

УДК 578.821

# Сравнение эффективности трансэпидермальной и интрадермальной иммунизации мышей вирусом осповакцины

С. Н. Щелкунов\*, А. А. Сергеев, К. А. Титова, С. А. Пьянков, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, С. Н. Якубицкий  
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

\*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.11.2022

Принята к печати 30.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11857

**РЕФЕРАТ** В 2022 году во многих странах за пределами африканского континента начала распространяться инфекция, вызываемая вирусом оспы обезьян, что с новой силой привлекло внимание медиков и ученых к вопросу о необходимости вакцинации против данной инфекции. Вакцинацию имеющейся в России оспенной вакциной первого поколения на основе штамма LIVP вируса осповакцины (VACV) рекомендовано проводить методом трансэпидермальной инокуляции (скарификации кожи, с/к). Однако многолетний опыт показал, что этот метод не обеспечивает высокой надежности введения вируса в кожу пациентов. Альтернативой методу с/к может быть интрадермальная (внутрикожная, в/к) инъекция вакцины. Эффективность в/к вакцинации может зависеть от места инъекции вируса. В данной работе сравнили развитие гуморального и клеточного иммунных ответов на введение штамма LIVP VACV мышам линии BALB/c в один и тот же район хвоста методами в/к или с/к. В обоих случаях использовали дозу вируса, равную  $10^5$  БОЕ. Не выявлено статистически значимых различий в динамике и уровне продукции VACV-специфичных IgM и IgG при использовании обоих методов вакцинации. ELISpot-анализ спленоцитов вакцинированных мышей показал, что в/к введение VACV LIVP индуцирует достоверно больший Т-клеточный иммунный ответ, чем с/к инокуляция. Для оценки протективности на 45 день после иммунизации мышей интраназально инфицировали высоколетальными дозами вируса оспы коров (CPXV) или эволюционно далеко отстоящим от VACV и CPXV вирусом экстремелии (ECTV). Оба метода вакцинации обеспечивали полную защиту мышей от заражения CPXV, но в группе в/к иммунизированных мышей, инфицированных ECTV, выжило 50% мышей, а в группе с/к иммунизированных – 17%. Таким образом, в/к инъекция VACV может обеспечивать более надежную иммунную защиту от ортопоксвирусных инфекций по сравнению с классической с/к техникой.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ортопоксвирусы, вирус осповакцины, скарификация кожи, внутрикожная инъекция, антитела, Т-клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CPXV – вирус оспы коров; ECTV – вирус экстремелии; VACV – вирус осповакцины; БОЕ – бляшкообразующая единица; в/к – внутрикожно; с/к – скарификация кожи; дни – день после иммунизации; и/н – интраназально; ЛД<sub>50</sub> – 50% летальная доза вируса.

## ВВЕДЕНИЕ

При массовой вакцинации вирусные препараты обычно вводят либо внутримышечно, либо подкожно, поскольку это наиболее простые в исполнении методы, обеспечивающие точную дозировку вакцины и не требующие высококвалифицированного персонала. Однако ткани организма, в которые при этом доставляются вакцины, относятся к иммунологически бедным и, как правило, не обеспечива-

ют развития длительного напряженного иммунного ответа на вводимый препарат [1–3]. Тем не менее, оспенные вакцины новых поколений (в том числе наиболее изученный штамм MVA) обычно предназначены для внутримышечного или подкожного введения [4, 5].

Кожная иммунизация является привлекательной альтернативой традиционным подкожному и внутримышечному методам введения. Это обусловле-

но тем, что кожа служит не только физическим барьером для проникновения в организм инфекционных агентов, но в ходе эволюции развилась в высокоактивный иммунный орган. Кожа богата различными типами дендритных клеток, и эти профессиональные антигенпредставляющие клетки (antigen presenting cells, APC) способны узнавать, ассимилировать и процессировать антигены. Важно, что дендритные клетки обеспечивают ключевую связь между врожденным и адаптивным иммунными ответами, перемещаясь в лимфатические узлы дренирования кожи и представляя антигены Т- и В-лимфоцитам, индуцируя тем самым развитие патоген-специфичного протективного иммунитета. Более того, эти высокоспециализированные APC обладают большой пластичностью, которая модулируется иммунными сигналами, исходящими от других клеток кожи (включая кератиноциты, фибробласты, меланоциты, тучные клетки и др.), инфицированных вирусом [1–3, 6].

