

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.371:578.891.074

Коноплева М.В.¹, Борисова В.Н.², Соколова М.В.¹, Фельдшерова А.А.¹, Крымский М.А.²,
Семенов Т.А.¹, Сулов А.П.¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ И НАТИВНЫХ HBs-АНТИГЕНОВ С МУТАЦИЕЙ G145R И ОЦЕНКА ИХ ИММУНОГЕННОСТИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;
²ЗАО НПК «Комбиотех», 117997, г. Москва

Введение. Одной из важных причин распространения вируса гепатита В (ВГВ) в условиях вакцинального прессинга является возникновение мутаций ускользания (эскейп-мутаций). К наиболее выраженным изменениям серологических свойств ВГВ приводит широко распространенная мутация G145R в S-гене. В результате HBsAg модифицируется столь значительно, что практически не распознается большинством анти-HBs. По иммуногенным свойствам мутант G145R также отличается от HBsAg дикого типа. В настоящее время признана актуальность совершенствования вакцины против гепатита В с учетом мутантных вариантов вируса.

Цель работы — сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природных и рекомбинантных мутантов G145R и оценка перспективы создания антигенного компонента вакцины против гепатита В с мутацией G145R в HBsAg.

Методы. Антигенные свойства рекомбинантных HBsAg с мутацией G145R сравнивали между собой и с нативными мутантами методом серологического портретирования. Отобранным рекомбинантным антигеном иммунизировали мышей BALB/c и овец по различным схемам. В сыворотке крови иммунизированных животных определяли титры антител, специфичных к HBsAg дикого или мутантного G145R типа.

Результаты. Обнаружено, что не все рекомбинантные варианты HBsAg с заменой G145R обладают теми же антигенными свойствами, как нативный HBsAg с аналогичной мутацией. Отобранный по принципу антигенного сходства рекомбинантный HBsAg обладал иммуногенностью у мышей и овец, вызывая образование антител, реагирующих с нативным HBsAg дикого и мутантного типа. Показано, что мутантный антиген менее иммуногенен, требует больших доз и времени для развития иммунного ответа, однако он способен вызывать образование антител на уровне, сопоставимом с таковым для антигена дикого типа.

Заключение. Предварительная селекция рекомбинантных HBsAg, содержащих мутацию G145R, по антигенным и иммуногенным свойствам близких нативному аналогу, дает основу для создания специфического компонента вакцины против гепатита В с эскейп-мутацией G145R в HBsAg.

Ключевые слова: мутация; S-ген; G145R; вирус гепатита В; рекомбинантный и нативный HBsAg; иммунизация.

Для цитирования: Коноплева М.В., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семенов Т.А., Сулов А.П. Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 179-186.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>

Konopleva M.V.¹, Borisova V.N.², Sokolova M.V.¹, Feldsherova A.A.¹, Krymskij M.A.², Semenenko T.A.¹,
Suslov A.P.¹

A COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ANTIGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT AND NATIVE HBs-ANTIGENS WITH G145R MUTATION AND EVALUATION OF THEIR IMMUNOGENICITY

¹Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

²ZAO NPK Combiotech, Moscow, 117997, Russian Federation

Background: One of the important reasons for spreading of hepatitis B virus (HBV) under conditions of vaccine pressure is emergence of escape mutations. Prevalent G145R mutation in S-gene leads to the most expressed changes of serological properties of HBV. Consequently, HBsAg is modified so thoroughly that it cannot be recognized by the majority of anti-HBs. Mutant G145R also differs from a wild type HBsAg by its immunogenic properties. At present, the relevance of enhancement of hepatitis B vaccine in view of mutant virus variants has been recognized.

Objectives: a comparative study of antigenic and immunogenic properties of native and recombinant G145R mutants and an estimation of possibility for developing antigenic component of hepatitis B vaccine with G145R mutation in HBsAg.

Methods: antigenic properties of recombinant HBsAg with G145R mutation were compared with each other and with native mutants by serological fingerprinting method. Then, BALB/c mice and sheep were immunized with selected recombinant antigen under different protocols. Titers of antibodies specific to wild type or mutant G145R type of HBsAg in sera of immunized animals were measured.

Results: it was found that not all the recombinant HBsAg variants with G145R substitution have the same antigenic properties as native HBsAg with similar mutation. Recombinant HBsAg selected according to the principle of

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

antigenic similarity possesses immunogenicity in mice and sheep causing the production of antibodies reacting with native wild and mutant type HBsAg. It was shown that mutant antigen is less immunogenic, requires larger doses and more time for the development of immune response; however, it is capable of causing an antibody level comparable with wild type antigen.

Conclusion: preliminary selection of recombinant HBsAg containing G145R mutation with antigenic and immunogenic properties similar to the native analogue creates the basis for development of a specific component of hepatitis B vaccine with escape mutation G145R in HBsAg.

Key words: *mutation; S-gene; G145R; S143L; HBV; recombinant and native HBsAg; immunization.*

For citation: Konopleva M.V., Borisova V.N., Sokolova M.V., Feldsherova A.A., Krymskij M.A., Semenenko T.A., Suslov A.P. A comparative characteristic of antigenic properties of recombinant and native HBs-antigens with G145R mutation and evaluation of their immunogenicity. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 179-186. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>

For correspondence: Maria V. Konopleva, Cand. Biol. Sci., senior researcher, Laboratory of immunity mediators and effectors, Department of immunology, Federal Research Center of 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>

Borisova V.N., <http://orcid.org/0000-0001-7571-150X>

Sokolova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-2836-8232>

Fel'dsherova A.A., <http://orcid.org/0000-0001-7216-4301>

Krymskij M.A., <http://orcid.org/0000-0003-4603-7354>

Semenenko T.A., <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Suslov A.P., <http://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

Acknowledgements. The authors are grateful to A.I. Bazhenov, Head of the laboratory of clinical immunology of SBHI «N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department» for fruitful collaboration in obtaining and characterization of native isolates of HBV with escape G145R mutation.

