



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183>

© ЛЕСНОВА Е.И., МАСАЛОВА О.В., ПЕРМЯКОВА К.Ю., ДЕМИДОВА Н.А., ВАЛУЕВ-ЭЛЛИСТОН В.Т., ИВАНОВ А.В., КУЩ А.А., 2023

Адьювантное действие агониста NOD1 и NOD2 полимурамила различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С (Flaviviridae: *Нерасивирус*) и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом

Леснова Е.И.¹, Масалова О.В.¹, Пермякова К.Ю.^{1,2}, Демидова Н.А.¹, Валуйев-Эллистон В.Т.³, Иванов А.В.³, Кущ А.А.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия

Введение. Гепатит С – заболевание печени с высокой хронизацией, являющееся причиной цирроза и гепатокарциномы. Главное препятствие для контроля за гепатитом С – отсутствие вакцин.

Цель работы – сравнение иммуногенной активности неструктурных рекомбинантных белков NS3, NS4 и NS5B вируса гепатита С (ВГС) как компонентов субъединичной кандидатной вакцины и анализ адьювантных свойств двух отечественных коммерческих препаратов: полимурамила и пирогенала.

Материалы и методы. Мышей линий BALB/c, DBA/2J и C57BL/6 иммунизировали трижды с интервалом 2 недели белками NS3, NS4 и NS5B без адьювантов или с полимурамилом (агонист рецепторов иммунного ответа NOD1 и NOD2) и пирогеналом (липополисахарид, агонист TLR-4). Гуморальный ответ определяли по активности антител в ИФА, клеточный – по индексу стимуляции пролиферации лимфоцитов и способности продуцировать IFN- γ при антигенспецифической стимуляции *in vitro*.

Результаты. Рекомбинантные белки проявляли различную иммуногенность. NS4 индуцировал антитела эффективнее, чем NS3 и NS5B. Значительные различия обнаружены в иммунном ответе мышей трех инбредных линий: уровень секреции IFN- γ у мышей BALB/c и DBA/2J на белок NS5B был в 30 раз выше, чем у мышей C57BL/6. Индукция антител, напротив, у мышей BALB/c была ниже, чем у C57BL/6 и у DBA/2J. Полимурамил не увеличивал гуморальный ответ на NS5B и усиливал клеточный ответ только у мышей C57BL/6. Сочетанное применение полимурамила с пирогеналом значительно увеличивало как гуморальный, так и клеточный ответ мышей на все рекомбинантные белки ВГС.

Выводы. Различные иммуногенные свойства и разные функции неструктурных белков ВГС в репликации вируса свидетельствуют о целесообразности их сочетанного включения в состав субъединичных вакцин. Впервые установлено, что иммунизация белками ВГС с комплексным адьювантом (полимурамил + пирогенал) оказывает синергетический эффект, значительно превышая действие каждого из них по отдельности.

Ключевые слова: гепатит С; вирус гепатита С; неструктурные белки вируса гепатита С; мыши BALB/c, DBA/2J и C57BL/6; гуморальный и клеточный иммунные ответы; полимурамил; пирогенал; синергетическое адьювантное действие

Для цитирования: Леснова Е.И., Масалова О.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуйев-Эллистон В.Т., Иванов А.В., Кущ А.А. Адьювантное действие агониста NOD1 и NOD2 полимурамила различается при иммунизации мышей разных инбредных линий неструктурными белками вируса гепатита С (Flaviviridae: *Нерасивирус*) и синергетически усиливается в комбинации с агонистом TLR4 пирогеналом. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(4): 315–326. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183> EDN: <https://elibrary.ru/pvluew>

Для корреспонденции: Леснова Екатерина Ивановна, научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Участие авторов: Леснова Е.И. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Масалова О.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Пермякова К.Ю. – проведение экспериментов; Демидова Н.А. – проведение экспериментов; Валуйев-Эллистон В.Т. – проведение экспериментов; Иванов А.В. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Кущ А.А. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July

23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Поступила 28.06.2023
Принята в печать 16.08.2023
Опубликована 31.08.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183>

The adjuvant effect of polymuramil, a NOD1 and NOD2 agonist, differs when immunizing mice of different inbred lines with nonstructural hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus*) proteins and is synergistically enhanced in combination with pyrogenalum, a TLR4 agonist

Ekaterina I. Lesnova¹, Olga V. Masalova¹, Kristina Yu. Permyakova^{1,2}, Natalia A. Demidova¹, Vladimir T. Valuev-Elliston³, Alexander V. Ivanov³, Alla A. Kushch¹

¹Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russia;

³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

Introduction. Hepatitis C is a liver disease with high chronicity, the cause of cirrhosis and hepatocarcinoma. The main obstacle to controlling hepatitis C is the lack of vaccines.

The aim of the work was to compare the immunogenic activity of nonstructural recombinant proteins NS3, NS4 and NS5B of hepatitis C virus (HCV) as components of a subunit candidate vaccine and to analyze the adjuvant properties of two available commercial drugs, polymuramil and pyrogenalum.

Materials and methods. BALB/c, DBA/2J and C57BL/6 mice were immunized with nonstructural proteins without adjuvants or with polymuramil (NOD1 and NOD2 agonist) and pyrogenalum (TLR-4 agonist). The activity of antibodies was determined in ELISA, the cellular response – by antigen-specific lymphocyte proliferation and by production of IFN- γ *in vitro*.

Results. Recombinant proteins showed different immunogenicity. NS4 induced antibodies more efficiently than NS3 and NS5B. Significant differences were found in the immune response of three inbred lines mice: the level of IFN- γ in BALB/c and DBA/2J mice induced by NS5B protein was 30 times higher than in C57BL/6 mice. In contrast, the induction of antibodies in BALB/c mice was lower than in C57BL/6 and DBA/2J. Polymuramil did not increase the humoral response to NS5B and enhanced the cellular response only in C57BL/6 mice. The combined use of polymuramil with pyrogenalum significantly increased both the humoral and cellular response of mice to all recombinant HCV proteins.

Conclusion. Different immunogenic properties and different functions of recombinant non-structural HCV proteins indicate the feasibility of their combined inclusion in subunit vaccines. It was established for the first time that immunization with HCV proteins with a complex adjuvant (polymuramil + pyrogenalum) has a synergistic effect, significantly exceeding the effect of each of them separately.

Keywords: hepatitis C; hepatitis C virus; non-structural hepatitis C virus proteins; BALB/c; DBA/2J and C57BL/6 mice; humoral and cellular immune responses; polymuramil; pyrogenalum; synergistic adjuvant effect

For citation: Lesnova E.I., Masalova O.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Ivanov A.V., Kushch A.A. The adjuvant effect of polymuramil, a NOD1 and NOD2 agonist, differs when immunizing mice of different inbred lines with nonstructural hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus*) proteins and is synergistically enhanced when administered in combination with pyrogenalum, a TLR4 agonist. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(4): 315–326. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-183> EDN: <https://elibrary.ru/pvluew>

For correspondence: Ekaterina I. Lesnova, Research associate of the Laboratory of Cell Engineering, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation; 123098, Moscow, Russia. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Information about the authors:

Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>

Permyakova K.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3579-4416>

Demidova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Valuev-Elliston V.T., <https://orcid.org/0000-0003-0365-570X>

Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>

Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Contribution: Lesnova E.I. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Masalova O.V. – the study concept design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Permyakova K.Yu. – conducting of the experiments; Demidova N.A. – conducting of the experiments; Valuev-Elliston V.T. – conducting of the experiments; Ivanov A.V. – conducting of the experiments, review and editing; Kushch A.A. – the study concept design, preparing of the text, review and editing.

Funding. The research was funded by the state budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology (Protocol No 10 dated June 7, 2021).

