

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 615.371:578.891].012.6.076.9

Пермякова К.Ю.¹, Леснова Е.И.¹, Масалова О.В.¹, Иванов А.В.², Атауллаханов Р.И.³, Куш А.А.¹**ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ДНК-КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ СТРУКТУРНУЮ И НЕСТРУКТУРНУЮ ОБЛАСТИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва, РФ; ²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, РФ; ³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр – «Институт иммунологии» ФМБА России, 115478, Москва, РФ

Создание вакцины против гепатита С – приоритетная задача современной биотехнологии и медицины. Одним из перспективных подходов является разработка ДНК-конструкций, содержащих гены вируса гепатита С (ВГС). Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе иммунного ответа мышей на ДНК-иммунизацию плазмидой рсЕ1-Е2, содержащей гены поверхностных белков ВГС, с иммунным ответом на плазмиду рсNS3-NS5B, включающую гены неструктурной области вируса, и оценке эффективности их совместного введения. Плазмиды вводили мышам DBA внутримышечно 3-кратно. В качестве адъюванта использовался иммуномодулятор Иммуномакс®. Гуморальный иммунный ответ оценивали по активности антител к белкам ВГС методом ИФА. Клеточный ответ изучали по пролиферации лимфоцитов в реакции бласттрансформации, по синтезу и секреции цитокинов в реакциях ELISpot и ИФА. Сравнительный анализ показал, что плазмиды рсЕ1-Е2 и рсNS3-NS5B, введенные с адъювантом по отдельности, индуцировали сходный по интенсивности клеточный ответ, но эффективный гуморальный ответ вырабатывался только на область поверхностных белков. Иммунизация мышей смесью плазмид, кодирующих белки Е1-Е2 и NS3-NS5B ВГС, по сравнению с каждой из этих конструкций по большинству изученных параметров вызывала усиление иммунного ответа. Наблюдался кумулятивный пролиферативный ответ лимфоцитов и формирование IFN-γ-секретирующих клеток как на структурную, так и неструктурную область ВГС. Показана активация синтеза антител, в том числе к эпитопам, индуцирующим антитела с вируснейтрализующими свойствами. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности совместной ДНК-иммунизации генами структурных и неструктурных белков ВГС для формирования эффективного иммунитета против гепатита С.

Ключевые слова: вирус гепатита С; структурные и неструктурные белки; ДНК-иммунизация; иммунный ответ; адъюванты; вакцина.

Для цитирования: Иммунология. 2015; 36(3): 162–167.

Permyakova K.Yu.¹, Lesnova E.I.¹, Masalova O.V.¹, Ivanov A.V.², Ataulakhonov R.I.³, Kushch A.A.¹

IMMUNOGENIC PROPERTIES OF DNA CONSTRUCTIONS CONTAINING STRUCTURAL AND NONSTRUCTURAL REGIONS OF HEPATITIS C VIRUS

¹Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ³Institute of Immunology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Development a vaccine against hepatitis C is a priority of modern biotechnology and medicine. The construction of plasmids containing HCV genes is one of prospective approach to the creation of hepatitis C virus (HCV) vaccine. The aim was to compare immune responses of mice immunized with pcE1-E2 plasmid containing genes encoding HCV structural proteins and with pcNS3-NS5B plasmid carrying genes of HCV nonstructural proteins and to evaluate the effectiveness of immunization with both plasmids. DBA mice were immunized with the plasmids 3 times intramuscularly using the immunomodulator Immunomax® as an adjuvant. The humoral immune response was evaluated by the activity of anti-HCV antibodies in ELISA. Cellular immune response was evaluated by lymphocyte proliferation test in vitro, production and secretion of cytokines using ELISpot and ELISA. The cellular immune responses induced by pcE1-E2 or pcNS3-NS5B were similar, while effective humoral immune response was developed only to envelope proteins. Immunization with a combination of plasmids containing genes of HCV E1-E2 and NS3-NS5B proteins enhanced the immune response by the majority of parameters studied as compared with that developed after the plasmids were used individually. A cumulative lymphocyte proliferation response and formation of IFN-γ-secreting cells both to HCV structural and nonstructural proteins were observed. The activation of antibody production, including antibodies against virus-neutralizing epitopes, was recorded. The results obtained indicate the feasibility of combined immunization with plasmids containing genes of HCV structural and nonstructural proteins to generate efficient immune defense against hepatitis C.

Keywords: hepatitis C virus; structural and nonstructural proteins; DNA immunization; immune response; adjuvants; vaccine.

