

Шкайр Лайали

аспирант, лаборант-исследователь

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Гаранина Екатерина Евгеньевна

канд. биол. наук, ассистент, старший научный сотрудник

Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский

(Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Мартынова Екатерина Владимировна

канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Колесникова Алёна Игоревна

магистрант

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Ризванов Альберт Анатольевич

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-клинический центр прецизионной и регенеративной медицины

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

Хайбуллина Светлана Францевна

д-р мед. наук, главный научный сотрудник

Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский

(Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

*DOI 10.31483/r-102526***СТИМУЛЯЦИЯ ГУМОРАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ
ОРТОХАНТАВИРУСА С ПОМОЩЬЮ МИКРОВЕЗИКУЛ**

Аннотация: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является природно-очаговым инфекционным заболеванием, которое представляет собой угрозу общественному здравоохранению. Большинство случаев ГЛПС в России регистрируются в Поволжье, где в качестве инфекционного агента в основном идентифицируется вирус Пуумала (PUUV). Лечение ГЛПС носит симптоматический характер, при этом отсутствие специфических мер профилактики, равно как и одобренных вакцин, являются существенным недостатком. С недавнего времени микровезикулы (МВ) рассматриваются в качестве перспективных носителей для доставки вакцинных антигенов, поскольку было показано, что они индуцируют врожденные и адаптивные иммунные реакции. Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности (МВ) в качестве средств для доставки структурных белков PUUV и индукция иммунного ответа. Нами было показано, что МВ, несущие белки нуклеокапсида (N) и гликопротеины (Gn / Gc) PUUV способны индуцировать специфический гуморальный иммунный ответ *in vivo*, что является одним из ключевых факторов в разработке методов вакцинопрофилактики.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, микровезикулы, ортохантавирус, гуморальный иммунный ответ, вакцина.

Введение. Геморрагические лихорадки, вызываемые ортохантавирусами, являются природно-очаговыми инфекционными заболеваниями, которые представляют значительную угрозу общественному здравоохранению [10]. В 2020 году в России было зарегистрировано 3845 случаев хантавирусной инфекции, большинство из которых было отмечено в Поволжье [1]. Несмотря на низкий уровень смертности (0–0,4%), ГЛПС часто сопровождается серьезными осложнениями, затрагивающими сердечно-сосудистую и выделительную системы [2; 16].

Вирус Пуумала (PUUV), представитель рода ортохантавирусов, является возбудителем ГЛПС в Республике Татарстан [20]. Ортохантавирусы имеют одноцепочечный РНК-геном с отрицательной полярностью [8]. Геном содержит

три сегмента – L, M и S, которые кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), гликопротеины оболочки (Gn и Gc) и белок нуклеокапсида (N), соответственно [11;14]. Было показано, что белок нуклеокапсида (N) и гликопротеины оболочки (Gn /Gc) могут вызывать специфические иммунные реакции [9;3], и они использовались в качестве компонентов нескольких вакцин [4;12]. Однако, в настоящее время в Российской Федерации нет одобренной вакцины для профилактики ГЛПС.

В последнее время мембранные микровезикулы (МВ) привлекли внимание как потенциальные средства для доставки вакцин [17]. МВ представляют собой наноразмерные внеклеточные пузырьки, которые в норме продуцируются всеми типами клеток путем прямого выделения из плазматической мембраны [18;15]. Потенциал доставки MVS был подтвержден активацией специфического иммунного ответа против их груза посредством поглощения антигена антигенпрезентирующими клетками [5; 13].

В рамках данного исследования была проведена оценка эффективности МВ, несущих белки PUUV, в индукции гуморального иммунного ответа *in vivo*.

Материалы и методы

Клетки. Мезенхимные стволовые клетки (мМСК) были выделены из жировой ткани мышей C57BL/6 [19]. Жировую ткань измельчали, промывали физиологическим раствором и подвергали ферментативной обработке с использованием 0,4% раствора коллагеназы (Biolut, Санкт-Петербург, Россия) в течение 1 часа при 37°C с интенсивным встряхиванием при 220 об/мин. Клетки осаждали центрифуге, трижды промывали физиологическим раствором и высевали в культуральные флаконы. мМСК культивировали на среде DMEM (ПанЭко, Россия), с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамин и 1% смеси антибиотиков пенициллина-стрептомицина.

Генетическая модификация мМСК. Клетки мМСК трансдуцировали рекомбинантным лентивирусом (LV-PUUV-S, LV-PUUV-M и LV-Katushka2S), несущим PUUV N, Gn/Gc или красный флуоресцентный белок Katushka2S (MOI 100),

используя среду Opti-MEM (Gibco, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) с добавлением протамина сульфата в гневной концентрации 8 мкг/мл (Sigma, Сент-Луис, США). Клетки собирали через 48 ч для выделения МВ.