Received 28 June 2023
Accepted 16 August 2023
Published 31 August 2023

Введение

Гепатит С, вызываемый вирусом гепатита С (ВГС), признан одной из главных причин хронических заболеваний печени, включая терминальные стадии – цирроз и гепатокарциному. До 80% случаев острого гепатита С переходят в хроническую форму, вызывая хронический гепатит С [1, 2]. Около 10 лет назад были разработаны препараты прямого противовирусного действия (ПППД), блокирующие репликацию ВГС; их применение позволило добиться устойчивого исчезновения вируса из периферической крови более чем у 90% пациентов. Однако со временем появились факты, показывающие, что проблема гепатита С еще не решена. Так, ПППД крайне дороги, что делает лечение малодоступным. Недостаточно изучены отдаленные последствия, так как у ряда пациентов ВГС определяется в печени и в клетках крови после исчезновения вирусной РНК из плазмы периферической крови [3]. После лечения ПППД сохраняются изменения в эпигенетическом статусе и сигнальных путях, вызванные ВГС [4]. Отмечено появление резистентности к ПППД [5]. Уже известно о некоторых побочных эффектах лечения этими препаратами, таких как мутации ВГС, реактивация других вирусов [6]. В связи с этим исследования по созданию профилактических и терапевтических вакцин против гепатита С, начатые со времени открытия ВГС в 1989 г. и приостановленные после создания ПППД, в последние годы интенсифицировались. В настоящее время полагают, что отсутствие вакцин – главное препятствие для контроля за гепатитом С [7].

Для создания вакцин против гепатита С используют разные подходы, включающие разработку генно-инженерных вирусспецифических компонентов. Рекомбинантные вирусные белки как компоненты субъединичных вакцин более безопасны по сравнению с ослабленными или полностью инактивированными цельновирионными вакцинами, однако они характеризуются более слабой иммуногенностью и требуют усиления эффективности за счет адъювантов. Распространенные лицензированные адъюванты на основе солей алюминия или водно-масляных эмульсий в основном приводят к индукции иммунитета по Th2-типу, и в итоге иммунитет направлен преимущественно на усиление образования антител [8]. Однако при большинстве вирусных инфекций критичен не толь-

ко гуморальный, но и клеточный иммунный ответ. Для гепатита С показано, что эффективная вакцина, помимо нейтрализующих антител к поверхностным белкам E1 и E2, должна стимулировать мощный, мультиэпитопный и функциональный иммунный ответ Th1-направленности, основными мишенями для которого служат относительно консервативные неструктурные белки NS3, NS4A/B, NS5A и NS5B ВГС [9]. Антигенные и иммуногенные свойства индивидуальных неструктурных белков ВГС недостаточно изучены, в то же время такие данные необходимы для разработки специфических компонентов вакцины.

В активации иммунного ответа ключевую роль играют рецепторы распознавания образов (pattern-recognition receptors – PRRs), которые обнаруживают молекулярные структуры, ассоциированные с патогенами (PAMPs). К PRRs принадлежат семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) и NOD-подобных рецепторов (NLR). В отличие от TLR – трансмембранных рецепторов, связанных с плазматическими мембранами, NLR являются внутриклеточными PRR, что позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты вирусов на разных стадиях их жизненного цикла [10]. TLR4 взаимодействует с липополисахаридами (ЛПС) клеточной стенки бактерий и индуцирует сильный иммунный ответ на введение антигенов различной природы [11]. В России разрешен для применения в качестве лекарственного препарата лиганд TLR4 Пирогенал (ПГ) производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России – ЛПС, выделенный из клеток *Salmonella typhi*. NLR распознают в цитоплазме инфицированной клетки пептидогликаны бактерий, а также вирусные РНК, в том числе геномную РНК ВГС [12]. Иммунологическая активность пептидогликанов определяется минимальной структурной единицей – мурамил дипептидом (МДП). Помимо МДП известны и другие агонисты NLR, в том числе различные синтетические и комплексные производные МДП, направленные на нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации, содержащий либо белок 1 (NOD1), либо белок 2 (NOD2). Один из новых препаратов – Полимурамил (ПМ) производства ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия), он содержит три фрагмента пептидогликана клеточной стенки бактерий *S. typhi*, что обеспечивает его преимущество перед другими агонистами NLR за счет взаимодействия с двумя

рецепторами – NOD1 и NOD2 [13]. На разных моделях *in vitro* и *in vivo* показано, что взаимодействие между рецепторами NOD1 и TLR4 или NOD2 и TLR4 способно вызвать синергетическую активацию иммунного ответа [14]. Накопленные данные позволяют рассматривать PRRs как потенциальные терапевтические мишени при вирусных инфекциях, а также в качестве адъювантов к вакцинам [15].

Действие комбинации агонистов рецепторов TLR4 и NOD1 + NOD2 на иммунизацию индивидуальными рекомбинантными неструктурными белками ВГС не изучено. В то же время перечисленные выше данные позволяют предположить, что взаимодействие рецепторов в индукции иммунных процессов может привести к усилению иммунного ответа на антигены ВГС *in vivo*.

Цель работы – определить способность доступных фармакологических препаратов ПМ и ПГ усиливать гуморальный и клеточный ответы индивидуально и при сочетанном применении для иммунизации мышей разных инбредных линий рекомбинантными белками NS3, NS4A/B и NS5B ВГС для оценки возможности их применения в качестве комплексного адъюванта к вакцине против гепатита С.

Материалы и методы

Рекомбинантные белки NS3 (1356–1459 а.о.), NS4 (1677–1754 а.о.) и NS5B (2420–2990 а.о.), генотип 1b ВГС, использовали как иммуногены для иммунизации мышей, как антигены для стимуляции Т-клеточных реакций *in vitro*, а также как сорбенты при иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки продукции антител. Белки были очищены методом аффинной хроматографии, их свойства описаны ранее [16–18]. Концентрацию белка определяли с использованием реактива Брэдфорда (Merck Sigma-Aldrich, США).

Препараты. В качестве потенциальных адъювантов использовали 2 препарата со свойствами иммуномодуляторов: ПМ, представляющий собой высокоочищенную смесь трех активных компонентов, выделенных из пептидогликана клеточной стенки грамотрицательных бактерий *S. typhi* (200 мкг/0,5 мл, серия 011-0219); ПГ – ЛПС, выделенный из бактерий *S. typhi* (100 мкг/мл, серия 164). Препараты были приобретены в аптечной сети.

Мыши. Для экспериментов *in vivo* использовали самок инбредных мышей трех линий – BALB/c (H-2d), DBA/2J (H-2d) и C57BL/6 (H-2b) (возраст 6–8 недель, средняя масса 20±3 г), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая».

Иммунизация мышей. Проводили несколько серий экспериментов по испытанию иммуностимулирующей активности ПМ и ПГ на модели рекомбинантных неструктурных белков ВГС NS3, NS4 и NS5B. Белки в дозе 4 мкг/мышь вводили подкожно в корень хвоста трехкратно с интервалом 2 недели без адъювантов в физиологическом растворе (ф/р) или в смеси с ПМ и/или ПГ, как описано в разделе «Результаты». Контрольным группам мышей вводили ф/р в те же сроки. Оценка иммунного ответа проводили через 9–13 суток после последней иммунизации.

Оценка иммунного ответа. Гуморальный ответ. Активность взаимодействия антител к белкам ВГС в сыворотках крови мышей с антигенами ВГС определяли методом непрямого ИФА. 96-луночные планшеты сенсibilizировали рекомбинантными белками в фосфатно-солевом буфере в концентрации 1 мкг/мл. В качестве вторичных антител использовали антитела к иммуноглобулинам мыши изотипов IgG1 и IgG2a, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин (Sigma, США); оптическую плотность измеряли при 450 нм. За титр сывороток в ИФА принимали предельное разведение сыворотки крови, при котором значение оптической плотности при A_{450} в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

Т-клеточные реакции на специфический антиген *in vitro* оценивали в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) и по секреции ими цитокина IFN- γ . Для получения лимфоцитов селезенки диспергировали, клеточные суспензии процеживали через ситечки с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell strainers), дважды отмывали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Лимфоциты помещали в 96-луночные культуральные панели по 5×10^6 клеток в лунку в среде RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина. К клеткам добавляли стимуляторы – соответствующие рекомбинантные белки NS3, NS4 или NS5B в конечных концентрациях 1 мкг/мл и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 5 суток. В качестве отрицательных контролей использовали, во-первых, клетки селезенки неиммунных мышей, стимулированные теми же антигенами, во-вторых, нестимулированные клетки селезенки иммунизированных мышей. Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП) – отношения среднего количества лимфобластов в присутствии стимуляторов к среднему количеству лимфобластов в отсутствие стимуляторов (лунки со средой).

