

**Финансирование.** Авторы заявляют об отсутствии финансовой поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5—13, 15 см. REFERENCES)

1. Бартлетт Д., Галант Д., Фам П. *Клинические аспекты ВИЧ-инфекции. 2009—2010*. Пер. с англ. М.: Р. Валент; 2010.
4. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канестри В.Г., Афонина Л.Ю. и др. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; (6): 14—5.
14. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Гольц М.Л., Бешимов А.Т. Клинико-иммунологический и цитокиновый профиль у пациентов ВИЧ-инфекцией на ранних сроках заболевания при различных путях инфицирования. *Цитокины и воспаление*. 2013; 12(3): 35—40.

#### REFERENCES

1. Bartlett J.G., Gallant J.E., Pham P.A. *Medical management of HIV infection*. Durham, NC: Knowledge Source Solutions, LLC; 2009.
2. Moore D., Hogg R., Yip B., Wood E., Tyndall M., Braitstein P. et al. Discordant immunologic and virologic responses to highly active antiretroviral therapy are associated with increased mortality and poor adherence to therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005; 40: 288—293.
3. Gilson R.J., Man S.L., Copas A., Rider A., Forsyth A., Hill S. et al. Discordant responses on starting highly active antiretroviral therapy: suboptimal CD4 increases despite early viral suppression in the UK Collaborative HIV Cohort (UK CHIC) Study. *HIV Med.* 2010; 11: 152—160.
4. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu. et al. Protocols of follow-up and treatment of patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2014; (6): 14—5. (in Russian)
5. Antiretroviral therapy guidelines, version 7.1. November 2014. European AIDS Clinical Society. Available at: [http://arvt.ru/sites/default/files/EACS\\_Guidelines\\_v7.1\\_ENG.pdf](http://arvt.ru/sites/default/files/EACS_Guidelines_v7.1_ENG.pdf)
6. Consolidated guidelines on HIV prevention, diagnosis, treatment and care for key populations. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/en/>
7. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services. Available at: <http://aidsinfo.nih.gov/guidelines>
8. Shmagel K., Smagel N., Saydakova E., Zverev S., Korolevskaya L., Vorobyeva N. et al. Investigation of mechanisms of immunological inefficiency of antiretroviral therapy in HIV-infected patients. In: *Proceedings of the ERA.Net RUS Brokerage event*. Yekaterinburg; 2011.
9. Julg B., Poole D., Ghebremichael M., Castilla C., Altfeld M., Sunpath H. et al. Factors predicting discordant virological and immunological responses to antiretroviral therapy in HIV-1 clade C infected Zulu/Xhosa in South Africa. *PLoS One*. 2012; 7(2): 1—5.
10. Blanco J.R., Jarrin I., Vallejo M., Berenguer J., Solera C., Rubio R. et al. Definition of advanced age in HIV infection: looking for an age cut-off. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2012; 28(9): 1000—6.
11. Grabar S., Kousignian I., Sobel A., Le Bras P., Gasnault J., Enel P. et al. Immunological and clinical responses to Highly active antiretroviral therapy over 50 years of age. Results from the French Hospital Database on HIV. *AIDS*. 2004; (18): 2029—38.
12. Hoover D.R. Would confirmatory retesting of CD4+ cells to verify AIDS status be too expensive? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1993; 6(5): 537—9.
13. Deeks S.G., Kithen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narváez AB., et al. Immune activation see point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood*. 2004; 104(4): 942—7.
14. Fazylov V.Kh., Manapova E.R., Gol'ts M.L., Beshimov A.T. Clinical and immunological and cytokine profile in patients with HIV infection in the early stages of the disease at different ways of infection. *Tsitokiny i vospalenie*. 2013; 12(3): 35—40. (in Russian)
15. Hunt P.W., Brenchley J., Sinclair E., McCune J.M., Roland M., Shafer KP. et al. Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(1): 126—33.

Поступила 16.05.16

Принята в печать 13.12.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.891:578.31.083.2

**Коноплева М.В.<sup>1</sup>, Соколова М.В.<sup>1</sup>, Шевлягина Н.В.<sup>1</sup>, Баженов А.И.<sup>2</sup>, Фельдшерова А.А.<sup>1</sup>, Крымский М.А.<sup>3</sup>, Борисова В.Н.<sup>3</sup>, Семенов Т.А.<sup>1</sup>, Нестеренко В.Г.<sup>1</sup>, Суслов А.П.<sup>1</sup>**

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ГЕПАТИТА В с ЭСКЕЙП-МУТАЦИЯМИ в S-гене G145R и S143L

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

<sup>2</sup> ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы, 129090, г. Москва;

<sup>3</sup> ЗАО НПК «Комбиотех», 117997, г. Москва

**Введение.** По серологическим свойствам и при иммунизации дикий тип HBsAg вируса гепатита В (ВГВ) и его мутант G145R ведут себя как различные антигены. Это свидетельствует о серьезных структурных изменениях, которые предположительно способны оказать существенное влияние на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Однако морфологические и ультраструктурные исследования ВГВ с мутацией G145R ранее не проводились. **Цель работы:** изучение структурно-морфологической организации ВГВ при наличии эскейп-мутации G145R. **Методы.** Исследования сывороток, очищенных вирусов, а также рекомбинантных HBsAg проводили с помощью трансмиссионной электронной микроскопии методом негативного контраста и непрямой реакции иммуномечения с применением моноклональных антител различной специфичности. В качестве контроля использовали образцы ВГВ дикого типа и ВГВ, имеющего мутацию S143L, полученные аналогичным способом.

**Для корреспонденции:** Коноплева Мария Вениаминовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

**Результаты.** В препаратах дикого штамма и ВГВ с мутацией S143L показано наличие типичных вирусных частиц ВГВ. Препараты ВГВ с мутацией G145R отличались выраженной морфологической гетерогенностью. В исходной сыворотке и препарате очищенного вируса, содержащих мутант G145R, обнаружены крупные овалы частицы размером 60–70 нм и до 200 нм соответственно. Подтверждено наличие антигенных структур ВГВ во всех гетерогенных формах. Показано, что формирование субвирусных частиц при экспрессии рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R зависит от условий экспрессии и очистки белка. Они могут варьировать от хорошо сформированных круглых и овальных субвирусных частиц размером 20–50 нм до практически неструктурированных мелкозернистых масс. **Заключение.** Получены прямые данные о влиянии эскейп-мутации G145R в S-гене в отличие от мутации S143L на морфогенез вирионов и субвирусных частиц ВГВ.

**Ключевые слова:** мутация; S-ген; G145R; S143L; вирус гепатита В; HBsAg; электронная микроскопия; вирион; субвирусные частицы.

**Для цитирования:** Коноплева М.В., Соколова М.В., Шевлягина Н.В., Баженов А.И., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Борисова В.Н., Семенов Т.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П. Морфологический анализ вируса гепатита В с эскейп-мутациями в S-гене G145R и S143L. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 119-128.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-119-128>

**Konopleva M.V.<sup>1</sup>, Sokolova M.V.<sup>1</sup>, Shevlyagina N.V.<sup>1</sup>, Bazhenov A.I.<sup>2</sup>, Fel'dshero A.A.<sup>1</sup>, Krymskij M.A.<sup>3</sup>, Borisova V.N.<sup>3</sup>, Semenenko T.A.<sup>1</sup>, Nesterenko V.G.<sup>1</sup>, Suslov A.P.<sup>1</sup>**

### MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEPATITIS B VIRUS WITH ESCAPE MUTATIONS IN S-GENE G145R AND S143L

<sup>1</sup>Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, 129090, Russian Federation;

<sup>3</sup>ZAO NPK Combiotech, Moscow, 117997, Russian Federation

**Background.** In terms of serological properties and immunization, the wild type of HBsAg HBV and its G145R mutant behave as different antigens. This testifies to serious structural changes, which presumably could have a significant impact on the morphogenesis of virions and subviral particles. Nevertheless, morphological and ultrastructural investigations of HBV with G145R mutation have not been carried yet.