Накожная (transepidermal) иммунизация – исторически первый способ прививки, берет свое начало от вариоляции (variola inoculation). Процедура вариоляции состояла во внесении инфекционного материала от больных оспой в надрезы кожи (skin scarification) здоровых пациентов. Этим же методом Э. Дженнер (E. Jenner) в конце 18-го века предложил прививать людям не инфекционный материал от больных оспой, а содержимое кожных пустул от людей, заразившихся оспой коров. Процедуру называли вакцинацией (vaccine inoculation). Накожную противооспенную вакцинацию осуществляли с помощью скальпеля, ланцета или специальных бифуркационных игл. Этот способ вакцинации, хотя и позволил ликвидировать оспу, но не отличался высокой надежностью доставки в кожу вирусного материала [1]. Более того, такая процедура может сопровождаться размножением в поврежденной коже бактериальной микрофлоры [7].

В 1909 году Ч. Манту (C. Mantoux) [8] предложил способ внутрикожной (intradermal) инъекции с помощью шприца со стандартной иглой. Этот метод стали активно использовать при введении разработанной в 1921 году противотуберкулезной вакцины BCG. Следует отметить, что стандартная техника внутрикожной инъекции спустя столетие используется для введения лишь узкого списка вакцин. Это обусловлено тем, что данный способ инъекции не относится к простым, антиген могут вводить либо слишком глубоко (под кожу), либо происходит вытекание препарата [9], поэтому требуется специальное обучение персонала и опыт таких инъекций.

Эксперименты на животных и клинические испытания на добровольцах последних лет часто

демонстрируют, что внутрикожное введение вакцин обеспечивает более высокий иммунный ответ по сравнению с традиционными внутримышечной или подкожной инъекциями [10–12]. Более того, при внутрикожном введении надежный иммунный ответ можно получить при меньшей вакцинирующей дозе [1, 12], что также важно при необходимости массовой вакцинации и, как следствие, наработке большого числа доз вакцины.

Опубликованы результаты экспериментов, в которых сравнивается эффективность развития иммунного ответа против вируса осповакцины (vaccinia virus, VACV), вводимого лабораторным животным разными способами: внутримышечно, подкожно, внутрикожно, внутривнутрибрюшинно и др. Внутрикожная инъекция VACV часто обеспечивала более выраженный противовирусный иммунный ответ, чем другие методы вакцинации [10, 13]. При этом получаемые результаты зависели от используемых штаммов и доз VACV.

Показано также, что нанесение препарата высокопатогенного для мышей штамма WR VACV на скарифицированную кожу хвоста мышей может приводить к развитию иммунного ответа, превосходящего ответ на внутрикожную инъекцию того же вируса в нижнюю область спины мыши [14]. Известно, что толщина кожи различается на разных участках тела [2], поэтому эффективность внутрикожной вакцинации может зависеть от места инъекции вируса. Все это указывает на необходимость сравнительного изучения влияния способа введения вакцинного штамма вируса в кожу одного и того же участка тела на динамику развития и уровень противовирусного иммунного ответа.

Объектом изучения в нашей работе был штамм LIVP VACV, на основе которого в России создана противооспенная вакцина первого поколения [15]. Целью данной работы было сравнение развития гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию мышей линии BALB/c штаммом LIVP VACV, который вводили в кожу в один и тот же район хвоста методом скарификации (трансэпидермально) или инъекцией с помощью иглы и шприца методом Манту (интрадермально).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Вирусы и культура клеток

В работе использовали клоновый вариант 14 штамма LIVP VACV [16], вирус оспы коров (cowpox virus, CPXV) штамм GRI-90 [17] и вирус экстремелии (ectromelia virus, ECTV) штамм K-1, полученные из коллекции вирусов. Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартишки CV-1

получена из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток CV-1 как описано ранее [15].

### Животные

В исследованиях использовали самок мышей линии BALB/c (возраст 6–7 недель, масса 16–19 г), 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. Манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 01-04.2021 от 22.04.2021).

### Иммунизация мышей

Иммунизацию животных осуществляли методом внутрикожной инъекции (в/к) или скарификации кожи (с/к), используя VACV LIVP в дозе  $10^5$  БОЕ.

Место для в/к инъекции (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70% этиловым спиртом, иглу 30G ( $0.3 \times 13$  мм), соединенную со шприцем, вводили под небольшим углом, скосом вверх, на глубину примерно 2–3 мм под поверхностный слой эпидермиса. Вирусный материал или физиологический раствор (контрольная группа) в объеме 20 мкл вводили медленно, ожидая расслоения верхних слоев кожи под давлением жидкости, о поступлении которой во внутрикожное пространство свидетельствовало побледнение кожных покровов, распространяющееся в обе стороны от места введения. После введения препарата иглу медленно извлекали, а место инъекции дезинфицировали 70% этиловым спиртом.