Измерение концентрации цитокинов в культуральных жидкостях, полученных после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью наборов для определения IFN- γ (Mouse IFN- γ ELISA development kit (HRP), Mabtech, Швеция) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для IFN- γ составлял 2 пг/мл.

Для статистической обработки результатов использовали программы Statistica 8 и GraphPad Prism 8. Данные представляли как среднее (или среднее геометрическое для титров антител) ± стандартное отклонение (SD). Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-test (критерий Стьюдента), непараметрических – U-test (критерий Манна–Уитни). Различия показателей считали

статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки сочетанного действия двух соединений на усиление иммунного ответа при введении животным рекомбинантных белков ВГС вычисляли индексы синергизма (ИС) по формуле:

$$ИС = \frac{\text{Параметр (ПМ, ПГ)}}{[\text{Параметр (ПМ)} + \text{Параметр (ПГ)}]}$$

где Параметр (ПМ, ПГ) – параметр иммунного ответа при иммунизации сочетанием ПМ и ПГ, Параметр (ПМ) и Параметр (ПГ) – параметры иммунного ответа при иммунизации ПМ и ПГ отдельно. Взаимодействие соединений ПМ и ПГ считали синергетическим при $ИС > 1$ с достоверностью $p < 0,05$ в t-тесте Стьюдента.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Результаты

1. Действие полимурамила на иммунный ответ мышей разных инбредных линий при иммунизации белком NS5B ВГС

Для оценки адъювантных свойств ПМ при иммунизации рекомбинантным белком NS5B использовали 3 линии мышей – BALB/c, DBA/2J и C57BL/6. Белок вводили мышам в ф/р и в смеси с ПМ в концентрации 20 мкг/мышь трехкратно с интервалом 2 недели. Оптимальная концентрация ПМ была определена в предварительных экспериментах путем сравнительного анализа иммунного ответа мышей на действия ПМ в концентрациях 4, 20 и 100 мкг/мышь. Через 9 суток после последней инъекции учитывали иммунный ответ индивидуально для каждой мыши

(8 животных в каждой группе). Результаты представлены в **таблице 1**.

Титры антител к белку NS5B изотипа IgG1 в группе мышей DBA/2J и C57BL/6, иммунизированных без адъювантов, достигали $1 : 10^4$ и не увеличивались при добавлении к антигену ПМ; у мышей BALB/c активность антител была в 50–100 раз меньше ($p < 0,05$, табл. 1) и также не изменялась при добавлении ПМ. Концентрация антител IgG2a была значительно ниже по сравнению с IgG1 (около $1 : 200$) у мышей всех исследованных линий и не изменялась при применении ПМ. Наиболее активная пролиферация лимфоцитов в ответ на стимуляцию NS5B показана у мышей линии BALB/c, однако статистически достоверных различий по сравнению с другими линиями не обнаружено. Иммунизация NS5B в смеси с ПМ пятикратно увеличивала ИСП у мышей линии C57BL/6 ($p < 0,05$), но не влияла на пролиферацию в других группах. Выработка IFN- γ в ответ на стимуляцию лимфоцитов NS5B была в 20–50 раз выше у мышей BALB/c и DBA/2J, иммунизированных белком без адъюванта, по сравнению с C57BL/6 ($p < 0,05$); использование ПМ в этой группе в 20 раз увеличивало секрецию цитокина. Таким образом, активность антител IgG1 в ответ на белок NS5B без адъюванта у мышей BALB/c была значительно ниже, тогда как секреция IFN- γ – значительно выше, чем у мышей C57BL/6. Адъювантные свойства ПМ проявлялись только у мышей C57BL/6, при этом значительно повышался только клеточный иммунный ответ. Дальнейшие эксперименты проводили с использованием мышей этой линии.

В контрольных группах мышей иммунный ответ на NS5B отсутствовал, все показатели были на уровне фоновых значений (результаты не показаны).

2. Влияние пирогенала на иммунный ответ мышей C57Bl/6 при иммунизации белком NS5B ВГС

Иммуностимулирующую способность ПГ анализировали при иммунизации мышей линии C57BL/6 бел-

Таблица 1. Иммунный ответ мышей разных линий на иммунизацию рекомбинантным белком NS5B ВГС с полимурамилом

Table 1. Immune response of mice of different lines to immunization with recombinant HCV NS5B protein with polymuramil

Показатель Parameter		Мыши линии BALB/c BALB/c mice		Мыши линии DBA/2J DBA/2J mice		Мыши линии C57BL/6 C57BL/6 mice	
		ф/р saline	ПМ PM	ф/р saline	ПМ PM	ф/р saline	ПМ PM
Титр антител к NS5B Titer of antibodies to NS5B	IgG1	132 ± 80*	200 ± 66	10125 ± 3200*	9040 ± 2560	8226 ± 1850*	9979 ± 2340
	IgG2a	229 ± 78	174 ± 73	250 ± 100	720 ± 400	200 ± 56	150 ± 78
Пролиферация лимфоцитов (ИСП) Lymphocyte proliferation (SI)		3,0 ± 0,7	2,6 ± 0,5	1,8 ± 0,4	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,4**	10,1 ± 2,7**
Секреция IFN- γ (пг/мл) IFN- γ secretion (pg/mL)		1580 ± 223*	1700 ± 294	725 ± 120*	920 ± 185	34 ± 15*, **	781 ± 154**

Примечание. ф/р – иммунизация NS5B без адъюванта; ПМ – иммунизация NS5B в смеси с полимурамилом в дозе 20 мкг/мышь; ИСП – индекс стимуляции пролиферации; * $p < 0,05$ между линиями мышей; ** $p < 0,05$ между показателями в группах, иммунизированных с ф/р и с ПМ.

Note. Saline – immunization with NS5B without adjuvant; PM – immunization with NS5B in a mixture with polymuramil at a dose of 20 μ g/mouse; SI – stimulation index; * $p < 0.05$ between mouse lines; ** $p < 0.05$ between parameters in groups immunized with saline and with PM.

ком NS5B. Белок вводили либо без адьюванта (ф/р), либо с добавлением ПГ в концентрациях 1, 5 или 15 мкг/мышь (8 животных в каждой группе). Сравнивали титры антител к NS5B и продукцию IFN-γ в ответ на антигенспецифическую стимуляцию (рис. 1).

Установлено, что ПГ повышал выработку антител изотипа IgG1 к NS5B, максимальное увеличение антител было зарегистрировано при введении 15 мкг/мышь, титр антител увеличивался в 12 раз (рис. 1 а). Аналогичная картина наблюдалась при оценке результатов продукции IFN-γ спленоцитами: ПГ статистически значимо индуцировал секрецию IFN-γ при всех использованных дозах, максимальная концентрация цитокина наблюдалась при дозе 15 мкг/мышь – усиление в 150 раз (рис. 1 б).

На основании полученных данных для использования ПГ в качестве адьюванта при иммунизации животных рекомбинантными белками ВГС была выбрана доза 15 мкг/мышь, или 0,75 мг/кг массы тела.

3. Иммунный ответ мышей на рекомбинантные белки NS3 и NS4 ВГС при иммунизации с полимурамилом в сочетании с пирогеналом

Представлялось важным определить, обладают ли ПМ и ПГ иммуностимулирующими свойствами при введении мышам других рекомбинантных белков ВГС. Мышей C57BL/6 иммунизировали трехкратно подкожно белками NS3 и NS4 ВГС (4 мкг/мышь) в смеси с ПМ (20 мкг/мышь), ПГ (15 мкг/мышь) и их сочетанием. Результаты сравнивали с показателями в группе, которой белки вводили в ф/р.