**Objectives.** Research of structural and morphological organization of HBV in the presence of the G145R escape mutation.

**Methods.** Studies of sera, purified viruses and recombinant HBsAg were carried out by transmission electron microscopy by the method of negative staining and indirect reaction of immunelabeling using monoclonal antibodies of different specificity. Specimens of wild type HBV and HBV with S143L mutation obtained in an identical manner were used as the control.

**Results.** The presence of typical virus particles of HBV was shown in the specimens of wild strain and HBV with S143L mutation. Specimens of HBV with G145R mutation were characterized by expressed morphological heterogeneity. In the initial serum and in the specimen of purified virus containing G145R mutant, large oval particles 60–70 nm and up to 200 nm in size, respectively, were found. The presence of antigen structures of HBV in all heterogeneous forms was confirmed. It was shown that forming of subviral particles in the process of expression of the recombinant HBsAg with G145R mutation depends on conditions of expression and purification of the protein. They can vary from well-formed circular and oval particles to practically unstructured fine-grained masses.

**Conclusion.** Direct data on the impact of G145R escape-mutation in S-gene, in contrast to S143L mutation, on the morphogenesis of virions and subviral particles of HBV were obtained.

**Key words:** mutation; S-gene; G145R; S143L; HBV; HBsAg; electronic microscopy; virion; subviral particles.

**For citation:** Konopleva M.V., Sokolova M.V., Shevlyagina N.V., Bazhenov A.I., Fel'dshero A.A., Krymskij M.A., Borisova V.N., Semenenko T.A., Nesterenko V.G., Suslov A.P. Morphological analysis of hepatitis B virus with escape mutations in S-gene G145R and S143L. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(3): 119-128. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-119-128>

**For correspondence:** Mariya V. Konopleva, PhD (Biol.), Senior Scientist, Laboratory of mediators and effectors of immunity, Department of Immunology, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

#### Information about authors:

Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>; Sokolova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-2836-8232>;  
Shevlyagina N.V., <http://orcid.org/0000-0001-9651-1654>; Bazhenov A.I., <http://orcid.org/0000-0002-1926-145>;  
Fel'dshero A.A., <http://orcid.org/0000-0001-7216-4301>; Krymskij M.A., <http://orcid.org/0000-0003-4603-7354>;  
Borisova V.N., <http://orcid.org/0000-0001-7571-150X>; Semenenko T.A., <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>;  
Nesterenko V.G., <http://orcid.org/0000-0002-9574-6512>; Suslov A.P., <http://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

**Acknowledgements.** We would like to thank our prematurely deceased colleagues Tretyakov O.Yu., Didenko, L.V. and Kost E.A. for their generous and invaluable help with the experimental work.

This work was funded by the ZAO NPK Combiotech, Moscow, Russian Federation.

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

Received 30 January 2017  
Accepted 28 February 2017

## Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) человека относится к семейству *Hepadnaviridae*. Нуклеокапсид вириона бывает двух

размеров, поскольку core-частицы могут состоять из 90 и 120 HBs-димеров, обладающих T = 3 или T = 4 ико-саэдрической симметрией соответственно, при этом при

инфекции доминируют  $T = 4$  капсиды [1, 2]. Капсиды содержат единичную копию частично двунитевой кольцевой ДНК, состоящей из 3200 нуклеотидных оснований, ковалентно связанной с вирусной ДНК-полимеразой на 5'-конце полноразмерной минус-цепи [3]. Оболочка вириона ВГВ сформирована тремя разными гликозилированными поверхностными белками (HBs), обозначаемыми L- (большой), M- (средний) и S- (малый) HBsAg, в пропорции 1:1:4, которые встроены в липидный слой, происходящий от клетки-хозяина, и являются продуктами одного гена, транслируясь в одной рамке считывания, но с разных стартовых кодонов [1].

В частично очищенных препаратах ВГВ были обнаружены 3 основные морфологические формы частиц: частицы 42—47 нм с двойной оболочкой (частицы Дейна), неинфекционные квазисферические частицы диаметром 20—22 нм и октаэдрической симметрией и филаменты диаметром 22 нм различной длины [4—7]. Субвирусные частицы экспрессируются в большей степени, чем вирионы, и их концентрация в сыворотке может быть больше в 10 000 раз [7]. Сферические субвирусные частицы состоят только из S-HBsAg и содержат низкое количество L-HBsAg, в то время как в филаментах и частицах Дейна относительное количество L-HBsAg гораздо выше [7]. Для морфогенеза вириона и секреции вирионов важны и Pre-S1, и S-домены [1, 7—11]. Экспрессия рекомбинантного S-HBsAg (например, в дрожжах *H. polymorpha* или клетках млекопитающих) приводит к появлению высокоиммуногенных внутриклеточных 20 нм-HBsAg частиц [7, 12].

Процесс включения липидов в субвирусные частицы до конца не ясен. Возможно, это происходит с участием шаперонов, помогающих созреванию HBsAg [7, 13]. Однако хотя липидов в субвирусных частицах содержится лишь около 25%, липидный слой важен не только для морфогенеза вируса, но и для его иммуногенности. С помощью поликлональных антител к HBsAg было показано, что его антигенная активность существенно снижается при удалении липидов. Шесть различных антигенных сайтов, распознаваемых панелью моноклональных антител, снижали свою способность связывать соответствующее антитело, если из препарата HBsAg удаляли липиды [13].

Некоторые мутации в S-HBsAg также могут кардинальным образом менять способность HBsAg взаимодействовать с антителами. Обнаружение относительно часто встречаемой мутации G145R [14] определило направление исследований HBsAg-мутантов, ускользающих от вакцинального и диагностического контроля [15, 16]. До 90% моноклональных антител к HBsAg теряют свою реактивность при взаимодействии с мутантом G145R [17—19] в отличие от HBsAg с близко расположенной мутацией S143L [20]. При иммунизации животных природным или рекомбинантным HBsAg, несущим мутацию G145R, образуются антитела, специфичные к данному мутанту, но не к дикому типу [18]. Вакцинация людей HBsAg дикого типа с одинаковой эффективностью индуцирует образование антител как к HBsAg дикого типа, так и к мутанту S143L, но практически не вызывает образования антител к HBsAg, несущему мутацию G145R [21]. Таким образом, как по серологическим свойствам, так и при иммунизации дикий тип HBsAg и мутант G145R ведут себя как различные антигены.

Столь существенные изменения в антигенных свойствах HBsAg с мутацией G145R свидетельствуют о се-

рьезных структурных изменениях. Замена G145R вызывает значимое снижение иммуногенной активности HBsAg за счет конформационного изменения антигенных петель в его молекуле. Эта мутация вставляет новую  $\beta$ -складку в район  $\alpha$ -детерминанты HBsAg и изменяет ориентацию трансмембранных сегментов, что влияет на локализацию мутантного HBsAg в липидном слое, т. е. меняет мембранную топологию HBsAg. Мутация G145R также повышает компактность и стабильность HBsAg за счет увеличения жесткости его  $\alpha$ -детерминанты [3].

Можно ожидать, что столь значимые отличия ВГВ, содержащего мутацию G145R, способны оказать существенное влияние и на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Однако морфологические и ультраструктурные исследования проводились до сих пор только для ВГВ дикого типа. В этой связи целью настоящего исследования было изучение особенностей морфологической организации ВГВ при наличии мутации G145R в препаратах очищенного в градиенте сахарозы вируса, в нативном сывороточном материале, а также в образцах рекомбинантного HBsAg, экспрессированного в дрожжах *H. polymorpha*.

