова // Вопросы вирусологии. – 1977. – Т. 22, № 4. – С. 387–395.
3. Амиксин® (тилорон) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/8a267191-4cf2-4d87-af75-64c2b971c787> (дата обращения: 16.05.2026).
4. Арбидол® (умифеновир) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/aa7024cd-4df6-4664-8a70-e8d92ff0a015> (дата обращения: 16.05.2026).
5. Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции / Н. Р. Махмудова, И. А. Ленева, Н. В. Ларионова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 30–39. – DOI: 10.36233/0372-9311-2019-6-30-39.
6. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней : санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 : утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2008 № 4 : дата введения 01.05.2008 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/902091086> (дата обращения: 28.05.2026).
7. ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами : межгосударственный стандарт : принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации

(протокол от 22 декабря 2014 г. № 73-П) : введен впервые : дата введения 2016-07-01. – Москва : Стандартиформ, 2016. – 16 с.

8. Григорьева, Е. П. Современное состояние вакцинопрофилактики гриппа с помощью живой гриппозной вакцины / Е. П. Григорьева, Е. М. Дорошенко, Л. Г. Руденко // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. – № 4 (23). – С. 13–17.

9. Грипп (сезонный) [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения : офиц. сайт. – 2025. – URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru/> (дата обращения: 16.05.2026).

10. Грипп у взрослых : клинические рекомендации / Национальная ассоциация специалистов по инфекционным болезням им. акад. В.И. Покровского ; Российское научное медицинское общество терапевтов. – Москва : Минздрав России, 2022. – 104 с. – URL: https://med.roche.ru/wp-content/uploads/2025/09/klinicheskie_rekomendacii_2022-gripp_u_vzroslyh.pdf (дата обращения: 02.04.2026).

11. Грипп, COVID-19 и другие ОРВИ. Вакцинопрофилактика и лечение : учебное пособие / В. В. Никифоров, Т. Г. Суранова, Н. Л. Бондаренко [и др.]. – Москва : Спецкнига, 2024. – 50 с. – ISBN 978-5-905702-20-5.

12. Гуськова, Т. А. Арбидол – иммуномодулятор, индуктор интерферона, антиоксидант / Т. А. Гуськова, Р. Г. Глушков. – Москва : Тимотек, 1999. – 93 с.

13. Егоров, А. Ю. Проблема бактериальных осложнений при респираторных вирусных инфекциях / А. Ю. Егоров // Независимые микробиологические исследования. – 2018. – Т. 5, № 1. – С. 1–11. – DOI: 10.18527/2500-2236-2018-5-1-1-11.

14. Ершов, Ф. И. Индукторы интерферона – новое поколение иммуномодуляторов / Ф. И. Ершов, Э. Б. Тазулахова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 1999. – № 4. – С. 52–56.

15. Ершов, Ф. И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств) / Ф. И. Ершов, О. И. Киселев. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 356 с. – ISBN 5-9704-0060-2.

16. Ершов, Ф. И. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях / Ф. И. Ершов, А. Н. Наровлянский // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60, № 2. – С. 5–10.
17. Живая гриппозная вакцина из реассортантного штамма A/17/Калифорния/2009/38 (H1N1) – эффективный препарат для профилактики пандемического гриппа / Н. В. Ларионова, И. В. Киселева, А. Н. Миронов [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т. 11, № 4. – С. 3–12. – DOI: 10.17816/MAJ1143-12.
18. Изучение вирусоподобных частиц на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей после гриппозной инфекции / И. Н. Фалынскова, Н. Р. Махмудова, Н. О. Вартанова [и др.] // Вестник Биомедицина и социология. – 2018. – Т. 3, № 3. – С. 5–7.
19. Изучение защитной эффективности вирусоподобных частиц, содержащих NA вируса гриппа, в мышинной модели постгриппозной бактериальной пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus* / Е. А. Глубокова, И. А. Ленева, И. Н. Фалынскова, А. В. Поддубиков // Российский иммунологический журнал. – 2020. – Т. 23, № 4. – С. 389–394. – DOI: 10.46235/1028-7221-441-EPF.
20. Изучение роли иммунитета к нейраминидазе вируса гриппа в защите от вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. aureus* после гриппозной инфекции у мышей / И. А. Ленева, И. Н. Фалынскова, Н. П. Карташова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97, № 6. – С. 564–577. – DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-7.
21. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторными штаммами вируса гриппа H1N1 / И. А. Ленева, А. Ю. Егоров, И. Н. Фалынскова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 1. – С. 68–74. – DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-68-74.
22. Интерферон-гамма в терапии гриппа и других респираторных вирусных инфекций / Т. В. Сологуб, Г. С. Голобоков, В. В. Цветков, И. И. Токин //

Медицинский совет. – 2015. – № 7. – С. 54–58. – DOI: 10.21518/2079-701X-2015-7-54-58.

23. Исаков, В. А. Иммуномодуляторы в терапии респираторных инфекций / В. А. Исаков, Д. В. Исаков // Антибиотики и химиотерапия. – 2017. – Т. 59, № 11–12. – С. 3–10.

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

25. Исследование противовирусной активности российских противогриппозных препаратов на культуре клеток и животных моделях / И. А. Ленева, И. Т. Федякина, М. И. Еропкин [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55, № 3. – С. 19–27.

26. Клиндамицин (клиндамицин) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/ae7d8d3e-689d-4822-bb77-5b936d46214b> (дата обращения: 16.05.2026).

27. Клиническая эффективность препарата Арбидол (умифеновир) в терапии гриппа у взрослых / О. И. Киселев, В. В. Малеев, Э. Г. Деева [и др.] // Терапевтический архив. – 2015. – № 1. – С. 88–96. – DOI: 10.17116/terarkh.201587188-96.

28. Клиническая эффективность умифеновира при гриппе и ОРВИ / Н. Ю. Пшеничная, В. А. Булгакова, Н. И. Львов [и др.] // Терапевтический архив. – 2019. – Т. 91, № 3. – С. 56–63. – DOI: 10.26442/00403660.2019.03.000127.

29. Ленева, И. А. Противовирусные этиотропные химиопрепараты: эффективность против вируса гриппа А подтипа H5N1 / И. А. Ленева, А. М. Шустер // Вопросы вирусологии. – 2006. – № 5. – С. 4–7.

30. Лобастова, А. К. Опыт применения живой интраназальной гриппозной вакцины в Российской Федерации и за рубежом / А. К. Лобастова, И. В. Красильников // Детские инфекции. – 2011. – № 3. – С. 37–38.

31. Медицинская вирусология : руководство / под ред. Д. К. Львова. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2008. – 655 с. – ISBN 5-89481-564-9.
32. Мониторинг чувствительности выделенных в России эпидемических штаммов вирусов гриппа к этиотропным химиопрепаратам / Е. И. Бурцева, Е. С. Шевченко, Н. В. Белякова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т. 54, № 5. – С. 24–28.
33. Новый индуктор интерферона, активный при пероральном введении / Ф. И. Ершов, А. М. Саиткулов, Э. Б. Тазулахова, А. С. Садыков // Вопросы вирусологии. – 1986. – № 3. – С. 335–338.
34. Пандемический грипп А/Н1N1 (2009) в России: эпидемиология, диагностика, клиническая картина и лечение / С. Б. Яцышина, А. Н. Миненко, Т. Е. Кушакова [и др.] // Терапевтический архив. – 2010. – Т. 82, № 11. – С. 10–14.
35. Патогенез гриппозной инфекции и вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированных различными подтипами вируса гриппа А, у мышей / А. А. Поромов, Н. Р. Махмудова, И. Н. Фалынскова [и др.] // Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 99–110. – DOI: 10.15789/1563-0625-IVI-1840.
36. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – Смоленск : МАКМАХ, 2007. – 462 с. – ISBN 5-86064-115-X.
37. Разработка экспериментальной модели сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии / И. А. Ленева, Е. И. Леонова, Н. Р. Махмудова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60, № 5. – С. 27–31.
38. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / отв. ред. А. Н. Миронов. – Москва : Гриф и К, 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3.
39. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) : санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 : утв. постановлением

Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 : дата введения 17.02.2015 // Кодекс : электрон. фонд правовой и норматив.-техн. информ. – URL: <https://docs.cntd.ru/document/420219460> (дата обращения: 28.05.2026).

