

С. Б. Алексеенкова, И. Ю. Ткачев, Г. К. Юров, К. П. Юров

**ИММУННЫЙ ОТВЕТ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ НА РЕКОМБИНАНТНУЮ ПЛАЗМИДУ, СОДЕРЖАЩУЮ В СВОЕМ СОСТАВЕ ГЕН, КОДИРУЮЩИЙ ГЛИКОПРОТЕИН D ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ 1 (ВГЛ-1) И ИНАКТИВИРОВАННЫЙ ВГЛ-1**

Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко, Москва

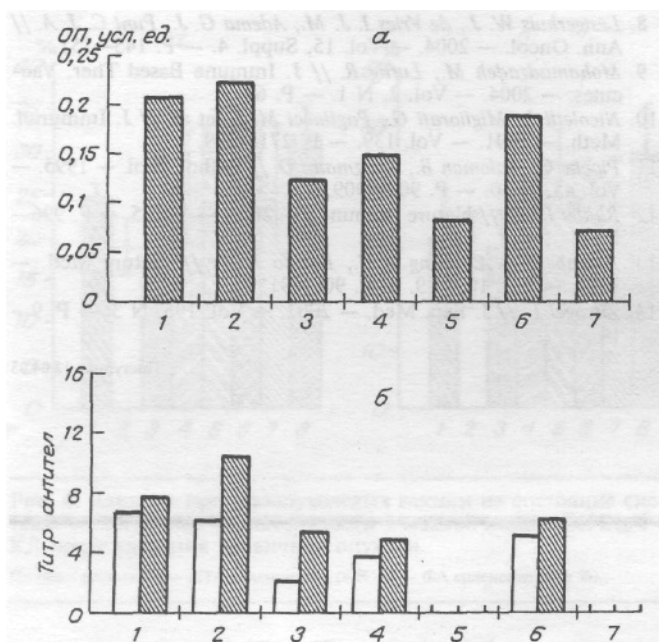
Настоящее сообщение является частью работы по определению иммуногенной активности рекомбинантной плазмиды pYT.1, содержащей в своем составе ген, кодирующий поверхностный гликопротеин D вируса герпеса лошадей 1 (ВГЛ-1). Изучали возможность использования полученной авторами рекомбинантной конструкции pYT.1 для создания генно-инженерной вакцины. В качестве экспериментальной модели использовали мышей линии BALB/c. Иммунный ответ определяли в реакции ELISA, реакции нейтрализации и в реакции торможения гемагглютинации. Иммунизация животных плазмидой pYT.1 и инактивированным ВГЛ-1 в различных комбинациях приводила к образованию вирусспецифических антител. Наиболее выраженный гуморальный иммунный ответ регистрировался у мышей, иммунизированных подкожно плазмидой pYT.1 и инактивированным ВГЛ-1 с интервалом 14 дней, а также у мышей, двукратно иммунизированных плазмидой pYT.1 с интервалом 14 дней.

The immunogenicity of constructed recombinant plasmid pYT.1 containing the complete gene of equine herpesvirus-1 (EHV-1) envelope glycoprotein D (gD) has been studied. The possibilities of obtained genetic construction for DNA vaccination have been investigated during the series of experiment in BALB/c murine model. The immune response has been detected using ELISA, NT and HAIR. It has been found that mice immunization with plasmid pYT.1 and inactivated EHV-1 in different combinations has resulted to virus-specific antibodies in liters compared to those from the positive group. The highest immune response level has been registered in mice injected with pYT.1 and inactivated EHV-1 at 14 day interval as well as in those mice injected with pYT.1 twice at the same interval.

Герпесвирусная инфекция лошадей 1 (ринопневмония лошадей) — острое контагиозное заболевание, возбудителем которого является вирус герпеса лошадей 1 (ВГЛ-1). ВГЛ-1 — распространённый инфекционный агент в популяции однокопытных, который вызывает эпизоотические и спорадические аборты у кобыл, респираторную инфекцию у жеребят, неврологические расстройства у лошадей всех возрастов и породных групп [2]. Основным методом борьбы с этим заболеванием является вакцинопрофилактика с использованием живых и инактивированных вакцин, имеющих определённые недостатки либо вследствие их повышенной реактогенности, либо из-за недостаточной иммуногенности. В последние годы благодаря развитию современных биотехнологических подходов возникло новое направление вакцинологии — ДНК-вакцинация. В ее основе лежит создание ре-

комбинантных плазмид, содержащих смысловой ген и последовательности, обеспечивающие его экспрессию в эукариотических клетках. Проникающая в клетку рекомбинантная ДНК транспортируется в ядро и транскрибируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой с образованием информационной РНК, которая в цитоплазме обеспечивает синтез экспрессируемого полипептида [1, 4]. Актуальным является поиск биологической модели для изучения антигенной и протективной активности вирусных полипептидов. Ранее было показано, что адекватной моделью при изучении некоторых вопросов патогенеза и иммуногенеза ВГЛ-1-инфекции лошадей являются инфицированные мыши линии BALB/c [3].