This work was funded by the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation (Grant No. 13411.1008799.13.184) and ZAO NPK Combiotech, Moscow, Russian Federation.

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

Received 18 February 2017

Accepted 27 February 2017

Введение

Проблема гепатита В остается актуальной во всем мире, несмотря на наличие эффективных вакцин. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) индуцирует естественный или поствакцинальный гуморальный иммунный ответ, направленный главным образом против «а»-детерминанты HBsAg. Эта детерминанта является частью большого гидрофильного региона HBsAg, располагается между 124-м и 147-м аминокислотными остатками (а. о.), образующими 3 петли, которые удерживаются дисульфидными мостиками, образованными С124 и С137 а. о., а также С139 и С147 а. о. [1]. Данная детерминанта имеет высококонформационную природу и является универсальной, обеспечивая защиту от всех вариантов вируса гепатита В (ВГВ), поэтому коммерческие вакцины против гепатита В включают в качестве иммуногена именно рекомбинантную «а»-детерминанту HBsAg [1].

Массовая вакцинация против гепатита В способствует селекции и распространению мутантных форм ВГВ, ускользающих от вакцинального контроля (эскейп-мутантов). Аминокислотные замены внутри «а»-детерминанты приводят к конформационным изменениям и влияют на антигенность и иммуногенность в различной степени. Например, замена G145R приводит к столь радикальным изменениям, что HBsAg-специфичные протективные антитела практически полностью теряют способность взаимодействовать с мутантным вариантом HBsAg [2—5]. Однако такие структурные изменения не полностью нарушают иммуногенность HBsAg [6]. Инфицирование шимпанзе мутантным изолятом вируса, несущим мутацию G145R, приводит к индукции антительного ответа (анти-HBs) [7].

Антигенные свойства нативного мутанта G145R HBsAg, обнаруженного впервые в 1990 г. [8], были проанализированы с помощью 4 моноклональных антител, связывающихся с синтетическими циклическими пептидами, состоящими из 124—137 и 139—147 а. о. «а»-детерминанты. Эксперименты проводили на 3 рекомбинантных HBsAg (*ay* и *ad* дикого типа и G145R *ay* типа), экспрессированных в дрожжах *S. cerevisiae*,

а также на нативном мутанте. Рекомбинантные HBs-антигены были получены таким образом, чтобы исключить возможные изменения антигенной структуры в процессе очистки [5]. На основании снижения связывающей способности моноклональных антител с HBsAg дикого типа был сделан вывод, что мутация G145R приводит к изменению, нарушающему ряд эпитопов данного района, позволяя, таким образом, мутанту ВГВ ускользать от гуморального иммунного ответа [5].

Изучение взаимодействия анти-HBs из сывороток крови переболевших или вакцинированных людей с мутантным G145R-антигеном показало, что связывание анти-HBs с HBsAg дикого типа полностью ингибировалось рекомбинантными *ay* и *ad*. Напротив, при использовании мутантного G145R HBsAg в сыворотке вакцинированных лиц ингибирования не наблюдалось, а в сыворотке переболевших пациентов наблюдалось незначительное ингибирование [5]. Другие мутации в регионе 145-го а. о. не оказывали такого выраженного воздействия. Показано, что вакцинация людей препаратами, содержащими HBsAg дикого типа, с одинаковой эффективностью индуцировала образование антител как к HBsAg дикого типа, так и к мутанту S143L, но практически не вызывала образования антител к HBsAg, несущему мутацию G145R [9, 10].

Исследование гуморального ответа у мышей BALB/c после иммунизации антигенами вируса, относящимися к субтипам *ay* и *ad* дикого или мутантного G145R *ay*-типа, показало, что варианты HBsAg существенно различаются по иммуногенности и специфичности детерминант [5]. У мышей, иммунизированных антигенами дикого типа, анти-HBs-ответ был более чем в 100 раз выше, чем иммунный ответ, развившийся в случае мутантного антигена после второй иммунизации. При иммунизации субтипом *ay* антител анти-*ay* было в 4 раза больше, чем анти-G145R. Напротив, иммунизация мутантным антигеном вызывала образование почти в 5 раз больше антител, распознающих этот мутантный антиген, чем антител, распознающих *ay* дикого типа [5].

В качестве инструмента для изучения иммуногенности

дикого и мутантного G145R-типа HBsAg (субтипа *adw2*) применяли также генетическую иммунизацию [6]. Было показано, что мутантный HBsAg G145R иммуногенен у мышей BALB/cj (H-2d), так как вызывал нормальный ответ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ-ответ) по отношению к узкому эпитопу H-2Ld, соответствующему 29—38 а. о. HBsAg, и индуцировал у мышей образование специфичных антител. При этом специфичные к G145R-мутанту моноклональные антитела были получены путем комбинирования плазмидной и белковой иммунизации. [6]. В то же время конформационное изменение, вызванное заменой G145R, не просто приводило к снижению иммуногенности, но и создавало новую специфичность. У мутантного HBsAg G145R частично сохранялась способность индуцировать антитела к дикому типу HBsAg. Несколько мышей, иммунизированных плазмидами, экспрессирующими мутантный HBsAg G145R, выработали детектируемые титры анти-HBs. В дополнение к этому одно из полученных моноклональных антител показало кросс-реактивность по отношению к HBsAg дикого и мутантного типа G145R [6].

Замена G145R является одной из наиболее распространенных мутаций ВГВ [11]. Ряд авторов рекомендуют включение в состав вакцин против гепатита В антигенных компонент, дающих защиту от инфекции, вызванной доминирующими мутантами [9, 11, 12]. Кроме того, предлагалось создание мультивалентной вакцины против гепатита В [13]. В мире предпринимались попытки осуществить идею разработки вакцины, защищающей от мутанта G145R [11, 14], однако до сих пор они не были реализованы в полной мере. Одним из возможных препятствий для этого могла быть сложность определения правильности фолдинга рекомбинантного белка и степени его соответствия мутанту G145R, встречающемуся в природных условиях.