Для иммунизации методом с/к место введения (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70% этиловым спиртом, после испарения которого делали 10 надрезов кожи иглой 26G ( $0.45 \times 16$  мм), оставаясь в пределах поверхностного слоя эпидермиса. На поврежденный участок кожи немедленно наносили вирусный материал или физиологический раствор в объеме 5 мкл и давали ему впитаться в кожу.

В состав каждой группы входило 36 животных.

### Взятие биоматериалов от экспериментальных животных

Через 7, 14, 21 и 28 дней после иммунизации (дпи) мышей вирусом VACV проводили забор проб крови (по 6 животных из каждой группы) из ретроорби-

тального венозного синуса путем его прокалывания иглой 23G ( $0.6 \times 30$  мм). Несмотря на то что взятие пробы крови является кратковременной, но болезненной процедурой, анестезирование животных по согласованию с комитетом по биоэтике не проводили, поскольку ранее было показано, что применение известных методов уменьшения боли влияет на иммунологические показатели крови животных. При заборе крови из ретроорбитального синуса повреждения органа зрения не происходило. После взятия крови животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Селезенки для выделения спленоцитов извлекали в стерильных условиях, используя пинцет и хирургические ножницы, и погружали в транспортировочную среду.

Из индивидуальных образцов крови мышей путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием получали препараты сыворотки. Образцы сывороток крови мышей хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$ .

На 42 дпи проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса мышей (по 12 животных каждой группы) и получали индивидуальные образцы сывороток крови как описано выше.

### Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей

На 45 дпи группы иммунизированных вирусом и контрольных животных интраназально (и/н) заражали CPXV GRI-90 в дозе 300 ЛД<sub>50</sub> ( $3.2 \times 10^6$  БОЕ) (6 животных в каждой группе) или ECTV K-1 в дозе 300 ЛД<sub>50</sub> ( $7.3 \times 10^3$  БОЕ) (6 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 суток и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. Мышей взвешивали каждые 2 суток. Рассчитывали средние арифметические значения массы тела мышей каждой группы на временную точку и выражали в процентах от начального веса. Показатель рассеивания данных относительно среднего значения представлен в виде стандартного отклонения и также выражен в процентах.

Получали данные для групп из 6 животных, иммунизированных (в/к или с/к) VACV LIVP, а также не иммунизированных групп мышей и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 или ECTV K-1 (положительный контроль).

### Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем индивидуального продавливания селезенки через клеточный фильтр (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью

буфера для лизиса эритроцитов (ACK Lysis Buffer, Sigma, США) спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 мкг/мл гентамицина. Концентрацию клеток определяли на автоматическом счетчике клеток TC20™ (Bio-Rad, США).

#### **Определение количества IFN-γ-продуцирующих клеток с использованием метода ELISpot**

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ, с помощью метода IFN-γ ELISpot. Анализ проводили с использованием наборов фирмы R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. По 100 мкл спленоцитов в концентрации  $5 \times 10^6$  клеток/мл помещали в ячейки планшета. Для каждого образца анализ проводили в повторях. Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей линии BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRFLNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV [18]. Смесь пептидов (100 мкл на ячейку) добавляли в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида. Не стимулированные и стимулированные конканавалином А (Con A, 5 мкг/мл) спленоциты использовали как отрицательный и неспецифичный положительный контроли соответственно. После стимуляции в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C с антителами против IFN-γ. Планшеты промывали и добавляли щелочную фосфатазу, конъюгированную со стрептавидином, и субстрат BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate/nitro-blue tetrazolium). Реакцию останавливали, промывая планшеты дистиллированной водой. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

#### **Иммуноферментный анализ сывороток крови**

ИФА сывороток крови мышей выполняли как описано ранее [15]. В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

#### **Статистический анализ данных**

Полученные данные анализировали с помощью GraphPad Prism 9.0 software (GraphPad Software Inc., США). Различия в иммунных ответах разных

групп оценивали с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни и дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Статистический анализ проводили с 95% уровнем значимости. Значение *P* менее 0.05 считали статистически значимым.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Внутрикожная инъекция VACV LIVP индуцирует у мышей большой Т-клеточный иммунный ответ, чем инокуляция скарификацией кожи**

Для оценки динамики развития Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию вирусом LIVP использовали мышей линии BALB/c. Мышам, разделенным на несколько групп (по 6 животных в каждой), вводили VACV LIVP в/к или с/к (хвост, 1 см от основания) в дозе 10<sup>5</sup> БОЕ/животное. Для проведения ELISpot-анализа спленоцитов извлекали селезенки у каждого из шести животных каждой экспериментальной группы на 7, 14, 21 и 28 дни. В качестве контроля использовали чистых (не иммунизированных) мышей.

