

УДК 578.821

# Влияние повышенной продукции внеклеточных вирионов вируса осповакцины на его свойства при инфицировании мышей

С. Н. Щелкунов\*, С. Н. Якубицкий, Т. В. Бауэр, А. А. Сергеев, А. С. Кабанов, Л. Е. Булычев, И. А. Юрганова, Д. А. Одношевский, И. В. Колосова, С. А. Пьянков, О. С. Таранов

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., Кольцово, 630559 Россия

\*E-mail: snshchel@rambler.ru; snshchel@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020

Принята к печати 10.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10972

**РЕФЕРАТ** Современный подход к созданию аттенуированных противооспенных вакцин обычно предполагает направленную инактивацию генов вирулентности вируса осповакцины (VACV). Нами изучено влияние увеличения продукции внеклеточных вирионов, покрытых оболочкой (EEV), на вирулентные и иммуногенные свойства VACV в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей. Исследования проводили на штамме LIVP VACV, принятом в России для противооспенной вакцинации. В состав гена A34R VACV направленно ввели две точечные мутации, приводящие к статистически значимому повышению формирования EEV по сравнению с родительским штаммом LIVP. Мутантный штамм LIVP-A34R проявлял меньшую нейровирулентность и при внутрикожном введении индуцировал повышенную продукцию противовирусных антител. Такой вариант VACV может стать основой для получения аттенуированной и высокоиммуногенной вакцины против оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека, а также использоваться в качестве вектора для конструирования живых рекомбинантных поливалентных вакцин против разных инфекционных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** оспа, вакцина, иммуногенность, вирулентность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БОЕ – бляшкообразующая единица; ФР – физиологический раствор; CEV – вирион, ассоциированный с клеткой; EEV – внеклеточный вирион, покрытый оболочкой; IMV – внутриклеточный зрелый вирион; VACV – вирус осповакцины.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входит в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Этот род объединяет такие вирусы животных, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV), вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV) и некоторые другие [1, 2]. Ортопоксвирусы являются крупнейшими сложно организованными ДНК-содержащими вирусами млекопитающих, и весь цикл их развития проходит в цитоплазме инфицированных клеток. Представители этого рода морфологически неразличимы и антигенно близки друг другу. Поэтому инфекция одним видом ортопоксвирусов обеспечивает иммунную защиту от других представителей данного рода [3]. Именно поэтому использование живой вакцины на основе разных штаммов VACV позволило искоренить оспу [1, 4].

VACV, как и другие виды ортопоксвирусов, существует в двух инфекционных формах. Подавляющее большинство вирусного потомства составляют внутриклеточные зрелые вирионы (*intracellular mature virion*, IMV), гораздо меньшую часть – внеклеточные оболочечные вирионы (*extracellular enveloped virion*, EEV) [5, 6]. IMV накапливаются в зараженной клетке в большом количестве и попадают в окружающую среду только после разрушения клетки. Небольшой процент синтезируемых вирусных частиц покрывается дополнительной липопротеиновой оболочкой и на раннем этапе цикла развития вируса выходит на поверхность клеток, где находится в ассоциированном с клеткой состоянии (*cell-associated enveloped virion*, CEV). Часть таких частиц отделяется от клеток и находится в свободном виде (EEV) [7]. Форма EEV составляет менее 1% всего потомства большинства штаммов VACV [5]. При этом EEV проника-

ет в клетки эффективнее IMV [7, 8] и обеспечивает быстрое распространение вируса в организме [5, 9]. Влияние повышенной продукции ЕЕV на иммуногенность VACV подробно до сих пор не изучали.

Штаммы VACV могут значительно различаться по уровню продукции ЕЕV [6, 10]. Штамм IHD-J (International Health Department-J) относится к наиболее подробно изученным вариантам VACV с высоким выходом ЕЕV при заражении культур клеток [6]. Одним из генов, контролирующих высвобождение СЕV в свободную форму ЕЕV, является ген A34R [10]. Белок A34, входящий в состав липопротеиновой оболочки ЕЕV, отсутствует в IMV. При этом оказалось, что аминокислотная последовательность белка A34 нейровирулентного адаптированного к мышам штамма WR (Western Reserve) VACV (образование менее 1% ЕЕV от инфекционного потомства вируса на культуре клеток) отличается от последовательности этого белка штамма IHD-J (до 30% ЕЕV) лишь двумя точечными заменами – Asp110 → Asn и Lys151 → Glu [10]. Показано, что замена гена A34R в штамме WR VACV на ген из штамма IHD-J существенно увеличивает выход ЕЕV [9, 10].

Экспериментально доказано, что увеличенная продукция ЕЕV, обусловленная введением мутаций в ген A34R, приводит к более эффективной диссеминации онколитических вариантов VACV и улучшенной противоопухолевой активности таких вирусов *in vivo* [9, 11]. Однако влияние этих мутаций на вирулентность и иммуногенность VACV не изучено.

Прекращение противооспенной вакцинации после 1980 года [2–4] привело к ситуации, когда современная человеческая популяция не защищена от возрождающихся ортопоксвирусных инфекций [12]. Поэтому важное значение приобретают исследования, направленные на создание новых аттенуированных и высокоиммуногенных вакцин на основе VACV [4].

VACV активно используется не только для получения безопасных живых вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека, но и в качестве молекулярного вектора при конструировании живых рекомбинантных поливалентных вакцин против различных инфекционных заболеваний [3, 6, 12–14]. При этом важным направлением является изучение влияния разных вирусных генов и их мутантных вариантов на иммуногенность и безопасность создаваемых вакцин.

Цель данной работы состояла в получении штамма LIVP VACV с мутациями в гене A34R, приводящими к увеличенной продукции ЕЕV-формы, и изучении вирулентных и иммуногенных свойств варианта LIVP-A34R в сравнении с исходным штаммом вируса LIVP при инфицировании мышей разными способами.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Вирус, культуры клеток

В работе использовали клоновый вариант 14 штамма LIVP VACV, ранее описанный нами [15], и перевиваемые культуры клеток почки африканской зеленой мартышки CV-1 и Vero из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток CV-1 как описано [16]. Культуру клеток Vero использовали в тесте вируснейтрализации сывороток крови мышей.

### Получение VACV с точечными мутациями в гене A34R

Методом ПЦР с синтетическими олигонуклеотидными праймерами в нуклеотидную последовательность гена A34R ввели две точечные мутации, приводящие к синтезу белка, соответствующего белку A34 штамма IHD-J VACV (замены Asp110 → Asn и Lys151 → Glu) [17]. Рекомбинантный штамм LIVP-A34R с мутантным геном A34R получали на основе клонового варианта 14 штамма LIVP VACV с использованием плазмиды pMGCgpt-A34R\* по ранее описанному методу [15].

### Животные

В исследованиях использовали инбредных разнополых мышей линии BALB/c, полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [18]. Манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

### Оценка нейровирулентности штаммов VACV

Мышам-сосункам (2–3-дневным) интрацеребрально вводили рекомбинантный штамм LIVP-A34R или исходный клоновый вариант LIVP, разведенные в физиологическом растворе (ФР), в дозе 10 БОЕ/10 мкл/мышь. Животным контрольной группы вводили равный объем ФР. За мышами наблюдали в течение 12 сут, учитывая количество погибших.

### Инфицирование мышей

Использовали 3–5-недельных мышей линии BALB/c массой 13–16 г. Препараты вирусов LIVP, LIVP-A34R или ФР вводили животным интраназально (и/н), подкожно (п/к) или внутривожно (в/к)

согласно [16]. Использовали дозы заражения  $10^8$ ,  $10^7$  или  $10^6$  БОЕ/30 мкл/животное. В каждой группе экспериментальных животных было по 5–6 особей. Мышей ежедневно взвешивали и фиксировали внешние клинические признаки заболевания (взъерошенность шерсти, адинамия, тремор) в течение 14 сут.

