

УДК 578.821

# Влияние делеции гена *ati* на патогенные и иммуногенные свойства вируса осповакцины

С. Н. Якубицкий, А. А. Сергеев, К. А. Титова, И. С. Шульгина, Е. В. Старостина,  
М. Б. Боргоякова, Л. И. Карпенко, С. Н. Щелкунов\*

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

\*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.04.2023

Принята к печати 13.07.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.17872

**РЕФЕРАТ** Среди невирионных белков вируса осповакцины (VACV) наиболее представлен поздний белок 94 кДа – укороченная форма белка внутриклеточных телец включения типа А (A-type inclusion, ATI) вируса оспы коров, который имеет размер 150 кДа и кодируется геном *ati*. Этот белок VACV не формирует внутриклеточные ATI, будучи при этом мажорным иммуногеном при инфекции/иммунизации VACV человека или животных, а антитела к этому белку не являются вируснейтрализующими. В представленной работе изучено влияние продукции неструктурного мажорного иммуногенного белка VACV на проявления патогенности и иммуногенности вируса при модельной инфекции мышей линии BALB/c. Для направленного введения делеции в геном VACV LIVP создана рекомбинантная плаزمиды интеграции/делеции  $r\Delta ati$  и с ее помощью рекомбинантный вирус LIVP $\Delta ati$ . Патогенность штаммов VACV LIVP и LIVP $\Delta ati$  изучали на 3-недельных мышках. Интраназальное заражение мышак вирусам в дозе  $10^7$  БОЕ приводило к гибели 50% животных, инфицированных исходным штаммом LIVP, тогда как после заражения штаммом LIVP $\Delta ati$  погибло лишь 20% мышак. Внутрнкожная иммунизация 6–7-недельных мышак вирусом LIVP $\Delta ati$  приводила к достоверному увеличению продукции VACV-специфических IgG по сравнению с внутрнкожной вакцинацией VACV LIVP. При этом не выявлено различий в клеточном иммунном ответе на вакцинацию мышак VACV LIVP или LIVP $\Delta ati$ , оцениваемом методом ELISpot по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- $\gamma$  в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами. Интраназальное заражение мышак летальными дозами вируса оспы коров или вируса экстромелии на 60-й день после иммунизации изучаемыми вариантами VACV показало, что мутантный LIVP $\Delta ati$  обуславливает более выраженный протективный эффект по сравнению с родителским LIVP.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ортопоксвирусы, вирус осповакцины, ген *ati*, внутрнкожная инъекция, иммуногенность, протективность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** CPXV – вирус оспы коров; ECTV – вирус экстромелии; VACV – вирус осповакцины; БОЕ – бляшкообразующая единица; в/к – внутрнкожно; дни – день после иммунизации; и/н – интраназально.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус осповакцины (*Vaccinia virus*, VACV) входит в состав рода *Orthopoxvirus* (семейство Poxviridae), который объединяет также такие виды, как вирус натуральной оспы (*Variola virus*, VARV), вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*, MPXV), вирус оспы коров (*Cowpox virus*, CPXV), вирус оспы верблюдов (*Camelpox virus*, CMLV) и некоторые другие [1, 2]. Ортопоксвирусы являются крупнейшими ДНК-содержащими вирусами млекопитающих, весь цикл развития которых проходит в цитоплазме инфици-

рованных клеток. Представители этого рода по структуре вирионов морфологически неразличимы и антигенно близки друг другу, поэтому заражение 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 вну-

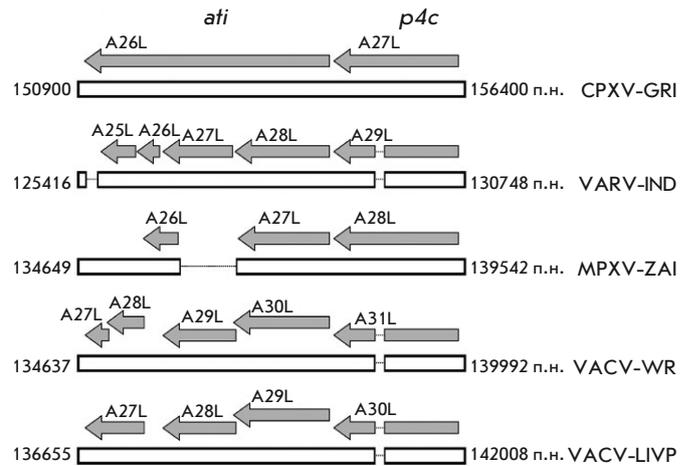
триклеточные зрелые вирионы (IMV), гораздо меньшую часть – внеклеточные, покрытые дополнительной оболочкой вирионы (EEV) [5, 6].

Еще в ранних работах по изучению иммунного ответа на внутрикожную (в/к) инфекцию кроликов вирусом VACV был обнаружен так называемый LS-антиген (единный белок, состоящий из термолабильного (L) и термостабильного (S) антигенных компонентов), против которого активно продуцировались антитела [7]. Высокоиммуногенный LS-антиген, который не относится к вирионным белкам и синтезируется в большом количестве, выделяют из экстрактов инфицированных тканей животных. Антитела, полученные после иммунизации животных LS-антигеном, не обладают вируснейтрализующей активностью, но реагируют в тестах связывания комплемента и иммунопреципитации в геле с клиническими образцами от больных оспой и оспой обезьян [2].

В дальнейшем показали, что LS-антиген VACV размером 94 кДа – это укороченная форма белка, формирующего у CPXV внутриклеточные тельца типа А (A-type inclusion bodies, ATI). Белок ATI CPXV имеет размер 150 кДа [8], накапливается в инфицированных клетках в большом количестве на позднем этапе цикла репликации вируса (до 4% суммарного клеточного белка) и агрегирует с образованием в цитоплазме клеток гелеподобных тел, в которые могут включаться зрелые вирионы [9, 10]. Укороченные на С-конце формы этого белка размером от 92 до 96 кДа в большом количестве синтезируются в VARV, MPXV, CMLV и VACV, не образуя ATI (*рис. 1*).