Целью данной работы явилось изучение эффективности иммунного ответа у мышей при введении им полученной рекомбинантной конструкции



Определение иммунного ответа у мышей на введение различных препаратов.

По осям абсцисс — группы мышей; по осям ординат: а — оптическая плотность (ОП, усл. ед.), б — титр антител. а — ELISA (разведение сывороток 1:1600); б — РН и РТГА. 1 — мыши двукратно иммунизированы rYUT.1; 2 — первая иммунизация мышей rYUT.1, вторая иммунизация инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл); 3 — первая иммунизация мышей инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл), вторая иммунизация rYUT.1; 4 — двукратная иммунизация инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл); 5 — двукратная иммунизация пДНК, не содержащей смыслового гена; 6 — двукратная иммунизация инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 5,0  $I_{g_{50}}$ /мл), положительный контроль; 7 — введение физиологического раствора, отрицательный контроль. Светлые столбики — РН, со штриховкой — РТГА.

rYUT.1, содержащей в своем составе ген, кодирующий гликопротеин D ВГЛ-1, и возможности усиления иммунного ответа при введении рекомбинантной плазмиды в сочетании с инактивированным ВГЛ-1 в различных комбинациях.

**Материалы и методы. Культивирование вируса.** В работе был использован эпизоотический штамм вируса ринопневмонии лошадей (РПЛ) ПП1 из музея Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии. Вирус подерживали путем пассирования на культуре клеток линии RK-13, выращиваемых в среде Игла MEM, содержащей 5% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

**Получение рекомбинантной конструкции.** Амплифицированный фрагмент генома ВГЛ-1, кодирующий в своем составе гликопротеин D, был клонирован в эукариотическую плазмиду под контролем раннего промотора CMV.

**Иммунизация животных.** Для определения эффективности иммунного ответа использовали 7 групп мышей (в каждой группе по 10 животных). Схема иммунизации мышей: 1-я группа — двукратное введение rYUT.1 с интервалом 14 дней подкожно в дозе 100 мкг на животное в 0,1 мл физиологического раствора; 2-я группа — введение rYUT.1 подкожно в дозе 100 мкг на животное в 0,1 мл физиологического раствора и через 14 дней введение инактивированного ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл) подкожно в дозе 0,2 мл; 3-я группа — введение инактивированного ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл) подкожно в дозе 0,2 мл и через 14 дней введение rYUT.1 подкожно в дозе 100 мкг на животное в 0,1 мл физиологического раствора; 4-я группа — двукратное введение инактивированного ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл) подкожно в дозе 0,2 мл с интервалом 14 дней; 5-я группа — двукратное введение пДНК, не содержащей смыслового гена, подкожно в дозе 100 мкг на животное в 0,1 мл физиологического раствора с интервалом 14 дней; 6-я группа — двукратное введение инактивированного ВГЛ-1 (ТСД 5,0  $I_{g_{50}}$ /мл) подкожно в дозе 0,2 мл с интервалом 14 дней (положительный контроль); 7-я группа — вве-

дение физиологического раствора подкожно в дозе 0,2 мл (отрицательный контроль).

**Иммунологические методы.** Антитела к ВГЛ-1 в сыворотках крови мышей изучали в реакции ELISA, реакции нейтрализации (РН) и в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). При постановке ELISA использовали 96-луночные иммунологические планшеты ("Costar", США) сенсibilизировали антигеном ВГЛ-1 в фосфатном буфере pH 7,4. Инкубацию сывороток крови в двукратных разведениях проводили в течение 2 ч при 37°C. После инкубации с сыворотками добавляли антимишинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве хромогена использовали О-фенилендиамин ("Sigma", США). РН проводили с двукратными разведениями сывороток и постоянной дозой вируса (100 ТСО<sub>50</sub>/мл). В лунки планшет вносили 0,03 мл сыворотки в двукратном разведении и равный объем вируса, инкубировали 1 ч до внесения суспензии клеток RK-13 (1 млн клеток на 1 мл в среде Игла MEM с добавлением 5% эмбриональной бычьей сыворотки), учет результатов реакции осуществляли на 3-й сутки.

РТГА проводили по методике, описанной ранее [5].