Целью данной работы было сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природных и рекомбинантных мутантов G145R, экспрессированных штаммами-продуцентами различной природы, и оценка перспективы создания антигенного компонента поливалентной вакцины против гепатита В при наличии мутации G145R.

Материал и методы

Рекомбинантные HBsAg. В исследованиях использовали рекомбинантные субтипы *adw* и *ayw* HBsAg дикого типа (ЗАО НПК «Комбиотех», Россия) и ряд HBsAg с мутацией G145R: АНВВ203, экспрессированный в *E. coli* (субтип *adw2*, НПО «Диагностические системы», Россия), НBS-878 (субтип *ayw*, «Prospec», Израиль), экспрессированный в дрожжах *P. pastoris*, а также серию антигенов ESC [15] (субтип *ayw2*, ЗАО НПК «Комбиотех», Россия), экспрессированных в дрожжах *H. polymorpha* и очищенных в различных условиях. Чистота антигенных препаратов, определенная методом электрофореза SDS-PAGE с красителем кумасси, составляла более 85%.

Нативные HBsAg. В качестве нативного HBsAg дикого типа использовали препарат очищенного HBsAg субтипа *ay* («ИмБио»). Исходный препарат HBsAg обессоливали на колонке (Pierce, кат. № 89892) методом центрифугирования, стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, концентрацию белка определяли спектрофотометрически, а активность проверяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в тест-системе «Гепастрип В» (ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Россия), используя в качестве стандарта отраслевой стандарт HBsAg (ОСО HBsAg) (42-28-31-00, НПО «Диагностические системы»).

Источником нативного ВГВ с мутацией G145R являлись ранее охарактеризованные нами [16] сыворотки № 1537 (генотип D, субтип *ayw2*), № 111 (генотип D, субтип *adw3*, ENA ERZ377006) и № 2043 (генотип D, субтип *ayw2*, ENA ERZ377011) с вирусной нагрузкой $2,6 \cdot 10^6$, $9 \cdot 10^5$ и $1 \cdot 10^8$ копий/мл соответственно. По данным полногеномного секвенирования

в мутантных вирусах из изолятов № 111 и 2043 таргетная мутация представлена в 99% молекул, гетерогенности нуклеотидов в соответствующих кодонах обнаружено не было (данные не приведены).

Конъюгаты. Поликлональные кроличьи и моноклональные мышинные (11F3, H10, HB4, 10D10, 5H7, 4F5, H2) антитела к HBsAg, а также их конъюгаты с пероксидазой хрена, приготовленные по методу, представленному в работе [17], были получены ранее [16]. Также использовали коммерческие моноклональные конъюгаты NF5 и NE2 («Сорбент», Россия), X7 («Фармакс», Россия).

Кроме того, в работе применяли конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG и IgM мыши с пероксидазой хрена, полученный в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», и конъюгат кроличьих антител, специфичных к IgG, IgA, IgM овцы с пероксидазой хрена («ИМТЕК», кат. № P-RAS Iss).

Метод серологического портретирования. Реактивность антигенных образцов с 11 пероксидазными конъюгатами антител, из которых 10 содержали индивидуальные моноклональные антитела к HBsAg, а одно — кроличьи поликлональные антитела к HBsAg (КАТ), оценивали методом ИФА, используя компоненты тест-системы «Гепастрип» (ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Россия) с заменой конъюгата, содержащегося в этой тест-системе, на исследуемые конъюгаты [16]. Анализ проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе. Оптимальные концентрации для каждого конъюгата подбирали в предварительных опытах с помощью внутрилабораторного стандарта (ВЛС), ститрованного с отраслевым стандартным образцом (ОСО HBsAg, НПО «Диагностические системы»). Оптимальной считалась концентрация конъюгата, при которой оптическая плотность (ОП) в лунках с ВЛС в концентрации 2 нг/мл составляла 0,5—2,5.

Относительную реактивность образцов оценивали по сравнению с соответствующей реактивностью ВЛС. Для этого ввели коэффициент C , равный отношению значения OP_{abc} (OP_{abc} равняется значению ОП в данной лунке за вычетом фона, т. е. значения ОП в лунке с буфером, использованным для разведения образцов), полученного для данного образца с данным конъюгатом ($OP_{abc-КГ}$), к соответствующему значению, полученному для того же образца с конъюгатом, показавшим максимальную реактивность с этим образцом ($OP_{abc-макс}$) ($C = OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс}$).

За относительную реактивность каждого образца с исследованными конъюгатами принимали отношение $C_{обр} / C_{вдс}$, обозначаемое $\varphi_{кр}$ при тестировании каждой «вариантной» сыворотки. Таким образом, реактивность образца вычисляли по формуле:

$$\varphi_{кр} = C_{обр} / C_{вдс} = ((OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс})_{образца} / ((OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс})_{вдс})) \cdot 10^{-3}$$

Реактивность образца с данным конъюгатом считали дефектной, если отношение $\varphi_{кр}$ для этого конъюгата не превышало 100, т. е. активность конъюгата снижалась более чем на два порядка.

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутривенно 1 мл раствора антигена (или смеси антигенов) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с адьювантом, в качестве которого использовали либо $Al(OH)_3$ («SPI Pharma», Aluminum hydroxide gel VAC-20) в концентрации 0,5 мг/мл, либо Poly(I:C) («Sigma», кат. № P-9582-50MG) в концентрации 50 мкг/мл.

В каждой экспериментальной группе было по 5 животных. Мышей 1-й группы иммунизировали смесью рекомбинантных HBsAg *ayw* и *adw* по 1 мкг/мл каждого. Мышей 2-й и 6-й групп иммунизировали смесью антигенов *ayw*, *adw* и ESC, взятых в концентрации по 1 мкг/мл каждого антигена, при этом во 2-й группе в качестве адьюванта использовался $Al(OH)_3$, а в 6-й группе — Poly(I:C). Мышам 3-й группы также вводили смесь антигенов *ayw*, *adw* и ESC с $Al(OH)_3$ в

качестве адьюванта, однако концентрации белков были другими: *aww* и *adw* в дозе 1 мкг/мл, ESC — в дозе 5 мкг/мл. Мышам 4-й и 5-й групп вводили только ESC-антиген в дозах 1 и 5 мкг/мл соответственно с $Al(OH)_3$ в качестве адьюванта. Контрольная группа (7-я) включала 5 интактных мышей.