Показано, что при иммунизации лабораторных животных или добровольцев VACV формируются антитела на широкий спектр вирионных белков, а также на высокоиммуногенный невирионный ATI-подобный белок [11]. Т-клеточный иммунный ответ на инфекцию VACV индуцируется в основном против ранних невирионных белков [6]. Исключение составляет укороченная форма белка ATI, синтезируемая на позднем этапе цикла репликации вируса, на которую, тем не менее, формируется выраженный Т-клеточный иммунный ответ [12]. По-видимому, это обусловлено тем, что укороченный ген *ati* (A29L в случае VACV-LIVP, см. *рис. 1*) является одним из наиболее интенсивно экспрессируемых генов VACV, а кодируемый им белок продуцируется в наибольшем количестве среди невирионных белков [9].

Ген *ati* не входит в число генов, жизненно важных для VACV, так как обнаружены природные варианты этого вируса, у которых данный ген делегирован [13, 14]. На примере CPXV показано также,



**Рис. 1.** Сравнение ортопоксвирусных потенциальных открытых рамок считывания (ОРТ), входящих в состав генов *ati* (ОРТ A26L) и *p4c* (A27L) CPXV-GRI. Серыми стрелками обозначены размер и направление соответствующих ОРТ, названия которых приведены над этими стрелками для вирусов CPXV-GRI, VARV-IND, MPXV-ZAI, VACV-WR [2] и VACV-LIVP. Цифрами справа и слева от белых блоков указаны позиции соответствующей области генома вируса. Тонкими линиями обозначены делеции в геномах вирусов относительно последовательности ДНК CPXV-GRI. Укороченная форма белка ATI кодируется ОРТ A29L VACV-LIVP и соответствующими ОРТ других вирусов

что делеция гена *ati* не влияет на способность вируса размножаться как *in vitro*, так и *in vivo* [15, 16]. Однако до сих пор не изучено влияние делеции гена *ati* на иммуногенные свойства VACV.

В данной работе изучено влияние делеции гена *ati*, кодирующего мажорный иммуногенный белок VACV, антитела к которому не обладают вируснейтрализующей активностью, на патогенные и иммуногенные свойства вируса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактерии, вирусы и культура клеток

В работе использовали штамм *Escherichia coli* XL2-Blue, клон 14 штамма LIVP VACV, полученный нами ранее методом предельного разведения через бляшку из-под агарозного покрытия [17], а также вирус оспы коров (CPXV) штамм GRI-90 и вирус эктромелии (ECTV) штамм K-1, полученные из коллекции вирусов. Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартишки CV-1 получена из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВВ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на монослойной культуре клеток CV-1 согласно [18].

### Животные

В исследованиях использовали инбредных мышей линии BALB/c, полученных из питомника Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (Новосибирск). 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 (ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами»). Исследования и манипуляции на животных проведены с одобрения комитета по биоэтике ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02-06.2022 от 28.06.2022 г.).

### Оценка патогенности штаммов VACV

В исследованиях по изучению патогенности VACV LIVP и LIVPΔati при интраназальном (и/н) заражении использовали 3-недельных мышей линии BALB/c (по 10 животных в группе). Мышам после ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром вводили в полость носа вирусосодержащую жидкость (50 мкл,  $10^7$  бляшкообразующих единиц (БОЕ)) либо физиологический раствор. За животными наблюдали в течение 22 дней и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель.

Использовали балльную оценку выявляемых симптомов заболевания: 0 – нет признаков заболевания, 1 – легкая взъерошенность шерсти, 2 – сильная взъерошенность шерсти, 3 – сильная взъерошенность шерсти, а также сутулая поза или конъюнктивит, 4 – затрудненное дыхание или отсутствие движения, 5 – гибель.

Мышей взвешивали по отдельности каждые 2 дня. Средние арифметические значения массы тела мышей в каждой группе на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса.

### Иммунизация мышей и взятие образцов на анализы

Мышей линии BALB/c в возрасте 6–7 недель иммунизировали штаммами LIVP и LIVPΔati VACV: внутрикожная (в/к) инъекция в дорсальную сторону хвоста (около 1 см от основания) как описано ранее [19], используя дозу вируса  $10^5$  БОЕ/20 мкл/мышь. В качестве отрицательного контроля использовали мышей, которым вводили физиологический раствор.

На 7, 14, 21, 28, 42 и 56 день после иммунизации (дни) анализировали гуморальный иммунный ответ у мышей. В каждой временной точке, указанной

выше, в анализ брали по 6 мышей в группе. Кровь у мышей прижизненно забирали из ретроорбитального венозного синуса с помощью иглы 23G. Забор крови из ретроорбитального синуса не приводит к повреждению органа зрения. Взятие пробы крови является кратковременной, но болезненной процедурой, однако обезболивание не проводили, поскольку показано, что применение известных методов обезболивания или наркоза может влиять на иммунологические показатели крови животных.

Из индивидуальных образцов крови животных получали сыворотку путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования с относительной центробежной силой 1000 *g* в течение 10 мин. Сыворотки выдерживали при температуре 56°C в течение 30 мин и хранили при температуре минус 20°C.

На 7, 14 и 21 дни после взятия крови мышей умертвляли методом цервикальной дислокации, селезенки стерильно извлекали у каждой из 6 мышей изучаемых групп.

### Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем продавливания каждой селезенки через клеточный фильтр (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью буфера ACK для лизиса эритроцитов (Thermo Fisher Scientific, США), спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицина (50 мкг/мл).

### Определение количества продуцирующих IFN-γ 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 MABTECH (Швеция) согласно инструкции производителя. Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRFLNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV (по 20 мкг/мл каждого пептида) [20, 21]. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

### Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей

Иммуноферментный анализ (ИФА) сывороток крови мышей выполняли согласно [18]. В качестве антигена использовали очищенный центрифугированный

ем через сахарозную подушку препарат вирионов штамма LIVP VACV. Все исследуемые образцы сыворотки крови мышей титровали серией двукратных последовательных разбавлений с разведения 1:100 до разведения 1:12800. Повтор титрования проведен в постановке ИФА на следующий день. Для определения титров IgM и IgG использовали растворы с пероксидазными конъюгатами анти-IgM мыши и анти-IgG мыши (Sigma, США) соответственно. Титры IgM и IgG определяли в каждом образце сыворотки крови (отдельно в каждом повторе, а затем усредняли). Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgG или IgM по экспериментальным группам, рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

**Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей**

На 60-й дни группы иммунизированных VACV LIVP или LIVPΔati и контрольных животных и/н заражали CPXV GRI-90 в дозе  $2.0 \times 10^6$  БОЕ/50 мкл/мышь (6 животных в каждой группе) или ECTV K-1 в дозе  $2.2 \times 10^3$  БОЕ/50 мкл/мышь (6 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 дней и регистрировали у них клинические проявления инфекции и гибель. Каждую мышь взвешивали каждые 2 дня. Средние арифметические значения массы тела мышей каждой группы на временную точку рассчитывали и выражали в процентах от начального веса.

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

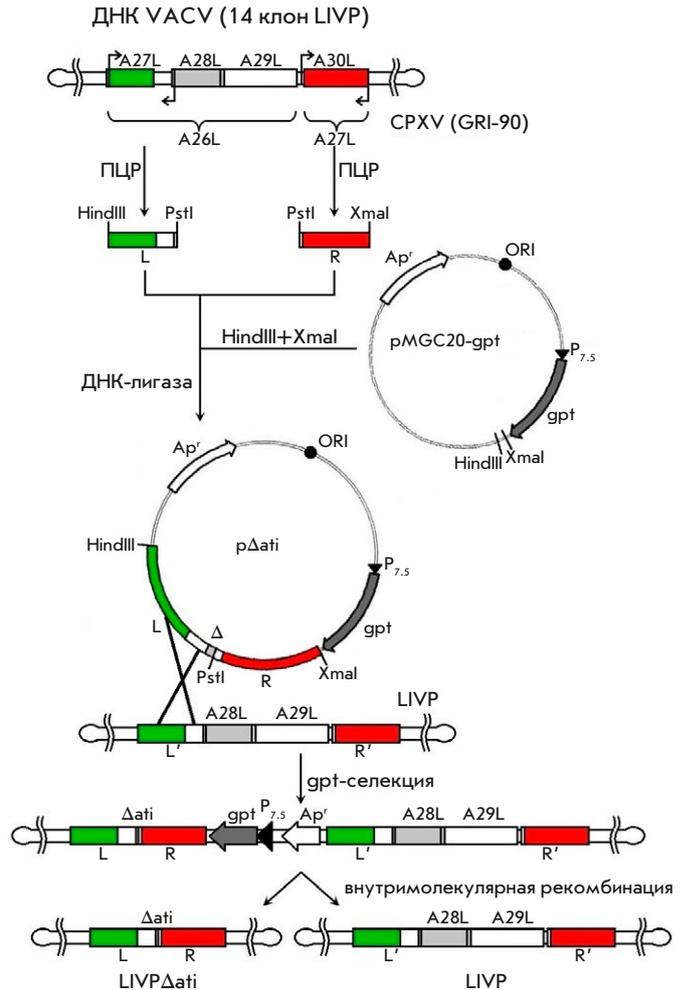
**Статистический анализ данных**

Статистическую обработку и сравнение результатов проводили стандартными методами, используя пакет компьютерных программ Statistica 13.0 (StatSoft Inc. 1984-2001). Значение *P* менее 0.05 считали статистически значимым.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

**Создание вируса LIVPΔati**

Направленное введение делеции в геном VACV LIVP (GenBank: KX781953.1) проводили в соответствии со схемой, приведенной на рис. 2. На первом этапе конструирования рекомбинантной плазмиды интеграции/делеции рΔati с использованием ком-



**Рис. 2.** Схема конструирования плазмиды рΔati и VACV LIVPΔati (см. объяснения в тексте). L и R – левая и правая фланкирующая ген att области вирусного генома

пьютерной программы Oligo (версия 3.3) (Borland International, США) рассчитали и синтезировали олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР и амплификации последовательностей ДНК VACV LIVP, фланкирующих слева и справа делетируемый участок вирусного генома (ОПТ A28L–A29L, положение на геноме 137618–140470 п.н.) (рис. 1, 2).

Левый фланкирующий фрагмент (L) получали с использованием пары праймеров 5'-AAGCTTGTT-TGGTAGTAGATACATATCAATATCATC-3' (**HindIII**) и 5'-CTGCAGGCTGACTCAATTGCATGAAGAT-3' (**PstI**), правый фланкирующий фрагмент (R) – праймеров 5'-CTGCAGGGGTAATTATAAGATCGTAGATCTCC-3' (**PstI**) и 5'-CCCGGGATGGCGAACAT-TATAAATTTATGG-3' (**XmaI**), а также полимеразу с редактирующими свойствами Platinum Taq DNA High Fidelity Polymerase (Invitrogen, США), а в качестве ДНК-матрицы использовали ДНК клона 14

штамма LIVP VACV. Полученные целевые фрагменты L и R очищали, используя QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Нидерланды), встраивали в векторный HindIII–XmaI-фрагмент pMGC20-gpt (рис. 2) и клонировали, используя трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамм XL2-Blue и ампициллин в качестве селективного маркера. Правильность структуры рекомбинантной плазмиды pΔati подтверждали секвенированием.