Citation: Immunologiya. 2015; 36(3): 162–167. (in Russian)

Введение

Около 200 млн человек во всем мире инфицированы вирусом гепатита С (ВГС) и более 1 млн ежегодно умирают от вызываемого им заболевания [1]. Прежде всего это свя-

зано с высокой степенью хронизации инфекции (от 50 до 85% случаев острого гепатита С переходит в хроническую форму), неблагоприятным исходом (у 20–30% больных гепатит С приводит к циррозу печени или гепатоцеллюлярной

Для корреспонденции: Масалова Ольга Владимировна, ol.mas@mail.ru
For correspondence: Masalova Olga Vladimirovna, ol.mas@mail.ru

Таблица 1

Рекомбинантные белки и пептиды, использованные в эксперименте

	Область ВГС					
	E1	E2	NS3	NS4	NS5A	NS5B
Рекомбинантные белки	rE1	rE2	rNS3 1192-1459 rNS3 1027-1229 протеазный домен (протеаза) rNS3 1230-1658 хеликазный домен (хеликаза)	rNS4 1677-1754	rNS5A2212-2313	rNS5B2420-3011
Синтетические пептиды	pE1 289-297 pE1 315-323 pE1 363-371	pE2 405-414 pE2 412-423 pE2 432-443	н/и	pNS4 1693-1707	pNS5A2163-2171	н/и

Примечание. r – рекомбинантные белки, p – пептиды; н/и – не исследовали.

карциноме), малодоступностью лечения (новые препараты прямого противовирусного действия на основе ингибиторов белков ВГС – NS3, NS5A и NS5B, характеризуются высокой стоимостью) [2].

В связи с этим большие надежды возлагают на специфическую профилактику, а именно создание вакцины против гепатита С. Несмотря на многолетние исследования ученых, сконструировать эффективную вакцину до сих пор не удалось. Препятствиями для создания вакцины против гепатита С служат такие факторы, как высокая изменчивость генома ВГС, недостаточная изученность механизмов развития врожденного и адаптивного иммунитета, связанная со способностью вируса избегать иммунный ответ за счет мутаций Т- и В-клеточных эпитопов, блокировка вирусными белками иммунного ответа, отсутствие доступной животной модели [3]. Среди многочисленных экспериментальных подходов для создания вакцин против ВГС перспективными являются разработки, основанные на использовании рекомбинантных белков и их фрагментов – пептидов, представляющих иммунодоминантные В- и Т-клеточные эпитопы, а также участки генома ВГС в составе различных экспрессионных векторов [1, 3, 4].

Вопрос об оптимальной вакцинной композиции пока остается открытым, так как описанные конструкции индуцируют преимущественно либо клеточный иммунный ответ (пептидные, ДНК- и векторные вакцины), либо гуморальный ответ (рекомбинантные белки) [3, 5]. В ряде исследований для создания вакцин используют структурные белки ВГС – белок нуклеокапсида (Core), поверхностные гликопротеины E1 и E2 [6–8], неструктурные белки (NS) NS3, NS4, NS5 [4] или комбинацию отдельных структурных и неструктурных белков [9, 10]. В проведенных ранее исследованиях мы показали эффективность иммунного ответа при иммунизации мышей ДНК-конструкцией pcNS3-NS5B, кодирующей комплекс неструктурных белков NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B [11]. Можно предположить, что сочетание двух ДНК-конструкций, кодирующей структурные поверхностные белки E1 и E2, и конструкции, содержащей комплекс генов неструктурных белков ВГС, будет активировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ.

Целью нашей работы явились сравнение параметров иммунного ответа мышей на ДНК-иммунизацию плазмидой pcE1-E2 с иммунным ответом на плазмиду pcNS3-NS5B и оценка эффективности их совместного введения для выбора вакцинной композиции, индуцирующей клеточные и гуморальные факторы иммунного ответа.

Материал и методы

ДНК-конструкции. На основе экспрессионного вектора pcDNA3.1(+) (Invitrogen, США) были сконструированы плазмиды, кодирующие структурную и неструктурные области генома ВГС. Плазмида pcNS3-NS5B, кодирующая белки NS3, NS4, NS5A и NS5B генотипа 1b, описана ранее [11]. Плазмида pcE1-E2, кодирующая поверхностные белки E1 и

E2, получена на основе российского изолята 274933RU, генотип 1b (GenBank: AF176573.1) [12]. Фрагмент генома ВГС, соответствующий остаткам 192-746 полипротеина, амплифицировали при использовании олигонуклеотидов 5'-ATTAAGCTTGGCCTGGAAGTGAAGTGCACGCTGTC-3' и 5'-ATTGAATTCAGGCCTCAGCTTGAGCTATC-3', полученный продукт расщепляли эндонуклеазами рестрикции *Hind*III и *Eco*RI и клонировали по соответствующим сайтам предварительно расщепленного вектора pcDNA3.1(+). Первичную структуру полученной плазмиды pcE1-E2 подтверждали флуоресцентным секвенированием (ЦКП «Геном»).

Плазмиды наращивали в культуре *E. coli* (штамм XL-1 blue), очищали щелочным методом. Концентрацию очищенной плазмидной ДНК измеряли на спектрофотометре Eppendorf (Германия) при длине волны 260/280 нм.