#### **Получение сывороток крови экспериментальных животных**

Через 28 сут после введения препаратов VACV проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса с помощью одноразовых стерильных капилляров, после чего мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации. Путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием получена сыворотка крови мышей. Индивидуальные образцы сывороток хранили при температуре минус  $20^{\circ}\text{C}$ .

#### **Иммуноферментный анализ сывороток крови (ИФА)**

ИФА индивидуальных сывороток крови мышей выполняли согласно [16]. В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG по экспериментальным группам, рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

#### **Определение титра вируснейтрализующих антител в сыворотках крови**

Титры антител к штамму LIVP VACV в образцах сыворотки крови мышей оценивали в реакции нейтрализации (РН) по уменьшению количества бляшек в монослое культуры клеток Vero согласно [19]. Сыворотки крови перед постановкой РН инактивировали в течение 30 мин при  $56^{\circ}\text{C}$ . Готовили 4–5-кратные разведения образцов сыворотки, начиная с разведения 1 : 10, в поддерживающей среде культивирования клеток. В качестве рабочего разведения VACV использовали то разведение, которое в объеме 0.1 мл содержало 30–60 БОЕ. Разведения сыворотки и VACV смешивали в равных объемах, инкубировали в течение 1 ч при температуре  $37.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , вносили по 0.2 мл на монослой клеток Vero в 24-луночных планшетах, добавляли по 0.8 мл поддерживающей среды и культивировали в течение 3 сут в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. После окончания срока культивирования монослой окрашивали раствором генцианового фиолетового и подсчитывали количество бляшек в лунках.

#### **Патоморфологический и вирусологический анализ органов**

Забор органов (легкие, мозг, печень, почки, селезенка) и проб тканей (носовая перегородка или образцы кожи из места введения препарата) осуществляли через 3, 7, 10 сут после введения мышам препаратов вирусов или ФР, предварительно проведя процедуру эвтаназии методом цервикальной дислокации. В каждой временной точке образцы органов и тканей брали от трех животных и анализировали индивидуально.

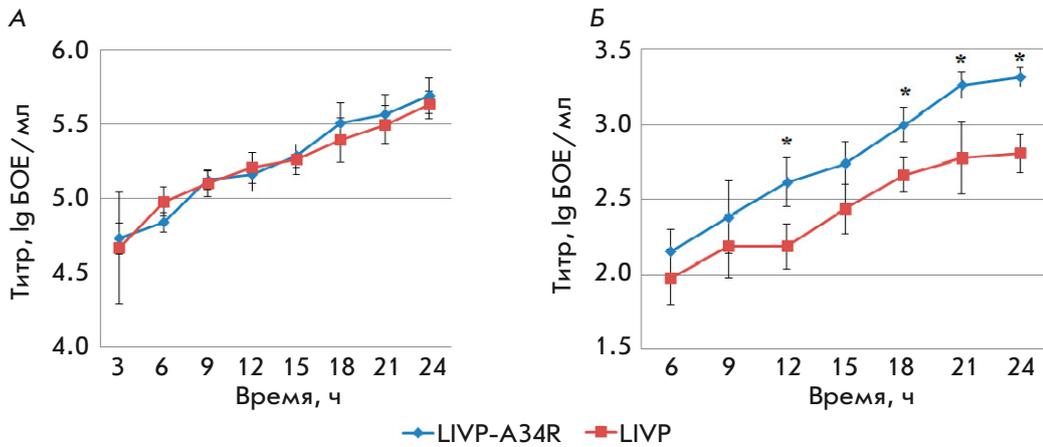
Для патоморфологического исследования органы мышей фиксировали в 4% растворе параформальдегида (Sigma, США) в течение 48 ч. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в растворах спиртов возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилол–парафин и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомата НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофото съемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

Для вирусологического исследования готовили 10% гомогенаты органов и тканей мышей методом механической дезинтеграции с помощью стальных шариков и гомогенизатора с последующим добавлением питательной среды ДМЕМ. В полученных гомогенатах после нескольких актов замораживания–оттаивания определяли титры вирусов на монослое культуры клеток CV-1 методом бляшек [15].

#### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

##### **Продукция EEV-формы штаммами VACV LIVP и LIVP-A34R**

Поскольку EEV VACV выходит из клетки до того, как произойдет лизис первично зараженной клетки и все инфекционные формы вируса окажутся в межклеточном пространстве, провели эксперименты, в которых оценили содержание вируса в зараженных клетках и надклеточной жидкости в зависимости от времени после инфицирования. Монослой клеток CV-1 в шестилуночных планшетах заражали VACV LIVP или полученным на его основе мутантным LIVP-A34R с множественностью 1 БОЕ/клетка, после чего каждые 3 ч в течение 1 сут отбирали аликвоты надклеточной жидкости, а клетки в оставшейся питательной среде подвергали двум циклам замораживания–оттаивания. В полученных образцах определяли титр вируса методом бляшек. Каждую точку отбора снимали в трех повторностях.



**Рис. 1.** Динамика размножения разных вариантов VACV в культуре клеток линии CV-1. А – биосинтез внутриклеточной IMV-формы; Б – накопление в надклеточной среде EEV-формы вирионов. \* – различия статистически значимы при  $p > 0.1$

Результаты этих экспериментов, представленные на рис. 1, показывают, что мутантный L1VP-A34R не отличается от исходного L1VP по уровню синтеза IMV-формы вируса (рис. 1А), в то время как EEV-форма продуцируется в достоверно большем количестве по сравнению с L1VP (рис. 1Б). Точное процентное соотношение IMV- и EEV-форм в суммарном урожае вирусов не определяли.

#### Патогенность штаммов VACV при разных способах введения мышам

Для сравнительного изучения влияния способа инфицирования и дозы вводимого вирусного препарата на проявление патогенных свойств штаммов VACV L1VP и L1VP-A34R мышей заражали тремя наиболее популярными (близкими к естественным) способами: и/н, в/к или п/к. Инфицирующие дозы каждого вируса были  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  БОЕ/животное. Поскольку инфицирование взрослых мышей большинством штаммов VACV обычно не приводит к гибели животных, патогенность вариантов этого вируса изучают по изменению массы тела после заражения и клиническим проявлениям заболевания (взъерошенность шерсти, адинамия, тремор) [20, 21].

Выраженные клинические проявления инфекции и временное снижение массы тела наблюдали только при и/н инфицировании мышей обоими штаммами VACV (рис. 2). Пик заболевания приходился на 6–8 сут после заражения. С увеличением дозы вирусов фиксировали более явные клинические признаки инфекции и большее снижение массы тела мышей. Как видно из рис. 2, при дозах  $10^6$  и  $10^7$  БОЕ мутантный штамм L1VP-A34R проявлял меньшую патогенность.

При в/к введении обоих штаммов клинические проявления инфекции у мышей не выявлены. Динамика массы тела инфицированных мышей при этом практически не отличалась от контрольных животных (рис. 3). Аналогичные результаты полу-

чены и при п/к заражении мышей (данные не приведены).

#### Диссеминация вирусов в организме мышей

Из изъятых на 3, 7 и 10 сут после заражения образцов органов и тканей животных, инфицированных и/н, в/к или п/к штаммами L1VP или L1VP-A34R в дозах  $10^6$ ,  $10^7$  или  $10^8$  БОЕ/животное, были приготовлены 10% гомогенаты, в которых методом бляшек определяли титры вирусов на культуре клеток CV-1. Анализировали образцы легких, головного мозга, печени, селезенки и почек. При и/н введении дополнительно исследовали носовую перегородку со слизистой, а в группах с в/к или п/к инъекцией – лоскуты кожи из места введения вируса.