Через 33 дня после первичной иммунизации животных проводили реиммунизацию, используя для каждой группы мышей те же самые антигены и адьюванты в тех же концентрациях. На 9-й день после реиммунизации у мышей брали кровь, получали сыворотку, разводили ее в 100 раз ФСБ и замораживали до начала тестирования.

Иммунизация овец. Для иммунизации овец использовали животных романовской породы (валухи и ярки) в возрасте 10 мес, клинически здоровых, содержащихся в изолированном стаде.

Иммунизацию проводили отдельно мутантным ESC HBsAg (22 мкг/мл), комбинированной смесью антигенов *aww* + *adw* + ESC (суммарно 30 мкг/мл, в соотношении антигенов 1:1:1), а также контрольной смесью антигенов *aww* + *adw* (суммарно 20 мкг/мл, соотношение антигенов 1:1). Каждым антигеном иммунизировали по два животных.

В качестве примиривания каждому животному вводили 0,5 мл раствора антигена трехкратно (в 0, 7 и 14-й день). Инъекции делали многоточечно внутримышечно. Кровапускание производили перед третьей примиривающей инъекцией и через 7—10 и 21 день после нее. Через 28—30 дней после завершения цикла примиривания проводили реиммунизацию. Для этого каждому животному вводили по 3,5 мл антигена внутримышечно в несколько точек. Кровапускание после реиммунизации производили на 7, 10 и 14-й день. Кровь брали из яремной вены с соблюдением правил асептики. После образования сгустка отделяли сыворотку, центрифугировали, расфасовывали в пробирки по 2—3 мл и хранили при $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Сэндвич-ИФА для выявления HBsAg-специфичных мышинных и овечьих антител. Для выявления мышинных и овечьих антител, специфичных к различным вариантам HBsAg, полученные антисыворотки исследовали индивидуально от каждого животного скрининговым вариантом сэндвич-ИФА. Данный вариант ИФА дает возможность различать антитела, реагирующие с HBsAg дикого типа, или с HBsAg, несущим мутацию G145R [18].

Разведения HBsAg-антигенов для сорбции готовили на ФСБ-Т с азидом натрия. В качестве нативного HBsAg (субтип *aww*) использовали раствор HBsAg «ИмБио» в концентрации 2 мкг/мл, в качестве источника нативного HBsAg с мутацией G145R использовали два образца: сыворотки № 111 (субтип *adw3*) и № 2043 (субтип *aww2*) в разведении 1/100.

В случае выявления специфичных антимышиных антител положительным контролем являлись моноклональные антитела с различной специфичностью по отношению к вариантам HBsAg: антитела 11F3, наиболее активно реагирующие с HBsAg дикого типа, но практически не распознающие HBsAg, несущий мутацию G145R, а также антитела H2, наиболее эффективно реагирующие с HBsAg, несущим мутацию G145R. Растворы контрольных антител готовили на ФСБ-Т с азидом натрия: концентрация антител H2 составляла 200 нг/мл, антител 11F3 — 100 нг/мл. В качестве отрицательного контрольного образца при тестировании мышинных и овечьих антител использовали фон индивидуальных сывороток при применении ФСБ-Т вместо HBsAg.

Постановка реакции состояла из следующих этапов. В лунки планшета с иммобилизованными поликлональными антителами к HBsAg вносили по 100 мкл раствора природного HBsAg («ИмБио», 111 или 2043) либо ФСБ-Т. Инкубировали 1 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$ во влажной камере, после чего отмывали ФСБ-Т 5 раз. Затем вносили тестируемые образцы мышинных или овечьих антисывороток в разведении 1/300 по 100 мкл и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$ во влажной камере, после чего 5-кратно отмывали ФСБ-Т. Далее в лунки отмывали

того тест-планшета вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^\circ\text{C}$ во влажной камере. В случае тестирования мышинных антисывороток использовали конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG и IgM мыши с пероксидазой хрена, в концентрации 0,4 мкг/мл в ФСБ-Т с 20% нормальной кроличьей сывороткой. При тестировании овечьих антисывороток использовали конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG, IgA и IgM овец с пероксидазой хрена, в концентрации 0,8 мкг/мл в ФСБ-Т, содержащем 20% нормальной козьей сыворотки и 1,7% бычьего сывороточного альбумина (БСА). После инкубации с конъюгатом планшеты отмывали с помощью ФСБ-Т 8 раз, затем в лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали 30 мин при $37\text{ }^\circ\text{C}$ во влажной камере. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2М H_2SO_4 и считывали результаты при длине волны 450 нм и дифференцирующей волне 620 нм.

При обработке результатов для получения величины специфической реакции из величины сигнала в лунках с соответствующим HBs-антигеном вычитали «собственный фон» данной конкретной сыворотки в лунках с ФСБ-Т-контролем.

Обработку экспериментальных результатов и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.01.

Результаты

Серологическое портретирование различных вариантов HBsAg. Результаты исследования различных рекомбинантных и природных вариантов HBsAg методом серологического портретирования показали, что рекомбинантные антигены дикого типа *aw* и *ad* распознаются всей панелью конъюгатов (см. таблицу). Это согласуется с понятием об универсальности «а»-детерминанты HBsAg в ВГВ дикого типа.

Серологическое портретирование антигенов с эскейп-мутацией G145R дало неоднородные результаты. Рекомбинантные образцы АНВВ203 и HBs-878 не имели ни одного дефекта распознавания моноклональными конъюгатами, что означает подобие конформации этих рекомбинантных молекул HBsAg дикого типа. Однако все исследованные рекомбинантные антигены серии ESC (субтип HBsAg *aww2*), также содержащие мутацию G145R, имели многочисленные глубокие «провалы» в реактивности с большинством конъюгатов, причем их реакционная способность была почти идентичной таковой нативных HBsAg с той же мутацией (субтипов *aww2* и *adw3*) (см. таблицу).