Трансфекция клеток и иммуоцитохимическое окрашивание. Для определения эффективности экспрессии генов ВГС использована линия клеток гепатокарциномы человека Huh7, трансфицированная плазмидами pcE1-E2 и pcNS3-NS5B. Отрицательным контролем служили клетки, трансфицированные вектором без вставки pcDNA3.1(+). За сутки до трансфекции клетки вносили в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток в 1 мл/лунку на стекла в 24-луночные панели (Nunc, Дания), трансфекцию проводили с помощью сливающего агента TurboFect Transfection Reagent (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Культивирование клеток осуществляли как описано ранее [13]. Через 72 ч стекла клетки фиксировали холодным ацетоном и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием коммерческих моноклональных антител (МКА) к E1 (ab21306) и E2 (ab20852) (Abcam, Великобритания), а также оригинальных МКА к неструктурным белкам, как описано ранее [11]. Вторичными антителами служили поликлональные кроличьи антитела к иммуноглобулинам (Ig) мыши, меченные FITC (Dako, Дания). Анализ окрашивания проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Scope.A1 Carl Zeiss (Германия).

Рекомбинантные белки (r) и синтетические пептиды (p), использованные в работе, представлены в табл. 1. Антигены, содержащие последовательности белков NS3, NS4, NS5A, NS5B, описаны ранее [11]. Коммерческие рекомбинантные белки rE1 (8804) и rE2 (8803) приобретены в ViroStat (США). Пептиды, имитирующие Т-клеточные эпитопы E1 и E2 (pE1 289-297, pE1 315-323, pE1 363-371, pE2 405-414) и В-клеточные эпитопы E2 (pE2 412-423, pE2 432-443), синтезированы в соответствии с последовательностью штамма 274933RU в ООО «Алмабион» (Россия).

Иммунизация. В качестве животной модели были использованы самки мышей линии DBA/2J (H-2^d) в возрасте 6–8 нед (массой 16–18 г) из Центрального питомника лабораторных животных «Андреевка» РАН. Каждая группа состояла из 8–10 животных, которым вводили очищенные ДНК-конструкции в четырехглавую мышцу бедра внутримышечно 3-кратно с 3-недельным интервалом. Группа 1 была иммунизирована

pcE1-E2 (100 мкг/мышь), группа 2 – pcNS3-NS5B (100 мкг/мышь), группа 3 – смесью обеих плазмид (по 100 мкг каждой плазмиды/мышь). В качестве адъюванта использовали препарат Иммуномакс® в концентрации 10 мкг/мышь. Контрольным группам мышей вводили экспрессионный вектор без вставки pcDNA 3.1(+) совместно с адъювантом (группа 4) или физиологический раствор (группа 5). Иммунный ответ оценивали через 9 дней после третьей иммунизации.

Гуморальный ответ. Активность взаимодействия антигенов с антителами из состава ВГС в сыворотках крови мышей определяли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) по стандартной методике, как описано ранее [13]. В качестве конъюгатов применяли антимышинные антитела изотипов IgG₁ и IgG_{2a}, меченные пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). За титр антител принимали обратное разведение, при котором оптическая плотность (ОП) в 2 раза превосходила ОП отрицательного контроля (сыворотки крови мышей контрольных групп).

Клеточный ответ оценивали с помощью комплекса методов:

1. По пролиферации лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), как описано ранее [13]. Индекс стимуляции пролиферации (ИСП) рассчитывали как отношение среднего количества лимфобластов, образовавшихся через 5 дней в ответ на специфические антигены, к среднему количеству лимфобластов в лунках с культуральной средой и контрольным антигеном.

2. По функциональной активности лимфоцитов – секреции цитокинов IFN-γ и IL-2 стимулированными спленоцитами в культуральную жидкость методом ИФА с помощью коммерческих тест-систем (Mabtech, Швеция) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Культуральные жидкости были отобраны через 2,5 сут с начала культивирования. Концентрацию цитокинов определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Чувствительность определения цитокинов составила 5 пг/мл.

3. По количеству клеток, синтезирующих IFN-γ и IL-2, методом ELISpot.

Количество клеток определяли с помощью тест-системы «Dual-Color ELISpot Mouse IFN-γ/IL-2 Kit» (R&D systems, США). Окрашивание клеток проводили в соответствии с инструкцией. Окрашенные пятна («spots») детектировали визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (ЛОМЗ, Россия). Результаты выражали в количестве пятен на 10⁶ клеток.

Статистический анализ данных экспериментов проводили с использованием программы «Statistica 6». Достоверность различий между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента и критерию χ^2 ; различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05. Пороговые значения определяли как величину cut off – среднее значение + 2 стандартных отклонения.