При и/н способе введения вирусы были обнаружены во всех исследуемых органах: больше всего в слизистой носовой перегородки (первичный очаг размножения), затем по убывающей – в легких, головном мозге, печени (рис. 4), почках и селезенке.

При в/к введении вирусы выявляли только в образцах кожи из места инъекции вирусных препаратов, а также при максимальной инфицирующей дозе ( $10^8$  БОЕ) – у некоторых животных в легких и печени на 3 и 7 сут после заражения (данные не приведены). При этом в легких мутантный вариант L1VP-A34R встречался в больших количествах по сравнению с исходным L1VP. В образцах головного мозга, селезенки и почек детектируемых уровней вирусов не обнаружено.

У зараженных п/к исследуемыми вариантами VACV животных вирусы обнаружены только в образцах кожного лоскута из места введения вирусных суспензий при максимальной заражающей дозе. В образцах внутренних органов вирусы не выявлены.

#### Патоморфологический анализ органов мышей

Патологические изменения органов, наблюдаемые у животных экспериментальных групп, в целом со-

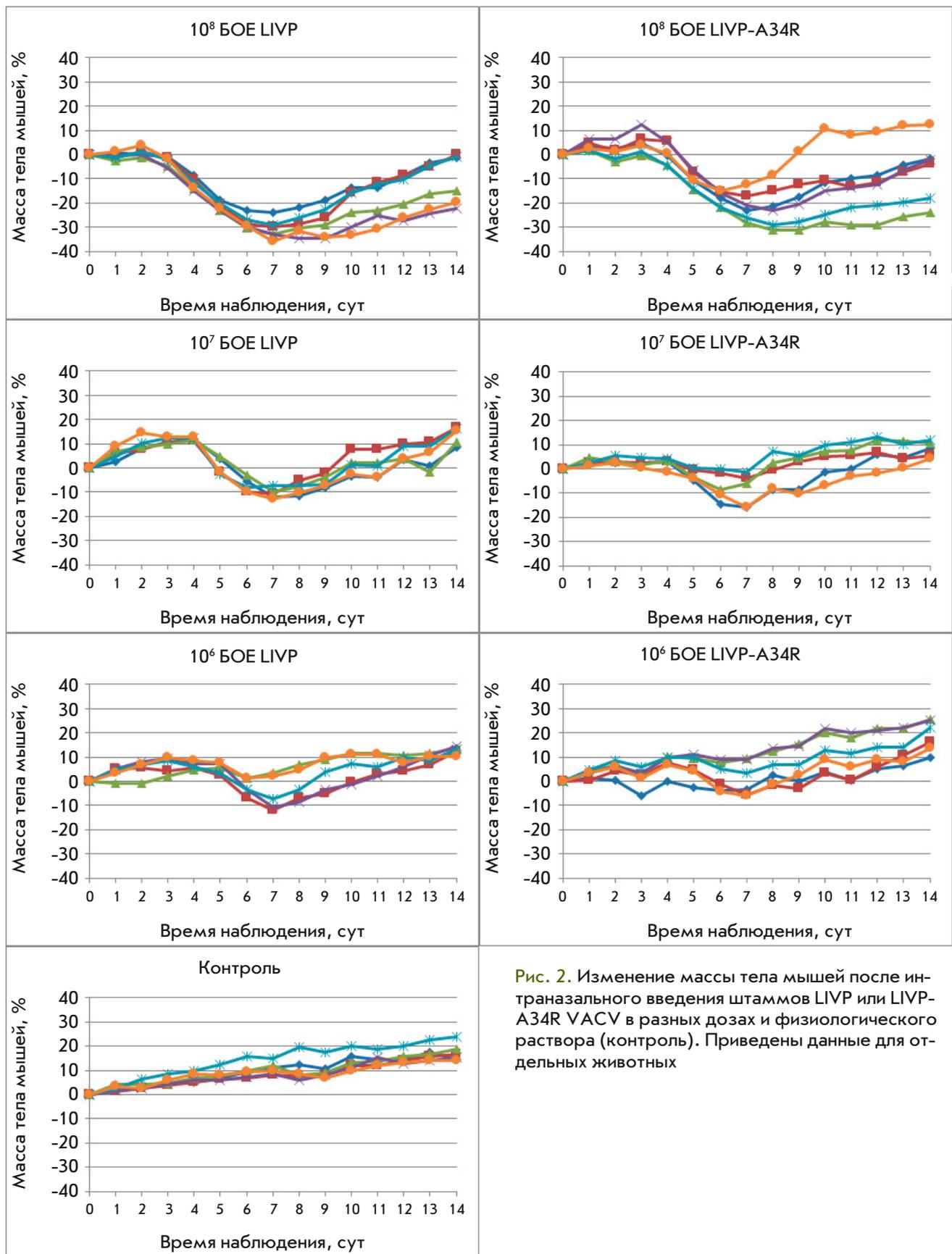


Рис. 2. Изменение массы тела мышей после интраназального введения штаммов LIVP или LIVP-A34R VACV в разных дозах и физиологического раствора (контроль). Приведены данные для отдельных животных