40. Сравнительная характеристика интерферониндуцирующей способности двух ароматических соединений / Э. Б. Тазулахова, М. М. Козловский, Н. П. Чижов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1991. – № 4. – С. 303–305.

41. Тазулахова, Э. Б. Интерферониндуцирующая активность тилорона гидрохлорида / Э. Б. Тазулахова, Н. Н. Амитина, Ф. И. Ершов // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1985. – № 9. – С. 668–672.

42. Тамифлю® (осельтамивир) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/64139ea3-a71e-439a-96fa-e3266c5e8111> (дата обращения: 16.05.2026).

43. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению тяжелых форм гриппа / А. Г. Чучалин, С. Н. Авдеев, А. Л. Черняев [и др.] // Пульмонология. – 2015. – № 5. – С. 11–19. – DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-5-11-19.

44. Химиопрепараты в терапии гриппа и других респираторных вирусных инфекций у детей / В. П. Дринецкий, Л. В. Осидак, В. К. Нацина [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – Т. 43, № 9. – С. 29–34.

45. Цефуроксим (цефуроксим) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/c0c26865-dbc3-4dc8-8f22-7732be1b78b6> (дата обращения: 16.05.2026).

46. Ципринол® (ципрофлоксацин) : инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата // Государственный реестр лекарственных средств : офиц. сайт. – URL: <https://grls.pharm-portal.ru/grls/a022ccc8-83f9-4c34-99e0-82552bd41a7c> (дата обращения: 16.01.2026).

47. Чувствительность к ремантадину и арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004–2005

гг. / Е. И. Бурцева, Е. С. Шевченко, И. А. Ленева [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т. 52, № 2. – С. 24–29.

48. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека / А. В. Васин, А. В. Петрова-Бродская, М. А. Плотникова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62, № 6. – С. 246–258. – DOI: 10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258.

49. Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные / И. Н. Фалынскова, А. Ю. Егоров, А. В. Поддубиков [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 150–158. – DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-3-150-158.

50. Эффективность индуктора интерферонов тилорона и его комбинации с антибактериальными препаратами на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. aureus* после гриппозной инфекции / И. Н. Фалынскова, А. А. Поромов, Н. А. Михайлова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2026. – Т. 71, № 1. – С. 76–85. – DOI: 10.36233/0507-4088-363.

51. Эффективность умифеновира (Арбидола) на модели экспериментальной сочетанной вирусно-бактериальной пневмонии мышей / И. А. Ленева, И. Н. Фалынскова, Е. И. Леонова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т. 59, № 9–10. – С. 17–24.

52. A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus penetration through the respiratory mucus / X. Yang, L. Steukers, K. Forier [et al.] // PLoS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 10. – Art. e110026. – DOI: 10.1371/journal.pone.0110026.

53. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting / M. Hussain, A. Melegaro, R. G. Pebody [et al.] // Epidemiology and Infection. – 2005. – Vol. 133. – P. 891–898. – DOI: 10.1017/S0950268805004012.

54. A novel outbred mouse model of pandemic influenza and bacterial co-infection / K. J. McHugh, S. Mandalapu, J. K. Kolls [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 12. – Art. e82865. – DOI: 10.1371/journal.pone.0082865.

55. A novel recombinant influenza virus neuraminidase vaccine candidate stabilized by a measles virus phosphoprotein tetramerization domain provides robust protection from virus challenge in the mouse model / S. Strohmeier, F. Amanat, X. Zhu [et al.] // *mBio*. – 2021. – Vol. 12, № 6. – Art. e02241-21. – DOI: 10.1128/mBio.02241-21.
56. A plant-derived quadrivalent virus-like particle influenza vaccine / S. Pillet, É. Aubin, S. Trépanier [et al.] // *Clinical Immunology*. – 2016. – Vol. 168. – P. 72–87. – DOI: 10.1016/j.clim.2016.03.008.
57. A single intramuscular dose of a plant-made virus-like particle vaccine elicits a balanced humoral and cellular response and protects young and aged mice from influenza h1n1 virus challenge despite a modest/absent humoral response / B. Hodgins, K. K. Yam, K. Winter [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2017. – Vol. 24. – Art. e00273-17. – DOI: 10.1128/CVI.00273-17.
58. Addressing the public health burden of respiratory viruses / A. Legand, S. Briand, N. Shindo [et al.] // *Future Virology*. – 2013. – Vol. 8, № 10. – P. 953–968. – DOI: 10.2217/fvl.13.85.
59. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus / M. C. Plotkowski, E. Puchelle, G. Beck [et al.] // *American Review of Respiratory Disease*. – 1986. – Vol. 134, № 5. – P. 1040–1044. – DOI: 10.1164/arrd.1986.134.5.1040.
60. Air, G. M. Influenza neuraminidase / G. M. Air // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2012. – Vol. 6, № 4. – P. 245–256. – DOI: 10.1111/j.1750-2659.2011.00304.
61. Antibiotic use during influenza infection augments lung eosinophils that impair immunity against secondary bacterial pneumonia / M. S. S. Zutton, T. Parimon, S. A. Bora [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 2024. – Vol. 134, № 21. – Art. e180986. – DOI: 10.1172/JCI180986.
62. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine) / W. L. Davies, R. R. Grunert, R. F. Haff [et al.] // *Science*. – 1964. – Vol. 144. – P. 862–863. – DOI: 10.1126/science.144.3620.862.

63. Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A (H1N1) virus infection / Q. Liu, H. R. Xiong, L. Lu [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2013. – Vol. 34, № 8. – P. 1075–1083. – DOI: 10.1038/aps.2013.54.
64. Antiviral therapy and outcomes of influenza A(H1N1) pneumonia / S. G. Yang, B. Cao, L. R. Liang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 1. – Art. e29652. – DOI: 10.1371/journal.pone.0029652.
65. Antiviral therapy for influenza in high-risk outpatients: a multicenter observational study of routine clinical practice in Russia / I. Tokin, D. Lioznov, A. Poromov [et al.] // *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. – 2025. – Vol. 12. – Art. 20499361251347726. – DOI: 10.1177/20499361251347726.
66. Aoki, F. Y. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir / F. Y. Aoki, G. Boivin, N. Roberts // *Antiviral Therapy*. – 2007. – Vol. 12, № 4 (Pt B). – P. 603–616.
67. Arbidol (Umifenovir): A broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses / J. Haviernik, M. Štefánik, M. Fojtíková [et al.] // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, № 4. – P. 184. – DOI: 10.3390/v10040184.
68. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion / Y. Boriskin, I. Leneva, E.-I. Pécheur, S. Polyak // *Current Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 15, № 10. – P. 997–1005. – DOI: 10.2174/092986708784049658.
69. Avian influenza overview March–June 2024 / L. Alexakis, A. Fusaro, T. Kuiken [et al.] // *EFSA Journal*. – 2024. – Vol. 22, № 7. – Art. e8930. – DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8930.
70. Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of pandemic influenza A (H1N1) 2009 / Centers for Disease Control and Prevention // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2009. – Vol. 58, № 38. – P. 1071–1074.
71. Bacterial pneumonia complicating influenza / M. L. Metersky, R. G. Masterton, H. Lode [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 16. – P. 321–331. – DOI: 10.1016/j.ijid.2012.01.003.
72. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza / F. G. Hayden, G. Sugaya, N. Hirotsu [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2018. – Vol. 379, № 10. – P. 913–923. – DOI: 10.1056/NEJMoal716197.

73. Barnard, D. L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy / D. L. Barnard // *Antiviral Research*. – 2009. – Vol. 82, № 2. – P. 110–122. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.12.014.