Результаты

Трансфекция. Экспрессию белков ВГС в клетках Huh7, трансфицированных плазмидами, оценивали с помощью метода иммуноцитохимии с использованием специфичных МКА. Для белков E1 и E2 было характерно окрашивание цитоплазмы (результаты не представлены). Белок E1 выявлялся в среднем в 78% клеток, E2 – в 53% клеток. Морфология клеток в опыте не отличалась от таковой в контроле. При иммуноцитохимическом окрашивании неструктурных белков ВГС в клетках, трансфицированных плазмидой pcNS3-NS5B, количество окрашенных клеток варьировало от 10 до 80% в зависимости от использованных МКА, как описано ранее [11].

Гуморальный ответ. Анализ сывороток мышей, иммунизированных ДНК-конструкцией pcE1-E2 (группа 1), показал, что антитела изотипа IgG_{2a} вырабатывались к рекомбинантным белкам gE1 и gE2 в титре 1:500 (табл. 2). Кроме того, зарегистрировано взаимодействие антител изотипа IgG₁ с двумя пептидами из последовательности белка E2 в титре 1:20. При иммунизации ДНК-конструкцией, кодирующей область неструктурных белков – pcNS3-NS5B (группа 2), антитела

Таблица 2

Индукция антител изотипа IgG_{2a} к поверхностным белкам ВГС у мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями

Антиген	Группа 1 – pcE1-E2	Группа 3 – pcE1-E2 + pcNS3-NS5B
gE1	1:500	1:1500
gE2	1:500	1:2500
pE1 289-297	< 1:20	< 1:20
pE1 315-323	< 1:20	< 1:20
pE1 363-371	< 1:20	< 1:20
pE2 405-414	< 1:20	< 1:20
pE2 412-423	< 1:20	1:20*
pE2 432-443	< 1:20	1:20*

Примечание. Представлены среднегеометрические титры антител к соответствующим антигенам в ИФА, выделены положительные значения; * титр антител изотипа IgG₁.

Таблица 3

Пролиферация лимфоцитов мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями pcE1-E2, pcNS3-NS5B и их смесью, индуцированная антигенами *in vitro*

Антиген	Группа 1 – pcE1-E2	Группа 2 – pcNS3-NS5B	Группа 3 – pcE1-E2 + pcNS3-NS5B
gE1	2,8	1,2	2,1
gE2	2,3	1,8	3,9
pE1 289-297	1,4	1,3	1,7
pE1 315-323	2,6	1,9	3,1
pE1 363-371	1,4	0,7	3,0
pE2 405-414	2,6	1,7	4,2
pE2 412-423	1,0	0,8	1,3
pE2 432-443	1,1	0,6	0,7
rNS3 1192-1459	1,9	4,8	4,4
rNS3 протеаза	108,3	141,7	172,9
rNS3 хеликаза	1,1	2,1	2,3
rNS4 1677-1754	1,9	3,5	3,4
pNS4 1693-1707	1,9	1,7	2,7
rNS5A 2212-2313	1,1	5,6	2,6
pNS5A 2163-2171	0,6	1,8	2,9
rNS5B 2420-3011	1,9	7,2	5,1
ConA	117	133	125

Примечание. Представлены средние значения индекса стимуляции пролиферации (ИСП); выделены значения ИСП, статистически значимо (*p* < 0,05) отличающиеся от контрольных групп.

не были зарегистрированы (титр < 1:20). При иммунизации смесью ДНК-конструкций pcE1-E2 и pcNS3-NS5B (группа 3) титр антител изотипа IgG_{2a} при взаимодействии с поверхностными белками gE1 и gE2 был высоким (1:1500 и 1:2500 соответственно), а с пептидами из области E2 – низким (1:20). С антигенами, представляющими неструктурные белки, сыворотки мышей группы 3 не взаимодействовали. Статистически значимые различия по выработке антител отмечены между группами 1 и 2 (*p* < 0,05), титры антител в группах 1 и 3 различались в 3–5 раз, однако не достигали статистической значимости (*p* = 0,095). Антитела к поверхностным белкам не определялись в группе 2 и контрольных группах, к неструктурным – в группе 1 и контроле.

Клеточный ответ. Проведен сравнительный анализ клеточного иммунного ответа на введение ДНК-конструкций. Для стимуляции *in vitro* спленоцитов мышей, трижды иммунизированных ДНК-плазмидами, использовали 16 специфических антигенов – рекомбинантные белки и пептиды. В РБТЛ в группе 1 (pcE1-E2) пролиферацию лимфоцитов стимулировали 4 антигена к поверхностным белкам ВГС E1 и E2 (табл. 3). В группе 2 (pcNS3-NS5B) пролиферативный ответ выявлен

Таблица 4

Синтез цитокинов IFN- γ и IL-2 в спленоцитах мышей, иммунизированных ДНК-конструкциями рсЕ1-Е2, рсNS3-NS5B и их смесью