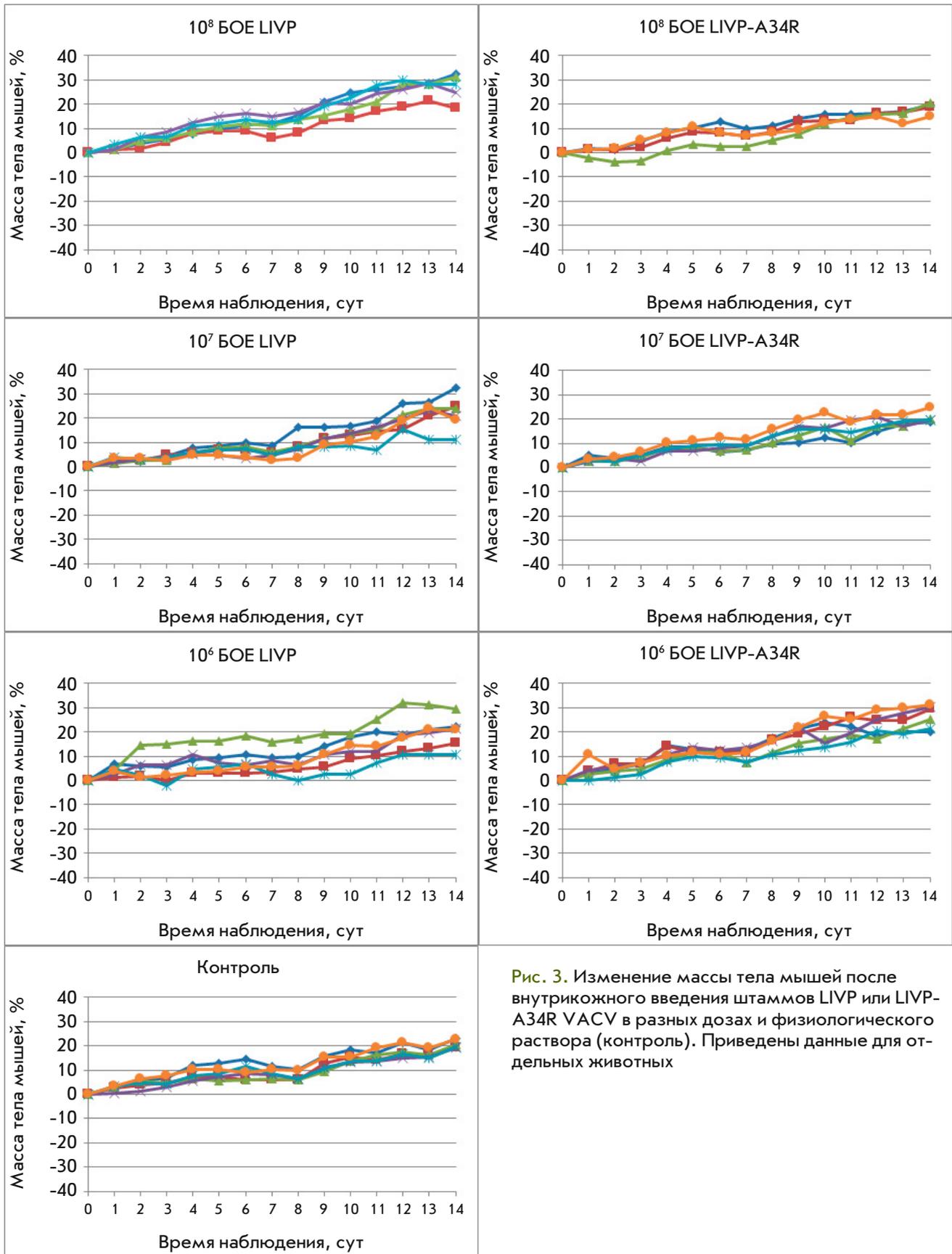


Рис. 3. Изменение массы тела мышей после внутрикожного введения штаммов LVP или LVP-A34R VACV в разных дозах и физиологического раствора (контроль). Приведены данные для отдельных животных

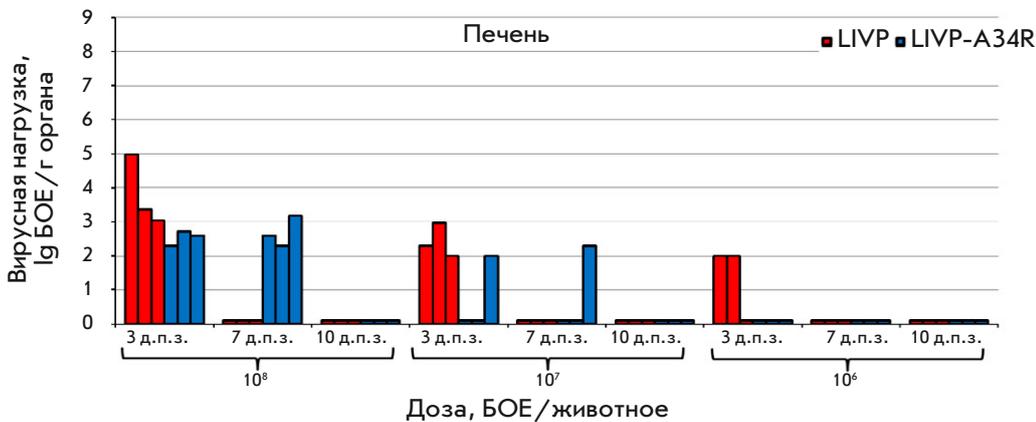
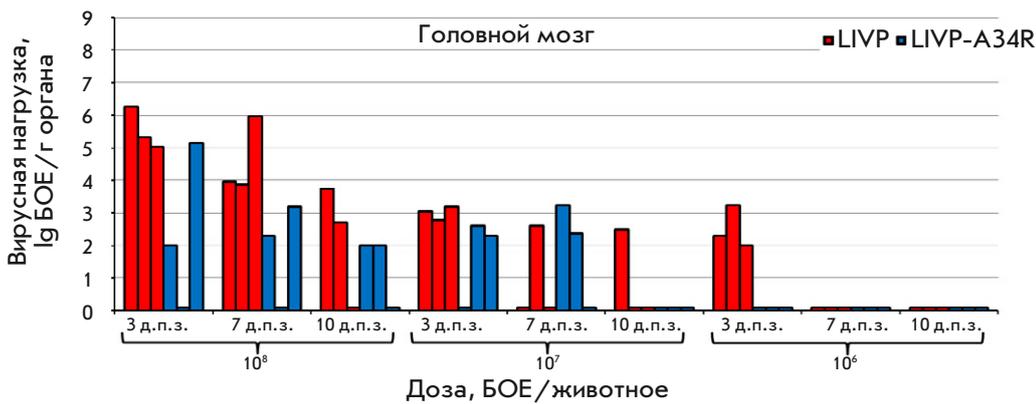
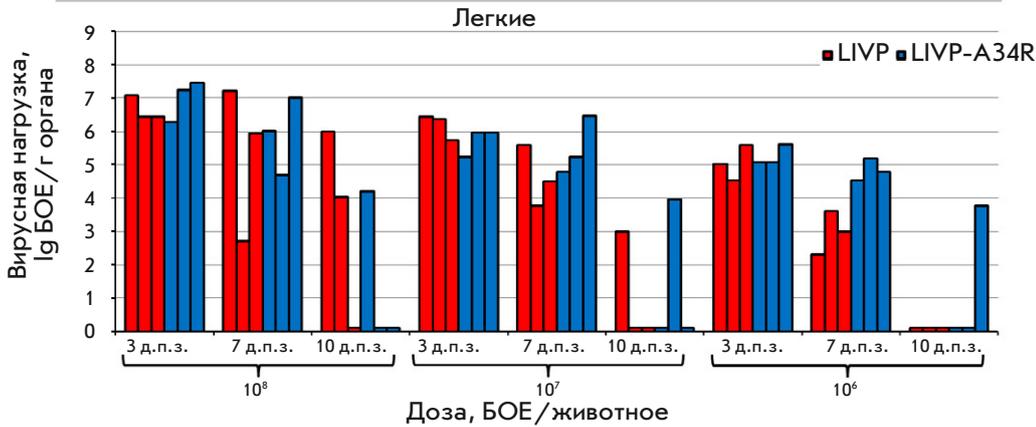
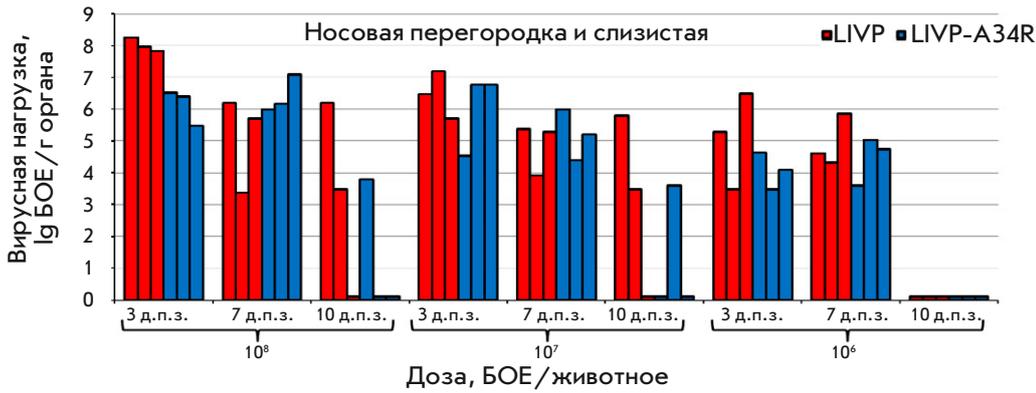


Рис. 4. Накопление VACV в органах и тканях мышей, интраназально зараженных штаммами L1VP или L1VP-A34R в разных дозах. Приведены данные для отдельных животных. д.п.з. – день после заражения