### Материал и методы

*Сыворотки крови, полученные от хронических HBsAg-носителей*

Источником ВГВ с мутациями S143L и G145R являлись ранее охарактеризованные нами [20] сыворотки № 283 (генотип D, субтип ауw3, ENA ERZ377007) и № 111 (генотип D, субтип адw<sub>3</sub>, ENA ERZ377006) с вирусной нагрузкой  $7,4 \cdot 10^8$  и  $9,0 \cdot 10^5$  копий/мл соответственно. По данным полногеномного секвенирования, в обоих мутантных вирусах целевая мутация представлена в 99% молекул, гетерогенности нуклеотидов в соответствующих кодонах обнаружено не было (данные не приведены). В качестве контрольного образца использовали ранее охарактеризованную сыворотку № 43, содержащую HBsAg дикого типа. Выделение ДНК ВГВ и определение вирусной нагрузки в образцах проводили методом количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческой тест-системы РеалБест ДНК-ВГВ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и приборов Rotor-Gene 3000 («Corbett Research», Австралия) и CFX-96 («Bio-Rad», США).

*Рекомбинантные HBsAg с мутацией G145R*

В работе использовали рекомбинантные HBsAg ESC-15 и ESC-17 с мутацией G145R, относящиеся к субтипу ауw2 (генотип D), полученные от ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия) [22]. ESC-антигены были экспрессированы в дрожжах *H. polymorpha* и очищены в различных условиях. Концентрации ESC-антигенов определяли методом иммуноблоттинга с поликлональными кроличьими антителами к HBsAg субтипа ауw2. Для проведения иммуноблоттинга использовали аффинно-очищенные поликлональные антитела кролика к восстановленному HBsAg (2% SDS, 5%  $\beta$ -меркаптоэтанол) в разведении 1:2000. Концентрация ESC-15 составляла 0,8 мг/мл, ESC-17 — 0,75 мг/мл.

*Выделение очищенного ВГВ дикого типа и мутантных форм вируса*

Сыворотку, содержащую ВГВ, осветляли центрифугированием при 13400 об/мин в течение 10 мин. К супернатанту добавляли равный объем 4% лимонной кислоты и пепсин до конечной концентрации 1 мг/мл (1 мг пепсина на 50—100 мг белка). Полученную смесь инкубировали

при 37 °С в течение 18 ч, после чего пепсиновый перевар нейтрализовывали 1 М NaOH до pH 8,0, добавляли Твин-80 до конечной концентрации 2% и инкубировали в течение 8 ч при комнатной температуре.

Для выделения вируса использовали ультрацентрифугирование в ступенчатом градиенте плотности сахарозы. В центрифужную пробирку объемом 14,5 мл вносили 3 мл 50% сахарозы в 0,9% NaCl, наслаивали 7 мл 20% сахарозы и вносили 4 мл пепсинового перевара. Пробирки уравнивали минеральным маслом Bayol F, запаивали и центрифугировали при 70 000 g в течение 20 ч при 15 °С, после чего отбирали фракции по 1 мл и проверяли их на наличие белка методом Брэдфорда и содержание HBsAg методом иммуноферментного анализа (ИФА).

#### Моноклональные анти-HBsAg-антитела

Моноклональные мышинные антитела 11F3 (IgG2a) и H2 (IgG1) к конформационным эпитопам а-детерминанты HBsAg были получены в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Антитела обладают различной специфичностью по отношению к HBsAg дикого и мутантного типа. Антитело 11F3 практически не выявляет варианты HBsAg, несущие мутации S143L и G145R, тогда как конъюгат H2 выявляет как HBsAg

дикого типа, так и названные варианты, причем взаимодействие с мутантом G145R превышает взаимодействие с HBsAg дикого типа [20].

#### Метод трансмиссионной электронной микроскопии

Пробоподготовка перед трансмиссионной электронной микроскопией заключалась в фиксации сыровоточного материала, а также образцов очищенного ВГВ и рекомбинантного HBsAg по методу S. Ito и M. Karnovsky [23] с последующей постфиксацией в 1% OsO<sub>4</sub> и обработкой 1% раствором уранилацетата, обезвоживанием в спиртах и заключением в метакрилатную смолу LR White. С помощью ультратома LKB-III (Швеция) готовили ультратонкие срезы и помещали их на медные и никелевые сетки (300 меш), которые непосредственно перед электронно-микроскопическим анализом контрастировали 1% раствором уранилацетата и цитрата свинца [24].

#### Метод негативного контрастирования

Для негативного контрастирования каплю каждого фиксированного по методу S. Ito и M. Karnovsky образца наносили на покрытую формваром никелевую сетку (300 меш) на 10 мин, после чего фильтровальной бумагой удаляли жидкость и наносили каплю 1% водного раствора уранилацетата или 2% фосфорно-вольфрамовой кислоты либо 1% водного раствора молибдата аммония на