Антиген	Количество IFN- γ -секретирующих клеток*			Количество IL-2-секретирующих клеток**		
	группа 1 – рсЕ1-Е2	группа 2 – рсNS3-NSB	группа 3 – рсЕ1-Е2 + рсNS3-NS5B	группа 1 – рсЕ1-Е2	группа 2 – рсNS3-NS5B	группа 3 – рсЕ1-Е2 + рсNS3-NS5B
гЕ1	26	31	50	0	0	5
гЕ2	29	31	62	0	0	0
рЕ1 289-297	57	26	31	0	0	15
рЕ1 315-323	54	22	77	0	0	0
рЕ1 363-371	25	31	81	5	0	0
рЕ2 405-414	21	16	46	0	0	0
рЕ2 412-423	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
рЕ2 432-443	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и	н/и
гNS3 1192-1459	25	16	46	0	0	0
гNS3 протеаза	30	55	108	0	0	0
гNS3 хеликаза	11	17	69	0	0	0
гNS4 1677-1754	28	55	73	0	0	0
рNS4 1693-1707	21	17	69	0	5	25
гNS5A 2212-2313	29	16	42	0	0	0
рNS5A 2163-2171	14	31	27	0	0	0
гNS5B 2420-3011	26	21	38	0	10	0

Примечание. Выделены положительные значения в реакции ELISpot, превышающие соответствующие контрольные значения (в группах 4 и 5); * > 39 IFN- γ -секретирующих клеток на 10^6 клеток, ** > 0 IL-2-секретирующих клеток на 10^6 клеток.

к 6 из 8 использованных антигенов из неструктурной области (на пептиды NS4 и NS5A значение ИСП не было статистически значимо). В группе 3 (рсЕ1-Е2 + рсNS3-NS5B) ИСП был выше по сравнению как с группой 1, так и с группой 2: лимфоциты пролиферировали в ответ на все антигены из последовательности неструктурных белков, и на 6/8 стимуляторов – участков белков Е1 и Е2 ($p > 0,05$). Протеазный домен NS3 вызывал интенсивную пролиферацию лимфоцитов на уровне ConA во всех группах мышей, включая контрольные группы 4 и 5, но величины ИСП статистически значимо отличались от контрольных животных только в группах 2 и 3.

Цитокин IFN- γ в группе 1 вырабатывался на 2 пептида из области Е1 (рЕ1 289-297) и Е2 (рЕ2 405-414) в концентрации 28–46 пг/мл; секреции IL-2 не обнаружено (результаты не представлены). IFN- γ в группе 2 стимулировали 2 антигена из областей NS4 и NS3 (гNS4 1677-1754 и гNS3 протеаза, 39–130 пг/мл), а IL-2 – эти же белки, а также хеликазный домен NS3 (8–30 пг/мл). Секреция IFN- γ при иммунизации смесью двух ДНК-конструкций рсЕ1-Е2 и рсNS3-NS5B (группа 3) получена в ответ на 3 стимулятора (гNS3 протеаза и 2 антигена NS4, 8–23 пг/мл), IL-2 – на 2 антигена, причем только на область неструктурных белков гNS3 протеаза и гNS4 1677–1754 (6–14 пг/мл).

IFN- γ -секретирующие клетки в группе 1 в реакции ELISpot обнаружены при стимуляции лимфоцитов пептидами из области Е1 – 289-297 и 315-323, IL-2-секретирующие – при стимуляции другим пептидом (рЕ1 363-371) (табл. 4). В группе 2 IFN- γ -секретирующие клетки обнаружены при стимуляции протеазным доменом NS3 и гNS4 1677-1754, IL-2-секретирующие – гNS4 1693-1707 и рекомбинантным белком NS5B. В группе 3 значительно большее число антигенов по сравнению с группами 1 и 2 стимулировали образование IFN- γ -секретирующих клеток – 5 поверхностных антигенов и 6 – из неструктурной области, но различия не достигали статистической значимости ($p = 0,13$). По числу IL-2-секретирующих клеток различия между группой 3 и группами 1 и 2 также не были значимы ($p > 0,05$).

Обсуждение

Экспрессия белков Е1 и Е2 в клетках гепатокарциномы Huh7, трансфицированных плазмидой рсЕ1-Е2, наблюдалась в цитоплазме. Сходная локализация поверхностных белков ВГС в цитоплазматических компартментах (главным обра-

зом в эндоплазматическом ретикулуме) была описана другими авторами [7, 14].

Показано, что ДНК-конструкция рсЕ1-Е2, кодирующая поверхностные белки ВГС, обладает иммуногенной активностью. Введение плазмиды с адьювантом индуцирует как клеточный, так и гуморальный ответ. Продукция провоспалительных цитокинов обнаружена в ответ на 4 пептида, представляющих эпитопы для CD8⁺-цитотоксических лимфоцитов [6–8], пролиферация наблюдалась также на 2 рекомбинантных белка. Полученные данные в целом подтверждают результаты других авторов, использующих плазмиду, кодирующую белок Е2 [6, 8], или сочетание структурных белков ВГС [7], а также поверхностные белки, экспрессированные в вирусных векторах [15–17]. В то же время активность иммунного ответа в нашей работе оказалась выше: показана выработка антител изотипа IgG_{2a} в титре 1:500 при иммунизации мышей ДНК-конструкций рсЕ1-Е2 к обоим белкам, что не достигнуто в других работах [7]. Антитела регистрировались только при использовании укороченных конструкций, кодирующих секретируемый Е2 [6, 8], или при использовании вирусных векторов [15–17]. Примечательно, что даже при иммунизации мышей конструкцией Е1Е2 на основе вирусной векторной платформы – вируса осповакцины Анкара (MVA), вырабатывались антитела изотипа IgG₁ только к белку Е2, но не к Е1, что свидетельствует о более низкой иммуногенности последнего [15].