На следующем этапе работы монослой клеток CV-1 инфицировали VACV LIVP и трансфицировали рекомбинантной плазмидой pΔati в условиях gpt-селекции рекомбинантов VACV как описано ранее [17]. В результате единичного кроссинговера плазмиды интеграции и вирусной ДНК образовывался рекомбинантный вирусный геном, содержащий как селективный ген *gpt*, так и последовательности, представляющие собой сегмент вирусного генома с целевой делецией и этот же сегмент без делеции (рис. 2). Такая генетическая конструкция с длинными прямыми повторами (R, R' и L, L') нестабильна и может существовать лишь под селективным давлением. После снятия селективного давления по гену *gpt* и внутримолекулярной рекомбинации по районам R-R' образовался рекомбинантный вирус LIVPΔati (рис. 2). Клоны данного варианта вируса выявляли ПЦР-анализом с последующим секвенированием вирусной ДНК.

**Оценка патогенности вирусов LIVP и LIVPΔati при интраназальном заражении мышей**

При изучении патогенности штаммов VACV LIVP и LIVPΔati использовали 3-недельных мышей линии BALB/c. Осуществляли и/н заражение мышей (10 животных в группе) вирусами в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ. За животными наблюдали в течение 22 дней, каждые 2 дня каждую мышь взвешивали и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. У мышей, зараженных VACV LIVP, выраженные клинические проявления инфекции выявляли, начиная с 4-го дня с максимумом на 6-й день, выздоровление наступало после 10-го дня (рис. 3Б). Заболевание сопровождалось существенным снижением массы тела (рис. 3А). Вирус LIVPΔati в тех же условиях вызывал менее выраженные клинические проявления инфекции (рис. 3Б) и меньшее снижение массы тела по сравнению с группой мышей, инфицированных LIVP (рис. 3А), хотя и без статистически значимых различий. Заражение мышей штаммом LIVP приводило к гибели 50% животных, тогда как после заражения штаммом LIVPΔati погибло лишь 20% мышей (рис. 4).

Полученные результаты указывают на снижение патогенности VACV LIVP с делецией гена *ati* (рис. 2).

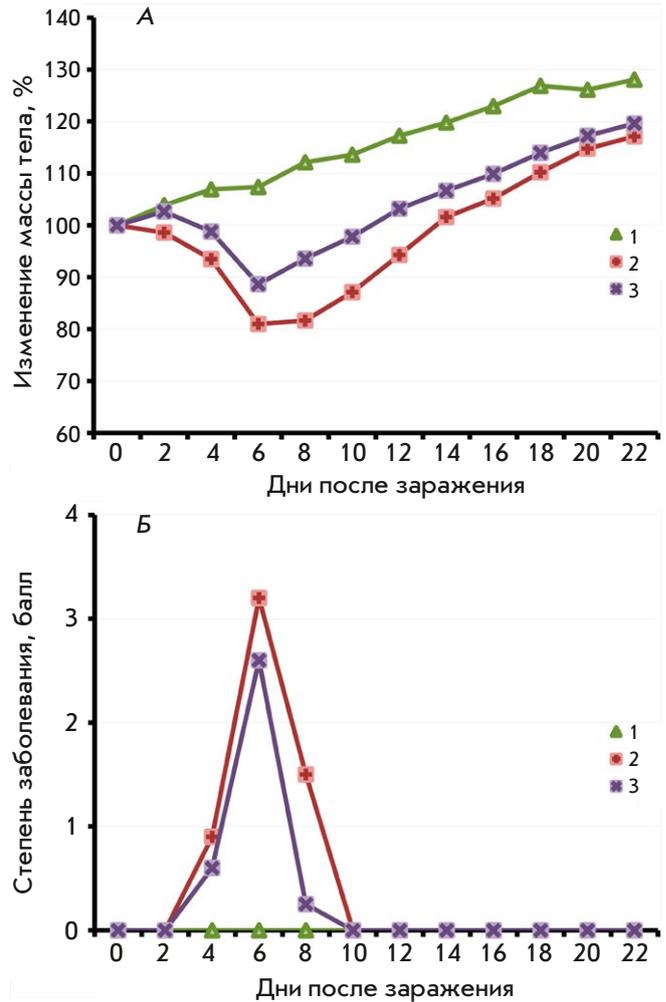


Рис. 3. Динамика изменения массы тела мышей (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения вирусами LIVP (2) или LIVPΔati (3) в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ. Приведены данные для групп из 10 животных, зараженных соответствующими вирусами, а также контрольной группы (1)

**Анализ развития клеточного иммунного ответа на вакцинацию мышей вариантами VACV**

Интенсивность клеточного иммунного ответа у мышей, в/к иммунизированных LIVP или LIVPΔati, определяли на 7, 14 и 21 дни по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию вирус-специфическими пептидами, с помощью метода IFN-γ ELISpot. В каждой временной точке анализировали по 6 животных в группе. Результаты, представленные на рис. 5, показывают, что высокий уровень клеточного иммунного ответа наблюдался уже на 7 дни, пик которого приходился на 14 дни со значительным снижением к 21 дни. Динамика и уровень клеточного иммунного ответа совпадали у обоих штаммов VACV.