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами из состава иммунодоминантных белков VACV [19], с помощью метода IFN-γ ELISpot. Результаты, представленные на *рис. 1*, свидетельствуют о формировании выраженного VACV-специфического Т-клеточного ответа у всех иммунизированных мышей. При этом спленоциты от контрольных животных не продуцировали IFN-γ.

При с/к инокуляции VACV LIVP на 7 дни у мышей индуцировался лишь небольшой уровень VACV-специфического Т-клеточного ответа, который на 14 дни достигал максимума, а на 21 и 28 дни значительно снижался (*рис. 1*).

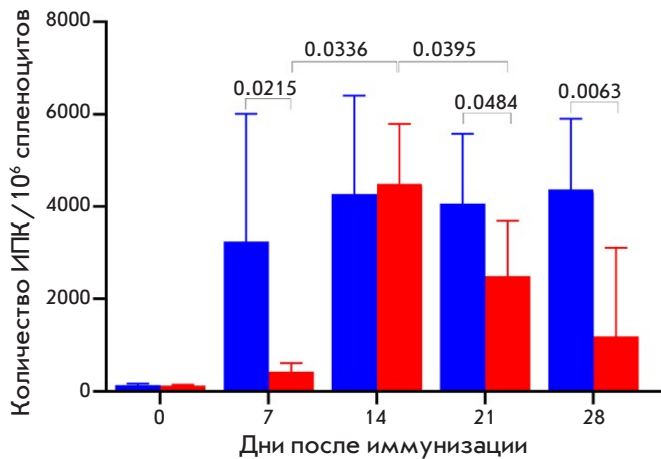
При в/к инъекции интенсивный Т-клеточный иммунный ответ развивался уже на 7 дни, немного увеличивался к 14 дни и сохранялся на высоком уровне все время наблюдения (до 28 дни).

На 7, 21 и 28 дни уровень Т-клеточного ответа у в/к вакцинированных мышей достоверно превышал такие показатели в группах мышей с/к инокулированных VACV LIVP (*рис. 1*).

### **Динамика развития гуморального иммунного ответа у мышей на введение VACV LIVP**

**внутрикожно или скарификацией не различается**  
На 7, 14, 21, 28 и 42 дни у каждой мыши брали образцы крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки, которые затем анализировали в ИФА, в котором в качестве антигена использовали препарат вирионов VACV LIVP.





**Рис. 1.** Оценка Т-клеточного ответа у иммунизированных VACV L1VP мышей BALB/c ( $n = 6$ /группа) с помощью анализа IFN- $\gamma$  ELISpot. Спленциты стимулировали пулом вирус-специфических пептидов в течение 24 ч. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к способ инъекции, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. Данные представлены как среднее геометрическое значение с доверительным интервалом для вероятности 95%. На оси Y представлено количество IFN $\gamma$ -продуцирующих клеток (ИПК) на  $10^6$  спленцитов. День 0 – показатель Т-клеточного ответа у неиммунизированных мышей. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения  $P$  приведены над горизонтальными скобками

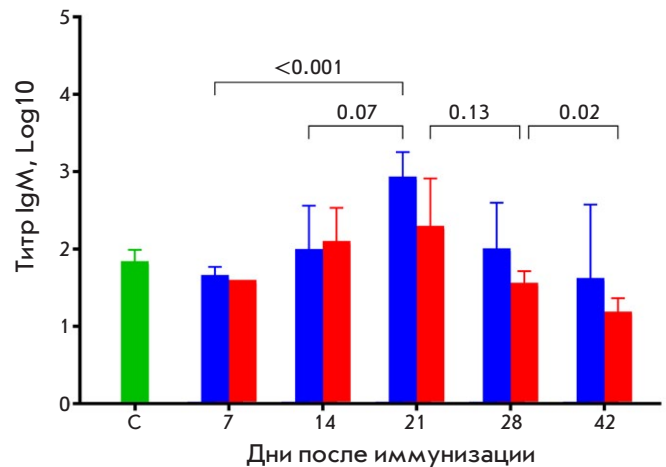
В каждой временной точке анализировали сыворотки от 6 животных каждой группы. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG.