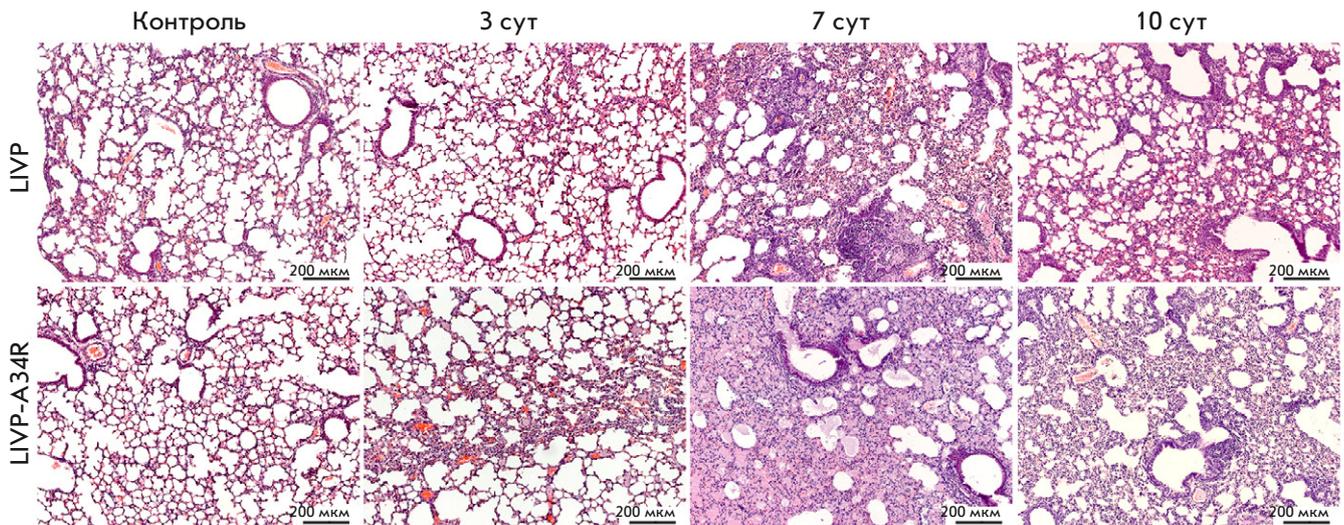


Рис. 5. Динамика развития патологического процесса в респираторной ткани при интраназальном заражении в дозе  $10^7$  БОЕ (см. пояснения в тексте). Гистологический препарат легких. Окраска гематоксилином и эозином

ответствовали гистологической картине поражений при заражении лабораторных животных ортопоксвирусами [22], что подтверждало адекватность выбранной модели. Степень выраженности и распространенность патологических изменений варьировала в зависимости от штамма вируса, дозы заражения и способа введения препарата.

Наиболее типичные патоморфологические манифестации инфекции локализовались в органах дыхания, преимущественно в легких. В респираторной ткани отмечен выраженный отек межальвеолярных перегородок, гиперемия капилляров, активный выход форменных элементов и плазмы крови в альвеолярные пространства. В наиболее тяжелых случаях экссудация сопровождалась дистрофическими и некробиотическими изменениями альвеолярного эпителия, скоплением фибрина, воспалительно-клеточной инфильтрацией смешанного характера (нейтрофилы, лимфоциты, эозинофилы в небольшом количестве). Макрофаги встречались редко, в основном при и/н заражении в дозе  $10^8$  БОЕ.

При и/н заражении штаммом LIVP-A34R на 3 сут на 1/5–1/4 площади среза наблюдалось снижение воздушности легочной ткани, слабовыраженный отек, гиперемия, умеренная инфильтрация стромы лимфоцитами и нейтрофилами. При заражении штаммом LIVP изменения в легких на 3 сут были минимальными (рис. 5). Наиболее выраженные патоморфологические признаки заболевания наблюдались на 7 сут с момента заражения: распространенный, выраженный отек межальвеолярных перегородок, полиморфно-клеточная инфильтрация, резкая гиперемия и тромбоз сосудов микроцирку-

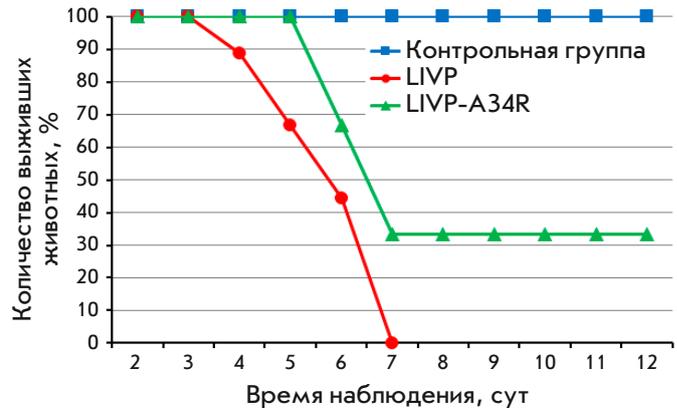
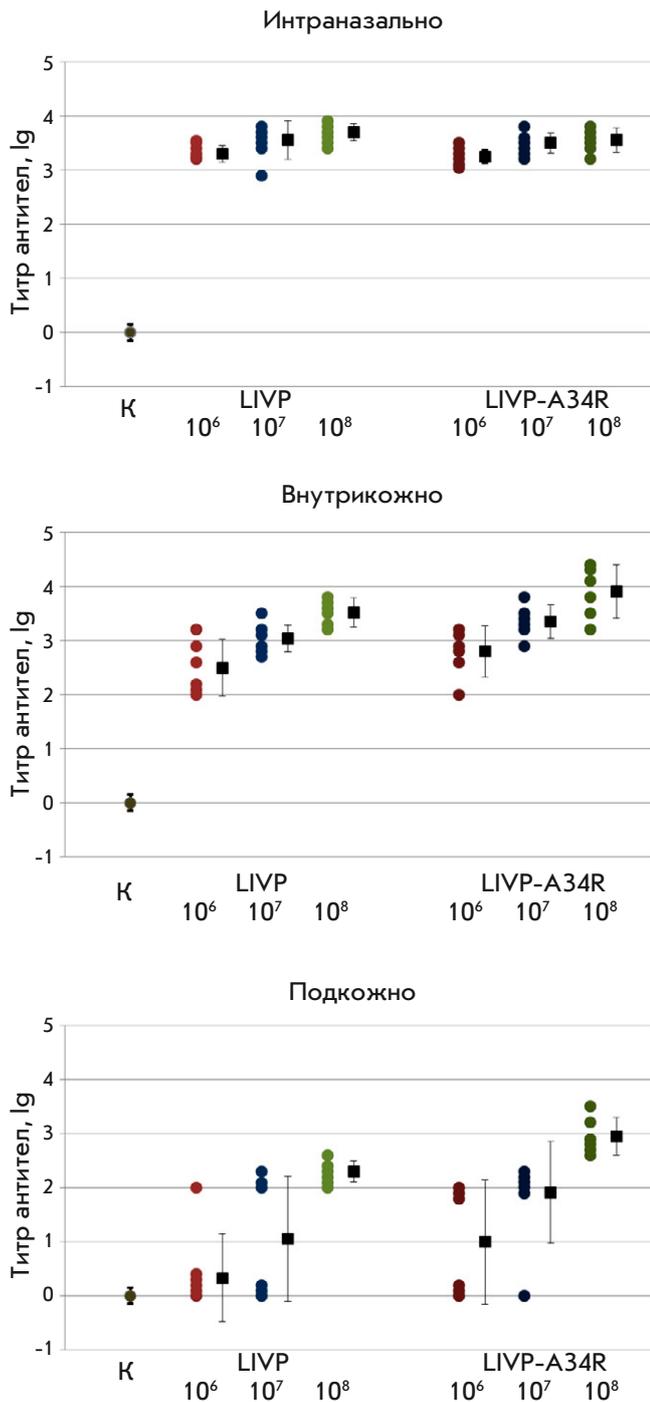


Рис. 6. Динамика гибели новорожденных мышей при интрацеребральном заражении штаммами LIVP или LIVP-A34R VACV

ляторного русла, очаги некроза в соединительной ткани, окружающей крупные бронхи и кровеносные сосуды. При инфицировании штаммом LIVP-A34R более выражена плазморрагия и выпот фибрина в просвет альвеол. Патологические проявления на 10 сут были умеренными.