Тем не менее глубина дефектов распознавания была неодинакова для разных вариантов ESC-антигенов, полученных в разных экспериментальных условиях. Например, нарушения распознавания антигенов ESC-1 и ESC-2 по конъюгату HB4 почти в 100 раз, по конъюгату X7 — в 20 раз меньше, чем у всех трех природных изолятов с мутацией G145R. У этих антигенов нарушения по конъюгатам 11F3 и 10D10 также меньше, чем у нативных мутантных антигенов и других рекомбинантных вариантов из серии ESC. Это позволяет сделать вывод о некотором нарушении правильного фолдинга антигенов ESC-01 и ESC-02, не позволяющем им полностью соответствовать природной конформации мутантного эпитопа G145R. Поэтому такие варианты антигенов нельзя применять при разработке специфических компонентов вакцины. Напротив, серологический портрет антигена ESC-03 наиболее приближен к природному G145R HBsAg из сывороток 1537 и 2043, имеющих тот же субтип (*aww2*), и такой вариант получения специфического антигена, по-видимому, предпочтителен.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при получении рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R условия его экспрессии и очистки играют не менее важную роль, чем замена нуклеотидов в таргетном кодоне, от них зависит правильный фолдинг мутантного антигена.

Другим определяющим фактором для оценки адекватности рекомбинантного антигена природному аналогу и его пригодности для включения в вакцину является исследование иммуногенных свойств.

Определение иммуногенности рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R in vivo на мышах. Иммунизация мышей смесью рекомбинантных HBsAg, относящихся к субтипам *ayw* и *adw* дикого типа (1-я группа), приводила преимущественно к развитию иммунного ответа против нативного HBsAg дикого типа, однако при этом развивался также очень слабый кросс-реактивный ответ на природный мутант G145R (рис. 1).

Добавление к смеси *ayw* + *adw* рекомбинантного ESC-антигена (соотношение антигенов 1:1:1, 2-я группа) способствовало увеличению титра антител, перекрестно реагирующих с природным мутантом G145R, но одновременно снижало титр антител к HBsAg дикого типа. Увеличение в антигенной смеси пропорции ESC-антигена в 5 раз (*ayw*:*adw*:ESC = 1:1:5, 3-я группа) повышало выработку антител к мутанту G145R и при этом еще сильнее снижало уровень антител к дикому типу вируса. Анализ антисывороток мышей 6-й группы, аналогичной 2-й группе, но с использованием в качестве адьюванта Poly(I:C) вместо Al(OH)₃ показал большой разброс среди иммунизированных животных. При этом в целом уровень антител к HBsAg дикого типа в этой группе был несколько ниже, чем во 2-й группе, а уровень антител к природному G145R-мутанту — выше.

Иммунизация мышей только ESC-антигеном в дозе 1 мкг/мл (4-я группа) была самой неэффективной: уровень антител, перекрестно реагирующих с нативным G145R-мутантом, был ниже по сравнению с той же дозой ESC-антигена, но в комбинации с белками *ay* и *ad*. При этом антитела, перекрестно реагирующие с HBsAg дикого типа, у мышей вырабатывались крайне слабо. Однако у мышей 5-й группы, которых иммунизировали только рекомбинантным ESC-антигеном в дозе 5 мкг/мл, были обнаружены антитела, приблизительно одинаково реагирующие как с природным G145R-мутантом,

так и с природным HBsAg дикого типа. В принципе аналогичные данные были получены и в 4-й группе, но в 5-й группе уровень специфического сигнала был значительно выше и поэтому достовернее.

Полученные результаты показали, что ESC-антиген, имеющий серологический портрет, идентичный природному HBsAg с мутацией G145R, имел и сходные с ним иммуногенные свойства, что соответствует данным литературы, согласно которым мутация G145R снижает способность ВГВ к выработке антител против «а»-детерминанты, причем вырабатываемые антитела направлены преимущественно против мутантного HBsAg, сохраняя невысокий уровень перекрестных реакций против вируса дикого типа.

Определение иммуногенности рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R in vivo на овцах. ESC-антиген обладал иммуногенностью не только на мышинной модели, вызывая образование у иммунизированных овец специфических антител, реагирующих с нативным HBsAg дикого и мутантного типа (рис. 2). При этом итоговый иммунный ответ на нативные мутантные G145R-варианты (*ayw* и *adw*), развившийся после реиммунизации антигеном ESC, был намного сильнее, чем при реиммунизации бивалентной антигенной композицией *ayw* + *adw*, а также трехвалентной антигенной композицией *ayw* + *ad* + ESC.

По профилям тестирования специфичности антисывороток в ходе иммунизации овец установлено, что первичный ответ на изолированный ESC-антиген развивался медленнее, чем на другие антигенные варианты, и давал существенно меньший уровень анти-HBsAg-антител. Особенно заметно это проявилось в случае анализа кросс-реакций сывороточных антител с нативным эскейп-антигеном субтипа *adw3* (антиген 111). Несколько меньшую интенсивность взаимодействия мутантспецифических антител с антигеном 111 по сравнению с антигеном 2043 (субтип *ayw2*) можно объяснить не только разницей субтипов, но и тем, что содержание HBsAg в случае изолята 111 было ниже, что можно пред-