Максимальный уровень VACV-специфических IgM выявляли на 21 дни (рис. 2), в то время как максимум продукции специфических IgG приходился на 28 дни (рис. 3). При в/к инъекции VACV L1VP на 21–42 дни уровень IgM в сыворотках мышей был несколько выше, чем в группах животных, подвергшихся с/к инокуляции этого вируса (рис. 2), но различия не были достоверными.

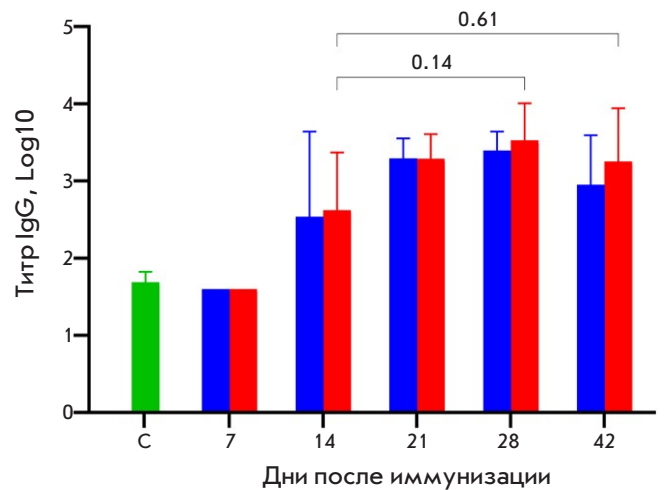
Не выявлено также достоверных различий в уровнях IgG в сыворотках мышей после в/к или с/к введения VACV L1VP (рис. 3).

**Внутрикожная инъекция VACV L1VP обеспечивает более надежную защиту мышей от повторной ортопоксвирусной инфекции по сравнению с иммунизацией методом скарификации**

Для выяснения влияния уровня гуморального и клеточного иммунных ответов на вакцинацию мышей VACV L1VP на уровень защиты мышей от повтор-



**Рис. 2.** Концентрация определенных в ИФА VACV-специфических IgM в сыворотках крови мышей, иммунизированных VACV L1VP в дозе  $10^5$  БОЕ. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к инъекция, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. C – контроль – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор. На диаграмме представлены средние геометрические значения с доверительным интервалом для вероятности 95%. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения  $P$  приведены над горизонтальными скобками



**Рис. 3.** Концентрация определенных в ИФА VACV-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных VACV L1VP в дозе  $10^5$  БОЕ. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к инъекция, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. C – контроль – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор. На диаграмме представлены средние геометрические значения с доверительным интервалом для вероятности 95%. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения  $P$  приведены над горизонтальными скобками