74. BioRender : website. – URL: <https://www.biorender.com> (дата обращения: 18.04.2026).

75. Blaising, J. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update / J. Blaising, S. J. Polyak, E.-I. Pécheur // *Antiviral Research*. – 2014. – Vol. 107. – P. 84–94. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.04.006.

76. Bogaert, D. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease / D. Bogaert, R. De Groot, P. W. Hermans // *Lancet Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 4, № 3. – P. 144–154. – DOI: 10.1016/S1473-3099(04)00938-7.

77. Bone, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS / R. C. Bone // *Critical Care Medicine*. – 1996. – Vol. 24, № 7. – P. 1125–1128. – DOI: 10.1097/00003246-199607000-00010.

78. Bouvier, N. M. The biology of influenza viruses / N. M. Bouvier, P. Palese // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № S4. – P. 49–53. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.039.

79. Brem, W. V. Pandemic influenza and secondary pneumonia at Camp Fremont, California / W. V. Brem, G. E. Bolling, E. J. Casper // *Journal of the American Medical Association*. – 1918. – Vol. 71. – P. 2138–2144. – DOI: 10.1001/jama.1918.26020520007010b.

80. Brundage, J. F. Deaths from bacterial pneumonia during 1918–19 influenza pandemic / J. F. Brundage, G. D. Shanks // *Emerging Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 14, № 8. – P. 1193–1199. – DOI: 10.3201/eid1408.071313.

81. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years / K. L. O'Brien, L. J. Wolfson, J. P. Watt [et al.] // *The Lancet*. – 2009. – Vol. 374, № 9693. – P. 893–902. – DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.

82. Carter, N. J. Live attenuated influenza vaccine (FluMist®; Fluenz™): review of its use in the prevention of seasonal influenza / N. J. Carter, M. P. Curran // *Drugs*. – 2011. – Vol. 71, № 12. – P. 1591–1622. – DOI: 10.2165/11206860-000000000-00000.

83. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus / I. A. Leneva, R. J. Russell, Y. S. Boriskin, A. J. Hay // *Antiviral Research.* – 2009. – Vol. 81, № 2. – P. 132–140. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.10.009.
84. Characterization of Influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) Virus in a Mouse Model and Protective Effect of Zanamivir on H5N1 Infection in Mice / L. V. Gubareva, J. A. McCullers, R. C. Bethell, R. G. Webster // *Journal of Infectious Diseases.* – 1998. – Vol. 178, № 6. – P. 1592–1596. – DOI: 10.1086/314515.
85. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil / S. Omoto, V. Speranzini, T. Hashimoto [et al.] // *Scientific Reports.* – 2018. – Vol. 8, № 1. – Art. 9633. – DOI: 10.1038/s41598-018-27890-4.
86. Chien, Y. W. Bacterial pathogens and death during the 1918 influenza pandemic / Y. W. Chien, K. P. Klugman, D. M. Morens // *New England Journal of Medicine.* – 2009. – Vol. 361, № 26. – P. 2582–2583. – DOI: 10.1056/NEJMc0908216.
87. Chronopoulou, S. Interferon Lambda: The Next Frontier in Antiviral Therapy? / S. Chronopoulou, I. Tsochantaridis // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2025. – Vol. 18, № 6. – Art. 785. – DOI: 10.3390/ph18060785.
88. Clarithromycin inhibits influenza virus infection / M. Yamaya, K. Shinya, Y. Hatachi [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2010. – Vol. 333. – P. 81–90. – DOI: 10.1124/jpet.109.162149.
89. Clarithromycin prevents secondary bacterial pneumonia / T. Harada, Y. Ishimatsu, A. Hara [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2016. – Vol. 358. – P. 457–463. – DOI: 10.1124/jpet.116.233932.
90. Clayville, L. R. Influenza update: a review of currently available vaccines / L. R. Clayville // *P&T.* – 2011. – Vol. 36, № 10. – P. 659–684.
91. Clinical practice guidelines for influenza [Electronic resource] // World Health Organization : official website. – 2024. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240097759> (дата обращения: 01.04.2026).
92. Clinical testing of pre-pandemic live attenuated A/H5N2 influenza candidate vaccine in adult volunteers: results from a placebo-controlled, randomized double-blind

phase I study / L. G. Rudenko, I. Kiseleva, M. Stukova [et al.] // *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33, № 39. – P. 5110–5117. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.08.019.

93. Comparing influenza vaccine efficacy against mismatched and matched strains / A. C. Tricco, A. Chit, C. Soobiah [et al.] // *BMC Medicine*. – 2013. – Vol. 11. – Art.153. – DOI: 10.1186/1741-7015-11-153.

94. Contribution of vaccine-induced immunity toward either the HA or the NA component of influenza viruses limits secondary bacterial complications / V. C. Huber, V. Peltola, A. R. Iverson, J. A. McCullers // *Journal of Virology*. – 2010. – Vol. 84, № 8. – P. 4105–4108. – DOI: 10.1128/JVI.02621-09.

95. Cowling, B. J. Influenza Vaccine Effectiveness and Progress Towards a Universal Influenza Vaccine / B. J. Cowling, G. N. Okoli // *Drugs*. – 2024. – Vol. 84. – P. 1013–1023. – DOI: 10.1007/s40265-024-02083-8.

96. Cox, M. M. J. Production of a novel influenza vaccine using insect cells: protection against drifted strains / M. M. J. Cox, D. K. Anderson // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2007. – Vol. 1, № 1. – P. 35–40. – DOI: 10.1111/j.1750-2659.2006.00007.x.

97. Critical Illness from 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus and Bacterial Co-Infection in the United States / T. W. Rice, L. Robinson, T. M. Uyeki [et al.] // *Critical Care Medicine*. – 2012. – Vol. 40. – P. 1487–1498. – DOI: 10.1097/CCM.0b013e3182416f23.

98. Current approaches for diagnosis of influenza virus infections in humans / S. V. Vemula, J. Zhao, J. Liu [et al.] // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8, № 4. – Art. 96. – DOI: 10.3390/v8040096.

99. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors / A. S. Monto, J. L. McKimm-Breschkin, C. Macken [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – Vol. 50. – P. 2395–2402. – DOI: 10.1128/AAC.01339-05.

100. Developments of subunit and VLP vaccines against influenza A virus / M.-P. Deng, Z.-H. Hu, H.-L. Wang, F. Deng // *Virologica Sinica*. – 2012. – Vol. 27. – P. 145–153. – DOI: 10.1007/s12250-012-3241-1.

101. Discovery of influenza polymerase PA-PB1 interaction inhibitors using an in vitro split-luciferase complementation-based assay / J. Zhang, Y. Hu, N. Wu, J. Wang // *ACS Chemical Biology*. – 2019. – Vol. 15, № 1. – P. 74–82. – DOI: 10.1021/acscchembio.9b00552.

102. Early administration of oral oseltamivir increases the benefits of influenza treatment / F. Y. Aoki, M. D. Macleod, P. Paggiaro [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 51. – P. 123–129. – DOI: 10.1093/jac/dkg007.

103. Effect of linezolid in a murine model of influenza and *Staphylococcus aureus* coinfection / X. Liu, Y. He, K. Xiao [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – Art. e57483. – DOI: 10.1371/journal.pone.0057483.

104. Effect of tilorone on the dynamics of viral load and cytokine levels in experimental influenza / O. V. Kalyuzhin, E. I. Isaeva, E. N. Vetrova [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – Vol. 171. – P. 736–740. – DOI: 10.1007/s10517-021-05306-0.

105. Effectiveness of influenza vaccine in the community-dwelling elderly / K. L. Nichol, J. D. Nordin, D. B. Nelson [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2007. – Vol. 357, № 14. – P. 1373–1381. – DOI: 10.1056/NEJMoa070844.

106. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials / N. J. Cooper, A. J. Sutton, K. R. Abrams [et al.] // *British Medical Journal*. – 2003. – Vol. 326, № 7401. – Art. 1235. – DOI: 10.1136/bmj.326.7401.1235.

107. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group / K. G. Nicholson, F. Y. Aoki, A. D. Osterhaus [et al.] // *The Lancet*. – 2000. – Vol. 355, № 9218. – P. 1845–1850. – DOI: 10.1016/s0140-6736(00)02288-1.

108. Efficacy and safety of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir in treating acute influenza: a randomized controlled trial. US oral neuraminidase study group / J. J. Treanor, F. G. Hayden, P. S. Vrooman [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2000. – Vol. 283. – P. 1016–1024. – DOI: 10.1001/jama.283.8.1016.

109. Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis / A. Huss, P. Scott, A. E. Stuck [et al.] // Canadian Medical Association Journal. – 2009. – Vol. 180. – P. 48–58. – DOI: 10.1503/cmaj.080734.

110. Efficacy of zanamivir in influenza / F. G. Hayden, A. D. M. E. Osterhaus, J. J. Treanor [et al.] // New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 337, № 13. – P. 874–880. – DOI: 10.1056/NEJM199709253371302.

111. Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study / D. Liebowitz, K. Gottlieb, N. S. Kolhatkar [et al.] // Lancet Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 20, № 4. – P. 435–444. – DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30584-5.

112. Ekstrand, J. J. Neurologic complications of influenza / J. J. Ekstrand // Seminars in Pediatric Neurology. – 2012. – Vol. 19, № 3. – P. 96–100. – DOI: 10.1016/j.spen.2012.02.004.

113. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children / I. C. Michelow, K. Olsen, J. Lozano [et al.] // Pediatrics. – 2004. – Vol. 113. – P. 701–707. – DOI: 10.1542/peds.113.4.70.

114. Estimates of deaths associated with seasonal influenza, United States, 1976–2007 / Centers for Disease Control and Prevention // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2010. – Vol. 59. – P. 1057–1062.

115. Exploring the protective role of recombinant type III interferons in respiratory infections: Insights from an Mx1-Deficient Mouse Model / A. Lozhkov, O. Dobrovolskaya, E. Romanovskaya-Romanko [et al.] // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2025. – Vol. 66, № 1. – Art. 107491. – DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2025.107491.

116. Factsheet about seasonal influenza [Electronic resource] // European Centre for Disease Prevention and Control : official website. – URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/facts/factsheet> (дата обращения: 10.05.2026).

117. Fatalities associated with the 2009 H1N1 influenza A virus in New York City / E. H. Lee, C. Wu, E. U. Lee [et al.] // Clinical Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 50, № 11. – P. 1498–1504. – DOI: 10.1086/652446.

118. Fedson, D. S. The burden of pneumococcal disease among adults / D. S. Fedson, J. Anthony, G. Scott // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17, № S1. – P. 11–18. – DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00122-X.

119. Francis, T. E. Combined infection of mice with *H. influenzae* and influenza virus / T. E. Francis, M. V. de Torregrosa // *Journal of Infectious Diseases*. – 1945. – Vol. 76. – P. 70–77. – DOI: 10.2307/30085688.

120. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project / J. Paget, P. Spreuwerberg, V. Charu [et al.] // *Journal of Global Health*. – 2019. – Vol. 9, № 2. – Art. 020421. – DOI: 10.7189/jogh.09.020421.

121. Global mortality impact of the 1957–1959 influenza pandemic / C. Viboud, L. Simonsen, R. Fuentes [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 213, № 5. – P. 738–745. – DOI: 10.1093/infdis/jiv534.

122. Gubareva, L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors / L. V. Gubareva // *Virus Research*. – 2004. – Vol. 103, № 1–2. – P. 199–203. – DOI: 10.1016/j.virusres.2004.02.034.

123. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers / I. Isakova-Sivak, M. Stukova, M. Erofeeva [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2015. – Vol. 11, № 4. – P. 970–982. – DOI: 10.1080/21645515.2015.1010859.

124. H5N1 virus-like particle vaccine elicits cross-reactive neutralizing antibodies in humans / S. Khurana, J. Wu, N. Verma [et al.] // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85, № 21. – P. 10945–10954. – DOI: 10.1128/JVI.05406-11.

125. H5N1 VLP vaccine induced protection in ferrets against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 influenza viruses / K. Mahmood, R. A. Bright, N. Mytle [et al.] // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 42. – P. 5393–5399. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.07.084.

126. Hernan, M. A. Oseltamivir and risk of lower respiratory tract complications / M. A. Hernan, M. Lipsitch // *Clinical Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 53, № 3. – P. 277–279. – DOI: 10.1093/cid/cir400.

127. Hers, J. F. Bacteriology of fatal Asian influenza / J. F. Hers, N. Masurel, J. Mulder // *Lancet*. – 1958. – Vol. 2, № 7057. – P. 1141–1143.

128. Hong Kong influenza: clinical and pathological features in 127 cases / M. I. Lindsay, E. C. Herrmann, G. W. Morrow, A. L. Brown // *Journal of the American Medical Association*. – 1970. – Vol. 214, № 10. – P. 1825–1832. – DOI: 10.1001/jama.214.10.1825.

129. IDSA/ATS consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults / L. A. Mandell, R. G. Wunderink, A. Anzueto [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 44, № S2. – P. 27–72. – DOI: 10.1086/511159.

130. Impact of neuraminidase inhibitor treatment on outcomes of public health importance during the 2009-2010 influenza A(H1N1) pandemic: a systematic review and meta-analysis in hospitalized patients / S. G. Muthuri, P. R. Myles, S. Venkatesan [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 207, № 4. – P. 553–563. – DOI: 10.1093/infdis/jis726.

131. Impact of oseltamivir treatment on influenza-related lower respiratory tract complications and hospitalizations / L. Kaiser, C. Wat, T. Mills [et al.] // *Archives of Internal Medicine*. – 2003. – Vol. 163. – P. 1667–1672. – DOI: 10.1001/archinte.163.14.1667.

132. Impact of respiratory virus infections in chronic disease / W. P. Glezen, S. B. Greenberg, R. L. Atmar [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2000. – Vol. 283. – P. 499–505. – DOI: 10.1001/jama.283.4.499.

133. Impact of zanamivir on antibiotic use for respiratory events following acute influenza in adolescents and adults / L. Kaiser, O. N. Keene, J. M. Hammond [et al.] // *Archives of Internal Medicine*. – 2000. – Vol. 160, № 21. – P. 3234–3240. – DOI: 10.1001/archinte.160.21.3234.

134. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses / Y. Itoh, K. Shinya, M. Kiso [et al.] // *Nature*. – 2009. – Vol. 460, № 7258. – P. 1021–1025. – DOI: 10.1038/nature08260.

135. Inactivated and live attenuated influenza vaccines protect mice against influenza-streptococcus pyogenes superinfections / M. S. Chaussee, H. R. Sandbulte,

M. J. Schuneman [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 3773–3781. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.03.031.

136. Increased incidence of co-infection in critically ill patients with influenza / I. Martin-Loeches, M. J. Schultz, J. L. Vincent [et al.] // *Intensive Care Medicine*. – 2017. – Vol. 43. – P. 48–58. – DOI: 10.1007/s00134-016-4578-y.

137. Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses / A. A. Navarini, M. Recher, K. S. Lang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2006. – Vol. 103. – P. 15535–15539. – DOI: 10.1073/pnas.0607325103.

138. Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins of influenza viruses / J. Szecsi, B. Boson, P. Johnsson [et al.] // *Virology Journal*. – 2006. – Vol. 3. – Art. 70. – DOI: 10.1186/1743-422X-3-70.

139. Infection with community-onset *Staphylococcus aureus* and influenza virus in hospitalized children / C. Reed, A. J. Kallen, M. Patton [et al.] // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2009. – Vol. 28. – P. 572–576. – DOI: 10.1097/INF.0b013e31819d8b71.

140. Influenza / T. M. Uyeki, D. S. Hui, M. Zambon [et al.] // *Lancet*. – 2022. – Vol. 400, № 10353. – P. 693–706. – DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00982-5.