Для повышения иммуногенности плазмид из состава ВГС в настоящей работе был выбран Иммуномакс® как фармакологический препарат, обладающий свойствами иммуномодулятора. Ранее была установлена высокая адьювантная активность Иммуномакса® при использовании других антигенов ВГС – рекомбинантных белков NS4 и NS5A [18, 19] и ДНК-конструкции, содержащей ген NS5A [13, 19].

При сравнении иммунного ответа на плазмиды рсЕ1-Е2 и рсNS3-NS5B выявлен клеточный ответ на сходное количество стимуляторов за исключением более низкой продукции IL-2 спленоцитами мышей группы 1. Эффективный гуморальный ответ вырабатывался только на область поверхностных белков ($p < 0,05$).

Показано, что совместное введение двух плазмид рсЕ1-Е2 и рсNS3-NS5B индуцирует более эффективный гуморальный ответ на область поверхностных белков, чем иммунизация одной плазмидой рсЕ1-Е2. Титры антител к Е1

и E2 увеличивались в 3–5 раз, отмечена выработка антител изотипа IgG_{2a} к двум консервативным эпитопам E2, о которых известно, что индуцируемые ими антитела проявляют вируснейтрализующие свойства [20].

Следует отметить, что данная комбинация ДНК-конструкций использована впервые. Интересно, что при иммунизации мышей конструкцией, содержащей полноразмерный геном ВГС в вирусном векторе MVA, CD8⁺-специфический иммунный ответ в большей степени индуцировали антигены из состава белков NS2, p7 и NS3, тогда как ответ на поверхностные гликопротеины практически отсутствовал. Напротив, CD4⁺-специфический иммунный ответ был направлен исключительно к области структурных белков [21]. При иммунизации мышей вирусоподобными частицами, экспрессирующими белки E1-E2 или неструктурные белки в составе альфавирусного вектора в сочетании с аналогичными рекомбинантными белками, гуморальный и клеточный ответ не увеличивался по сравнению с ответом на отдельные конструкции [10]. В нашей работе секрета цитокинов отмечена только в ответ на стимуляцию антигенами из области неструктурных белков NS3, NS4, NS5A. Однако такие показатели, как пролиферация лимфоцитов, образование IFN-γ-секретирующих клеток, в группе 3 были выше как на структурные, так и на неструктурные белки по сравнению с иммунизацией отдельными плазмидами. Полученные данные свидетельствуют о перспективности сочетанного использования ДНК-конструкций, кодирующих комплекс поверхностных структурных и неструктурных белков ВГС, в качестве основы для разработки профилактических и терапевтических вакцин против ВГС.

Выводы

1. ДНК-конструкция pсE1-E2, кодирующая поверхностные белки ВГС, обладает иммуногенной активностью. Введение плазмиды с адъювантом Иммуномакс индуцирует как клеточный, так и гуморальный ответ.

2. Плазида pсNS3-NS5B, содержащая гены неструктурных белков, индуцировала клеточный ответ, сходный по интенсивности с плазмидой pсE1-E2, но не вызывала гуморальный ответ.

3. Сочетанная иммунизация мышей смесью ДНК-плазмид, кодирующих структурные белки E1-E2 и неструктурные белки NS3-NS5B ВГС, по сравнению с каждой из этих конструкций по большинству параметров вызывала усиление иммунного ответа. Наблюдался кумулятивный пролиферативный ответ лимфоцитов и формирование IFN-γ-секретирующих клеток как на структурную, так и неструктурную область ВГС, активация синтеза антител, в том числе и вируснейтрализующих.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.Н. Буркову и Т.И. Улановой (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород) за предоставление трех рекомбинантных белков ВГС.

Работа получила частичную финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (проект №№ 13-04-40308-Н).

ЛИТЕРАТУРА

- Масалова О.В., Леснова Е.И., Иванов А.В., Пичугин А.В., Пермякова К.Ю., Смирнова О.А. и др. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (2): 21–8.
- Мохонов В. В., Новиков Д.В., Самохвалов Е.И., Шаталов А.Г., Селиванов, Н.А., Прилипов А.Г. и др. Анализ генома изолята 274933RU вируса гепатита С, выделенного на территории Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47 (1): 9–12.
- Масалова О.В., Леснова Е.И., Грабовецкий В.В., Смирнова О.А., Уланова Т.И., Бурков А.Н. и др. ДНК-иммунизация плазмидой, содержащей ген белка NS5A вируса гепатита С,

индуцирует эффективный клеточный иммунный ответ. *Молекулярная биология*. 2010; 44 (2): 275–83.