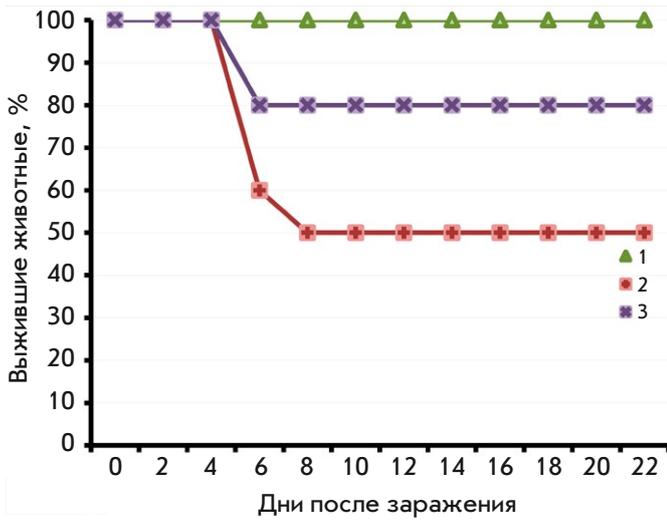


Рис. 4. Динамика гибели мышей, и/н зараженных вирусами LIVP (2) или LIVPΔati (3) в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ. Контрольная группа – неинфицированные животные (1)

**Сравнение динамики развития гуморального иммунного ответа на вакцинацию мышей вирусами LIVP и LIVPΔati**

Уровень VACV-специфичных IgM и IgG в сыворотках крови мышей, в/к иммунизированных LIVP или LIVPΔati, определяли методом ИФА на 7, 14, 21, 28, 42 и 56 дни.

На 7 дни выявлен относительно высокий уровень IgM, который достигал максимума на 14 дни, а затем снижался. По динамике и уровню продукции вирион-специфичных IgM оба штамма VACV не различались (рис. 6А).

Активный синтез VACV-специфичных IgG наблюдали на 14 дни с последующим увеличением уровня антител на 21–28 дни, который оставался высоким все время наблюдения (до 56 дни, рис. 6Б) у мышей, иммунизированных LIVPΔati, но снижался у мышей, вакцинированных LIVP. По среднегеометрическим значениям обратных титров IgG на 28, 42 и 56 дни LIVPΔati заметно превосходил LIVP, и эти различия были статистически значимыми на 42 и 56 дни (рис. 6Б).

**Оценка защитного эффекта вакцинации мышей вариантами VACV от повторной инфекции летальными дозами гетерологичных ортопоксвирусов**

На 60-й дни мышей, в/к иммунизированных VACV LIVP или LIVPΔati, а также контрольных (неиммунизированных) и/н заражали либо CPXV (в дозе 2.0×10<sup>6</sup> БОЕ/мышь), либо ECTV (в дозе 2.2×10<sup>3</sup> БОЕ/мышь) (по 6 животных в группе). В течение 14 дней наблюдали за клиническими проявлениями

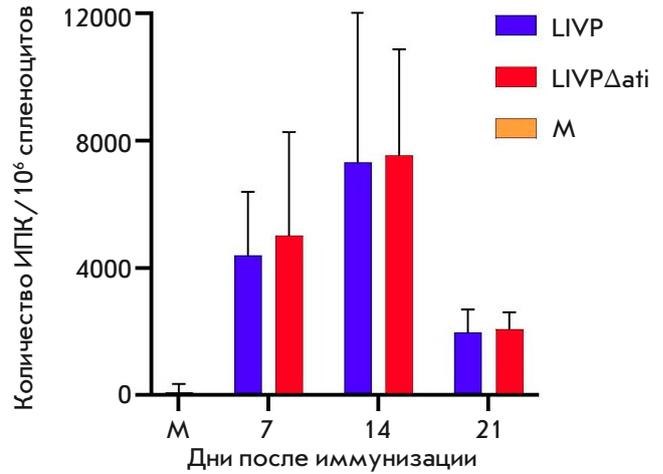


Рис. 5. ELISpot-анализ VACV-специфичного клеточного ответа на иммунизацию мышей линии BALB/c. ИПК – интерферон-γ-продуцирующие клетки, М – неиммунизированные мыши