При иммунизации мышей белком NS3 обращает на себя внимание, что он индуцирует в 20 раз большие титры антител изотипа IgG1 по сравнению с белком NS5B при иммунизации без адьювантов (около 1 : 1,6 × 10⁵, p < 0,05, табл. 1 и рис. 2 а).

ПМ и в большей степени ПГ увеличивали активность антител IgG1 (p < 0,05). Антитела к NS3 изотипа IgG2a характеризовались меньшими титрами по сравнению с IgG1, применение ПГ их увеличивало (p < 0,05, рис. 2 б). На параметры клеточного ответа ни ПМ, ни ПГ не влияли (рис. 2 в, г). Сочетанное применение ПМ и ПГ статистически значимо повышало все исследованные показатели гуморального и клеточного иммунного ответа на белок NS3 (p < 0,05, рис. 2 а–г).

На модели белка NS4 показано, что титры антител изотипа IgG1 были в 3 раза выше по сравнению с NS3 и в 50 раз – с NS5B (1 : 4,5 × 10⁵, p < 0,05, табл. 1, рис. 2 а и рис. 3 а). ПМ не влиял на показатели иммунного ответа, ПГ повышал клеточный ответ (рис. 3 в, г). Иммунизация NS4 в смеси с ПМ и ПГ статистически значимо увеличивала титры антител изотипа IgG2a, пролиферацию лимфоцитов и секрецию ими IFN-γ в ответ на антигенспецифическую стимуляцию *in vitro* (рис. 3 б–г).

Для оценки сочетанного действия двух соединений на иммунный ответ при введении животным рекомбинантных белков ВГС вычисляли ИС. Анализ полученных данных, представленных в таблице 2, показывает, что усиление иммунного ответа на рекомбинантные белки ВГС в большинстве случаев является результатом синергизма ПМ и ПГ: эффект от их комбинированного действия значительно превышает эффект каждого из них по отдельности.

Обсуждение

В настоящей работе для изучения адьювантных свойств ПМ и ПГ в качестве антигенов использовали неструктурные белки ВГС NS3, NS4A/B и NS5B. Анализ роли этих белков в жизненном цикле ВГС показал, что неструктурные белки формируют репликативный

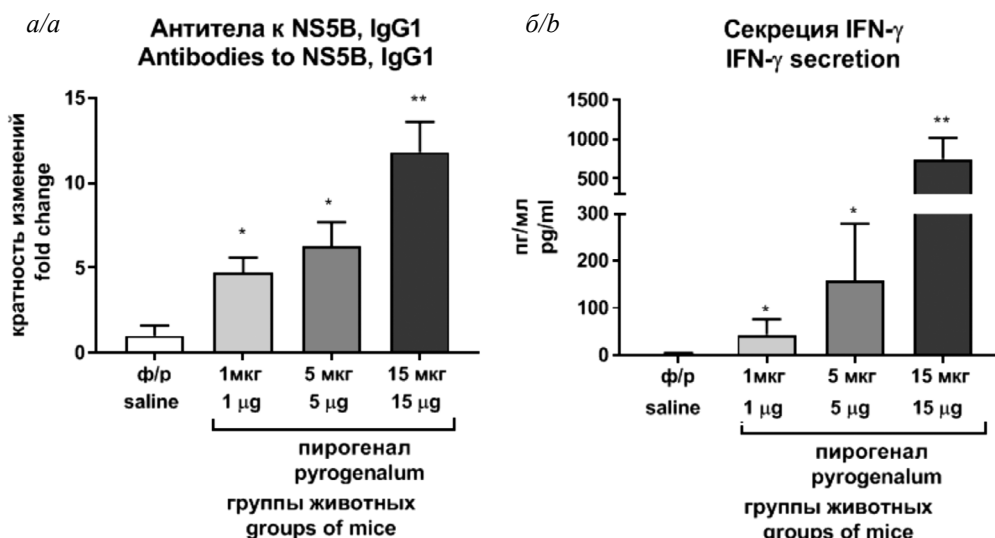


Рис. 1. Гуморальный (а) и клеточный (б) ответ мышей C57BL/6 на рекомбинантный белок NS5B ВГС, введенный с пирогеналом.

*p < 0,05 по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; **p < 0,05 по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 1. Humoral (a) and cellular (b) response of C57BL/6 mice to recombinant HCV NS5B protein injected with pyrogenal.

*p < 0.05 compared to the group to which NS5B was administered with saline solution (saline); **p < 0.05 compared to other groups of mice.

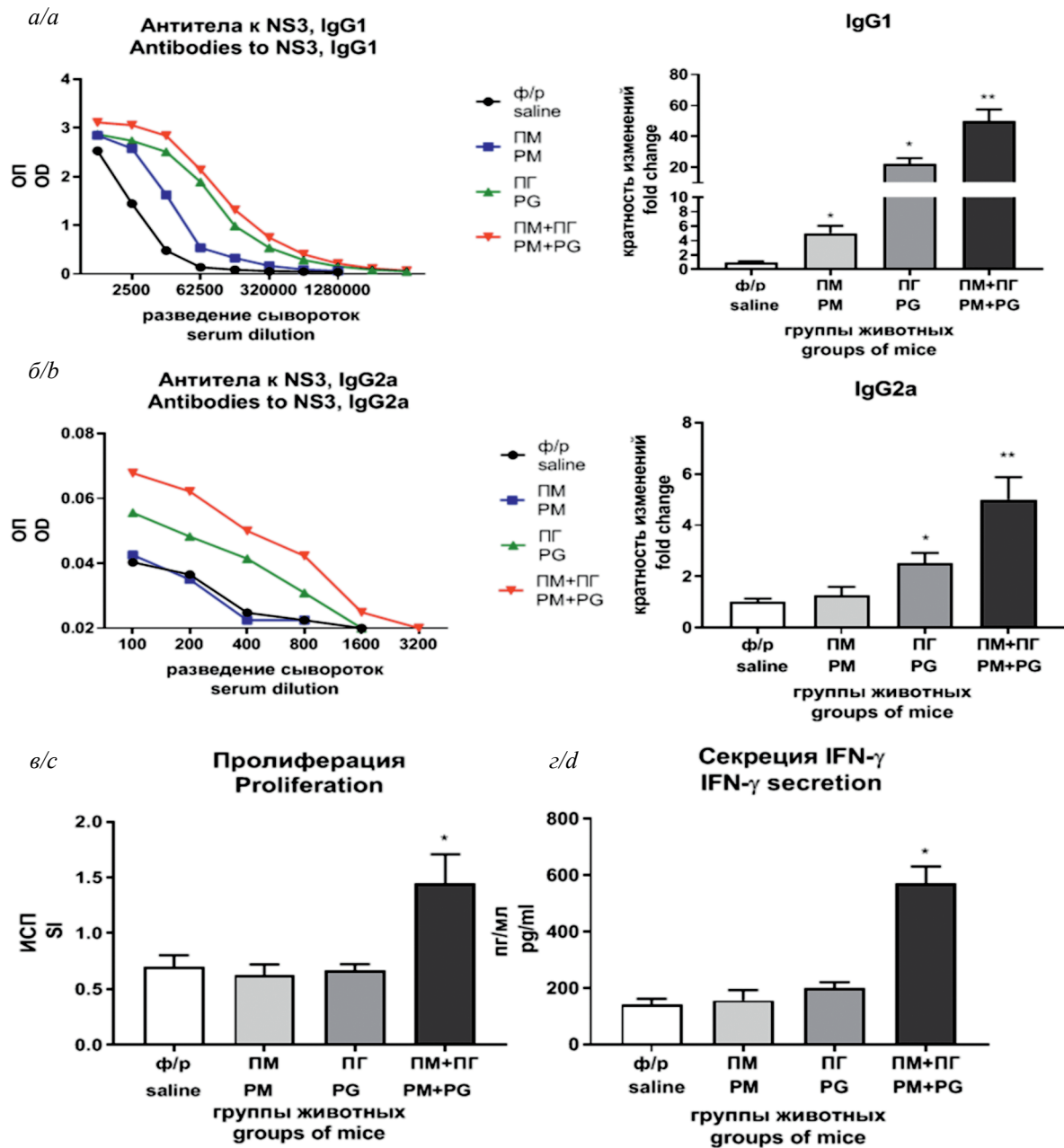


Рис. 2. Усиление гуморального (а, б) и клеточного (в, г) ответа мышей на рекомбинантный белок NS3 ВГС при сочетанном использовании полимурамила и пирогенала в качестве адъювантов.