Относительная реактивность $\phi_{кт}$ природных и рекомбинантных HBsAg*

Вид HBsAg	Антиген	Относительная реактивность анти-HBsAg-конъюгатов, $\phi_{кт}$										
		11F3	NF5	X7	10D10	H2	H10	4F5	NE2	HB4	5H7	KAT
Рекомбинантный HBsAg, дикий тип	<i>adw</i>	1000	1320	500	930	11960	890	350	890	790	1230	730
	<i>ayw</i>	1230	340	260	400	1590	1210	280	600	600	700	660
Нативный HBsAg с мутацией G145R	111	0,3	714	0,05	0,2	2600	4,7	2,3	0,3	0,4	0,4	200
	1537	0,3	56	0,37	0,5	500	16	56	0,6	0,7	0,9	500
	2043	0,1	143	0,08	0,1	250	33	53	0,3	0,4	0,2	500
Рекомбинантный HBsAg с мутацией G145R	АНВВ 203	333	333	101	167	143	250	167	250	200	2000	2000
	HBS-878	1000	2000	250	250	1000	333	250	1000	1000	3000	1000
	ESC-01	2,3	250	20	7,6	3000	9,1	5,6	0,6	91	1,3	250
	ESC-02	2,3	125	20	7,6	3000	8,8	8,1	0,0	91	0,0	143
	ESC-03	0,0	278	0,0	0,0	3200	16,1	5,3	0,6	0,0	1,3	1000
	ESC-10	0,0	400	0,0	0,0	3200	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	357
	ESC-11	0,0	217	0,0	0,0	3200	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	119
	ESC-12	0,0	164	0,0	0,0	2650	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	164
	ESC-13	0,0	1434	0,0	0,0	1300	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1300
	ESC-15	0,0	358	0,0	0,0	3100	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	351
ESC-16	0,0	423	0,0	0,0	3000	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0	434	
ESC-17	0,0	525	0,0	0,0	3300	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	458	

Примечание. * — дефектом распознавания считаются значения менее 100; темно-серым цветом и жирным шрифтом выделены глубокие дефекты распознавания (диапазон 0—1), менее интенсивным серым цветом и обычным шрифтом выделены дефекты распознавания «средней силы» (диапазон 1—10), светло-серым цветом выделены наименее выраженные дефекты распознавания (диапазон 10—100).

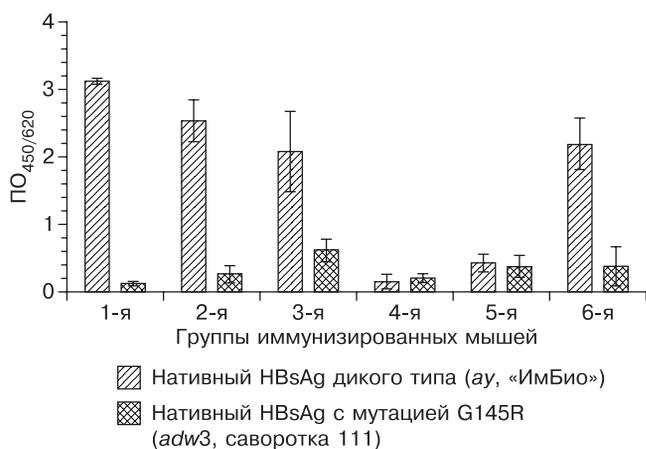


Рис. 1. Определение методом ИФА уровня антител, реагирующих с нативными HBsAg дикого типа (ay, «ИмБио») и мутантного (adw3, сыворотка № 111) G145R-типа, у мышей BALB/c, иммунизированных различными рекомбинантными антигенами. Результаты ИФА представлены за вычетом фона и реакции от контрольной группы интактных мышей.

положить исходя из уровня вирусной нагрузки в образцах. В целом удалось показать, что иммунизация овец смесью HBsAg дикого типа (ayw + adw) стимулирует образование преимущественно антител против дикого типа, а мутантным рекомбинантным — против нативного мутантного G145R-варианта вируса. Полученные данные в целом согласуются с результатами по иммунизации мышей.

Обсуждение

В ряде исследований описаны особые свойства HBsAg с мутацией G145R. В работе J. Waters и соавт. [5] связывание моноклональных антител, специфичных к циклическим пептидам, воспроизводящим две составные части «а»-детерминанты, полностью ингибировалось рекомбинантными антигенами дикого типа ay и ad, но не мутантным G145R HBsAg. Два моноклональных антитела, распознающие пептид 139—147, содержащий 145 а. о., не связывались с мутантным G145R-антигеном. Одно из антител, распознающее циклический пептидный аналог 124—137, также не связывалось с мутантным G145R-антигеном. Другое моноклональное антитело из этой группы связывалось с мутантным антигеном, но в 10 раз большей концентрации. Таким образом, было показано, что моноклональные антитела, использованные в работе J. Waters и соавт., выявляют 4 разных эпитопа и 2 перекрывающихся эпитопа общей «а»-детерминанты, причем все они были изменены у природного и рекомбинантного мутантного антигена [5]. В работе X. Zheng и соавт. [6] одно из моноклональных антител распознавало мутантный HBsAg с заменой G145R, но не с другими, что указывает на особую специфичность мутантного G145R-эпитопа. Это подтверждалось тем, что большинство мутантных HBsAg с единичными аминокислотными заменами распознавалось анти-HBs [6].

Наши исследования подтверждают наличие особой конформации мутантного G145R-эпитопа. Установлено, что с помощью метода серологического портретирования можно определить точный профиль серологических реакций, характерный для этой мутации. Однако не все рекомбинантные антигены, с помощью которых можно воспроизвести природный мутантный вариант эпитопа вирусного антигена, обладали такой способностью. На это прежде всего оказывали влияние условия экспрессии и очистки антигена.

Важность экспериментальных условий для правильного фолдинга рекомбинантных HBsAg была показана ранее и для

дикого типа HBsAg. Так, известно несколько неудачных попыток экспрессировать иммунологически активные HBsAg-частицы в *E. coli*, однако дрожжи *S. cerevisiae* проявили большую способность к экспрессии этого белка [12]. В работе J. Waters и соавт. также учитывали условия очистки целевых белков, обработка рекомбинантных HBsAg мочевиной была исключена [5], поскольку имелись данные, что это соединение и другие хаотропные соли могут нарушить структуру белка HBsAg [19].