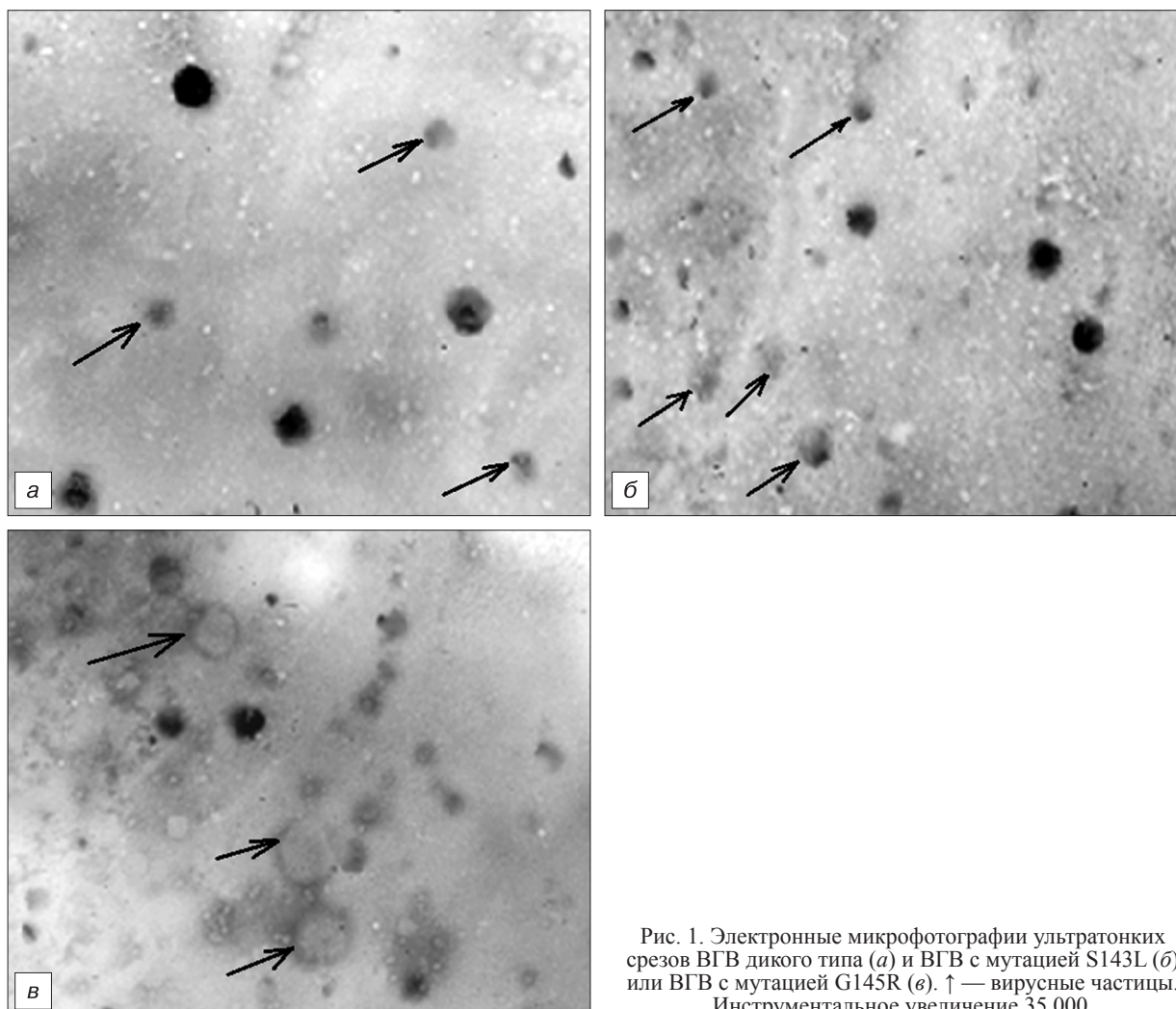


Рис. 1. Электронные микрофотографии ультратонких срезов ВГВ дикого типа (а) и ВГВ с мутацией S143L (б) или ВГВ с мутацией G145R (в). ↑ — вирусные частицы. Инструментальное увеличение 35 000.

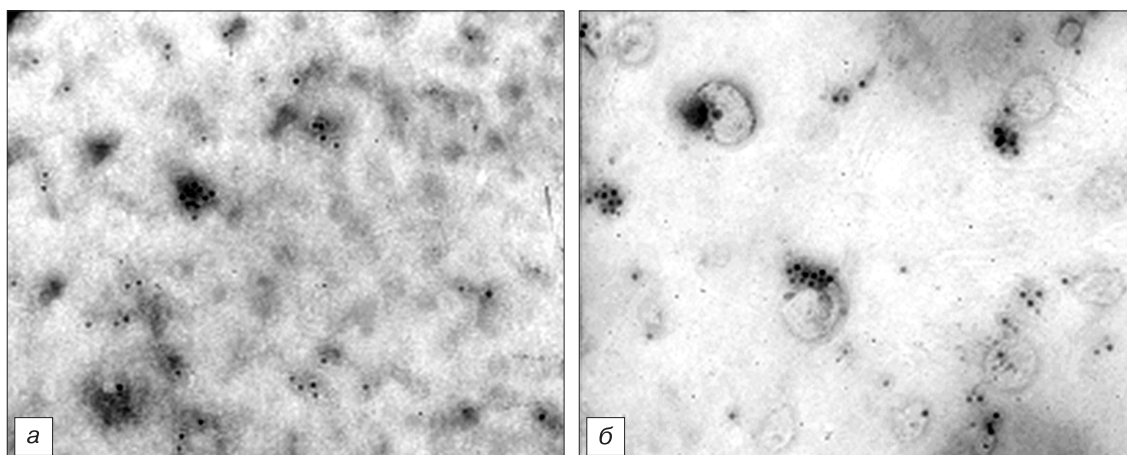


Рис. 2. Электронные микрофотографии ультратонких срезов с проведенной реакцией непрямого иммуномечения: анти-HBsAg H2 взаимодействуют с частицами ВГВ дикого типа (а) и крупными овальными частицами ВГВ, несущего мутацию G145R (б). Инструментальное увеличение 40 000.

1 мин, высушивали и анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM 100B («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и на микроскопе STEM Tecnai 12 iCORR («Philips», Нидерланды) при ускоряющем напряжении 120 кВ в двух режимах (CCD Acquire или CCD Eagle 4x4k).

*Реакция непрямого иммуномечения*

Реакция иммуномечения проводилась на тотальных препаратах очищенных ВГВ и сывороточном материале, содержащем ВГВ, на никелевых сетках с формваровой подложкой. Каплю, содержащую вирусные частицы, наносили на никелевую сетку на 10 мин, после этого фильтровальной бумагой удаляли лишнюю жидкость и

обрабатывали мышинными моноклональными аффинно-очищенными антителами к HBsAg. В работе были использованы 2 вида моноклональных антител: 11F3, способные распознавать HBsAg дикого типа, но не HBsAg с мутацией G145R, а также антитела H2, взаимодействующие с мутантным вариантом HBsAg G145R. В качестве вторичных антител использовали конъюгат антимишинных антител с коллоидным золотом с размером частиц 10 нм (AlexaFluor 488, «Invitrogen», США). Инкубацию с антителами проводили в течение 30 мин при 37 °С, после чего препараты были отмыты фосфатно-солевым буфером и контрастированы 1% водным раствором уранилацетата.

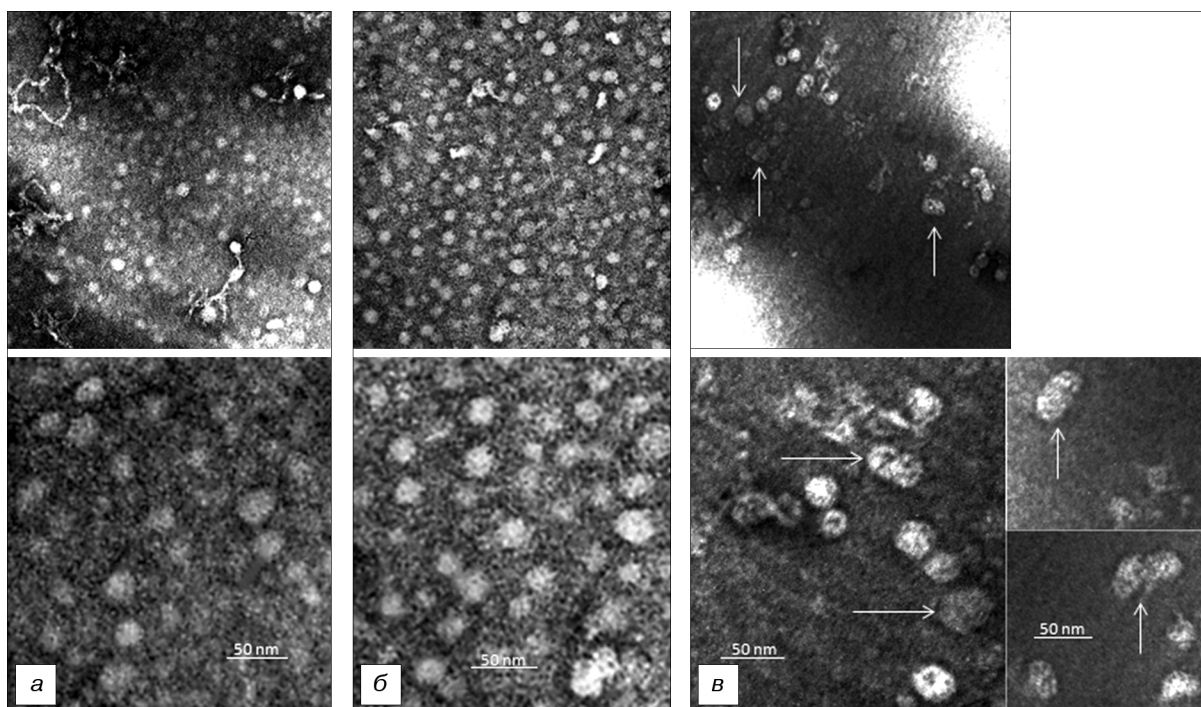


Рис. 3. Электронные микрофотографии (метод негативного контрастирования): а — ВГВ дикого типа; б — ВГВ с мутацией S143L; в — ВГВ с мутацией G145R; ↑ — овальные вирусные частицы.