141. Influenza and cardiovascular disease pathophysiology: strings attached / K. G. Skaarup, D. Modin, L. Nielsen [et al.] // *European Heart Journal Supplements*. – 2023. – Vol. 25, № S1 (A). – P. 5–11. – DOI: 10.1093/eurheartjsupp/suac117.

142. Influenza coinfection and outcomes in children with complicated pneumonia / D. J. Williams, M. Hall, T. V. Brogan [et al.] // *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*. – 2011. – Vol. 165, № 5. – P. 506–512. – DOI: 10.1001/archpediatrics.2010.295.

143. Influenza disease burden in adults by subtypes following the initial epidemic of pandemic H1N1 in Singapore / M. K. Win, M. I. Chen, T. Barkham [et al.] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 563–567. – DOI: 10.1111/j.1750-2659.2011.00282.x.

144. Influenza immunization and subsequent group A Streptococcus illness / S.-E. Lee, A. Eick, M. S. Bloom, J. F. Brundage // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 3383–3386. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2008.04.041.

145. Influenza Update № 449 [Electronic resource] // World Health Organization : official website. – 2023. – URL: <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-update-n--449> (дата обращения: 10.04.2026).

146. Influenza vaccine effectiveness in preventing hospitalizations and deaths in persons 65 years or older / J. Nordin, J. Mullooly, S. Poblete [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2001. – Vol. 184. – P. 665–670. – DOI: 10.1086/323085.

147. Influenza viral neuraminidase primes bacterial coinfection / N. Li, A. Ren, X. Wang [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2015. – Vol. 112. – P. 238–243. – DOI: 10.1073/pnas.1414422112.

148. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions / J. L. McAuley, B. P. Gilbertson, S. Trifkovic [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – Art. 39. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.00039.

149. Influenza virus primes mice for pneumonia from Staphylococcus aureus / A. R. Iverson, K. L. Boyd, J. L. McAuley [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 203. – P. 880–888. – DOI: 10.1093/infdis/jiq113.

150. Influenza virus-like particles as a vaccine immunogenicity tool / V. Gavrilov, T. Orekov, C. Alabanza [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2011. – Vol. 173, № 2. – P. 364–373. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.03.011.

151. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin / R. A. Bright, D. M. Carter, S. Daniluk [et al.] // *Vaccine*. – 2007. – Vol. 25. – P. 3871–3878. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.106.

152. Influenza-induced type I interferon enhances susceptibility to bacterial pneumonia in mice / B. Lee, K. M. Robinson, K. J. McHugh [et al.] // *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. – 2015. – Vol. 309, № 2. – P. 158–167. – DOI: 10.1152/ajplung.00338.2014.

153. Inhibition of infectivity and inflammatory response of influenza virus by arbidol / Y. Wang, Y. Ding, C. Yang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2017. – Vol. 91. – P. 393–401. – DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.091.

154. Interferon lambda inhibits bacterial uptake during influenza superinfection / H. E. Rich, C. C. McCourt, W. Q. Zheng [et al.] // *Infection and Immunity*. – 2019. – Vol. 87. – Art. e00114-19. – DOI: 10.1128/IAI.00114-19.

155. Interferon-gamma inhibits influenza A virus cellular attachment by reducing sialic acid cluster size / C. H.-Y. Fong, L. Lu, L.-L. Chen [et al.] // *iScience*. – 2022. – Vol. 25, № 4. – Art. 104037. – DOI: 10.1016/j.isci.2022.104037.

156. José, R. J. Adult pneumococcal vaccination: advances, impact, and unmet needs / R. J. José, J. S. Brown // *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. – 2017. – Vol. 23, № 3. – P. 225–230. – DOI: 10.1097/MCP.0000000000000369.

157. Kadam, R. U. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol / R. U. Kadam, I. A. Wilson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2017. – Vol. 114, № 2. – P. 206–214. – DOI: 10.1073/pnas.1617020114.

158. Kang, Y. Arbidol: The current demand, strategies, and antiviral mechanisms / Y. Kang, Y. Shi, S. Xu // *Immunity, Inflammation and Disease*. – 2023. – Vol. 11. – Art. e984. – DOI: 10.1002/iid3.984.

159. Kelvin, A. A. Influenza imprinting in childhood and the influence on vaccine response later in life / A. A. Kelvin, M. Zambon // *Eurosurveillance*. – 2019. – Vol. 24, № 48. – Art. 1900720. – DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.48.1900720.

160. Kirk, N. M. Comparative Pathology of Animal Models for Influenza A Virus Infection / N. M. Kirk, Y. Liang, H. Ly // *Pathogens*. – 2024. – Vol. 13. – Art. 35. – DOI: 10.3390/pathogens13010035.

161. Krammer, F. Is it possible to develop a “universal” influenza virus vaccine? Potential target antigens and critical aspects for a universal influenza vaccine / F. Krammer, A. García-Sastre, P. Palese // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2018. – Vol. 10, № 7. – Art. a028845. – DOI: 10.1101/cshperspect.a028845.

162. Lee, G.-J. Protection induced by early-stage vaccination with pandemic influenza virus-like particles / G.-J. Lee, F.-S. Quan // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34. – P. 3764–3772. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.06.011.

163. Levandowski, R. A. Modifications of lung clearance mechanisms by acute influenza A infection / R. A. Levandowski, T. R. Gerrity, C. S. Garrard // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 1985. – Vol. 106, № 4. – P. 428–432.

164. Li, W. Type I interferon induction increases susceptibility to secondary pneumococcal infection / W. Li, B. Moltedo, T. M. Moran // *Journal of Virology*. – 2012. – Vol. 86. – P. 12304–12312. – DOI: 10.1128/JVI.01269-12.

165. Lim, W. S. Pneumonia–Overview / W. S. Lim // *Encyclopedia of Respiratory Medicine*. – London : Elsevier, 2021. – P. 185–197. – DOI: 10.1016/B978-0-12-801238-3.11636-8.

166. Limited efficacy of antibacterial vaccination against secondary serotype 3 pneumococcal pneumonia following influenza infection / D. W. Metzger, Y. Furuya, S. L. Salmon [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 212. – P. 445–452. – DOI: 10.1093/infdis/jiv066.

167. Linezolid has unique immunomodulatory effects in postinfluenza community-acquired MRSA pneumonia / U. Bhan, A. B. Podsiad, M. A. Kovach [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, № 1. – Art. e0114574. – DOI: 10.1371/journal.pone.0114574.

168. Lucas, S. Predictive clinicopathological features derived from systematic autopsy examination of patients who died with A/H1N1 influenza infection / S. Lucas // *Health Technology Assessment*. – 2010. – Vol. 14, № 55. – P. 83–114. – DOI: 10.3310/hta14550-02.

169. Madhi, S. A. A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia / S. A. Madhi, K. P. Klugman // *Nature Medicine*. – 2004. – Vol. 10, № 8. – P. 811–813. – DOI: 10.1038/nm1077.

170. Mahy, B. W. J. *Encyclopedia of Virology* / B. W. J. Mahy, M. H. V. Van Regenmortel. – 3rd ed. – Boston : Elsevier Ltd., 2008. – 691 p. – ISBN 978-0-12-373935-3.

171. Mammalian expression of virus-like particles for advanced mimicry of authentic influenza virus / C. Y. Wu, Y. C. Yeh, Y. C. Yang [et al.] // *PLoS ONE*. – 2010. – Vol. 5, № 3. – Art. e9784. – DOI: 10.1371/journal.pone.0009784.

172. Martin-Loeches, I. Bacterial pneumonia as an influenza complication / I. Martin-Loeches, F. van Someren Greve, M. J. Schultz // *Current Opinion in Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 30, № 2. – P. 201–207. – DOI: 10.1097/QCO.0000000000000347.

173. Matsuoka, Y. The mouse model for influenza / Y. Matsuoka, E. W. Lamirande, K. Subbarao // *Current Protocols in Microbiology*. – 2009. – P. 15G.3.1–15G.3.30. – DOI: 10.1002/9780471729259.mc15g03s13.