Метод серологического портретирования дает возможность дифференцировать мутантные рекомбинантные анти-

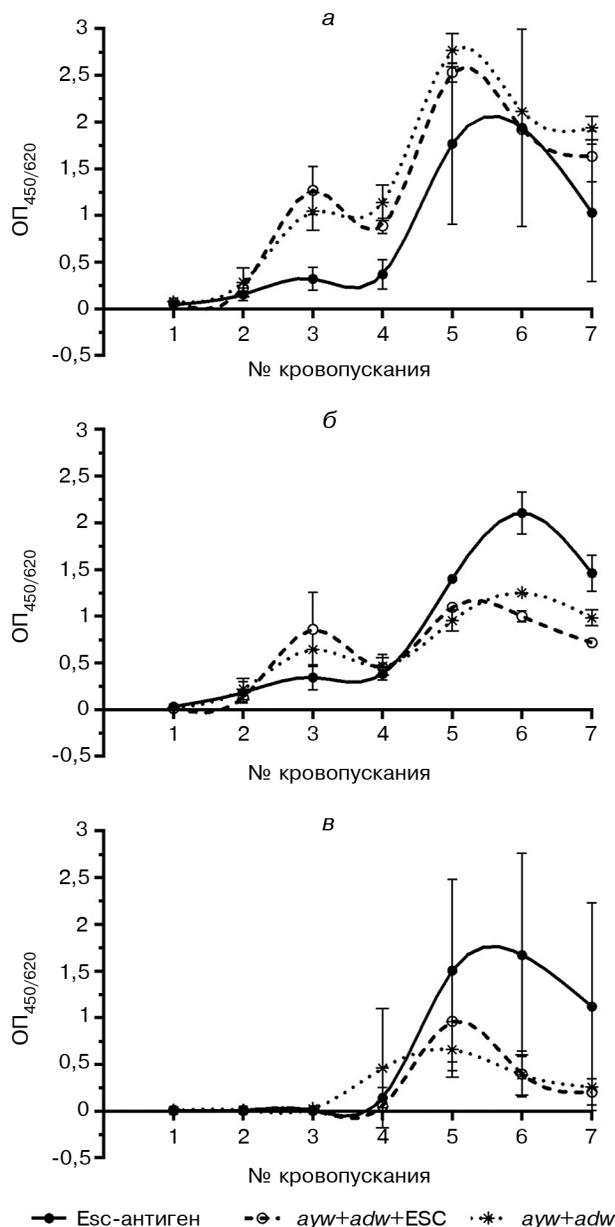


Рис. 2. Определение методом ИФА уровня специфического гуморального ответа у овец, иммунизированных тремя антигенными композициями (ESC-антиген или смесь adw + ayw + ESC или смесь adw + ayw): а — ответ на нативный HBsAg дикого типа субтипа ay («ИмБио»); б — ответ на нативный HBsAg субтипа ayw2 с эскейп-мутацией G145R (сыворотка № 2043); в — ответ на нативный HBsAg субтипа adw3 с эскейп-мутацией G145R (сыворотка № 111).

гены и выбрать из них наиболее близкий природному аналогу, однако для окончательных выводов, кроме него, требуются дополнительные методы, например оценка селектированных антигенов по перекрестным реакциям с использованием сывроток от переболевших и вакцинированных людей, а также оценка их иммуногенности.

Наши результаты, касающиеся оценки иммуногенных свойств ESC-антигена (рекомбинантного HBsAg с эскейп-мутацией G145R), выбранного нами из-за наибольшего сходства с нативным мутантом, согласуются с данными, полученными J. Waters и соавт. [5]. Они показали, что при иммунизации мышей мутант G145R и дикий тип вируса существенно различаются по иммуногенности и специфичности детерминант, причем иммунизация диким вариантом вируса приводит к выработке преимущественно антител против дикого типа, а мутантным — против мутантного типа [5]. Возможность получения кросс-реагирующих антител как при белковой, так и при генетической иммунизации мышей мутантным вариантом HBsAg [5, 6] также подтверждена нашими результатами. Впервые была установлена иммуногенность рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R для овец. При оценке гуморального ответа, развивающегося у овец в ходе нескольких раундов иммунизации, обнаружено, что первичный ответ на изолированный ESC-антиген развивался несколько медленнее, чем на другие антигенные композиции, и приводил к существенно меньшей выработке анти-HBsAg. Особенно заметно это проявилось в случае анализа кросс-реакций сывроточных антител с нативным эскейп-антигеном субтипа *ad*. Однако итоговый иммунный ответ на нативные мутантные G145R-варианты (*ayw* и *adw*) после реиммунизации моноантигеном ESC был намного сильнее, чем при реиммунизации бивалентной антигенной композицией *ayw* + *adw*, а также трехвалентной антигенной композицией *ayw* + *ad* + ESC. Истинность реакций мышиных и овечьих антисывороток с нативными мутантами G145R подтверждается тем, что, по данным полногеномного секвенирования, эти изоляты ВГВ отличались 100% гомогенностью в 145-м кодоне S-HBsAg.

Возможно, в данной серии экспериментов доза ESC-антигена в антигенной композиции и ее соотношение с другими антигенами была не вполне оптимальной. Однако полученные результаты позволяют предположить, что развитие иммунного ответа на HBsAg с мутацией G145R происходит по несколько иному механизму, чем в случае с HBsAg дикого типа. Это требует дополнительных исследований.

Заключение

Создание эффективной вакцины против гепатита В, способной защищать не только от вируса дикого типа, но и от его доминирующего и значимого мутанта G145R, может пойти по пути разработки мультивалентной вакцины, в которой рекомбинантные антигены HBsAg дикого типа, например субтипов *ad* и *ay*, будут сочетаться с мутантным вариантом, адекватно отражающим антигенные и иммуногенные свойства природного ВГВ с мутацией G145R. При этом большую роль будут играть правильно подобранные дозы всех компонентов и, вполне вероятно, особый график иммунизации и/или использования адьюванта.