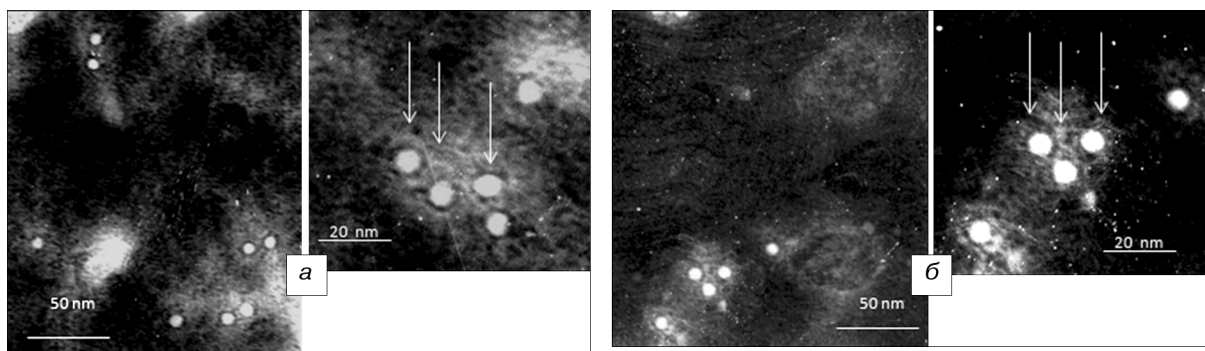


Рис. 4. Электронная микрофотография (негатив) иммунной метки ВГВ дикого типа (а) и ВГВ с мутацией G145R (б) с использованием первичных моноклональных антител 11F3 и вторичных антител, конъюгированных с золотом (размер наночастиц золота — 10 нм); ↓ — сферические вирусные частицы.

Кроме того, реакция иммунометки проводилась на неоконтрастированных ультратонких срезах с использованием вышеперечисленных первичных и вторичных антител [25, 26]. Анализ препаратов проводили с помощью электронного микроскопа JEM 100B («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

### Результаты

В очищенных препаратах вирусов, полученных ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы, наблюдалось существенное отличие морфологии вирусных частиц мутантного G145R-варианта ВГВ от ВГВ дикого типа и ВГВ с мутацией S143L.

При исследовании ультраструктуры ВГВ, несущего мутацию S143L, и ВГВ дикого типа не было установлено существенных различий. Обнаружены относительно крупные частицы размером около 40 нм и мелкие частицы — около 20 нм (рис. 1, а, б), что согласуется с классическими представлениями о морфологии ВГВ. Напротив, при исследовании ультраструктуры изолята ВГВ с мутацией G145R помимо частиц классических размеров и форм в больших количествах обнаружены крупные овальные частицы размером более 100 нм (рис. 1, в). Принадлежность выявленных крупных овальных частиц к мутанту G145R доказывается результатами иммуноэлектронной микроскопии (рис. 2), где видно, что моноклональные антитела H2, выявляющие HBsAg с мутацией G145R, реагируют именно с такими частицами. Поскольку методика выделения вируса для всех сывороточных образцов была одинаковой, можно предположить, что наблюдаемые морфологические различия связаны с природой поверхностного антигена. Этот вывод представляется справедливым, несмотря на возможные артефакты, связанные с манипуляциями при очистке вируса.

Результаты, полученные при морфологическом изучении вирусов в их нативном состоянии в исходных сыворотках, в целом согласовывались с результатами, полученными при исследовании очищенных вариантов ВГВ вирусов гепатита В, хотя между ними были обнаружены различия в размерах вирусных частиц.

В препарате нативной сыворотки, содержащей HBsAg дикого типа, выявлялись сферические, овальные частицы размером 30—50 нм и частицы Дейна (рис. 3, а). В препаратах, содержащих вирус с мутацией S143L, обнаруживались такие же морфологические варианты вирусных частиц (рис. 3, б). В препаратах ВГВ с мутацией G145R также обнаружены сходные сферические части-

цы, но в то же время выявлены более крупные овальные частицы размером 60—70 нм, которые отсутствовали в препаратах дикого типа и с мутацией S143L (рис. 3, в).

При проведении реакции иммунометки с антителами 11F3 к дикому типу ВГВ метка была обнаружена на сферических частицах во всех препаратах вируса и не выявлялась на овальных частицах в препаратах мутанта G145R (рис. 4), которые позитивно метились только антителами H2 (рис. 5).

Исследования рекомбинантных HBsAg с мутацией G145R показали, что формирование субвирусных частиц зависит от условий экспрессии и очистки белка. Так, в образце ESC-15 были обнаружены частицы размером 20—30 нм округлой и овальной формы. Форма некоторых частиц напоминала прямоугольники. Ободок частиц имел низкую электронную плотность и относительно более темный центр при окраске 1% раствором молибдата аммония (рис. 6) и 1% раствором уранилацетата. Встречались в небольшом количестве более крупные частицы размером 50 нм (см. рис. 6). В отличие от препарата ESC-15 в препарате ESC-17 подобные структуры не выявлялись. Препарат представлял собой скопление мелкозернистых масс высокой, средней и низкой электронной плотности (рис. 7).

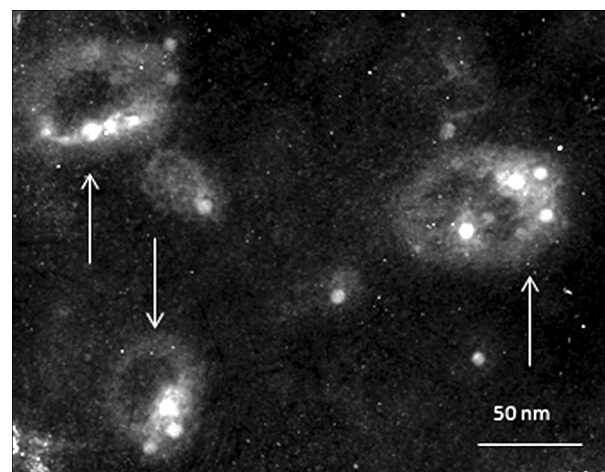


Рис. 5. Электронная микрофотография (негатив) иммунной метки ВГВ с мутацией G145R с использованием первичных моноклональных антител H2 и вторичных антител, конъюгированных с золотом (размер наночастиц золота — 10 нм); ↑ — овальные вирусные частицы.

### Обсуждение

Классические представления о морфологических типах ВГВ, согласно которым вирус ассоциируется с частицами Дейна 42—47 нм, сферическими субвирусными частицами 20—22 нм и филаментами диаметром 22 нм, в последнее десятилетие стали пересматриваться. Имеются сообщения о морфологической вариабельности ВГВ. Еще D.S. Dane и соавт. [4] обнаружили ВГВ в форме «головастика» с головой около 42 нм и хвостом 22 нм в диаметре с длиной 120 нм. В исследованиях M. Kaito и соавт. [6], проведенных как с клеточными линиями, так и с сыворотками крови пациентов, были обнаружены морфологические варианты ВГВ в виде «кобры» и «рога», причем в сыворотке соотношение классических частиц Дейна, кобро- и рогоподобных частиц составляло 5:4:1. После ультрацентрифугирования последние варианты полностью исчезали, оставались только частицы

Дейна, сферические частицы и микрофиламенты. Авторы предполагают, что первичными репликативными формами ВГВ являются именно кобро- и рогоподобные частицы [6]. В работе S. Seitz и соавт. [1] методом криоэлектронной микроскопии было идентифицировано 2 основных морфологических фенотипа, «компактные» и «рыхлые», с нуклеокапсидами в различных конформациях. Также были обнаружены промежуточные формы. Предположительно часть морфологических форм ВГВ связана со структурными особенностями его упаковки в виде упорядоченной решетки, отличающими этот вирус от других оболочечных вирусов [27].