ОП – оптическая плотность при 450 нм; ИСП – индекс стимуляции пролиферации. * $p < 0,05$ по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; ** $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 2. Enhancement of the humoral (a, b) and cellular (c, d) response of mice to the recombinant HCV NS3 protein with the combined use of polymuramyl and pyrogenalum as adjuvants.

OD – optical density at 450 nm; SI – stimulation index. * $p < 0.05$ compared to the group to which NS3 was administered with saline solution (saline). ** $p < 0.05$ compared to other groups of mice.

комплекс и необходимы для амплификации вирусного генома [19]. NS3 содержит протеазный и геликазный домены, обеспечивающие процессинг полипротеина ВГС и раскручивание вторичных структур РНК соответственно. NS4A – кофактор протеазы NS3, NS4B участвует в формировании везикул, которые служат органеллами репликации, NS5B выполняет функцию РНК-зависимой РНК-полимеразы. Известно, что не-

структурные белки ВГС являются привлекательными компонентами для разработки вакцин. В то же время антигенные и иммуногенные свойства неструктурных белков недостаточно изучены. Ранее мы установили, что иммунизация мышей C57Bl/6 рекомбинантным белком NS5B без адъюванта индуцирует слабый Т-клеточный и В-клеточный ответы [20]. Эти данные подтвердились при сравнительном анализе ответа

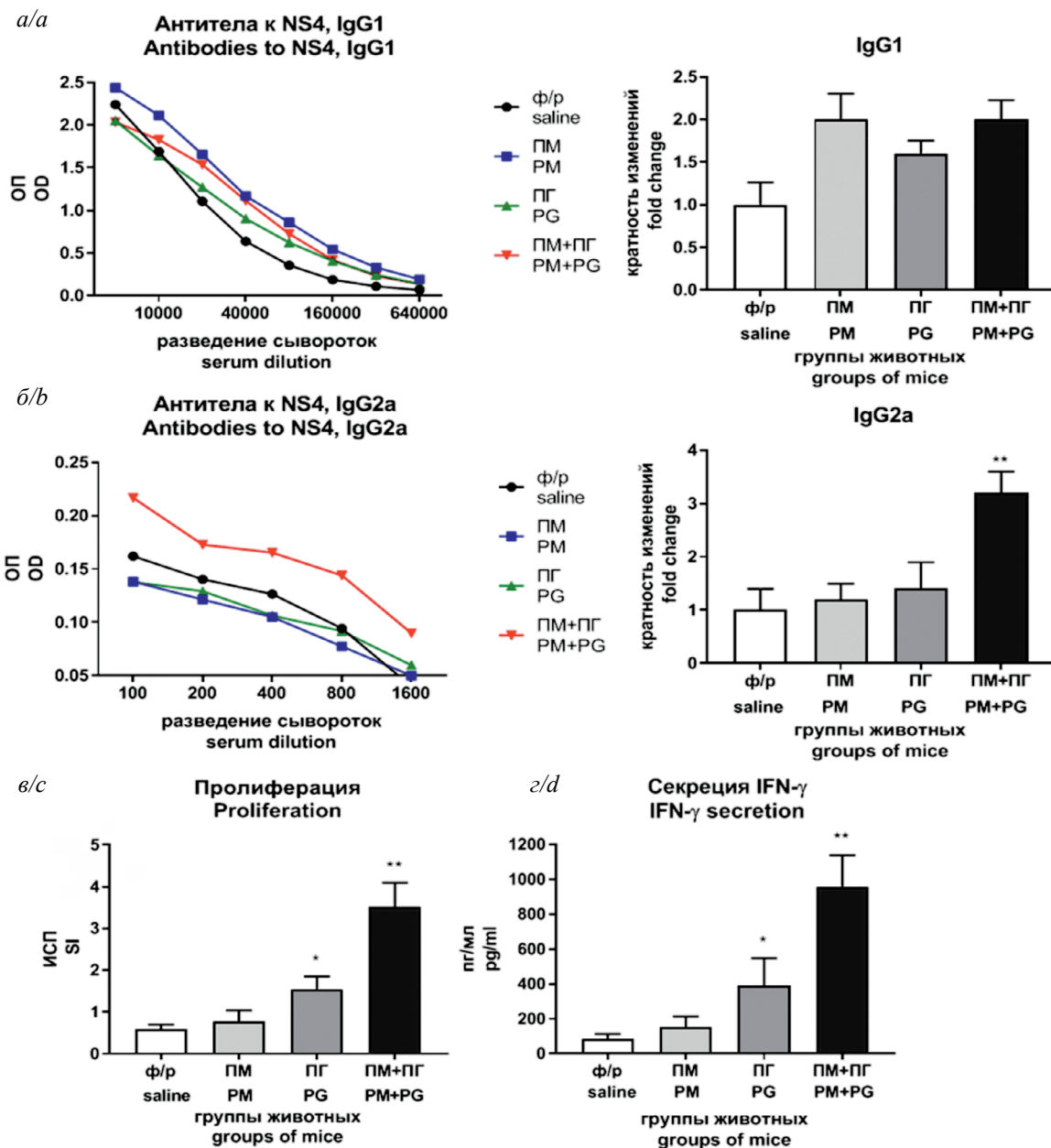


Рис. 3. Усиление гуморального (а, б) и клеточного (в, г) ответа мышей на рекомбинантный белок NS4 ВГС при сочетанном использовании полимурамила и пирогенала в качестве адъювантов.

ОП – оптическая плотность при 450 нм; ИСП – индекс стимуляции пролиферации. * $p < 0,05$ по сравнению с группой мышей, иммунизированных с ф/р; ** $p < 0,05$ по сравнению с остальными группами мышей.

Fig. 3. Enhancement of the humoral (a, b) and cellular (c, d) response of mice to the recombinant HCV NS4 protein with the combined use of polymuramyl and pyrogenalum as adjuvants.

OD – optical density at 450 nm; SI – stimulation index. * $p < 0.05$ compared to the group to which NS4 was administered with saline solution (saline); ** $p < 0.05$ compared to other groups of mice.

мышей C57Bl/6 на рекомбинантные белки NS3 и NS4. Представляло интерес определить влияние ПМ и ПГ на иммуногенные свойства этого белка – ключевого компонента репликативного комплекса. Показано, что этот белок способен активировать один из NLR – NOD1 [12]. В настоящей работе выявлено, что низкий уровень Т-клеточного ответа на NS5B без адъювантов под действием ПМ значительно повышается, однако уровень анти-NS5B антител не изменяется (табл. 1).

ПГ при иммунизации мышей C57Bl/6 повышал показатели обоих звеньев иммунитета: активность антител к NS5B в 12 раз и уровень секреции ИФН-γ более чем в 150 раз (рис. 1).