Благодарности. Авторы статьи выражают благодарность заведующему лабораторией клинической иммунологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ А.И. Баженову за плодотворное сотрудничество при получении и охарактеризовании нативных изолятов ВГВ с HBsAg с эскейп-мутацией G145R.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Минпромторга России (№ 13411.1008799.13.184), а также ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—8, 11—14, 17, 19 см. REFERENCES)

- Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Г.И., Хац Ю.С. и др. Выявление антител к мутантным формам HBsAg у лиц иммунизированных против гепатита В вакцинами разных субтипов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2011; (5): 49-53.
- 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 путём или вакцинацией, в отношении различных вариантов HBsAg. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2012; (2): 76-81.
- 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.
- 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.
- Крымский М.А., Борисов И.А., Яковлев М.С., Мельников В.А., Суслов А.П., Семенов Т.А. и др. Способ оценки уровня антител, специфичных к различным вариантам HBsAg вируса гепатита В. Патент РФ № 2616236С1; 2017.

REFERENCES

- Blum H.E. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11(47): 7391-400.
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102-12.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zheng X., Weinberg K.M., Gehrke R., Isogawa M., Hilkene G., Kemper T., et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology*. 2004; 329: 454-64.
- Ogata N., Zanetti A.R., Yu M., Miller R.H., Purcell R.H. Infectivity and Pathogenicity in Chimpanzees of a Surface Gene Mutant of Hepatitis B Virus that Emerged in a Vaccinated Infant. *J. Infect. Dis.* 1997; 175(3): 511-23.
- 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: 325-9.
- Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsheroва A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina G.I., Khats Yu.S., et al. Detection of Antibodies to HBsAg Mutant Forms in Individuals Immunized of Different Subtypes Hepatitis B Vaccines. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2011; (5): 49-53. (in Russian)
- Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsheroва 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)
- Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutant. *J. Med. Virol.* 1999; 58: 193-5.
- Kniskern P.J. HBsAg escape mutant vaccine. Patent EP № 0 511 855 A1; 1992.
- Kniskern P.J. A multivalent hepatitis B virus vaccine. Patent EP № 0 533 263 A2; 1992.
- Thomas H.C., Carman W.F. Hepatitis B vaccine. Patent US 5.639.637; 1997.
- 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 RU № 2586513 C1.; 2016. (in Russian)
16. 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)
 17. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem*. 1984; 136(2): 451-7.
 18. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Mel'nikov V.A., Suslov A.P., Semenenko T.A., et al. A method of assessing the level of antibodies specific to various HBsAg of HBV. Patent RF № 2616236C1; 2017. (in Russian)
 19. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M., Brass V., Koutsoudakis G., Blum H.E., et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology*. 2009; 50(1): 46-55.

Поступила 18.02.17
Принята в печать 27.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 616.98:578.833.26]-078.33-092.9

Бахвалова В.Н.¹, Панов В.В.¹, Потапова О.Ф.¹, Морозова О.В.^{2,3}

ЦИТОКИНЫ И АНТИТЕЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ДИКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ (RODENTIA) ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» Сибирского отделения РАН, 630091, г. Новосибирск;

² Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, г. Москва

Моделирование персистенции проводили посредством заражения диких грызунов красной полевки *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) и полевой мыши *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), а также лабораторных мышей вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в составе клещевых суспензий с последующей детекцией вируса, антигемагглютининов и вируснейтрализующих антител к ВКЭ, а также экспрессии генов цитокинов в течение 4 мес. При высоких частотах детекции РНК и антигена Е ВКЭ на протяжении всего периода наблюдений патогенный для лабораторных мышей-сосунков вирус выделяли преимущественно до 8 сут после заражения. На поздних стадиях персistentной инфекции (1—4 мес) частота детекции вирусной РНК у красных полевок и лабораторных мышей оставалась высокой, а у полевых мышей значительно снижалась ($p < 0,001$). Вирусные нагрузки у диких грызунов достоверно превышали ($p < 0,001$) значения у лабораторных мышей. Средние частоты экспрессии генов Th2-цитокинов были сходными у *M. rutilus* (50 ± 8,5%) и *A. agrarius* (50 ± 9,6%) на протяжении всего периода, но частоты детекции мРНК цитокинов Th1-пути после активации транскрипции через 2 сут инфекции и последующего возвращения к исходному уровню различались ($p > 0,05$) у двух видов диких грызунов, составляя 22,2 ± 5 и 38,1 ± 7,6% соответственно. При этом доля особей с мРНК интерлейкина-1β была значимо ($p < 0,05$) больше у *A. agrarius*, чем у *M. rutilus*, что, возможно, обуславливало пониженные частоты вирусносительства среди полевых мышей по сравнению с красными полемками. Антигемагглютинины и вируснейтрализующие антитела у диких грызунов были выявлены через 30 сут после заражения и оставались в детектируемых количествах до 4 мес. Таким образом, персистенция ВКЭ у мелких грызунов сопровождалась детекцией патогенного вируса в ранний период, вирусной РНК и антигена Е в течение 4 мес с большими вирусными нагрузками у диких грызунов, превышающими значения у лабораторных мышей. Изменения экспрессии генов провоспалительных цитокинов и наличие вирусспецифических антител свидетельствовали об иммуномодулировании как возможном механизме персистенции.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; красная полевка *Myodes rutilus* (Pallas, 1779); полевая мышь *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771); цитокины; вируснейтрализующие антитела и антигемагглютинины.

Для цитирования: Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Морозова О.В. Цитокины и антитела при экспериментальном заражении диких и лабораторных мелких грызунов (Rodentia) вирусом клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 186-192.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-186-192>

Bakhvalova V.N.¹, Panov V.V.¹, Potapova O.F.¹, Morozova O.V.^{2,3}

CYTOKINES AND ANTIBODIES IN EXPERIMENTAL INFECTION OF WILD AND LABORATORY RODENTS (RODENTIA) WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

³ Federal Research Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russian Federation

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии отдела арбовирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва.
E-mail: omorozova2010@gmail.com