Несмотря на довольно интенсивные исследования ультраструктуры ВГВ дикого типа, до сих пор отсутствуют публикации о морфологическом «портрете» эскейп-мутантов ВГВ, содержащих замены в S-гене HBsAg, хотя предполагается, что для морфообразующе-

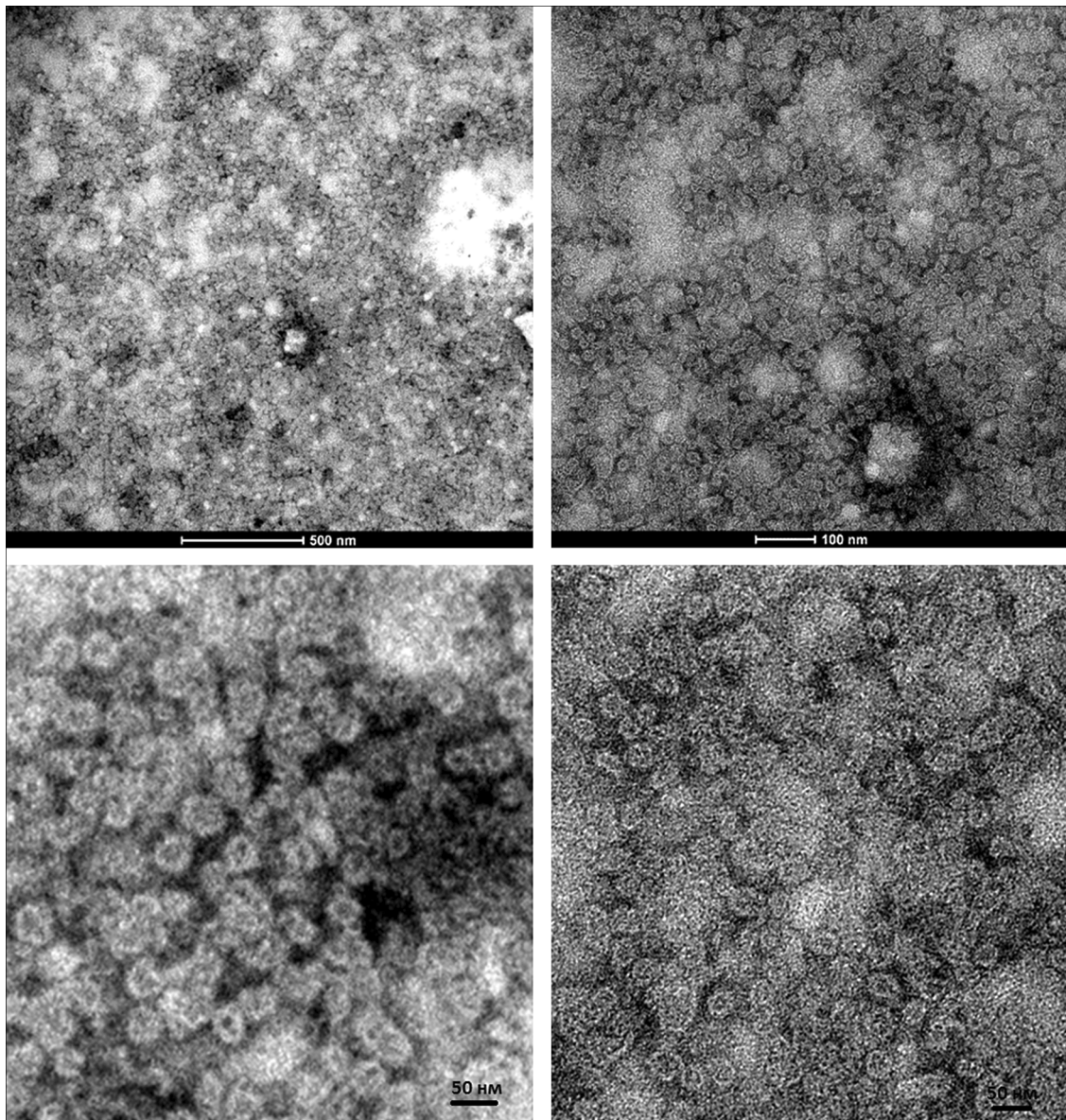


Рис. 6. Исследование рекомбинантного HBsAg ESC-15 с мутацией G145R методом негативного контрастирования 1% водным раствором молибдата аммония.

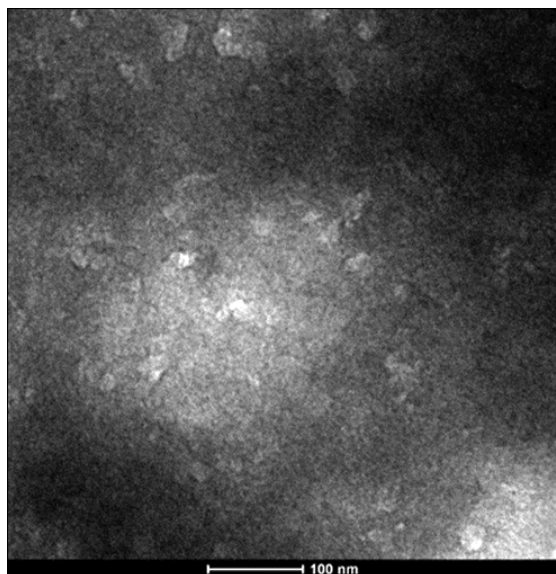
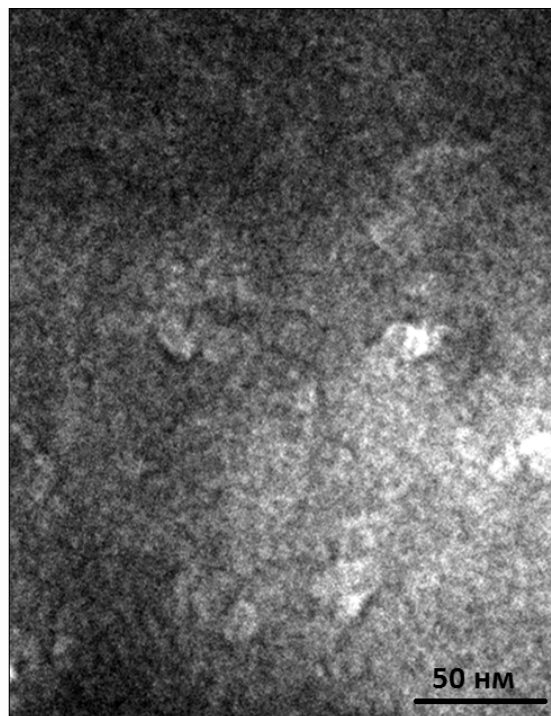


Рис. 7. Исследование рекомбинантного HBsAg ESC-17 с мутацией G145R методом негативного контрастирования 1% водным раствором молибдата аммония. При большом увеличении обнаружены мелкозернистые массы.