Патологические изменения со стороны трахеи и бронхов были выражены слабо и проявлялись в основном в виде редких локусов дистрофических изменений эпителия, утолщения стенки бронхов небольшого калибра, умеренно выраженного отека межклеточных пространств, редко – десквамации эпителиального слоя с развитием эрозивной поверхности. Довольно редко и только при и/н заражении наблюдалась умеренная перибронхиальная и периваскулярная полиморфно-клеточная инфильтрация.



**Рис. 7.** Уровни определенных в ИФА VACV-специфических антител сывороток крови мышей, инфицированных разными способами и штаммами LIVP или LIVP-A34R в различных дозах. В каждой группе приведены данные для отдельных животных, а также средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG и доверительные интервалы для уровня вероятности 95%

При в/к или п/к заражении бронхи в патологический процесс практически не вовлекались.

**Нейровирулентность вариантов VACV**

Способность вирусов вызывать гибель при интрацеребральном заражении изучали на трех группах новорожденных мышей (по 10 особей каждая), за которыми вели наблюдение в течение 12 сут после инфицирования. В группе животных, зараженных VACV LIVP в дозе 10 БОЕ/мышь, гибель началась на 4-е сут и к 7-м все животные погибли. В группе мышей, инфицированных такой же дозой мутантного варианта LIVP-A34R, гибель началась на 6-е сут, после 7-х прекратилась, и треть животных выжила (рис. 6). В контрольной группе (инъекция ФР) смертности животных не наблюдали.

**Иммуногенная активность штаммов VACV**

Иммуногенность вариантов VACV LIVP и LIVP-A34R оценивали по уровню индуцируемых ими вирусспецифических (в тесте ИФА) и вируснейтрализующих антител (по снижению инфекционности препарата VACV) в сыворотках крови мышей, полученных через 28 сут после инфицирования тремя разными способами и разными дозами вирусов (10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> или 10<sup>8</sup> БОЕ/мышь).

В реакциях ИФА в качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP, представляющий собой IMV-форму вируса. Результаты ИФА, приведенные на рис. 7, показывают, что при и/н заражении высокий уровень антител к вирионным белкам IMV-формы VACV детектируется как при высокой дозе инфицирования (10<sup>8</sup> БОЕ), так и при более низких дозах вируса. Следует отметить, что достоверных различий между штаммами LIVP и LIVP-A34R по данному показателю не выявлено.

Самые низкие уровни VACV-специфических антител зарегистрированы при п/к введении вирусов. При этом наблюдалась выраженная зависимость продукции антител от дозы инфицирующего вируса. Причем мутантный LIVP-A34R обуславливал более высокую продукцию вирусспецифических антител по сравнению с исходным штаммом VACV LIVP (рис. 7).

При в/к инъекции уровень VACV-специфических антител при инфицирующей дозе 10<sup>8</sup> БОЕ был соизмерим с уровнем антител при этой же дозе и/н введения вирусов. При уменьшении дозы в/к инфицируемого вируса биосинтез вирусспецифических антител снижается более заметно, чем при и/н способе заражения (рис. 7). При этом средние значения титра антител были выше в сыворотках крови мышей, инфицированных LIVP-A34R.

При анализе уровня вируснейтрализующих антител получили картину, схожую с данными ИФА, но имеющую некоторые отличия (рис. 8). Наибольшая продукция вируснейтрализующих антител зарегистрирована при и/н введении вирусов. При этом штамм LIVP индуцировал более высокий уровень антител по сравнению с мутантным LIVP-A34R. Наименьший иммунный ответ выявлен при п/к инъекции вирусов. При в/к введении вирусов нейтрализующие антитела синтезировались на относительно высоком уровне, при этом штамм LIVP-A34R обеспечивал более эффективную продукцию таких антител по сравнению со штаммом LIVP.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Самым надежным способом профилактики вирусных инфекций является вакцинация, которая была введена в практику здравоохранения более 200 лет назад при разработке методов защиты от натуральной оспы [1, 6]. Классическую противосспенную живую вакцину получали размножением VACV на коже телят или других домашних животных. Эта вакцина обеспечивала надежную защиту от оспы, но в ряде случаев наблюдались тяжелые побочные поствакцинальные реакции, в том числе в виде энцефалитов и энцефаломиелитов, иногда с летальным исходом [1, 2]. Поэтому после объявления Всемирной организацией здравоохранения в мае 1980 года о ликвидации оспы, вакцинация против этого особо опасного инфекционного заболевания человека была прекращена. Это привело к тому, что в настоящее время огромная часть населения Земли не имеет иммунитета не только против натуральной оспы, но и других зоонозных ортопоксвирусных инфекций, таких, как оспа обезьян, оспа коров, оспа верблюдов и вакциния. Отсутствие иммунной прослойки существенно облегчает возможность циркуляции зоонозных ортопоксвирусов в человеческой популяции [23–27]. Особую тревогу вызывает оспа обезьян у человека, имеющая клиническую картину, напоминающую натуральную оспу, и летальность до 10%. Более того, в последние годы эффективность передачи вируса оспы обезьян среди людей многократно возросла [23, 25].

Чтобы предотвратить развитие небольших вспышек ортопоксвирусных инфекций в распространенные эпидемии и уменьшить риск возникновения в результате естественной эволюции высокопатогенного для человека ортопоксвируса, усилия исследователей направлены на создание безопасных живых вакцин новых поколений на основе VACV [3, 6, 28].

Современный подход к созданию аттенуированных высокоиммуногенных вакцин обычно состоит в направленной инактивации генов вирулентности VACV [6, 15, 29–31]. Кроме того, свойства патоген-