Иммунизация белком NS5B мышей двух других часто используемых линий BALB/c и DBA/2J показала, что ПМ не оказывал адъювантного действия ни на один из изученных показателей иммунитета этих мышей. Следует отметить, что ответ на рекомбинантный

Таблица 2. Синергетическое усиление иммунного ответа на рекомбинантные белки ВГС при сочетании действия полимурамила и пирогенала

Table 2. Synergistic enhancement of the immune response to recombinant HCV proteins with the combined action of polymuramyl and pyrogenalum

Белок ВГС для иммунизации мышей HCV protein for mice immunization	Параметры иммунного ответа Parameters of the immune response			
	пролиферация лимфоцитов lymphocyte proliferation	секреция IFN- γ IFN- γ secretion	титр антител изотипа IgG1 titer of antibodies, IgG1	титр антител изотипа IgG2a titer of antibodies, IgG2a
NS3	1,12 \pm 0,5 ^a	1,62 \pm 0,51*	1,85 \pm 0,69*	1,33 \pm 0,21*
NS4	1,38 \pm 0,28*	1,75 \pm 0,63*	0,60 \pm 0,41	1,39 \pm 0,27*

Примечание: ^a – индексы синергизма (M \pm SD); * – отличие от 1, $p < 0,05$ (объяснения см. в разделе «Материалы и методы»).

Note: ^a – values of the combination indices (M \pm SD); * – difference from 1, $p < 0.05$ (for explanations see Materials and methods).

белок NS5B без адьюванта значительно отличался у мышей разных линий. Так, уровень секреции IFN- γ у мышей BALB/c и DBA/2J был в среднем в 30 раз выше, чем у мышей C57Bl/6 (табл. 1). Индукция анти-NS5B антител IgG1, напротив, у мышей BALB/c (H-2d) была в 62 раза ниже по сравнению с мышами C57Bl/6 (H-2b) и в 77 раз ниже, чем у мышей DBA/2J, относящихся к тому же гаплотипу (H-2d).

Различие иммунного ответа мышей разных инбредных линий отмечено при воздействии различных бактериальных и вирусных инфекций. Во многих работах отмечено, что мыши BALB/c или DBA более восприимчивы к бактериальным инфекциям, чем C57Bl/6, например, при заражении *Listeria monocytogenes* [21] или *Mycoplasma pulmonis* [22]. Однако при заражении *S. enterica* Serovar *Typhimurium*, напротив, мыши C57Bl/6 оказались более чувствительны, а мыши BALB/c более устойчивы к бактериальному заражению [23]. Ответ на вирусные инфекции также различался у лабораторных мышей разных линий. Так, мыши DBA/2J были в 1000 раз более чувствительны к вирусу гриппа A/Puerto Rico/8/1934, чем мыши C57Bl/6J [24, 25]. Принципиально сходные данные получены при сравнении иммунного ответа мышей BALB/c и C57Bl/6J на респираторно-синцитиальный вирус [26], на инактивированный вирус Денге [27], на аденоассоциированный вирус AAV6, содержащий ген ACE2, кодирующий клеточный рецептор SARS-CoV-2 [28]. Интересно, что различия в иммунном ответе обнаружены также между мышами BALB/c и DBA/2J, относящимися к одному гаплотипу 2d. Например, при заражении *M. pneumoniae* клеточный ответ значительно повышался у мышей DBA/2 по сравнению с мышами BALB/c [29]. Клетки, выделенные из лимфоузлов мышей DBA/2, иммунизированных модельным антигеном моллюска KLH, продуцировали до 30 раз больше интерлейкинов (IL)-12, чем клетки мышей BALB/c, рестимулированные *in vitro* в тех же условиях [30].

Различия в иммунных ответах мышей разных линий объясняют направленностью Т-клеточных реакций у мышей BALB/c по Th2-типу, тогда как у мышей C57Bl/6 – по Th1-типу [31, 32]. В первом случае индуцируются преимущественно гены противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10 и IL-13), во втором – гены провоспалительных цитокинов (TNF- α и IFN- γ).

Различные цитокиновые профили являются важными факторами, определяющими чувствительность или резистентность к инфекциям или вакцинам. Эффективность вакцины зависит также от субтипа антител, индуцируемых вакцинацией, поскольку подклассы IgG различаются по своей биологической функции. В то же время мыши разных линий могут продуцировать различные уровни и типы антител. К такому выводу пришли авторы, использовавшие 28 видов инбредных и нелинейных «диких» мышей для иммунизации бесклеточной коклюшной вакциной [33]. Генетические различия мышей вносили значительный вклад в величину и продолжительность активности антител субтипов IgG1, IgG2b и IgG3, индуцированных вакциной. Анализируя причины иммунной гетерогенности, можно констатировать, что точный генетический механизм, регулирующий иммунный ответ и восприимчивость к инфекциям у разных линий мышей, до конца не выяснен. Таким образом, данные, полученные нами и другими авторами, указывают на необходимость изучения вклада генетических факторов как для выбора оптимальной животной модели, так и для оценки эффективности вакцины с использованием различных инбредных или нелинейных мышей.

Параметры врожденного иммунного ответа при инфекциях в значительной степени определяются взаимодействиями PRR. В частности, хорошо известным синергетическим взаимодействием является взаимодействие между TLR и членами семейства NOD-подобных рецепторов (NOD1 и NOD2), которые распознают определенные фрагменты бактериального пептидогликана: NOD1 – γ -d-glutamyl-mesodiaminopimelic acid (iE-DAP), NOD2 – L-Ala-D-isoGln [34, 35]. Синергетические взаимодействия NODs и TLRs могут быть использованы в терапевтических целях для повышения устойчивости организма хозяина к патогенам. Например, комбинация агонистов NOD1 и TLR5 обеспечивала 80%-ную устойчивость к смертельной дозе *S. typhimurium*, тогда как каждый отдельный компонент не проявлял протективных свойств [36]. В другой работе этих авторов показано, что комбинированная стимуляция PRRs из разных семейств (NOD2 и TLR4) обуславливает более сильную активацию адаптивного иммунитета по сравнению с воздействием на каждый отдельный PRR. Иммунизация модельным антигеном овалбумином

с агонистом TLR4 (MPLA) и агонистом NOD2 (MDP) синергетически усиливала гуморальный и клеточный иммунные ответы [37]. Адьювантный эффект при иммунизации мышей антигеном вируса гриппа совместно с агонистами TLR4 и NOD2 обеспечивал усиление иммуногенности и защиту животных от летальной вирусной инфекции [38].

В то же время показано, что комбинированные действия агонистов семейств TLR и NOD могут приводить не только к синергетической, но также к аддитивной индукции иммунных реакций (например, в макрофагах *in vitro*), а при некоторых условиях даже подавлять иммунный ответ друг друга [14, 39]. В связи с этим очевидно, что изучение сочетанного действия кандидатных адьювантов необходимо при разработке вакцин к каждому конкретному патогену. Тем более, что механизмы синергетических взаимодействий NOD–TLR изучены недостаточно. Авторы обсуждают разные возможные механизмы синергии [40]. Одна из гипотез основана на изучении сигнальных путей PRR. Предполагают, что синергия между парами PRR возникает, если два рецептора сначала используют разные проксимальные адапторы, а затем совместно – дистальные части молекулярных путей [41]. Агонисты TLR4- и NOD1-рецепторов передают сигналы разными путями: Rip2 – для сигнального пути NOD1 и NOD2 [42], MyD88 и TRIF – для TLR4 [43]. Потенциально агонисты NOD1 и TLR4 в сочетании могут повышать экспрессию более широкого набора генов, которые взаимно усиливают передачу сигналов. В работе [14] детально анализировали стимуляцию клеток агонистами NOD1 и TLR4 в динамике на примере макрофагов. Изучение сигнальных путей показало сложность ответа макрофагов человека на комбинацию агонистов NOD1 и TLR4. Установили, что до поступления сигнала активации в ядро синергия между двумя рецепторами не возникает. Однако на выходе сигнала из ядра наблюдается синергетическая активация NOD1- и TLR4-индуцируемых генов. Анализ результатов приводит к заключению, что синергия агонистов рецепторов, относящихся к разным семействам, является результатом многих пока не до конца изученных процессов. Выяснение молекулярных путей и взаимодействия генов в регуляции синергии позволит создать высокоэффективные комплексные адьюванты и разработать субъединичные вакцины, не уступающие по силе иммунного ответа, но более безопасные по сравнению с аттенуированными или инактивированными цельновирионными вакцинами.