го взаимодействия HBsAg с HBcAg в вирионах важен не только Pre-S1, но и S-район [10], причем именно двойное взаимодействие между капсидом и обоими S- и Pre-S1 доменами требуется для морфогенеза вируса [9]. Так, было показано, что в L-белке существует 2 разных сайта, локализованных между 24-м и 191-м аминокислотными остатками (а. о.), а также между 191-м и 322-м а. о., действующих синергически для обеспечения высокой аффинности антител к HBcAg, причем в этом взаимодействии наиболее важную роль играет Arg92 (R92) [10]. Кроме R92, в классических частицах Дейна с HBcAg могут также взаимодействовать R88 и R102 Pre-S1 (для субтипа ауw). Все эти 3 аргинина способны образовывать связь с E77 и D78 а. о. в HBcAg [1, 8]. В то же время иммунопреципитация С-концевых делеционных мутантов показала, что Pre-S-регионы сами по себе недостаточны для эффективной ассоциации с HBcAg. Для формирования лучшего докинг-сайта для HBcAg требуется дополнительно 28 а. о. в S-регионе, особенно остатки 21—26 S-HBsAg в предполагаемой гидрофобной спирали I, однако роль пептида 21—26 а. о. S-HBsAg не была доказана [10]. В работе [9] для связывания HBcAg была показана важность другого региона S-HBsAg, располагающегося в I цитозольной петле S-белка, включающего 56—80 а. о. S-HBsAg (примерно соответствующие 219—243 а. о. от N-конца Pre-S1), содержащего кластер из трех остатков аргинина (R73, R78 и R79 S-HBsAg), которые могут опосредовать взаимодействие с отрицательно заряженными E77 и D78 а. о. в HBcAg [1, 9, 28]. Некоторые экспериментальные данные позволяли предположить, что во взаимодействии с HBcAg, возможно, способна вовлекаться гидрофильная петля между остатками 263 и 322 в L-белке (между спиралями II и III), что соответствует приблизительно области 100—159 а. о. в S-HBsAg, т. е. α-детерминанта [10].

Следует учитывать, что особенностью замены G145R в S-HBsAg является появление дополнительного аргинина,

который гипотетически может связываться аминокислотными остатками E77 и D78 в HBcAg и тем самым нарушать обычное формирование вирусных частиц. Это становится особенно интересным, если учесть недавно опубликованные результаты компьютерного моделирования структуры HBsAg, показавшие, что происходящая перестройка α-детерминанты HBsAg изменяет ориентацию трансмембранных сегментов, т. е. изменяет локализацию мутантного HBsAg в липидном слое [3].

То, что мутация G145R может нарушать классическое формирование вирусных частиц, косвенно было показано в работе [29], в которой сравнивали продукцию вирусных частиц после трансфекции клеток гепатомы человека рекомбинантными вирусами дикого типа и несущего мутацию G145R по их продукции и стабильности. Стабильность экспрессированных вирусных частиц оценивали по влиянию детергента NP-40, который разрушает оболочку частиц, зависящую от взаимодействий белок/липид и белок/белок. Оказалось, что разрушение оболочки носило дозозависимый характер. При этом в самой большой дозе детергента число сохранившихся частиц дикого типа составило 10%, тогда как мутанта — лишь 1% [29]. Кроме того, авторы показали, что после трансфекции мутанта G145R количество выходящих в супернатант поверхностных белков уменьшалось до 65—70% по сравнению с диким типом, причем значительное угнетение секреции наблюдалось только для L-белка, тогда как уровень S-белка оставался неизменным. Полученный результат был подтвержден с помощью ИФА и иммуноблоттинга. Основываясь на факте предпочтительного угнетения секреции L-белка, авторы предположили, что мутация G145R может по-разному влиять на секрецию сферических частиц, содержащих только S-белок, а также на вирионы и филаменты, содержащие как S-белок, так и L-белок. В частности, мутация G145R может интерферировать с правильной упаковкой Core, нарушая таким образом предпочтительно



морфогенез и секрецию вирионов ВГВ, но не пустых субвирусных частиц [29].

Проведенные нами с помощью трансмиссионной электронной микроскопии исследования выявили в препарате очищенного ВГВ с мутацией G145R и в исходной сыворотке большую гетерогенность морфологических форм вируса, в том числе структуры необычной овальной формы. Размер овальных частиц в препарате очищенного вируса составил 100—200 нм, а в исходной сыворотке — 60—70 нм. При этом выявлялись также сферические частицы. В отличие от ВГВ с мутацией G145R в нативной сыворотке, содержащей ВГВ дикого типа и ВГВ с мутацией S143L, а также в препаратах очищенных из них вирусов подобные частицы не обнаруживались. В нативной сыворотке выявлялись сферические и овальные частицы размером 30—50 нм, частицы Дейна. Аналогичные результаты были получены и с очищенным вирусом. Картина, наблюдавшаяся при исследовании ультраструктуры ВГВ, несущего мутацию S143L, практически не отличалась от картины, наблюдаемой с ВГВ дикого типа. На поверхности всех гетерогенных форм ВГВ, выделенных из мутантного изолята G145R, были представлены эпитопы, распознаваемые моноклональными антителами H2, реагирующими в ИФА с мутантом G145R с не меньшей активностью, чем с HBsAg дикого типа, но не выявлялись антителами 11F3, практически не реагирующие с мутантом G145R в ИФА. Эти результаты подтверждают, что обнаруженные нами в препаратах необычные вирусные частицы связаны именно с мутацией G145R. Это находится в соответствии с гипотезой о влиянии замены G145R на морфогенез ВГВ.

Тем не менее в значительной степени в образцах очищенного вируса наблюдалось сохранение лишь контуров частиц и отсутствие хорошей сохранности деталей строения ДНК и капсульных белков. Это может являться как результатом воздействия факторов, возникших в процессе очистки вирусных частиц, так и повышенной нестабильностью оболочки самого вируса в случае наличия в нем мутации G145R.

Полученные нами результаты согласуются с данными о наличии морфологической гетерогенности ВГВ, а также с результатами экспериментов, посвященных нарушенной секреции и стабильности ВГВ с мутацией G145R, показанных методами ИФА и иммуноблоттинга [29].

Мы также установили, что формирование субвирусных частиц при экспрессии рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R очень сильно зависит от условий экспрессии и очистки белка. Морфологические структуры, образуемые при этом рекомбинантным белком, могут варьировать от четко сформированных круглых и овальных субвирусных частиц размером 20—50 нм до практически неструктурированных мелкозернистых агрегатов. Однако это может являться не только следствием условий получения мутантного белка, но и присущими ему свойствами, поскольку для рекомбинантного HBsAg дикого типа не было показано подобной зависимости.

В исследовании *in silico* [3] было показано, что при мутации G145R не только возникает новая  $\beta$ -складка, но и утрачивается часть  $\alpha$ -спиральной структуры. В то же время, согласно общепринятому мнению,  $\beta$ -складки играют ключевую роль в агрегации белков. Таким образом, в соответствии с этими данными мутация G145R может увеличивать жесткость, компактность и агрегационный потенциал  $\alpha$ -детерминанты, что влияет на ее

иммуногенность и секрецию [3]. Полученные нами экспериментальные данные о морфологической гетерогенности мутанта G145R, обнаружении существенно более крупных вирусоподобных и субвирусных частиц в целом согласуются с этими данными. Вероятно также, что предполагаемая вовлеченность области 100—159 а. о. в S-HBsAg  $\alpha$ -детерминанты во взаимодействии с HBcAg [10] в случае мутанта G145R имеет место или даже усиливается за счет изменения трансмембранной топологии HBsAg [3] и возможного взаимодействия G145R с отрицательно заряженными аминокислотными остатками белка core.

### Заключение

Впервые получены прямые данные о влиянии мутации G145R в отличие от мутации S143L на морфологические свойства ВГВ. Структурные изменения в S-доме белков оболочки ВГВ, вызванные эскейп-мутацией G145R, влияют не только на иммуногенные и антигенные свойства HBsAg, но и на морфогенез вирионов и субвирусных частиц. Возможно, это происходит за счет изменения мембранной топологии белка, в результате чего G145R приобретает способность взаимодействовать с E77 и D78 а. о. в HBcAg, а также за счет возрастания агрегационного потенциала мутантного G145R HBsAg.

**Благодарности.** Авторы статьи выражают благодарность безвременно ушедшим сотрудникам ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Третьякову О.Ю., Диденко Л.В. и Кост Е.А. за неоценимую помощь в экспериментальной работе.