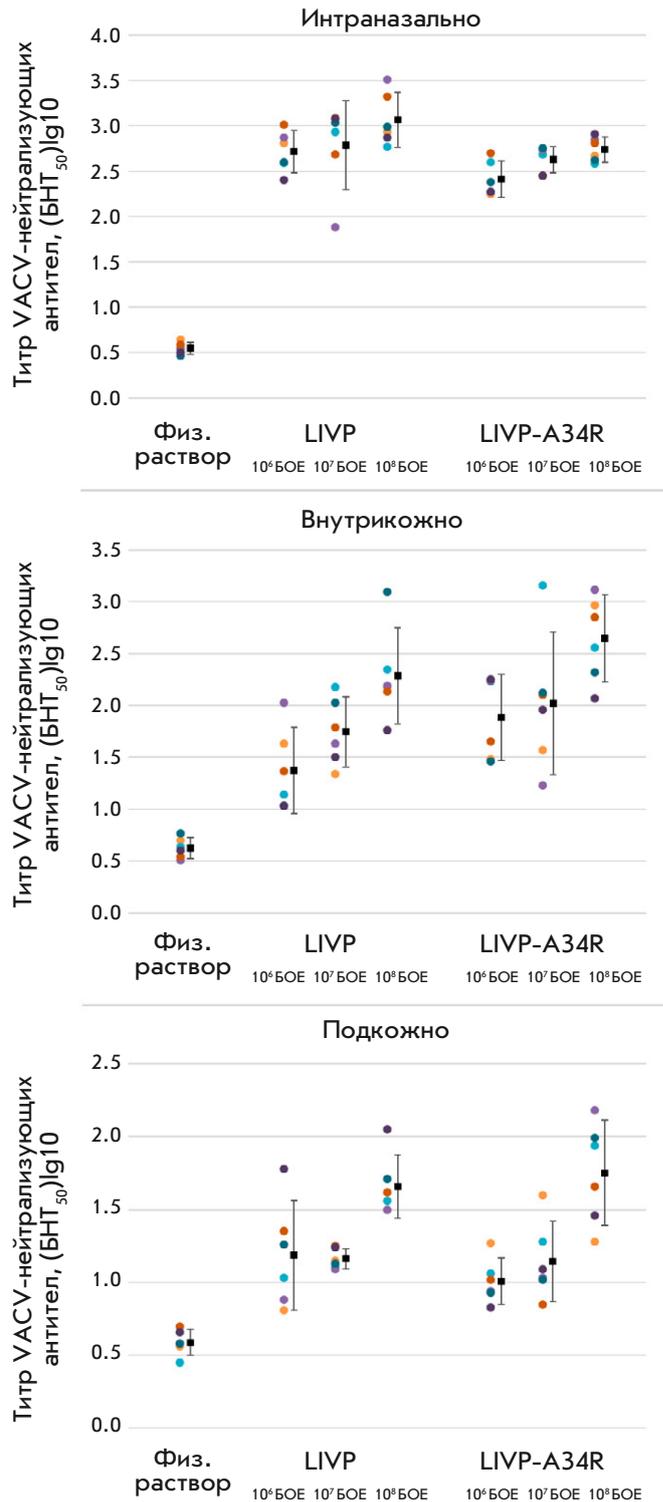


Рис. 8. Уровни VACV-нейтрализующей активности сывороток, полученных на 28 сут после инфицирования мышей разными способами и различными дозами штаммов LIVP или LIVP-A34R. В каждой группе приведены данные для отдельных животных, а также средние геометрические значения логарифмов обратного титра вируснейтрализации и доверительные интервалы для уровня вероятности 95%

ности и иммуногенности VACV зависят от используемого штамма вируса и способа его введения в организм животного [2, 6, 32–35].

Ранее на лабораторных штаммах VACV было показано, что ген A34R VACV является одним из важных генов, контролирующих отделение внеклеточных вирионов CEV, связанных с поверхностью инфицированной клетки, от клетки и переход их в окружающую среду в виде так называемой EEV-формы [7, 10]. Ген A34R кодирует гликопротеин с лектиноподобным доменом, входящий в состав внешней мембраны EEV VACV [7, 10, 36]. Оказалось, что белок A34 штамма WR VACV, продуцирующего в культуре клеток менее 1% вирусного потомства в виде EEV, отличается от аналогичного белка штамма IHD-J, в потомстве которого EEV-форма может составлять до 30–40%, лишь двумя аминокислотными остатками в позициях 110 и 151. Замена в штамме WR гена A34R на вариант этого гена штамма IHD-J приводит к значительному увеличению продукции EEV-формы, но уровень выхода EEV, характерный для штамма IHD-J VACV, при этом не достигался [10]. Белок A34 выполняет свои функции по высвобождению из клеток EEV, взаимодействуя с рядом других вирусных и клеточных белков [37], и обеспечивает эффективное связывание EEV с клеткой и проникновение в нее [8, 38].

Полагают, что С-концевой лектиноподобный домен вирусного гликопротеина A34, находящийся на поверхности внеклеточных вирионов (CEV и EEV), обеспечивает высокоспецифичное взаимодействие этого белка (и вирионов) с углеводами на поверхности клеток [10]. Замена Lys151 → Glu в составе этого домена белка A34, по-видимому, снижает эффективность связывания выходящих из клетки вирионов VACV с поверхностью клетки и увеличивает выход EEV в окружающую среду [10, 39].

Комплекс вирусных белков B5 и A34 играет важную роль в связывании EEV с поверхностью клеток. При этом участок в положении 80–130 белка A34 является областью взаимодействия этих белков [38]. Возможно, мутация Asp110 → Asn в гликопротеине A34 штамма IHD-J снижает эффективность образования комплекса белков A34 и B5 и приводит к уменьшению эффективности связывания CEV с поверхностью клетки и дополнительному увеличению выхода EEV.

Нами впервые изучено, как увеличение продукции EEV-формы VACV может влиять на вирулентные и иммуногенные свойства вируса в зависимости от способа его введения в организм лабораторных мышей.

Исследования проводили на штамме L1VP VACV, принятом в России для противооспенной вакцинации

[2]. В качестве исходного штамма использовали ранее описанный клоновый вариант L1VP [15]. В состав гена A34R ввели две точечные мутации, характерные для этого гена штамма IHD-J VACV. На культуре клеток CV-1 показано, что созданный мутантный вариант L1VP-A34R продуцирует достоверно большее количество EEV-формы вирусных частиц по сравнению с родительским штаммом L1VP (рис. 1).

Патогенное воздействие обоих штаммов VACV показано при и/н заражении мышей линии BALB/c, что выявлялось по клиническим признакам и снижению массы тела мышей (рис. 2). Пик инфекции приходился на 6–8 сут после заражения. При этом мутантный штамм VACV L1VP-A34R проявлял (по этим признакам) несколько меньшую патогенность. В/к (рис. 3) или п/к введение вирусов даже в максимальной дозе  $10^8$  БОЕ не приводило к снижению массы тела мышей и появлению клинических признаков заболевания.

Анализ распространения вирусов в организме экспериментальных животных показал, что наибольшая диссеминация вирусов *in vivo* наблюдалась при и/н заражении, и уровень вирусной нагрузки во внутренних органах мышей зависел от дозы инфицирования (рис. 4). При этом следует отметить, что после заражения мышей в дозе  $10^7$  и  $10^6$  БОЕ на 7-е сут (пик инфекции) мутантный L1VP-A34R накапливался в легких в больших количествах по сравнению с исходным штаммом L1VP.

Гистологические исследования органов мышей показали, что наиболее типичные патоморфологические манифестации инфекции локализовались в органах дыхания, преимущественно в легких. Патологические изменения легких при и/н заражении L1VP-A34R проявлялись раньше, чем при заражении L1VP, и были более выраженными за счет большего поражения сосудов микроциркуляторного русла. Вследствие этого отек, плазморрагия и геморрагия проявлялись на 3-и сут в большей степени (рис. 5). На 10-е сут в обоих случаях патологические проявления снижались.

В печени мышей на 7-е сут эксперимента при и/н заражении выявлен только штамм L1VP-A34R (рис. 4). Все это указывает на более эффективное распространение L1VP-A34R в организме мышей по сравнению с L1VP. Однако в головном мозге штамм L1VP-A34R накапливался в меньшем количестве, чем L1VP.

Интрацеребральное заражение новорожденных мышей также показало, что штамм L1VP-A34R характеризуется сниженной нейровирулентностью по сравнению с родительским L1VP (рис. 6).

При в/к заражении вирусы обнаружили только в образцах кожи из места инъекции вирусных пре-

паратом, а также при максимальной инфицирующей дозе – у некоторых животных в легких и печени на 3 и 7 сут эксперимента. При этом в легких мутантный вариант LIVP-A34R встречался в больших количествах по сравнению с исходным штаммом LIVP. В образцах головного мозга, селезенки и почек вирусы не выявлены.

У животных, зараженных п/к исследуемыми вариантами VACV, вирусы выявлены только в образцах кожного лоскута из места введения в максимальной заражающей дозе. В образцах внутренних органов вирусы не обнаружены.

Известно, что уровень антительного ответа на вакцинацию против ортопоксвирусных инфекций играет решающую роль в защите от последующей вирусной инфекции [6]. Поэтому мы ограничились изучением индукции биосинтеза противовирусных антител в зависимости от дозы и способа введения вариантов VACV лабораторным мышам. Уровень противовирусных антител в сыворотках крови мышей, инфицированных изучаемыми штаммами вирусов, определяли двумя методами. Иммуоферментным анализом тестировали антитела, специфически взаимодействующие с вирионными белками IMV VACV. Вторым методом в тех же сыворотках крови определяли уровни антител, которые связывались *in vitro* с IMV и подавляли таким образом их инфекционность (бляшкообразование) при последующем заражении культуры клеток. Коррелирующие между собой результаты получены при в/к введении вирусов (рис. 7 и 8). Оба вируса индуцировали при этом высокие уровни продукции как VACV-специфичных, так и VACV-нейтрализующих антител, но LIVP-A34R обеспечивал больший иммунный ответ.