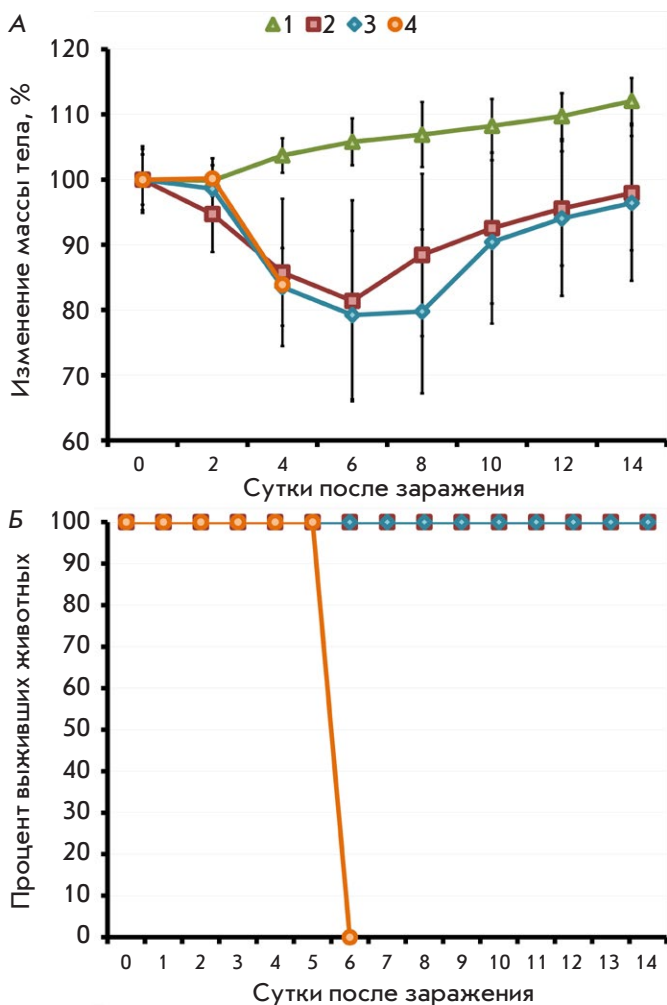


Рис. 4. Динамика изменения массы тела (А) и гибели мышей (Б), иммунизированных вирусом LIPV в дозе  $10^5$  БОЕ, после интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 300 ЛД<sub>50</sub>. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных способами с/к (2) или в/к (3), а также не иммунизированных и не инфицированных (1) или зараженных CPXV GRI-90 (4)

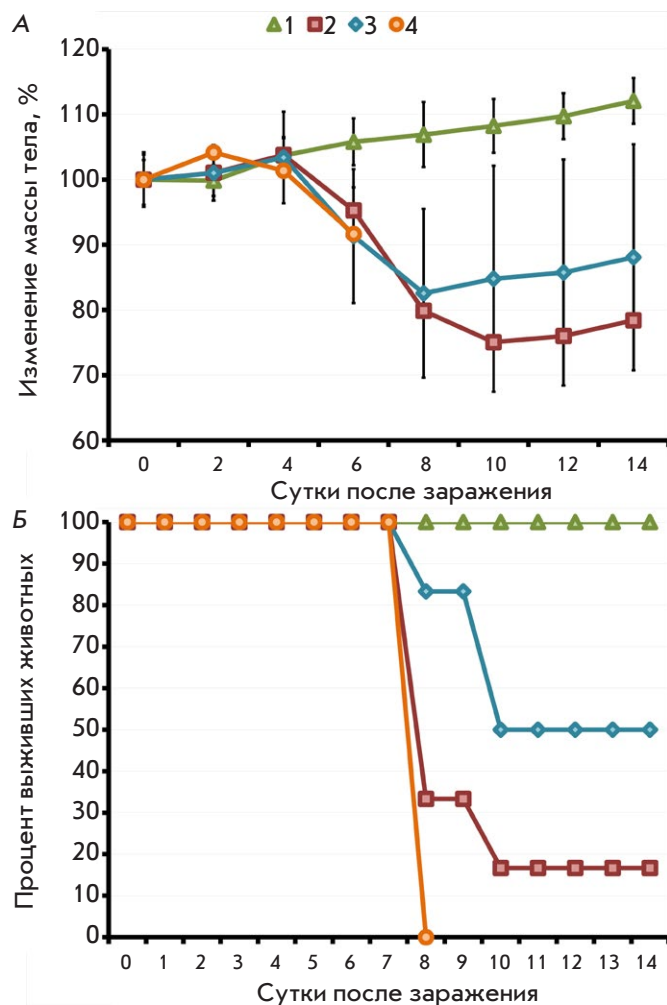


Рис. 5. Динамика изменения массы тела (А) и гибели мышей (Б), иммунизированных вирусом LIPV в дозе  $10^5$  БОЕ, после и/н заражения ECTV К-1 в дозе 300 ЛД<sub>50</sub>. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных способами с/к (2) или в/к (3), а также не иммунизированных и не инфицированных (1) или зараженных ECTV К-1 (4)

ной летальной ортопоксвирусной инфекции, на 45 день после в/к или с/к введения вируса LIPV мышей и/н заражали летальными дозами CPXV GRI-90 (по 6 животных в группе) или ECTV К-1 (по 6 животных в группе). За мышами наблюдали в течение 14 дней, регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. Каждые 2 дня мышей взвешивали для определения динамики изменения массы тела.

После и/н инфекции CPXV в дозе  $3.2 \times 10^6$  БОЕ ( $300 \text{ ЛД}_{50}$ ) у мышей экспериментальных групп с 4 по 8 день наблюдали признаки заболевания и вре-

менное снижение массы тела (рис. 4А). Все животные группы положительного контроля погибли к 6 дню, в то время как все мыши экспериментальных групп выздоровели (рис. 4Б).