**Финансирование.** Работа была выполнена при финансовой поддержке ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва, Россия.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—19, 23—29 см. REFERENCES)

20. Баженов А.И., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Хац Ю.С., Годков М.А. и др. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у хронических носителей вируса гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (6): 30—7.
21. Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., Хац Ю.С. и др. Сравнительная оценка активности анти-HBs, индуцированных естественным путем или вакцинацией, в отношении различных вариантов HBsAg. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2012; (2): 76—81.
22. Крымский М.А., Борисов И.А., Яковлев М.С., Агафонов М.О., Тер-Аванесян М.Д., Суслов А.П. и др. Рекомбинантный штамм дрожжей *Hansenula polymorpha* — продуцент мутантного поверхностного антигена вируса гепатита В (варианты). Патент РФ № 2586513 С1; 2016.

### REFERENCES

1. Seitz S., Urban S., Antoni C., Böttcher B. Cryo-electron microscopy of hepatitis B virions reveals variability in envelope capsid interactions. *EMBO J*. 2007; 26(18): 4160—7.
2. Zlotnick A., Venkatakrishnan B., Tan Z., Lewellyn E., Turner W., Francis S. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. *Antiviral Res*. 2015; 121: 82—93.
3. Rezaee R., Poorebrahim M., Najafi S., Sadeghi S., Pourdast A., Alavian S.M. et al. Impacts of the G145R Mutation on the Structure and Immunogenic Activity of the Hepatitis B Surface Antigen: A Computational Analysis. *Hepat. Mon*. 2016; 16(7): e39097.
4. Dane D.S., Cameron C.H., Briggs N.M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. 1970; 1(7649): 695—708.

5. Gilbert R.J., Beales L., Blond D., Simon M.N., Lin B.Y., Chisari F.V. et al. Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(41): 14783—8.
6. Kaito M., Ohba H., Chiba J., Kohara M., Tanaka H., Fujita N. et al. The ultrastructural morphology of native hepatitis B virus. *Med. Mol. Morphol.* 2006; 39(3): 136—45.
7. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(1): 65—73.
8. Bruss V. A short linear sequence in the pre-S domain of the large hepatitis B virus envelope protein required for virion formation. *J. Virol.* 1997; 71(12): 9350—7.
9. Poisson F., Severac A., Hourieux C., Coudeau A., Roingard P. Both pre-S1 and S domains of hepatitis B virus envelope proteins interact with the core particle. *Virology.* 1997; 228(1): 115—120.
10. Tan W.S., Dyson M.R., Murray K. Two distinct segments of the hepatitis B virus surface contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J. Mol. Biol.* 1999; 286(3): 797—808.
11. Khan N., Guarnieri M., Ahn S.H., Li J., Zhou Y., Bang G. et al. Modulation of hepatitis B virus secretion by naturally occurring mutations in the S gene. *J. Virol.* 2004; 78(7): 3262—70.
12. Greiner V.J., Egelé C., Oncul S., Ronzon F., Manin C., Klymchenko A. et al. Characterization of the lipid and protein organization in HBsAg viral particles by steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochimie.* 2010; 92(8): 994—1002.
13. Gavilanes F., Gomez-Gutierrez J., Aracil M., Gonzalez-Ros J.M., Ferragut J.A., Guerrero E. et al. Hepatitis B surface antigen. Role of lipids in maintaining the structural and antigenic properties of protein components. *Biochem. J.* 1990; 265(3): 857—64.
14. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet.* 1990; 336(8711): 325—9.
15. Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutant. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 193—5.
16. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102—12.
17. Ben-Porath E., Wands J.R., Marciniak R.A., Wong M.A., Hornstein L., Ryder R. et al. Structural analysis of hepatitis B surface antigen by monoclonal antibodies. *J. Clin. Invest.* 1985; 76(4): 1338—47.
18. Waters J.A., Kennedy M., Voet P., Hauser P., Petre J., Carman W. et al. Loss of the Common «A» Determinant of Hepatitis B Surface Antigen by a Vaccine-induced Escape Mutant. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2543—7.
19. Roohi A., Khoshnoodi J., Zarnani A.H., Shokri F. Epitope mapping of recombinant hepatitis B surface antigen by murine monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt).* 2005; 24(2): 71—7.
20. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Khats Yu.S., Godkov M.A. et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2007; (6): 30—7. (in Russian)
21. Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., Khats Yu.S. et al. The comparative estimation of anti-HBs activity against native and recombinant type HBsAg. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2012; (2): 76—81. (in Russian)
22. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Agafonov M.O., Ter-Avanesyan M.D., Suslov A.P. et al. Recombinant Hansenula polymorpha yeast strain — producer of mutant hepatitis B virus surface antigen (versions). Patent RF № 2586513 C1; 2016. (in Russian)
23. Ito S., Karnovsky M.J. Formaldehyde/glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds. *J. Cell Biol.* 1968; 39: 168a-9a.
24. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1963; 17(2): 208—12.
25. Newman G.R., Jasani B., Williams E.D. A simple post-embedding system for the rapid demonstration of tissue antigens under the electron microscope. *Histochem. J.* 1983; 15(6): 543—55.
26. Bendayan M., Zollinger M. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. *J. Histochem. Cytochem.* 1983; 31(1): 101—9.
27. Dryden K.A., Wieland S.F., Witten-Bauer C., Gerin J.L., Chisari F.V., Yeager M. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol. Cell.* 2006; 22: 843—50.
28. Böttcher B., Tsuji N., Takahashi H., Dyson M.R., Zhao S., Crowther R.A. et al. Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection. *EMBO J.* 1998; 17(23): 6839—45.
29. Kalinina T., Iwanski A., Will H., Sterneck M. Deficiency in virion secretion and decreased stability of the hepatitis B virus immune escape mutant G145R. *Hepatology.* 2003; 38(5): 1274—81.

Поступила 30.01.17

Принята в печать 28.02.17

© СМЕРНОВ В.С., ПЕТЛЕНКО С.В., 2017  
УДК 615.281.8.03:616.98:578.825.11|.076.9

Смирнов В.С., Петленко С.В.

## ВЛИЯНИЕ ИМИХИМОДА НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРФЕРОНА И РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСАМИ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «ЦИТОМЕД», 191023, г. Санкт-Петербург

Производное имидазола — имихимод — относится к иммуномодуляторам, действующим на врожденную и адаптивную системы иммунитета. Целью исследований было изучение динамики синтеза сывороточного интерферона (ИФН) при разных режимах дозирования и оценка противовирусной активности воспроизведенного в России препарата имихимода в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) при его подкожном применении мышам и интравагинальном — морским свинкам. **Результаты.** При подкожном введении имихимода мышам в дозах 0,5; 1 и 10 мг/кг наблюдали дозозависимое увеличение выработки ИФН, пик концентрации которых достигался через 4 ч после введения. Применение имихимода защищало лабораторных животных (мышей) от внутрибрюшинного заражения ВПГ в дозах 3,2 и 32 ЛД<sub>50</sub>. При этом максимальный защитный эффект (100% выживаемость) достигался при введении имихимода в дозе 100 мг/кг ежедневно в течение 5 дней до заражения. Топическое применение имихимода в виде 5% крема по сравнению с контрольной группой сопровождалось достоверно более быстрой и полной элиминацией вируса при интравагинальном заражении морских свинок ВПГ 2-го типа. **Заключение.** Воспроизведенный аналог имихимода обладает иммуномодулирующими и противовирусными свойствами, выявленными у первоначально синтезированного химического соединения.

Ключевые слова: имихимод; вирус простого герпеса; морские свинки; мыши.

**Для корреспонденции:** Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, руководитель научно-исследовательского отдела ЗАО МБНПК «Цитомед». 191023, г. Санкт-Петербург. E-mail: vssmi@mail.ru