Выводы

1. Показаны различные антигенные и иммуногенные свойства рекомбинантных неструктурных белков NS3, NS4 и NS5B репликативного комплекса ВГС, что с учетом разных функций этих белков в репликации вируса свидетельствует о целесообразности их сочетанного использования в составе субъединичных вакцин.

2. Рекомбинантные неструктурные белки ВГС проявляют различную иммуногенность при введении мышам разных инбредных линий (DBA/2J, BALB/c, C57Bl/6) как различающихся по антигенам главного комплекса гистосовместимости (гаплотипы H-2b и H-2d), так и относящихся к одному гаплотипу. Это указывает на необходимость использования животных разных инбредных линий или нелинейных животных при анализе эффективности субъединичных вакцин.

3. Доступные отечественные препараты ПГ и ПМ оказывают синергетическое усиление В-клеточного и Т-клеточного иммунного ответа при иммунизации неструктурными белками ВГС и открывают перспективу создания на их основе комплексного адьюванта в составе кандидатной субъединичной вакцины против гепатита С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Park S.H., Rehermann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014; 40(1): 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.010>
2. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>
3. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
4. Polyak S.J., Crispe I.N., Baumert T.F. Liver abnormalities after elimination of HCV infection: persistent epigenetic and immunological perturbations post-cure. *Pathogens*. 2021; 10(1): 44. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010044>
5. Sun D., Dai M., Shen S., Li C., Yan X. Analysis of naturally occurring resistance-associated variants to NS3/4A protein inhibitors, NS5A protein inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with chronic hepatitis C. *Gene Expr*. 2018; 18(1): 63–9. <https://doi.org/10.3727/105221617X15100607143377>
6. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist*. 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
7. Todryk S.M., Bassendine M.F., Bridge S.H. Revisiting the elusive hepatitis C vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(2): 114. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020114>
8. Kozak M., Hu J. The integrated consideration of vaccine platforms, adjuvants, and delivery routes for successful vaccine development. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3): 695. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>
9. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
10. Carty M., Guy C., Bowie A.G. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem. Pharmacol*. 2021; 183: 114316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316>
11. Caucheteux S.M., Hu-Li J., Mohammed R.N., Ager A., Paul W.E. Cytokine regulation of lung Th17 response to airway immunization using LPS adjuvant. *Mucosal Immunol*. 2017; 10(2): 361–72. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.54>
12. Vegna S., Gregoire D., Moreau M., Lassus P., Durantel D., Assenat E., et al. NOD1 participates in the innate immune response triggered by hepatitis C virus polymerase. *J. Virol*. 2016; 90(13): 6022–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-15>
13. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Strategies for using muramyl peptides – modulators of innate immunity of bacterial origin – in medicine. *Front. Immunol*. 2021; 12: 607178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607178>
14. Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Nikolaeva A.M., Balyasova L.S., et al. Interplay between NOD1 and TLR4 receptors in macrophages: nonsynergistic activation of signaling pathways results in synergistic induction of proinflammatory gene expression. *J. Immunol*. 2021; 206(9): 2206–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000692>

15. Hennessy C., McKernan D.P. Anti-viral pattern recognition receptors as therapeutic targets. *Cells*. 2021; 10(9): 2258. <https://doi.org/10.3390/cells10092258>
16. Абдулмеджидова А.Г., Масалова О.В., Атанадзе С.Н., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Худяков Ю.Е. и др. Характеристика панели моноклональных антител к рекомбинантному белку NS3 вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(1): 21–5.
17. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tumitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
18. Masalova O.V., Lakina E.I., Abdulmedzhidova A.G., Atanadze S.N., Semiletov Y.A., Shkurko T.V., et al. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* 2002; 83(3): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00081-0)
19. Li H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Hepatitis C viral replication complex. *Viruses*. 2021; 13(3): 520. <https://doi.org/10.3390/v13030520>
20. Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермьякова К.Ю. и др. Адьювантное действие дисперсного фуллера C60 на иммунный ответ против конструкции, имитирующей аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 516–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149> <https://elibrary.ru/laaczg>
21. Liu T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Yajima T., Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 2002; 70(12): 6638–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6638-6645.2002>
22. Boonyarattanasoonthorn T., Elewa Y.H.A., Tag-El-Din-Hassan H.T., Morimatsu M., Agui T. Profiling of cellular immune responses to Mycoplasma pulmonis infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 73: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.019>
23. Huang H., Even Z., Wang Z., Li L., Erickson A., Golovko M., et al. Proteomics profiling reveals regulation of immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* 2023; 91(1): e0049922. <https://doi.org/10.1128/iai.00499-22>
24. Casanova T., Van de Paar E., Desmecht D., Garigliany M.M. Hyporeactivity of alveolar macrophages and higher respiratory cell permissivity characterize DBA/2J mice infected by influenza A virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(10): 808–20. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0237>
25. Srivastava B., Blazejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004857>
26. Marzec J., Cho H.Y., High M., McCaw Z.R., Polack F., Kleeberger S.R. Toll-like receptor 4-mediated respiratory syncytial virus disease and lung transcriptomics in differentially susceptible inbred mouse strains. *Physiol. Genomics*. 2019; 51(12): 630–43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00101.2019>
27. Leclerc C., Dériaud E., Megret F., Briand J.P., Van Regenmortel M.H., Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol. Immunol.* 1993; 30(7): 613–25. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90072-j](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90072-j)
28. Tailor N., Warner B.M., Griffin B.D., Tierney K., Moffat E., Frost K., et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV6.2FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene. *Viruses*. 2022; 15(1): 85. <https://doi.org/10.3390/v15010085>
29. Tamiya S., Yoshikawa E., Suzuki K., Yoshioka Y. Susceptibility analysis in several mouse strains reveals robust T-cell responses after mycoplasma pneumoniae infection in DBA/2 mice. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021; 10: 602453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602453>
30. Gieni R.S., Fang Y., Trinchieri G., Umetsu D.T., DeKruyff R.H. Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int. Immunol.* 1996; 8(10): 1511–20. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.10.1511>
31. Saha P., Xiao X., Li Y., Golonka R.M., Abokor A.A., Yeoh B.S., et al. Distinct iron homeostasis in C57BL/6 and Balb/c mouse strains. *Physiol. Rep.* 2020; 8(9): e14441. <https://doi.org/10.14814/phy2.14441>
32. Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004; 22(5): 460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
33. Mosley Y.C., Radder J.E., HogenEsch H. Genetic variation in the magnitude and longevity of the IgG subclass response to a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 124. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040124>
34. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(11): 8869–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
35. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanno M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300(5625): 1584–7. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
36. Tukhvatulina A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- κ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10): 3855–64. <https://doi.org/10.1128/IAI.00525-13>
37. Tukhvatulina A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650>
38. Tukhvatulina A., Dzharullaeva A., Erokhova A., Zemskaya A., Balyasin M., Ozharovskaia T., et al. Adjuvantation of an influenza hemagglutinin antigen with TLR4 and NOD2 agonists encapsulated in poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhances immunogenicity and protection against lethal influenza virus infection in mice. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 519. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030519>
39. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(49): 19440–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
40. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105(4): 669–80. <https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R>
41. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
42. Magalhaes J.G., Lee J., Geddes K., Rubino S., Philpott D.J., Girardin S.E. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(5): 1445–55. <https://doi.org/10.1002/eji.201040827>
43. Owen A.M., Luan L., Burelbach K.R., McBride M.A., Stothers C.L., Boykin O.A., et al. MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1044662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044662>

REFERENCES

1. Park S.H., Rehmann B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity*. 2014; 40(1): 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.12.010>
2. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>
3. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
4. Polyak S.J., Crispe I.N., Baumert T.F. Liver abnormalities after elimination of HCV infection: persistent epigenetic and immunological perturbations post-cure. *Pathogens*. 2021; 10(1): 44. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010044>
5. Sun D., Dai M., Shen S., Li C., Yan X. Analysis of naturally occurring resistance-associated variants to NS3/4A protein inhibitors, NS5A protein inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with chronic hepatitis C. *Gene Expr.* 2018; 18(1): 63–9. <https://doi.org/10.37271/105221617X15100607143377>
6. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>