174. McCullers, J. A. A mouse model of dual infection with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* / J. A. McCullers, R. G. Webster // *Methods in Molecular Medicine*. – 2001. – Vol. 1219. – P. 601–607. – DOI: 10.1016/S0531-5131(01)00631-8.

175. McCullers, J. A. Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza / J. A. McCullers // *Journal of Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 190. – P. 519–526. – DOI: 10.1086/421525.

176. McCullers, J. A. Improving therapeutic strategies for secondary bacterial pneumonia following influenza / J. A. McCullers, B. K. English // *Future Microbiology*. – 2008. – Vol. 3. – P. 397–404. – DOI: 10.2217/17460913.3.4.397.

177. McCullers, J. A. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus / J. A. McCullers // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 571–582. – DOI: 10.1128/CMR.00058-05.

178. McCullers, J. A. Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae* / J. A. McCullers, J. E. Rehg // *Journal of Infectious Diseases*. – 2002. – Vol. 186. – P. 341–350. – DOI: 10.1086/341462.

179. McCullers, J. A. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia / J. A. McCullers, E. I. Tuomanen // *Frontiers in Bioscience*. – 2001. – Vol. 6. – P. 877–889. – DOI: 10.2741/mccullers.

180. McCullers, J. A. Role of neuraminidase in lethal synergism / J. A. McCullers, K. C. Bartmess // *Journal of Infectious Diseases*. – 2003. – Vol. 187. – P. 1000–1009. – DOI: 10.1086/368163.

181. McFee, R. B. Avian influenza: the next pandemic? / R. B. McFee // *Disease-a-Month*. – 2007. – Vol. 53, № 7. – P. 348–387. – DOI: 10.1016/j.disamonth.2007.05.006.

182. Meeting report: fourth correlates of protection for next generation influenza vaccines / A. Tscherne, R. J. Cox, F. Krammer, A. Bonnevie // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2026. – Vol. 20, № 4. – Art. e70258. – DOI: 10.1111/irv.70258.

183. Michaelis, M. Novel swine-origin influenza A virus in humans / M. Michaelis, H. W. Doerr, J. Cinatl // *Medical Microbiology and Immunology*. – 2009. – Vol. 198, № 3. – P. 175–183. – DOI: 10.1007/s00430-009-0118-5.

184. Mina, M. J. Live attenuated influenza vaccine enhances pneumococcal colonization / M. J. Mina, J. A. McCullers, K. P. Klugman // *mBio*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – Art. e01040-13. – DOI: 10.1128/mBio.01040-13.

185. Monto, A. S. The role of antivirals in the control of influenza / A. S. Monto // *Vaccine*. – 2003. – Vol. 21. – P. 1796–1800. – DOI: 10.1016/s0264-410x(03)00075-6.

186. Morens, D. M. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness / D. M. Morens, J. K. Taubenberger, A. S. Fauci // *Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 198, № 7. – P. 962–970. – DOI: 10.1086/591708.

187. Morris, D. E. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics / D. E. Morris, D. W. Cleary, S. C. Clarke // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – Art. 1041. – DOI: 10.3389/fmicb.2017.01041.

188. Mortality among recipients of the Merck V710 *Staphylococcus aureus* vaccine / T. B. McNeely, N. A. Shah, A. Fridman [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2014. – Vol. 10. – P. 3513–3516. – DOI: 10.4161/hv.34407.

189. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States / W. W. Thompson, D. K. Shay, E. Weintraub [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2003. – Vol. 289. – P. 179–186. – DOI: 10.1001/jama.289.2.179.

190. Mucosal immunity against neuraminidase prevents influenza B virus transmission in guinea pigs / M. McMahon, E. Kirkpatrick, D. Stadlbauer [et al.] // *mBio*. – 2019. – Vol. 10, № 3. – Art. e00560-19. – DOI: 10.1128/mBio.00560-19.

191. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and group B *Streptococcus* recombinant peptides / Y. Desheva, G. Leontieva, T. Kramskaya [et al.] //

PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, № 6. – Art. e0218544. – DOI: 10.1371/journal.pone.0218544.

192. Murata, Y. Pleuropulmonary complications of interpandemic influenza A / Y. Murata, E. E. Walsh, A. R. Falany // *Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 195. – P. 1029–1037. – DOI: 10.1086/512160.

193. Nakamura, S. Synergistic stimulation of type I interferons promotes pneumococcal colonization / S. Nakamura, M. Davis, J. N. Weiser // *Journal of Clinical Investigation*. – 2011. – Vol. 121, № 9. – P. 3657–3665. – DOI: 10.1172/JCI57762.

194. Nau, R. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis / R. Nau, H. Eiffert // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2002. – Vol. 15, № 1. – P. 95–110. – DOI: 10.1128/CMR.15.1.95-110.2002.

195. Nichol, K. L. Benefits of influenza vaccination for low-, intermediate-, and high-risk senior citizens / K. L. Nichol, J. Wuorenma, T. von Sternberg // *Archives of Internal Medicine*. – 1998. – Vol. 158, № 16. – P. 1769–1776. – DOI: 10.1001/archinte.158.16.1769.

196. Noda, T. Native morphology of influenza virions / T. Noda // *Frontiers in Microbiology*. – 2012. – Vol. 2. – Art. 269. – DOI: 10.3389/fmicb.2011.00269.

197. Novel correlates of protection against pandemic H1N1 influenza A virus infection / S. Ng, R. Nachbagauer, A. Balmaseda [et al.] // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 6. – P. 962–967. – DOI: 10.1038/s41591-019-0463-x.

198. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped Gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus aureus* infections / M. Klausberger, I. A. Leneva, A. Egorov [et al.] // *Vaccine*. – 2020. – Vol. 38, № 4. – P. 859–867. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.10.083.

199. Oh, D. Y. Using the ferret as an animal model for investigating influenza antiviral effectiveness / D. Y. Oh, A. C. Hurt // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – Art. 80. – DOI: 10.3389/fmicb.2016.00080.

200. Oral oseltamivir treatment of influenza in children / R. J. Whitley, F. G. Hayden, K. S. Reisinger [et al.] // *Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2001. – Vol. 20, № 2. – P. 127–133. – DOI: 10.1097/00006454-200102000-00002.

201. Orman, K. L. Effects of antibiotic class on the macrophage inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* / K. L. Orman, B. K. English // *Journal of Infectious Diseases*. – 2000. – Vol. 182, № 5. – P. 1561–1565. – DOI: 10.1086/315861.
202. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States, 2010–2011 / A. D. Storms, L. V. Gubareva, S. Su [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 18. – P. 308–311. – DOI: 10.3201/eid1802.111466.
203. Pielak, R. M. Influenza M2 proton channels / R. M. Pielak, J. J. Chou // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – Vol. 1808, № 2. – P. 522–529. – DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.04.015.
204. Plaza, P. Update on H5N1 panzootic: infected mammal species increase by almost 50% in just over a year / P. Plaza, S. A. Lambertucci // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2025. – Vol. 19, № 9. – Art. e70159. – DOI: 10.1111/irv.70159.
205. Positive contribution of adjuvanted influenza vaccines to the resolution of bacterial superinfections / V. Zurli, M. Gallotta, M. Taccone [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 213. – P. 1876–1885. – DOI: 10.1093/infdis/jiw048.
206. Potter, C. W. A history of influenza / C. W. Potter // *Journal of Applied Microbiology*. – 2001. – Vol. 91, № 4. – P. 572–579. – DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x.
207. Prevention and control of influenza with vaccines / A. E. Fiore, T. M. Uyeki, K. Broder [et al.] // *MMWR Recommendations and Reports*. – 2010. – Vol. 59. – P. 1–62.
208. Protective efficacy and antigenicity of influenza HA-VLPs in a murine model of postinfluenza bacterial pneumonia / I. Falynskova, I. Leneva, A. Egorov [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2019. – Vol. 54, № S63. – Art. PA4557. – DOI: 10.1183/13993003.congress-2019.PA4557.
209. Protective efficacy of virus like particles (VLPs) containing the influenza HA and/or NA in a murine model of postinfluenza bacterial pneumonia / I. Leneva, I. Falynskova, A. Egorov [et al.] // *European Respiratory Journal*. – 2020. – Vol. 56, № S64. – Art. 2338. – DOI: 10.1183/13993003.congress-2020.2338
210. Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections / J. R. Gill, Z. M. Sheng, S. F. Ely [et al.] // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2010. – Vol. 134, № 2. – P. 235–243. – DOI: 10.5858/134.2.235.

211. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2026 – 2027 northern hemisphere influenza season [Electronic resource] // World Health Organization : official website. – 2026. – URL: <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2026-2027-northern-hemisphere-influenza-season> (дата обращения: 29.04.2026).

212. Reconstruction of the 1918 influenza virus: Unexpected Rewards from the Past / J. K. Taubenberger, D. Baltimore, P. C. Doherty [et al.] // *mBio*. – 2012. – Vol. 3, № 5. – Art. e00201-12. – DOI: 10.1128/mBio.00201-12.

213. Reed, L. J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L. J. Reed, H. Muench // *American Journal of Epidemiology*. – 1938. – Vol. 27. – P. 493–497. – DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

214. Renaud, C. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1 / C. Renaud, J. Kuypers, J. A. Englund // *Journal of Clinical Virology*. – 2011. – Vol. 52. – P. 70–78. – DOI: 10.1016/j.jcv.2011.05.019.

215. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review / J. M. Hament, J. L. Kimpen, A. Flier, T. F. Wolfs // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. – 1999. – Vol. 26. – P. 189–195. – DOI: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01389.x.

216. Richman, D. Antiviral drug resistance / D. Richman // *Antiviral Research*. – 2006. – Vol. 71, № 2–3. – P. 117–121. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2006.03.004.

217. Rise of multidrug-resistant non-vaccine serotype 15A *Streptococcus pneumoniae* in the United Kingdom, 2001 to 2014 / C. Sheppard, N. K. Fry, S. Mushtaq [et al.] // *Euro Surveillance*. – 2016. – Vol. 21, № 50. – Art. 30423. – DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30423.

218. Rothberg, M. B. Complications of seasonal and pandemic influenza / M. B. Rothberg, S. D. Haessler // *Critical Care Medicine*. – 2010. – Vol. 38, № S4. – P. 91–97. – DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181c92eeb.

219. Rothberg, M. B. Complications of viral influenza / M. B. Rothberg, S. D. Haessler, R. B. Brown // *American Journal of Medicine*. – 2008. – Vol. 121, № 4. – P. 258–264. – DOI: 10.1016/j.amjmed.2007.10.040.

220. Russian experience in screening and clinical application of novel interferon inducers / E. B. Tazulakhova, O. V. Parshina, T. S. Guseva, F. I. Ershov // *Journal of Interferon and Cytokine Research*. – 2001. – Vol. 21. – P. 65–73. – DOI: 10.1089/107999001750069926.

221. Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine / J. J. Treanor, G. M. Schiff, F. G. Hayden [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2007. – Vol. 297, № 14. – P. 1577–1582. – DOI: 10.1001/jama.297.14.1577.

222. Safety and immunogenicity of a virus-like particle pandemic influenza A (H1N1) 2009 vaccine in adults in Mexico / C. Lopez-Macias, E. Ferat-Osorio, A. Tenorio-Calvo [et al.] // *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29, № 44. – P. 7826–7834. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.07.099.

223. Safety and immunogenicity of mRNA-1010, an investigational seasonal influenza vaccine, in healthy adults: final results from a phase 1/2 randomized trial / J. Ananworanich, I. T. Lee, D. Enszt [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 231, № 1. – P. 113–122. – DOI: 10.1093/infdis/jiae329.

224. Serotypes and antibiotic resistance of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* in Moscow / N. Mayanskiy, N. Alyabieva, O. Ponomarenko [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – P. 58–62. – DOI: 10.1016/j.ijid.2013.11.005.

225. Severe Community-acquired Pneumonia Due to *Staphylococcus aureus*, 2003–04 Influenza Season / J. C. Hageman, T. M. Uyeki, J. S. Francis [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2006. – Vol. 12. – P. 894–899. – DOI: 10.3201/eid1206.051141.

226. Severe flu management: a point of view / A. Torres, I. M. Martin-Loeches, W. Sligl [et al.] // *Intensive Care Medicine*. – 2020. – Vol. 46. – P. 153–162. – DOI: 10.1007/s00134-019-05868-8.

227. Shindo, N. Making progress on the WHO Public Health Research Agenda for Influenza / N. Shindo // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. – 2013. – Vol. 7, № S2. – P. 1–3. – DOI: 10.1111/irv.12149.

228. Shope, R. E. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology / R. E. Shope // *Journal of Experimental Medicine*. – 1931. – Vol. 54. – P. 373–385. – DOI: 10.1084/jem.54.3.373.
229. Sialidase-based anti-influenza therapy / M. Hedlund, L. M. Aschenbrenner, K. Jensen [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 201, № 7. – P. 1007–1015. – DOI: 10.1086/651170.
230. Simonsen, L. The global impact of influenza on morbidity and mortality / L. Simonsen // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17, № S1. – P. 3–10. – DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00099-7.
231. Sridhar, S. Influenza vaccination strategies: comparing inactivated and live attenuated influenza vaccines / S. Sridhar, K. A. Brokstad, R. J. Cox // *Vaccines*. – 2015. – Vol. 3. – P. 373–389. – DOI: 10.3390/vaccines3020373.
232. Standardizing the influenza neuraminidase inhibition assay among United States public health laboratories conducting virological surveillance / M. Okomo-Adhiambo, V. P. Mishin, K. Sleeman [et al.] // *Antiviral Research*. – 2016. – Vol. 128. – P. 28–35. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.01.009.
233. Staphylococcus aureus community-acquired pneumonia during the 2006–2007 influenza season / A. J. Kallen, J. Brunkard, Z. Moore [et al.] // *Annals of Emergency Medicine*. – 2009. – Vol. 53. – P. 358–365. – DOI: 10.1016/j.annemergmed.2008.04.027.
234. Status of vaccine research and development of vaccines for Staphylococcus aureus / B. K. Giersing, S. S. Dastgheyb, K. Modjarrad, V. Moorthy // *Vaccine*. – 2016. – Vol. 34. – P. 2962–2966. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.03.110.
235. Stevaert, A. The influenza virus polymerase complex: an update on its structure, functions, and significance for antiviral drug design / A. Stevaert, L. Naesens // *Medicinal Research Reviews*. – 2016. – Vol. 36, № 6. – P. 1127–1173. – DOI: 10.1002/med.21401.
236. Streptococcus pneumoniae coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza / G. Palacios, M. Hornig, D. Cisterna [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4, № 12. – Art. e8540. – DOI: 10.1371/journal.pone.0008540.

237. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention / A. E. Bridy-Pappas, M. B. Margolis, K. J. Center, D. J. Isaacman // *Pharmacotherapy*. – 2005. – Vol. 25. – P. 1193–1212. – DOI: 10.1592/phco.2005.25.9.1193.

238. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus / J. Wang, Y. Wu, C. Ma [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110, № 4. – P. 1315–1320. – DOI: 10.1073/pnas.1216526110.

239. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion / R. J. Russell, P. S. Kerry, D. J. Stevens [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 17736–17741. – DOI: 10.1073/pnas.0807142105.

240. Structure-based optimization and synthesis of antiviral drug Arbidol analogues with significantly improved affinity to influenza hemagglutinin / Z. Wright, N. C. Wu, R. U. Kadam [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2017. – Vol. 27, № 16. – P. 3744–3748. – DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.06.074.

241. Studies on influenza in the pandemic of 1957–58. II. Pulmonary complications of influenza / D. Louria, H. Blumenfeld, J. Ellis [et al.] // *Journal of Clinical Investigation*. – 1959. – Vol. 38. – P. 213–265. – DOI: 10.1172/JCI103791.