Получение МВ. Микровезикулы получали из генетически модифицированных мМСК с использованием цитохалазина В (10 мкг/мл). После инкубации суспензию клеток интенсивно перемещивали на вортексе с дальнейшим центрифугированием при 700 об/мин в течение 10 мин и последующими центрифугированиями супернатанта при 700 об/мин в течение 20 мин и 15 000 об/мин в течение 25 мин.

Эксперименты in vivo. Самки мышей C57Bl/6 (возраст 8–10 недель) разделили на 5 групп (в каждой по 8 животных) и получали подкожную инъекцию препарата МВ, содержащих белок PUUV-N, или белки PUUV-Gn/Gc, а также комбинацию этих белков. А также контрольные группы, одну с введением препарата МВ, содержащих красный флуоресцентный белок Katushka2S, а другая с введением физиологического раствора. Животным вводили МВ по (15 мкг/50 мкл) [6; 7]. Экспериментальный протокол in vivo был одобрен локальным этическим комитетом Казанского Университета Институциональные (протокол №23.30.06.2020).

Иммуноферментный анализ (ИФА). Выявление антител IgG в сыворотке подопытных животных проводили с использованием коммерческого набора ВектоХанта IgG (Вектор Бест, Уфа, Россия) согласно рекомендованному протоколу с некоторыми модификациями: вместо конъюгата планшет инкубировали с антителами осла к IgG мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma, Дармштадт, Германия) в разведении 1:5000. Визуализацию иммунопреципитата осуществляли путем добавления субстрата 3`3`5`5` – тетраметилбензидина. Остановку реакции проводили путем добавления эквимолярного объема 10% ортофосфорной кислоты. Регистрацию результатов оценивали на планшетном спектрофотометре Тесап при длине волны 450 нм и референсном значении 650 нм.

Результаты. Введение препаратов МВ, содержащих N белок PUUV, или белки G оболочки PUUV, а также комбинацию этих белков, осуществляли подкожно из расчета 15 мкг в объеме 50 мкл. В качестве контрольной группы служили животные, которым вводили эквивалентный объем физиологического раствора, а также группа животных с введением препарата МВ, содержащих красный флуоресцентный белок Katushka2S. Для оценки иммунологических реакций, образцы сыворотки собирали через 14 и 28 дней после введения МВ. Выявление специфических антител IgG к белкам ортохантавирусов осуществляли методом иммуноферментного анализа с использованием набора ВектоХанта IgG (Вектор Бест, Россия).

Значительное увеличение уровня антител IgG было зафиксировано у мышей, получавших МВ, одновременно несущих белки N и Gn/Gc, через 14 дней по сравнению с группой МВ-Katushka2S (рис. 1).

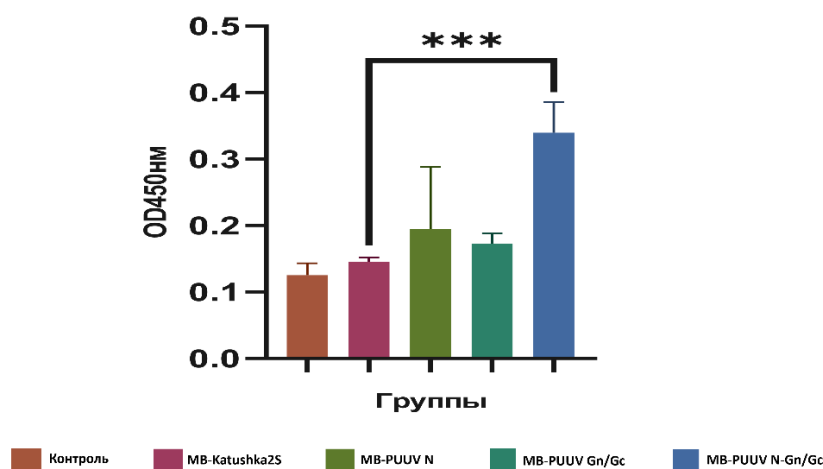


Рис. 1. Уровень антител IgG к белкам ортохантавирусов 14 суток после введения МВ. Ось ординат – данные оптической плотности при OD₄₅₀. Данные представлены в виде медианы ± С.О. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым

Статистически значимое увеличение уровня сывороточных IgG у мышей, получавших МВ, несущих PUUV N или Gn/Gc, а также комбинацию данных белков, было установлено через 28 дней после введения, по сравнению с МВ-Katushka2S (рис. 2).