7. Todryk S.M., Bassendine M.F., Bridge S.H. Revisiting the elusive hepatitis C vaccine. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(2): 114. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020114>
8. Kozak M., Hu J. The integrated consideration of vaccine platforms, adjuvants, and delivery routes for successful vaccine development. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3): 695. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030695>
9. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
10. Carty M., Guy C., Bowie A.G. Detection of viral infections by innate immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2021; 183: 114316. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316>
11. Caucheteux S.M., Hu-Li J., Mohammed R.N., Ager A., Paul W.E. Cytokine regulation of lung Th17 response to airway immunization using LPS adjuvant. *Mucosal Immunol.* 2017; 10(2): 361–72. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.54>
12. Vegna S., Gregoire D., Moreau M., Lassus P., Durantel D., Assenat E., et al. NOD1 participates in the innate immune response triggered by hepatitis C virus polymerase. *J. Virol.* 2016; 90(13): 6022–35. <https://doi.org/10.1128/JVI.03230-15>
13. Guryanova S.V., Khaitov R.M. Strategies for using muramyl peptides – modulators of innate immunity of bacterial origin – in medicine. *Front. Immunol.* 2021; 12: 607178. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607178>
14. Budikhina A.S., Murugina N.E., Maximchik P.V., Dagil Y.A., Nikolaeva A.M., Balyasova L.S., et al. Interplay between NOD1 and TLR4 receptors in macrophages: nonsynergistic activation of signaling pathways results in synergistic induction of proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* 2021; 206(9): 2206–20. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000692>
15. Hennessy C., McKernan D.P. Anti-viral pattern recognition receptors as therapeutic targets. *Cells*. 2021; 10(9): 2258. <https://doi.org/10.3390/cells10092258>
16. Абдулмеджидова А.Г., Масалова О.В., Атанадзе С.Н., Уланова Т.И., Бурков А.Н., Худяков Ю.Е. и др. Характеристика панели моноклональных антител к рекомбинантному белку NS3 вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(1): 21–5.
17. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
18. Masalova O.V., Lakina E.I., Abdulmedzhidova A.G., Atanadze S.N., Semiletov Y.A., Shkurko T.V., et al. Characterization of monoclonal antibodies and epitope mapping of the NS4 protein of hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* 2002; 83(3): 187–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-2478\(02\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0165-2478(02)00081-0)
19. Li H.C., Yang C.H., Lo S.Y. Hepatitis C viral replication complex. *Viruses*. 2021; 13(3): 520. <https://doi.org/10.3390/v13030520>
20. Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu., et al. Adjuvant effect of dispersed fullerene C60 on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(6): 516–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149> <https://elibrary.ru/laaczg> (in Russian)
21. Liu T., Matsuguchi T., Tsuboi N., Yajima T., Yoshikai Y. Differences in expression of toll-like receptors and their reactivities in dendritic cells in BALB/c and C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* 2002; 70(12): 6638–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6638-6645.2002>
22. Boonyarattanasoonthorn T., Elewa Y.H.A., Tag-El-Din-Hassan H.T., Morimatsu M., Agui T. Profiling of cellular immune responses to Mycoplasma pulmonis infection in C57BL/6 and DBA/2 mice. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 73: 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.019>
23. Huang H., Even Z., Wang Z., Li L., Erickson A., Golovko M., et al. Proteomics profiling reveals regulation of immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in mice. *Infect. Immun.* 2023; 91(1): e0049922. <https://doi.org/10.1128/iai.00499-22>
24. Casanova T., Van de Paar E., Desmecht D., Garigliani M.M. Hyporeactivity of alveolar macrophages and higher respiratory cell permissivity characterize DBA/2J mice infected by influenza A virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 2015; 35(10): 808–20. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0237>
25. Srivastava B., Blazejewska P., Hessmann M., Bruder D., Geffers R., Mauel S., et al. Host genetic background strongly influences the response to influenza A virus infections. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004857>
26. Marzec J., Cho H.Y., High M., McCaw Z.R., Polack F., Kleeburger S.R. Toll-like receptor 4-mediated respiratory syncytial virus disease and lung transcriptomics in differentially susceptible inbred mouse strains. *Physiol. Genomics*. 2019; 51(12): 630–43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00101.2019>
27. Leclerc C., Dériaud E., Megret F., Briand J.P., Van Regenmortel M.H., Deubel V. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol. Immunol.* 1993; 30(7): 613–25. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90072-j](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90072-j)
28. Taylor N., Warner B.M., Griffin B.D., Tierney K., Moffat E., Frost K., et al. Generation and characterization of a SARS-CoV-2-susceptible mouse model using adeno-associated virus (AAV6.2FF)-mediated respiratory delivery of the human ACE2 gene. *Viruses*. 2022; 15(1): 85. <https://doi.org/10.3390/v15010085>
29. Tamiya S., Yoshikawa E., Suzuki K., Yoshioka Y. Susceptibility analysis in several mouse strains reveals robust T-cell responses after mycoplasma pneumoniae infection in DBA/2 mice. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021; 10: 602453. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.602453>
30. Gieni R.S., Fang Y., Trinchieri G., Umetsu D.T., DeKruyff R.H. Differential production of IL-12 in BALB/c and DBA/2 mice controls IL-4 versus IFN-gamma synthesis in primed CD4 lymphocytes. *Int. Immunol.* 1996; 8(10): 1511–20. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.10.1511>
31. Saha P., Xiao X., Li Y., Golonka R.M., Abokor A.A., Yeoh B.S., et al. Distinct iron homeostasis in C57BL/6 and Balb/c mouse strains. *Physiol. Rep.* 2020; 8(9): e14441. <https://doi.org/10.14814/phy2.14441>
32. Watanabe H., Numata K., Ito T., Takagi K., Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*. 2004; 22(5): 460–6. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9>
33. Mosley Y.C., Radder J.E., HogenEsch H. Genetic variation in the magnitude and longevity of the IgG subclass response to a diphtheria-tetanus-acellular pertussis (DTaP) vaccine in mice. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 124. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040124>
34. Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(11): 8869–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200651200>
35. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanon M., Viala J., et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003; 300(5625): 1584–7. <https://doi.org/10.1126/science.1084677>
36. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF-κB, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect. Immun.* 2013; 81(10): 3855–64. <https://doi.org/10.1128/IAI.00525-13>
37. Tikhvatulin A.I., Dzharrullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Dolzhikova I.V., et al. Powerful complex immunoadjuvant based on synergistic effect of combined TLR4 and NOD2 activation significantly enhances magnitude of humoral and cellular adaptive immune responses. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155650>
38. Tikhvatulin A., Dzharrullaeva A., Erokhova A., Zemskaia A., Balyasin M., Ozharovskaia T., et al. Adjuvantation of an influenza hemagglutinin antigen with TLR4 and NOD2 agonists encapsulated in poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) nanoparticles enhances immunogenicity and protection against lethal influenza virus infection in mice. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 519. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030519>
39. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(49): 19440–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
40. Pashenkov M.V., Murugina N.E., Budikhina A.S., Pinegin B.V. Synergistic interactions between NOD receptors and TLRs: Mechanisms and clinical implications. *J. Leukoc. Biol.* 2019; 105(4): 669–80. <https://doi.org/10.1002/JLB.2RU0718-290R>
41. Bagchi A., Herrup E.A., Warren H.S., Trigilio J., Shin H.S., Valentine C., et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 2007; 178(2): 1164–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>
42. Magalhaes J.G., Lee J., Geddes K., Rubino S., Philpott D.J., Girardin S.E. Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(5): 1445–55. <https://doi.org/10.1002/eji.201040827>
43. Owen A.M., Luan L., Burelbach K.R., McBride M.A., Stothers C.L., Boykin O.A., et al. MyD88-dependent signaling drives toll-like receptor-induced trained immunity in macrophages. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1044662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1044662>