После и/н инфекции мышей высокопатогенным ECTV в дозе  $7.3 \times 10^3$  БОЕ ( $300 \text{ ЛД}_{50}$ ) в экспериментальных группах с 6 по 10 день наблюдали признаки заболевания и временное снижение массы тела (рис. 5А). Все животные группы положительного контроля погибли к 8 дню. При этом в группе в/к вакцинированных выжило 50% мышей, а в группе с/к вакцинированных – 17% (рис. 5Б).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Кожа – обогащенный иммунными клетками орган, содержащий компоненты, которые обеспечивают эффективную индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа на инфекцию/вакцинацию [1–3]. При этом существуют два способа кожной вакцинации: исторически первым стал метод трансэпидермальной инокуляции, или скарификации кожи (с/к), и предложенная в начале 20-го века техника внутрикожной инъекции (в/к) [8]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки.

Метод с/к относительно прост, но при его применении нарушаются кожные покровы, что обуславливает индукцию локальных воспалительных реакций и сложность четкого контроля дозы вводимого препарата. В/к инъекция с помощью иглы и шприца вносит минимальные повреждения в кожу и позволяет точнее вводить вакцину в нужный компартмент кожи и дозировать ее.

Несмотря на долгую историю использования как с/к, так и в/к методов вакцинации, до сих пор не проведено полностью корректного сравнения иммуногенной и протективной эффективности этих двух методов при введении VACV на животных моделях. Такое заключение можно сделать исходя из того, что при сравнении с/к и в/к способов введения VACV в большинстве работ осуществляли в разные области тела лабораторных мышей [19]. Результаты наших предварительных экспериментов показали, что уровень иммунного ответа при в/к инъекции VACV зависит от области тела мыши, куда вводится препарат вируса. Чтобы исключить такое влияние, мы сравнили с/к и в/к техники, используя введение одной и той же дозы VACV в одну и ту же область хвоста мыши.

В качестве объектов исследования использовали мышей линии BALB/c и штамм LIVP VACV. Вирус LIVP в дозе  $10^5$  БОЕ вводили мышам в/к или с/к в кожу хвоста на расстоянии 1 см от его основания. У шести животных, вакцинированных каждым из двух изучаемых методов, в каждой временной точке (7, 14, 21 и 28 дни) проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали индивидуальные сыворотки для анализа уровня VACV-специфичных антител. После этого у каждого животного извлекали селезенки для выделения спленоцитов и проведения IFN- $\gamma$  ELISpot-анализа Т-клеточного иммунного ответа. В качестве контроля использовали чистых (не иммунизированных) мышей.

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ

на стимуляцию пептидами из состава иммунодоминантных белков VACV (рис. 1). При с/к инокуляции VACV LIVP на 7 дни у мышей индуцировался лишь небольшой уровень VACV-специфичного Т-клеточного ответа, который на 14 дни достигал максимума, а на 21 и 28 дни значительно снижался. При в/к инъекции интенсивный Т-клеточный иммунный ответ у мышей развивался уже на 7 дни, сохраняясь на высоком уровне все время наблюдения (до 28 дни). Таким образом, в/к иммунизация VACV LIVP активирует у мышей более выраженный и долговременный Т-клеточный иммунный ответ по сравнению с с/к вакцинацией.

У оставшихся мышей в экспериментальных и контрольных группах (по 12 животных в каждой группе) на 42 дни проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали образцы сывороток каждой мыши. ИФА всех сывороток иммунизированных мышей показал, что динамика и уровень продукции VACV-специфичных IgM (рис. 2) и IgG (рис. 3) при в/к и с/к методах вакцинации не имели значимых различий. Максимум уровней IgM приходился на 21 дни, а IgG – на 28 дни.

Для оценки протективного иммунитета, развившегося в ответ на в/к или с/к вакцинацию, на 45 дни по шесть мышей каждой группы и/н инфицировали высоколетальными дозами CPXV GRI-90 или ECTV K-1. Оказалось, что оба метода вакцинации обеспечивали полную защиту мышей от заражения CPXV в дозе  $300 \text{ ЛД}_{50}$  (рис. 4), но при и/н инфекции мышей дозой  $300 \text{ ЛД}_{50}$  высоковирулентным ECTV, эволюционно относительно далеко отстоящим от VACV и CPXV [20], защита вакцинированных животных была частичной (рис. 5). При этом в группе в/к иммунизированных мышей выжило 50%, а в группе с/к иммунизированных – 17%.

На основании полученных результатов можно заключить, что хотя наибольший вклад в защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции вносит гуморальный иммунный ответ [21–23], важное значение имеет и уровень клеточного иммунитета, развившегося в ответ на вакцинацию. Также можно сделать вывод, что в/к инъекция VACV может обеспечить более надежный протективный иммунитет по сравнению с классической с/к техникой.