Наименьшую индукцию противовирусных антител наблюдали при п/к введении как LIVP, так и LIVP-A34R.

Максимальная продукция как VACV-специфичных, так и вируснейтрализующих антител выявлена при и/н заражении штаммом LIVP (рис. 7, 8). При данном способе введения мутантный вирус LIVP-A34R вызывал образование VACV-специфичных антител в такой же высокой концентрации, как родительский штамм LIVP, но меньший уровень VACV-нейтрализующих антител.

Таким образом, при и/н заражении оба вируса проявляют выраженную патогенность, распространяются по внутренним органам и, как результат, обеспечивают высокий уровень индукции противо-

вирусных антител. При этом патогенность и нейровирулентность штамма LIVP-A34R ниже, чем у LIVP. Однако такой способ введения вирусов, учитывая высокую общую вирулентность инфекции, мало приемлем при использовании VACV LIVP или LIVP-A34R в качестве живой противооспенной вакцины или основы для рекомбинантной поливалентной вакцины.

При п/к инъекции как LIVP, так и LIVP-A34R наряду с низкой вирулентностью продуцируют в организме мышей и низкий уровень вирусспецифичных антител.

Оптимальным способом введения как штамма LIVP, так и мутантного LIVP-A34R, определенным по соотношению патогенность/иммуногенность, можно считать внутрикожную инъекцию. Кроме кожи в месте введения, вирусы после в/к инъекции обнаруживаются титрованием (уровень выявления – не менее  $10^2$  БОЕ/г органа) на 3-и и 7-е сут эксперимента только в легких и печени некоторых животных и лишь при наибольшей использованной дозе заражения ( $10^8$  БОЕ). При этом LIVP-A34R накапливался в легких в больших количествах по сравнению с LIVP. Возможно, именно увеличенная способность к диссеминации в организме и обуславливает при в/к введении большую иммуногенность штамма LIVP-A34R по сравнению с исходным вариантом LIVP.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты данной работы показали, что за счет введения двух точечных замен в последовательность вирусного белка А34 штамм LIVP-A34R VACV продуцирует внеклеточную форму вирионов EEV в большем количестве по сравнению с исходным штаммом LIVP, проявляет меньшую нейровирулентность и при внутрикожном введении индуцирует повышенную продукцию противовирусных антител. Такой вариант VACV может стать основой для получения аттенуированной и высокоиммуногенной вакцины против оспы и других возрождающихся ортопоксвирусных инфекций человека. В качестве молекулярного вектора этот вариант VACV может использоваться для конструирования живых рекомбинантных поливалентных вакцин против различных инфекционных заболеваний и онколитических вариантов VACV. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Российского научного фонда  
(грант № 19-14-00006).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health

Organization, 1988. 1460 p.  
2. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. Berlin, Heidelberg,

- New York: Springer, 2005. 425 p.
3. Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26.
  4. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. P. 4–12.
  5. Payne L.G. // *J. Gen. Virol.* 1980. V. 50. P. 89–100.
  6. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. № 1. P. 33–41.
  7. Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 2915–2931.
  8. Locker J.K., Kuehn A., Schleich S., Rutter G., Hohenberg H., Wepf R., Griffiths G. // *Mol. Biol. Cell.* 2000. V. 11. P. 2497–2511.
  9. Kirn D.H., Wang Y., Liang W., Contag C.H., Thorne S.H. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. P. 2071–2075.
  10. Blasco R., Sisler J.R., Moss B. // *J. Virol.* 1993. V. 67. P. 3319–3325.
  11. Thirunavukarasu P., Sathaiah M., Gorry M.C., O'Malley M.E., Ravindranathan R., Austin F., Thorne S.H., Guo Z.S., Bartlett D.I. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. P. 1024–1033.
  12. Olson V.A., Shchelkunov S.N. // *Viruses.* 2017. V. 9. e242.
  13. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 1726–1803.
  14. Prow N.A., Jimenez Martinez R., Hayball J.D., Howley P.M., Suhrbier A. // *Exp. Rev. Vaccines.* 2018. V. 17. P. 925–934.
  15. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.
  16. Щелкунов С.Н., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Якубицкий С.Н., Бауэр Т.В., Пьянков С.А. // *Инфекция и иммунитет.* 2020. Т. 10. doi:10.15789/2220-7619-PAI-1375.
  17. Бауэр Т.В., Трегубчук Т.В., Щелкунов С.Н., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. // *Медицинская иммунология.* 2020. Т. 22. С. 371–378.
  18. National Research Council Guidelines on Laboratory Animal Care and Use, 8th ed. National research Council of the National Academies. Washington: The National Acad. Press, 2011. 135 p.
  19. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D. Tissier M.-H., Fuchs F., Crance J.-M. // *J. Clin. Virol.* 2005. V. 32. P. 47–52.
  20. McIntosh A.A.G., Smith G.L. // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 272–281.
  21. Paran N., Lustig S., Zvi A., Erez N., Israely T., Melamed S., Politi B., Ben-Nathan D., Schneider P., Lachmi B., et al. // *Virol. J.* 2013. V. 10. e229.
  22. Stabenow J., Buller R. M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S. // *J. Virol.* 2010. V. 84. P. 3909–3920.
  23. Shchelkunov S.N. // *PLoS Path.* 2013. V. 9. e1003756.
  24. Peres M.G., Bacchiega T.S., Appolinario C.M., Vicente A.F., Mioni M.S.R., Ribeiro B.L.D., Fonseca C.R.S., Pelicia V.C., Ferreira F., Oliveira G.P., et al. // *Viruses.* 2018. V. 10. e42.
  25. Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. // *Вопр. вирусол.* 2019. Т. 64. С. 206–214.
  26. Reynolds M.G., Doty J.B., McCollum A.M., Olson V.A., Nakazawa Y. // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2019. V. 17. P. 129–139.
  27. Styczynski A., Burgado J., Walteros D., Usme-Ciro J., Laiton K., Farias A.P., Nakazawa Y., Chapman C., Davidson W., Mauldin M., et al. // *Emerg. Infect. Dis.* 2019. V. 25. P. 2169–2176.
  28. Shchelkunov S.N. // *Vaccine.* 2011. V. 29S. P. D49–D53.
  29. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
  30. Di Pilato M., Mejias-Perez E., Sorzano C.O.S., Esteban M. // *J. Virol.* 2017. V. 91. e00575–17.
  31. Albarnaz J.D., Torres A.A., Smith G.L. // *Viruses.* 2018. V. 10. e101.
  32. McClain D.J., Harrison S., Yeager C.L., Cruz J., Ennis F.A., Gibbs P., Wright M.S., Summers P.L., Arthur J.D., Graham J.A. // *J. Infect. Dis.* 1997. V. 175. P. 756–763.
  33. Phelps A., Gates A.J., Eastaugh L., Hillier M., Ulaeto D.O. // *Vaccine.* 2017. V. 35. P. 3889–3896.
  34. Roy S., Jaeson M.I., Li Z., Mahboob S., Jackson R.J., Grubor-Bauk B., Wijesundara D.K., Gowans E.J., Ranasinghe C. // *Vaccine.* 2019. V. 37. P. 1266–1276.
  35. Xie L., Zai J., Yi K., Li Y. // *Vaccine.* 2019. V. 37. P. 3335–3342.
  36. McIntosh A.A.G., Smith G.L. // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 272–281.
  37. McNulty S., Powell K., Erneux C., Kalman D. // *J. Virol.* 2011. V. 85. P. 7402–7410.
  38. Monticelli S.R., Earley A.K., Tate J., Ward B.M. // *J. Virol.* 2019. V. 93. e01343–18.
  39. Earley A.E., Chan W.M., Ward B.M. // *J. Virol.* 2008. V. 82. P. 2161–2169.