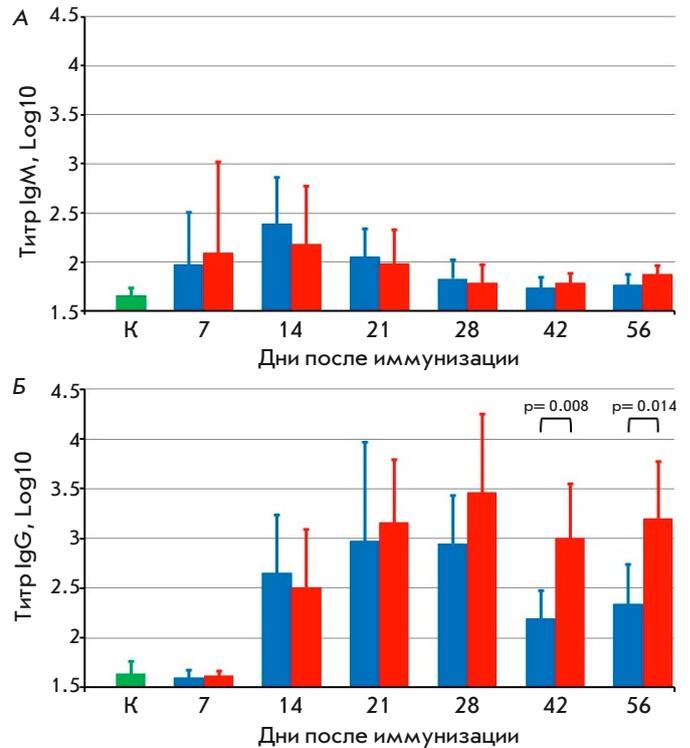
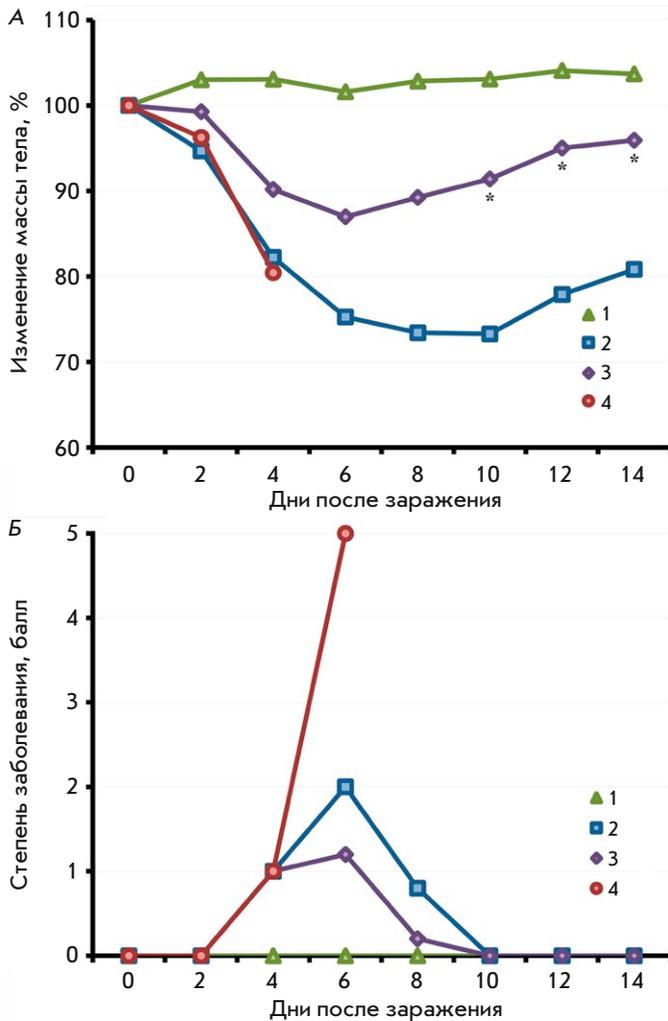


Рис. 6. Титры VACV-специфичных IgM (А) и IgG (Б) в сыворотках мышей, иммунизированных вирусами LIVP (синие столбики) или LIVPΔati (красные столбики). К – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор

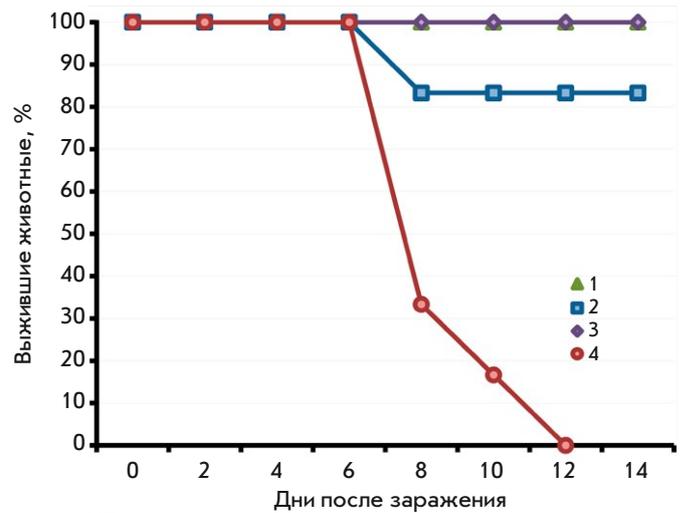
и гибелью мышей. Использовали критерий развития VACV инфекции по величине снижения массы тела.

При заражении CPXV все мыши контрольной группы погибли через 6 дней, а животные, иммунизированные обоими вариантами VACV, выжили.



**Рис. 7.** Динамика изменения массы тела (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения CPXV-GRI мышей, вакцинированных LIVP (2) или LIVPΔati (3), на 60-й день после иммунизации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей как не инфицированных CPXV-GRI (1), так и зараженных этим вирусом (4). Звездочкой обозначены временные точки, в которых среднее значение массы тела в процентах от первоначального веса в группе иммунизированных LIVPΔati достоверно отличается от значений в группе мышей, иммунизированных LIVP. Сравнение проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок

При этом обнаружили менее выраженное снижение массы тела и менее существенные клинические проявления у мышей, вакцинированных LIVPΔati, по сравнению с мышами, вакцинированными LIVP (рис. 7). На 10–14 дни после заражения CPXV различия в снижении массы тела между группами вакцинированных мышей были статистически значимыми (рис. 7А).