Полученные нами результаты отличаются от ранее описанных результатов группы T.S. Kupper [14, 19], которые выявили более выраженную иммуногенность и протективность VACV при с/к иммунизации мышей по сравнению с в/к и другими методами введения вируса. В этих работах мышей линии C57BL/6 иммунизировали дефектным по репликации штаммом MVA VACV и оценивали защи-

ту от и/н летальной инфекции нейровирулентным для мышей штаммом WR VACV. При этом при использовании разных способов вирусы вводили в разные части тела мышей.

В нашей работе использовали другую линию мышей BALB/c, а иммунизацию осуществляли реплицирующимся штаммом LIVP VACV. Оценивали протективность иммунизированных мышей от и/н инфекции гетерологичными ортопоксвирусами CPXV и ECTV. В предварительных экспериментах обнаружено, что иммуногенность VACV LIVP значительно отличается при в/к инъекции вируса в разные части тела мышей. Поэтому для корректного сравнения эффективности с/к и в/к техник иммуни-

зации VACV LIVP вводили в один и тот же участок кожи хвоста мышей. По-видимому, именно это стало причиной различий в результатах, полученных нами, и в ранее опубликованных [14, 19].

Наблюдаемое в последние годы развитие современных техник внутрикожного введения вакцинных препаратов [1–3, 24] позволит упростить и повысить надежность этого перспективного подхода к противовирусной иммунизации, особенно при массовой вакцинации. ●

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim Y.C., Jarrahan C., Zehrung D., Mitragotri S., Prausnitz M.R. // *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 2012. V. 351. P. 77–112.
- Gamazo C., Pastor Y., Larraneta E., Berzosa M., Irache J.M., Donnelly R.F. // *Ther. Deliv.* 2019. V. 10. P. 63–80.
- Hettinga J., Carlisle R. // *Vaccines.* 2020. V. 8. P. 534.
- Vollmar J., Arndtz N., Eckl K.M., Thomsen T., Petzold B., Mateo L., Schlereth B., Handley A., King L., Hulsemann V., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 2065–2070.
- Jackson L.A., Frey S.E., El Sahly H.M., Mulligan M.J., Winokur P.L., Kotloff K.L., Campbell J.D., Atmar R.L., Graham I., Anderson E.J., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. P. 1675–1682.
- Lei V., Petty A.J., Atwater A.R., Wolfe S.A., MacLeod A.S. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. 593901.
- Shmeleva E.V., Gomez de Aguero M., Wagner J., Enright A.J., Macpherson A.J., Ferguson B.J., Smith G.L. // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. e1009854.
- Mantoux C. // *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris.* 1909. V. 148. P. 996–998.
- Tarnow K., King N. // *Appl. Nursing Res.* 2004. V. 17. P. 275–282.
- Egunsola O., Clement F., Taplin J., Mastikhina L., Li J.W., Lorenzetti D.L., Dowsett L.E., Noseworthy T. // *JAMA Network Open.* 2021. V. 4. P. e2035693.
- Wilck M.B., Seaman M.S., Baden L.R., Walsh S.R., Grandpre L.E., Devoy C., Giri A., Kleinjan J.A., Noble L.C., Stevenson K.E., et al. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. P. 1361–1370.
- Schnyder J.L., De Pijper C.A., Garcia Garrido H.M., Daams J.G., Goorhuis A., Stijnis C., Schaumburg F., Grobusch M.P. // *Trav. Med. Infect. Dis.* 2020. V. 37. 101868.
- Hughes L.J., Townsend M.B., Gallardo-Romero N., Hutson C.L., Patel N., Dotty J.B., Salzer J.S., Damon I.K., Carroll D.S., Satheshkumar P.S., et al. // *Virology.* 2020. V. 544. P. 55–63.
- Liu L., Zhong Q., Tian T., Dubin K., Athale S.K., Kupper T.S. // *Nat. Med.* 2010. V. 16. P. 224–227.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses.* 2020. V. 12. P. 795.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // *Virology.* 1998. V. 243. P. 432–460.
- Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A., Kolosova I.V., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Kisakov D.N., et al. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 1631.
- Pan Y., Liu L., Tian T., Zhao J., Park C.O., Lofftus S.Y., Stingley C.A., Yan Y., Mei S., Liu X., et al. // *NPJ Vaccines.* 2021. V. 6. P. 1.
- Carrroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., Nakazawa Y., Czerny C.P., Tryland M., Kolodziejek J., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e23086.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 9458–9463.
- Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. P. 33–41.
- Lambert P.H., Laurent P.E. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 3197–3208.