**Результаты и обсуждение.** В I серии экспериментов определяли иммунный ответ животных на однократную иммунизацию инактивированным ВГЛ-1 и рекомбинантной конструкции rYUT.1. В обоих случаях при серологическом исследовании в ELISA в мышей выявляли антитела к ВГЛ-1. При повторной иммунизации через 14 дней уровень антител заметно увеличивался и достигал максимального значения титра на 6—8-й неделе. На рисунке а показан уровень специфических антител в сыворотке крови мышей при их исследовании в ELISA на 7-й неделе после первичной иммунизации. Эти данные свидетельствуют о том, что титр антител в мышей 2-й группы, последовательно иммунизированных rYUT.1 и инактивированным ВГЛ-1, выше, чем в мышей остальных групп. Двукратное введение рекомбинантной конструкции также вызывало в мышей выраженный иммунный ответ, превышающий уровень положительного контроля. У мышей 5-й группы, иммунизированных пДНК, не содержащей смыслового гена, а также в мышей 7-й группы (отрицательный контроль) специфический иммунный ответ не был обнаружен.

Результаты исследования этих же проб в РН и РТГА, которые в большей степени отражают состояние напряженности иммунитета к ВГЛ-1, коррелировали с данными ELISA. В то же время данные РТГА показали большую эффективность иммунного ответа на последовательное введение рекомбинантной плазмиды и инактивированного ВГЛ-1. При этом титр антител к гемагглютинину вируса повышался в 1,7 раза в сравнении с титром антител, выявляемых в мышей группы положительного контроля, двукратно иммунизированных инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 5,0  $I_{g_{50}}$ /мл). При двукратном введении рекомбинантной плазмиды был получен пониженный ответ на гемагглютинирующий антиген ВГЛ-1. Самый низкий уровень антител был обнаружен в мышей 4-й группы, двукратно иммунизированных инактивированным ВГЛ-1 (ТСД 4,0  $I_{g_{50}}$ /мл).

Уровень вируснейтрализующих антител был выше в мышей 1-й группы, двукратно иммунизированных rYUT.1, по сравнению с остальными группами. Самый низкий уровень антител отмечен в мышей 3-й группы, последовательно иммунизированных инактивированным ВГЛ-1 и rYUT.1 (рисунк, б).





Результаты, полученные нами ранее, показали, что иммунизация рекомбинантной конструкцией rYU.1 вызывает у животных специфический иммунный ответ [1]. Известно, что предшествующий иммунитет может существенно влиять на интенсивность ответа на иммунизацию животного гомологичными антигенами. Указанное обстоятельство имеет немаловажное практическое значение, поскольку большой процент таких естественно восприимчивых животных, как лошади, имеют антитела к вирусу ринопневмонии. В связи с этим мы, в частности, попытались выяснить эффективность вакцинации мышей (в качестве лабораторной модели), иммунизированных инактивированным ВГЛ-1 и рекомбинантной конструкцией rYU.1 в различных комбинациях. Так, в 3-й группе у мышей, предварительно иммунизированных инактивированным вирусом, зафиксирован низкий уровень антител после введения рекомбинантной плазмиды. Полученный результат показывает, что предварительная иммунизация лабораторных мышей инактивированным ВГЛ-1 снижает иммунный ответ на введение рекомбинантной плазмиды. Напротив, повышение уровня специфических антител было отмечено у мышей, иммунизированных инактивированным ВГЛ-1, на фоне специфиче-

ского иммунного ответа, ранее сформированного рекомбинантной плазмидой.

Таким образом, на основании результатов модельных экспериментов на мышах можно предложить наиболее перспективные схемы иммунизации естественно восприимчивых животных (лошадей) с целью формирования у них более напряженного и пролонгированного иммунитета.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ткачев И. Ю., Юров Г. К., Шмаров М. М.* и др. Конструирование ДНК-вакцины на основе поверхностных гликопротеинов вируса ринопневмонии лошадей // *Материалы 2-го Московского международного конгресса "Биотехнология: Состояние и перспективы развития"*. Секция 2: Биотехнология и сельское хозяйство. — М., 2003. — С. 233.
2. *Юров К. П.* Инфекционные болезни лошадей. — М., 2000. — С. 18-20.
3. *Awan A. R., Chong Y. C., Field H. J.* The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: a new model for studying host responses to the infection // *J. Gen. Virol.* — 1990. — Vol. 71. — P. 1131-1140.
4. *Donelly J. J., Ulmer J. B., Shiver J. W., Liu M. A.* DNA vaccine // *Annu. Rev. Immunol.* - 1997. - Vol. 15. - P. 617-648.
5. *Yurov K. P., Soloeb V. K.* Application of the hemagglutination inhibition test for diagnosis of equine herpesvirus 1 infection. *Equine infectious diseases IV. Proceedings of the Fourth International conference on equine infectious diseases* // *J. Equine Med. Surg.* - 1978. - N 1. - P. 43-49.

Поступила 02.06.05