- Масалова О.В., Леснова Е.И., Пичугин А.В., Мельникова Т. М., Беликова-Исагулянц М. Г., Уланова Т. И. и др. Исследование иммуногенности ковалентных конъюгатов неструктурных белков вируса гепатита С с иммуномаксом. *Иммунология*. 2008; 29: 338–45.

Поступила 05.12.14

REFERENCES

- Drummer H.E. Challenges to the development of vaccines to hepatitis C virus that elicit neutralizing antibodies. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 329.
- Rupp D., Bartenschlager R. Targets for antiviral therapy of hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* 2014; 34 (1): 9–21.
- Feinstone S.M., Hu D.J., Major M.E. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 55 (1): 25–32.
- Barnes E., Folgori A., Capone S., Swadling L., Aston S., Kurioka A et al. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Science Transl. Med.* 2012; 4 (115): 115ra1.
- Torresi J., Fischer A., Grollo L., Zeng W., Drummer H., Jackson D.C. Induction of neutralizing antibody responses to hepatitis C virus with synthetic peptide constructs incorporating both antibody and T-helper epitopes. *Immunol. Cell Biol.* 2007; 85 (2): 169–73.
- Sominskaya I., Alekseeva E., Skrastina D., Mokhonov V., Starodubova E., Jansons J. et al. Signal sequences modulate the immunogenic performance of human hepatitis C virus E2 gene. *Mol. Immunol.* 2006; 43 (12): 1941–52.
- Ghorbani M., Nass T., Azizi A., Soare C., Aucoin S., Giulivi A. et al. Comparison of antibody- and cell-mediated immune responses after intramuscular hepatitis C immunizations of BALB/c mice. *Viral. Immunol.* 2005; 18 (4): 637–48.
- Li Y.P., Kang H.N., Babiuk L.A., Liu Q. Elicitation of strong immune responses by a DNA vaccine expressing a secreted form of hepatitis C virus envelope protein E2 in murine and porcine animal models. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(44): 7126–35.
- Youn J.W., Hu Y.W., Tricoche N., Pfahler W., Shata M.T., Dreux M. et al. Evidence for protection against chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees by immunization with replicating recombinant vaccinia virus. *Virology*. 2008; 82 (21): 10896–905.
- Lin Y., Kwon T., Polo J., Zhu Y., Coates S., Crawford K. et al. Induction of broad CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses and cross-neutralizing antibodies against hepatitis C virus by vaccination with Th1-adjuvanted polypeptides followed by defective alphaviral particles expressing envelope glycoproteins gpE1 and gpE2 and nonstructural proteins 3, 4, and 5. *J. Virol.* 2008; 82 (15): 7492–503.
- Masalova O.V., Lesnova E.I., Ivanov A.V., Pichugin A.V., Permyakova K.Yu., Smirnova O.A. et al. Comparative analysis of the immune response to DNA constructions encoding hepatitis C virus nonstructural proteins. *Voprosy virusologii*. (Moscow). 2013; 58 (2): 21–8. (in Russian)
- Mokhonov V.V., Novikov D.V., Samokhvalov E.I., Shatalov A.G., Selivanov N.A., Prilipov A.G. et al. Genome analysis of hepatitis C virus strain 274933RU isolated in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2002; 47(1): 9–12. (in Russian)
- Masalova O.V., Lesnova E.I., Grabovetskiy V.V., Smirnova O.A., Ulanova T.I., Burkov A.N. et al. DNA immunization with a plasmid carrying the gene of hepatitis C virus protein 5A (NS5A) induces an effective cellular immune response. *Molekulyarnaya Biologiya* (Moscow). 2010; 44 (2): 275–83. (in Russian)
- Egan P.A., Sobkowiak M., Chan S.W. Hepatitis C virus envelope protein E1 binds PERK and represses the unfolded protein response. *Open Virol. J.* 2013; 7: 37–40.
- Abraham J.D., Himoudi N., Kien F., Berland J.L., Codran A., Bartosch B. et al. Comparative immunogenicity analysis of modified vaccinia Ankara vectors expressing native or modified