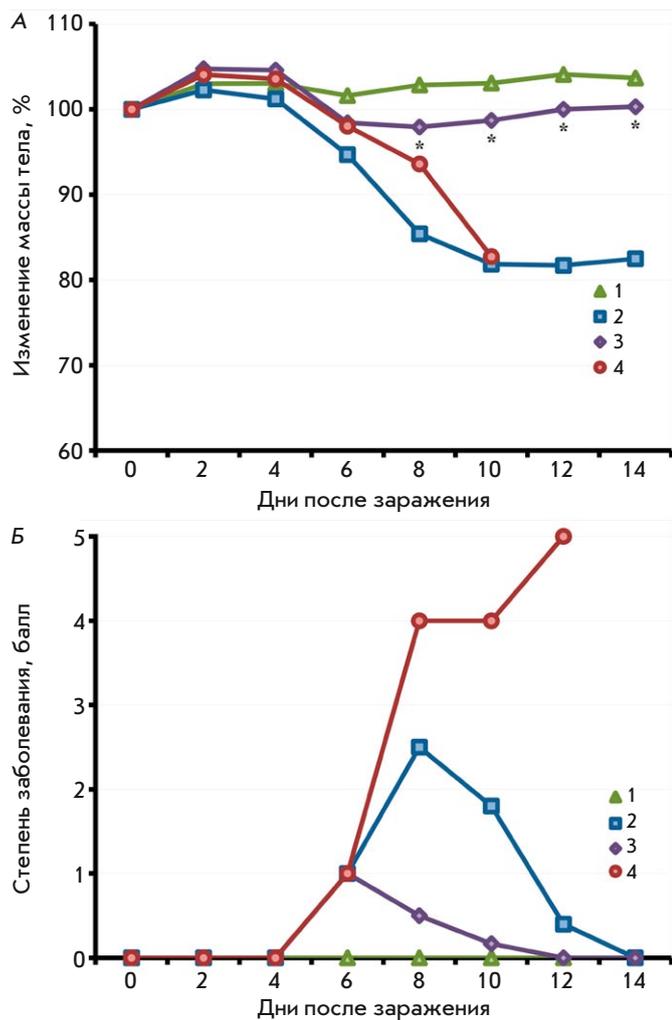


**Рис. 8.** Динамика гибели мышей, вакцинированных LIVP (2) или LIVPΔati (3), после и/н заражения ECTV-K1 на 60-й день после вакцинации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей как не инфицированных ECTV-K1 (1), так и зараженных этим вирусом (4)

При заражении иммунизированных мышей вирусом ECTV различия между группами животных были более выраженными. Все контрольные мыши погибли через 12 дней после заражения ECTV; в группе, вакцинированной LIVP, выжило 83% животных, а в группе LIVPΔati – все животные (рис. 8). При этом в группе LIVPΔati проявления инфекции были очень слабо выраженными и практически не сопровождалось снижением массы тела (рис. 9). В то же время у мышей, вакцинированных LIVP, клинические признаки инфекционного процесса наблюдали на 6–12 дни после заражения ECTV. Выявлено значительное снижение массы животных и достоверные отличия по этому показателю от группы мышей, вакцинированных LIVPΔati, на 8–14 дни после заражения ECTV (рис. 9А).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее активно из невирионных белков VACV синтезируется укороченная форма белка АТ1 – белок 94 кДа, который не формирует внутриклеточные АТ1, но является мажорным иммуногеном при инфекции/иммунизации VACV человека или животных [11]. При этом антитела против этого белка не обладают вируснейтрализующей активностью. Влияние продукции данного неструктурного мажорного иммуногенного белка на проявление патогенности и иммуногенности VACV до сих пор не исследовано. Поэтому цель данной работы со-



**Рис. 9.** Динамика изменения массы тела (А) и клинических проявлений инфекции (Б) после и/н заражения ECTV-K1 мышей, вакцинированных L1VP (2) или L1VPΔati (3), на 60-й день после иммунизации. Приведены данные для групп из 6 животных. В качестве контрольных использованы группы невакцинированных мышей, не инфицированных ECTV-K1 (1) и зараженных этим вирусом (4). Звездочкой обозначены временные точки, в которых среднее значение массы тела в процентах от первоначального веса в группе иммунизированных L1VPΔati мышей достоверно отличается от значения в группе мышей, иммунизированных L1VP. Сравнение проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок

стояла в получении VACV с направленно удаленным геном *ati* и изучении свойств этого вируса на мышах.

В качестве объекта исследования использовали ранее охарактеризованный клоновый вариант L1VP VACV [17]. У L1VP ген *ati* (A26L у CPXV-GRI) распадается на три короткие потенциальные открытые

рамки считывания, из которых ген A29L кодирует мажорный иммуногенный белок A29 (94 кДа) (рис. 1).

Плазмида интеграции/делеции pΔati, а затем штамм L1VPΔati получены согласно схеме, представленной на рис. 2.

На первом этапе сравнили патогенность штаммов L1VP и L1VPΔati. Чувствительность мышей к ортопоксвирусам существенно зависит от их возраста [2], поэтому использовали молодых (возраст 3 недели) мышей линии BALB/c. Животных (по 10 особей в группе) и/н инфицировали вирусами, поскольку этот способ имитирует естественный путь заражения и обуславливает наибольшую чувствительность мышей к данной инфекции [22, 23].

Оказалось, что при и/н заражении молодых мышей в дозе  $10^7$  БОЕ штамм L1VP индуцировал развитие клинически выраженной инфекции (рис. 3) с гибелью 50% животных (рис. 4), тогда как штамм L1VPΔati вызывал менее выраженные признаки заболевания (рис. 3) и вызывал гибель 20% мышей (рис. 4). Таким образом, удаление гена *ati* у VACV L1VP привело к его аттенуации по сравнению с исходным вариантом вируса. Это согласуется с ранее сформулированным предположением, что сниженная патогенность некоторых природных штаммов VACV может быть обусловлена спонтанной делецией у них гена *ati* [13], хотя это и не доказано экспериментально.

Иммуногенность VACV L1VP и L1VPΔati изучали на взрослых мышах (возраст 6–7 недель) со сформированной иммунной системой. Развитие VACV-специфичного клеточного иммунного ответа на в/к вакцинацию мышей оценивали с помощью метода ELISpot по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами. На 7 дни уже наблюдался высокий уровень клеточного иммунного ответа, пик которого приходился на 14 дни со значительным снижением к 21 дни (рис. 5). При этом делеция гена *ati* у VACV L1VP не сказывалась на динамике развития и уровне клеточного иммунного ответа мышей на вакцинацию.