242. Surveillance and impact of influenza in the United States / A. Klimov, L. Simonsen, K. Fukuda, N. Cox // *Vaccine*. – 1999. – Vol. 17, № S1. – P. 42–46. – DOI: 10.1016/s0264-410x(99)00104-8.

243. Surveillance for influenza – United States, 1997–98, 1998–99, and 1999–00 seasons / Centers for Disease Control and Prevention // *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*. – 2002. – Vol. 51, № SS07. – P. 1–10.

244. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide / V. M. Deyde, X. Xu, R. A. Bright [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 196, № 2. – P. 249–257. – DOI: 10.1086/518936.

245. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro / T. Baranovich, S. S. Wong, J. Armstrong [et al.] // *Journal of Virology*. – 2013. – Vol. 87, № 7. – P. 3741–3751. – DOI: 10.1128/JVI.02346-12.

246. Takashita, E. Influenza polymerase inhibitors: mechanisms of action and resistance / E. Takashita // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2021. – Vol. 11, № 5. – Art. a038687. – DOI: 10.1101/cshperspect.a038687.

247. The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (favipiravir) ribofuranosyl triphosphate towards influenza A virus polymerase / Z. Jin, L. K. Smith, V. K. Rajwanshi [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – Art. e68347. – DOI: 10.1371/journal.pone.0068347.

248. The broad-spectrum antiviral drug arbidol inhibits foot-and-mouth disease virus genome replication / M. R. Herod, O. O. Adeyemi, J. Ward [et al.] // *Journal of General Virology*. – 2019. – Vol. 100, № 9. – P. 1293–1302. – DOI: 10.1099/jgv.0.001283.

249. The destruction of type 2 pneumocytes by airborne influenza PR8-A virus; its effect on surfactant and lecithin content of pneumonic lesions of mice / C. G. Loosli, S. F. Stinson, D. P. Ryan [et al.] // *Chest*. – 1975. – Vol. 67, № S2. – P. 7–14. – DOI: 10.1378/chest.67.2_supplement.7s.

250. The efficacy and cost effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons living in the community / K. L. Nichol, K. L. Margolis, J. Wuorenma, T. von Sternberg // *New England Journal of Medicine*. – 1994. – Vol. 331. – P. 778–784. – DOI: 10.1056/NEJM199409223311206.

251. The impact of influenza epidemics on mortality: introducing a severity index / L. Simonsen, M. J. Clarke, G. D. Williamson [et al.] // *American Journal of Public Health*. – 1997. – Vol. 87. – P. 1944–1950. – DOI: 10.2105/ajph.87.12.1944.

252. The influence of influenza virus infection on exogenous staphylococcal and endogenous murine bacterial infection of the bronchopulmonary tissues of mice / T. F. Sellers, J. Schulman, C. Bouvier [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. – 1961. – Vol. 114. – P. 237–256. – DOI: 10.1084/jem.114.2.237.

253. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections / M. Klausberger, I. A. Leneva, I. N. Falynskova [et al.] // *Vaccines*. – 2019. – Vol. 7. – Art. 187. – DOI: 10.3390/vaccines7040187.

254. The synthetic antiviral drug arbidol inhibits globally prevalent pathogenic viruses / E.-I. Pécheur, V. Borisevich, P. Halfmann [et al.] // *Journal of Virology*. – 2016. – Vol. 90, № 6. – P. 3086–3092. – DOI: 10.1128/JVI.02077-15.

255. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract / E. S. Charlson, K. Bittinger, A. R. Haas [et al.] // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2011. – Vol. 184, № 8. – P. 957–963. – DOI: 10.1164/rccm.201104-0655OC.

256. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses in ferrets and mice / T. R. Maines, A. Jayaraman, J. A. Belser [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 325, № 5939. – P. 484–487. – DOI: 10.1126/science.1177238.

257. Treatment with neuraminidase inhibitors for critically ill patients with influenza A(H1N1)pdm09 / J. K. Louie, S. Yang, M. Acosta [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 55, № 9. – P. 1198–1204. – DOI: 10.1093/cid/cis636.

258. Treatment with protein synthesis inhibitors improves outcomes of secondary bacterial pneumonia after influenza / A. Karlstrom, K. L. Boyd, B. K. English, J. A. McCullers // *Journal of Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 199. – P. 311–319. – DOI: 10.1086/596051.

259. Type I IFN as a vaccine adjuvant for both systemic and mucosal vaccination against influenza virus / L. Bracci, I. Canini, M. Venditti [et al.] // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, № S2. – P. 56–57. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.01.121.

260. Universal influenza virus neuraminidase vaccine elicits protective immune responses against human seasonal and pre-pandemic strains / A. L. Skarlupka, A. G. Bebin-Blackwell, S. F. Sumner, T. M. Ross // *Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 95, № 17. – Art. e0075921. – DOI: 10.1128/JVI.00759-21.

261. Update: ACIP recommendations for the use of quadrivalent live attenuated influenza vaccine (LAIV4) / L. A. Grohskopf, L. Z. Sokolow, A. M. Fry [et al.] // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2018. – Vol. 67. – P. 643–645. – DOI: 10.15585/mmwr.mm6722a5.

262. Update: influenza activity – United States, 2003–04 season / Centers for Disease Control and Prevention // *Morbidity and Mortality Weekly Report*. – 2003. – Vol. 49. – P. 1197–1202.

263. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza – *Streptococcus pyogenes* superinfection / S. Okamoto, S. Kawabata, H. Fujitaka [et al.] // *Vaccine*. – 2004. – Vol. 22. – P. 2887–2893. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2003.12.024.

264. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract / A. A. Bosch, G. Biesbroek, K. Trzcinski [et al.] // *PLoS Pathogens*. – 2013. – Vol. 9, № 1. – Art. e1003057. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1003057.

265. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus / F. S. Quan, C. Huang, R. W. Compans [et al.] // *Journal of Virology*. – 2007. – Vol. 81, № 7. – P. 3514–3524. – DOI: 10.1128/JVI.02052-06.

266. Virus-like particles in vaccine development / A. Roldao, M. C. Mellado, L. R. Castilho [et al.] // *Expert Review of Vaccines*. – 2010. – Vol. 9, № 10. – P. 1149–1176. – DOI: 10.1586/erv.10.115.

267. Wang, T. T. Unraveling the mystery of swine influenza virus / T. T. Wang, P. Palese // *Cell*. – 2009. – Vol. 137, № 6. – P. 983–985. – DOI: 10.1016/j.cell.2009.05.032.

268. Webster, R. G. Continuing challenges in influenza / R. G. Webster, E. A. Govorkova // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 1323. – P. 115–139. – DOI: 10.1111/nyas.12462.

269. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic influenza A/H1N1 2009 and other influenza viruses [Electronic resource] // World Health Organization : official website. – 2010. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138515/> (дата обращения: 01.04.2026).

270. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance [Electronic resource] // World Health Organization : official website. – 2002. – URL: <https://iris.who.int/handle/10665/68026> (дата обращения: 01.04.2026).

271. Wong, S. Y. Avian influenza virus infections in humans / S. Y. Wong, K.-Y. Yuen // *Chest*. – 2015. – Vol. 129, № 1. – P. 156–168. – DOI: 10.1378/chest.129.1.156.

272. Wu, W. The role of type I IFNs in influenza: antiviral superheroes or immunopathogenic villains? / W. Wu, J. P. Metcalf // *Journal of Innate Immunity*. – 2020. – Vol. 12, № 6. – P. 437–447. – DOI: 10.1159/000508379.

273. Yoo, J.-K. Interferon- β modulates type 1 immunity during influenza virus infection / J.-K. Yoo, D. P. Baker, E. N. Fish // *Antiviral Research*. – 2010. – Vol. 88. – P. 64–71. – DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.07.006.

274. Zinner, S. H. Antibiotic use: present and future / S. H. Zinner // *New Microbiologica*. – 2007. – Vol. 30. – P. 321–325.