- forms of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *Vaccine*. 2004; 22 (29–30): 3917–28.
16. Zhu W., Fu J., Lu J., Deng Y., Wang H., Wei Y. et al. Induction of humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus by vaccination with replicon particles derived from Sindbis-like virus XJ-160. *Arch. Virol.* 2013; 158 (5): 1013–9.
 17. Huret C., Desjardins D., Miyalou M., Levacher B., Amadouji Zin M., Bonduelle O. et al. Recombinant retrovirus-derived virus-like particle-based vaccines induce hepatitis C virus-specific cellular and neutralizing immune responses in mice. *Vaccine*. 2013; 31(11): 1540–7.
 18. Masalova O.V., Lesnova E.I., Pichugin A.V., Mel'nikova T.M., Ulanova T.I., Burkov A.N. et al. Investigation into immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural proteins covalently conjugated with immunomax. *Immunologiya*. 2008; 29: 338–345. (in Russian)
 19. Masalova O.V., Lesnova E.I., Pichugin A.V., Melnikova T.M., Grabovetsky V.V., Petrakova N.V. et al. The successful immune response against hepatitis C nonstructural protein 5A (NS5A) requires heterologous DNA/protein immunization. *Vaccine*. 2010; 28 (8): 1987–96.
 20. Wang Y., Keck Z.Y., Fong S.K. Neutralizing antibody response to hepatitis C virus. *Viruses*. 2011; 3(11): 2127–45.
 21. Gómez C.E., Perdiguero B., Cepeda M.V., Mingorance L., García-Arriaza J., Vandermeeren A. et al. High, broad, polyfunctional, and durable T cell immune responses induced in mice by a novel hepatitis C virus (HCV) vaccine candidate (MVA-HCV) based on modified vaccinia virus Ankara expressing the nearly full-length HCV genome. *J. Virol.* 2013; 87 (13): 7282–300.

Received 05.12.14

ИММУНОПАТОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 618.177-089.888.11-036.8-097-078.33

Ванян Р.Э., Менжинская И.В., Ванько Л.В., Долгушина Н.В., Калинина Е.А.

СПЕКТР АУТОАНТИТЕЛ К ГОРМОНАМ И ФОСФОЛИПИДАМ У ПАЦИЕНТОК С «БЕДНЫМ» ОВАРИАЛЬНЫМ ОТВЕТОМ В ПРОГРАММЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

ФГБУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова Минздрава РФ, 117997, Москва

Бесплодие у женщин, плохой ответ на гормональную стимуляцию овуляции, неудачи в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) часто ассоциируются с аутоантителами: антиовариальными, антифосфолипидными (АФА), антителами к гонадотропинам и их рецепторам. Цель исследования – изучить спектр аутоантител к гормонам и фосфолипидам в сыворотке крови и фолликулярной жидкости (ФЖ) у пациенток ЭКО с «бедным» овариальным ответом (БОО) на стимуляцию суперооуляции. С использованием ИФА было показано, что антитела (IgM, IgG) к фолликулостимулирующему гормону (аФСГ), хорионическому гонадотропину (аХГ) и гонадотропин-рилизинг-гормону (аГнРГ) выявляются в сыворотке крови пациенток ЭКО ($n=150$) чаще (у 50%), чем антитела к кардиолипину и β_2 -гликопротеину-I (у 9,3%; $p<0,0001$), их средний уровень значительно выше, чем у здоровых женщин ($n=63$) ($p<0,01$). Антитела к ХГ и ФСГ выявляются чаще (у 34 и 29,3%), чем ГнРГ (у 22%). Уровни IgG и IgA к гормонам в ФЖ в 5–10 раз ниже, чем в сыворотке, между ними отмечается прямая корреляционная связь. При БОО аГнРГ выявляются чаще (у 30,8%), чем при нормальном овариальном ответе (у 15,3%; $p=0,0383$). Средние уровни антител к гормонам несколько выше, а IgG к ГнРГ значительно выше при БОО ($p=0,0468$). У пациенток с двумя попытками ЭКО в прошлом средний уровень аФСГ выше, чем у пациенток с одной попыткой и без лечения методом ЭКО ($p<0,05$). Таким образом, антитела к гормонам выявляются в сыворотке крови и ФЖ у пациенток ЭКО более часто, чем АФА. Антитела к ГнРГ чаще определяются у пациенток с бедным овариальным ответом, а аФСГ – у пациенток с двумя попытками ЭКО в прошлом.

Ключевые слова: аутоантитела к фолликулостимулирующему гормону; аутоантитела к хорионическому гонадотропину; аутоантитела к гонадотропин-рилизинг-гормону; антифосфолипидные антитела; экстракорпоральное оплодотворение; бедный овариальный ответ.

Для цитирования: Иммунология. 2015; 36(3): 167–172.

Vanyan R. E., Menzhinskaya I. V., Van'ko L. V., Dolgushina N. V., Kalinina E. A.

SPECTRUM OF AUTOANTIBODIES AGAINST HORMONES AND PHOSPHOLIPIDS IN PATIENTS WITH POOR OVARIAN RESPONSE IN THE *IN VITRO* FERTILIZATION PROGRAM

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after V.I. Kulakov, Ministry of Health of the Russian Federation, 117997, Moscow

Для корреспонденции: Менжинская Ирина Владимировна, i_menzinskaya@oparina4.ru
For correspondence: Menzhinskaya Irina Vladimirovna, i_menzinskaya@oparina4.ru