Известно, что наибольший вклад в развитие адаптивного иммунного ответа на VACV-вакцинацию вносит антительный ответ [3, 24], поэтому с помощью ИФА оценили динамику синтеза IgM и IgG, специфичных к вирионным белкам VACV, после в/к вакцинации мышей штаммами L1VP или L1VPΔati в дозах  $10^5$  БОЕ.

На 7 дни выявлен относительно высокий уровень IgM, который достигал максимума на 14 дни, а затем снижался. По динамике и уровню продукции вирионспецифичных IgM оба штамма VACV не различались (рис. 6А).

Активный синтез VACV-специфичных IgG наблюдали, начиная с 14 дни, с последующим увеличением уровня антител на 21–28 дни. По среднегеометрическим значениям обратных титров IgG на 28, 42 и 56 дни LIVPΔati заметно превосходил LIVP, при этом на 42 и 56 дни – с высокой статистической значимостью (рис. 6Б). Одной из вероятных причин этого может быть тот факт, что отсутствие синтеза мажорного позднего неструктурного белка A29 у LIVPΔati «не отвлекает» иммунную систему на синтез IgG к этому белку и обуславливает больший синтез антител, специфичных к вирионным белкам VACV.

В ряде работ показано, что наибольший вклад в защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции вносит гуморальный иммунный ответ [3, 6, 24, 25], поэтому важно было оценить протективный иммунитет, развившийся в ответ на в/к вакцинацию мышшей VACV LIVP и LIVPΔati. С этой целью на 60-й дни по 6 мышшей каждой группы и/н инфицировали летальными дозами CPXV GRI-90 или ECTV K-1. Оказалось, что в обоих случаях защитный эффект вакцинации LIVPΔati был выше, чем вакцинации родительским штаммом LIVP (рис. 7–9), что подтверждает ранее сделанные заключения о ключевой

роли антительного ответа в формировании защиты организма от ортопоксвирусной инфекции.

Таким образом, можно заключить, что делеция участка генома VACV LIVP в районе гена *ati* привела к снижению патогенных свойств вируса LIVPΔati при и/н инфицировании мышшей линии BALB/c и увеличению продукции вирионспецифичных IgG в ответ на в/к вакцинацию мышшей данным мутантным вирусом, что привело (по сравнению с родительским LIVP) к формированию более высокого уровня защиты мышшей от последующей летальной инфекции гетерологичными ортопоксвирусами CPXV и ECTV. Поэтому штамм LIVPΔati можно рассматривать в качестве перспективного вектора для создания поливалентных рекомбинантных вакцин против различных инфекционных заболеваний. ●

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

*Авторы выражают благодарность И.В. Колосовой за препараты VACV LIVP, Д.Н. Кисакову и С.А. Пьянкову – за статистическую обработку результатов экспериментов.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 1988. 1460 p.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York, USA: Springer, 2005. 425 p.
- Moss B. // Immunol. Rev. 2011. V. 239. P. 8–26.
- Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2017. V. 9. P. 4–12.
- Payne L.G. // J. Gen. Virol. 1980. V. 50. P. 89–100.
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // Acta Naturae. 2020. V. 12. P. 33–41.
- Shedlovsky T., Smadel J.E. // J. Exp. Med. 1942. V. 75. № 2. P. 165–178.
- Funahashi S., Sato T., Shida H. // J. Gen. Virol. 1988. V. 69 (Pt 1). P. 35–47.
- de Carlos A., Paez E. // Virology. 1991. V. 185. № 2. P. 768–778.
- Katsafanas G.C., Moss B. // J. Virol. 2020. V. 94. № 4. e01671–19.
- Jones-Trower A., Garcia A., Meseda C.A., He Y., Weiss C., Kumar A., Weir J.P., Merchinsky M. // Virology. 2005. V. 343. № 1. P. 128–140.
- Moutafsi M., Tschärke D.C., Vaughan K., Koelle D.M., Stern L., Calvo-Calle M., Ennis F., Terajima M., Sutter G., Crotty S., et al. // Future Microbiol. 2010. V. 5. № 2. P. 221–239.
- Marques J.T., Trindade G.D., Da Fonseca F.G., Dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. // Virus Genes. 2001. V. 23. № 3. P. 291–301.
- Leite J.A., Drumond B.P., de Souza Trindade G., Bonjardim C.A., Ferreira P.C.P., Kroon E.G. // Virus Genes. 2007. V. 35. № 3. P. 531–539.
- Leite J.A., da Fonseca F.G., de Souza Trindade G., Abrahao J.S., Arantes R.M., de Almeida-Leite C.M., dos Santos J.R., Guedes M.I., Ribeiro B.M., Bonjardim C.A., et al. // Arch. Virol. 2011. V. 156. № 4. P. 617–628.
- Kastenmayer R.J., Maruri-Avidal L., Americo J.L., Earl P.L., Weisberg A.S., Moss B. // Virology. 2014. V. 452–453. P. 59–66.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 113–121.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Bauer T.V., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulichev L.E., Yurganova I.A., Odnoshevskiy D.A., Kolosova I.V., Pyankov S.A., et al. // Acta Naturae. 2020. V. 12. P. 120–132.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Starostina E.V., Titova K.A., Pyankov S.A., Shchelkunova G.A., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Orlova L.A., et al. // Viruses. 2022. V. 14. P. 1453.
- Oseroff C., Peters B., Pasquetto V., Moutafsi M., Sidney J., Panchanathan V., Tschärke D.C., Maillere B., Grey H., Sette A. // J. Immunol. 2008. V. 180. P. 7193–7202.
- Russell T.A., Tschärke D.C. // Immunol. Cell Biol. 2014. V. 92. P. 466–469.
- 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.
- 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. № 8. P. 795.
- 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., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 9458–9463.
- Lambert P.H., Laurent P.E. // Vaccine. 2008. V. 26. P. 3197–3208.