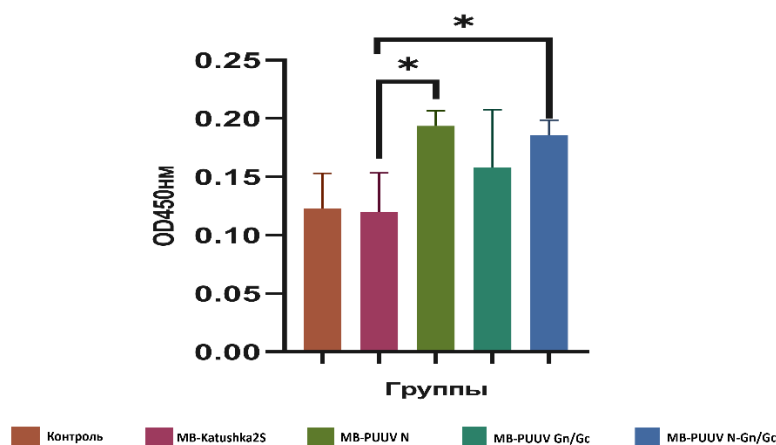


Рис. 2. Уровень антител IgG к белкам ортохантавирусов 28 суток после введения МВ. Ось ординат – данные оптической плотности при OD₄₅₀. Данные представлены в виде медианы ± С.О. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005.

Значение p < 0,05 считалось статистически значимым

Обсуждение. Целью настоящего исследования являлась оценка иммуногенного потенциала МВ, выделенных из МСК, экспрессирующих структурные белки ортохантавируса PUUV и их комбинации. Нами было установлено, что МВ способны индуцировать гуморальный иммунный ответ *in vivo*. Было показано, что МВ, одновременно экспрессирующие белки N и Gn/Gc, обеспечивали формирование IgG спустя 14 и 28 дней после введения. Интересно, что МВ, несущие комбинацию белков PUUV N и Gn/Gc, обладали более высокой способностью индуцировать гуморальный иммунный ответ по сравнению с МВ, содержащими отдельные вирусные белки. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что МВ могут быть использованы в качестве носителя для доставки белков PUUV и способны обеспечивать формирование гуморального иммунного ответа на белки ортохантавируса.

Список литературы

1. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare On the State of Sanitary and Epidemiological Well-Being of the Population in the Russian Federation in 2020 [(accessed on 12 December 2021)]; 2021 Available online: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/5fa/gd-seb_02.06-_s-podpisyu_.pdf.
2. Garanina E., Martynova E., Davidiyuk Y., Kabwe E., Ivanov K., Titova A., Markelova M., Zhuravleva M., Cherepnev G., Shakirova V.G., et al. Cytokine Storm Combined with Humoral Immune Response Defect in Fatal Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome Case, Tatarstan, Russia. *Viruses*. 2019;11:601. doi: 10.3390/v11070601.
3. Geldmacher A., Skrastina D., Borisova G., Petrovskis I., Krüger D.H., Pumpens P., Ulrich R. A hantavirus nucleocapsid protein segment exposed on hepatitis B virus core particles is highly immunogenic in mice when applied without adjuvants or in the presence of pre-existing anti-core antibodies. *Vaccine*. 2005;23:3973–3983. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.02.025.
4. Geldmacher A., Skrastina D., Petrovskis I., Borisova G., Berriman J.A., Roseman A.M., Crowther R.A., Fischer J., Musema S., Gelderblom H.R., et al. An amino-terminal segment of hantavirus nucleocapsid protein presented on hepatitis B virus core particles induces a strong and highly cross-reactive antibody response in mice. *Virology*. 2004;323:108–119. doi: 10.1016/j.virol.2004.02.022.
5. Gerritzen M.J.H., Martens D.E., Wijffels R.H., van der Pol L., Stork M. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnol. Adv.* 2017;35:565–574. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.05.003.
6. Gomzikova M.O., Aimaletdinov A.M., Bondar O.V., Starostina I.G., Gorshkova N.V., Neustroeva O.A., Kletukhina S.K., Kurbangaleeva S.V., Vorobev V.V., Garanina E.E., et al. Immunosuppressive properties of cytochalasin B-induced membrane vesicles of mesenchymal stem cells: Comparing with extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 2020;10:10740. doi: 10.1038/s41598-020-67563-9.

7. Gomzikova M.O., Kletukhina S.K., Kurbangaleeva S.V., Neustroeva O.A., Vasileva O.S., Garanina E.E., Khaiboullina S.F., Rizvanov A.A. Mesenchymal Stem Cell Derived Biocompatible Membrane Vesicles Demonstrate Immunomodulatory Activity Inhibiting Activation and Proliferation of Human Mononuclear Cells. *Pharmaceutics*. 2020;12:577. doi: 10.3390/pharmaceutics12060577.
8. Guardado-Calvo P., Rey F.A. The Envelope Proteins of the Bunyavirales. *Adv. Virus Res.* 2017;98:83–118. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.02.002.
9. Jiang D.B., Zhang J.P., Cheng L.F., Zhang G.W., Li Y., Li Z.C., Lu Z.H., Zhang Z.X., Lu Y.C., Zheng L.H., et al. Hantavirus Gc induces long-term immune protection via LAMP-targeting DNA vaccine strategy. *Antivir. Res.* 2018;150:174–182. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.12.011.
10. Jonsson C.B., Figueiredo L.T.M., Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010;23:412–441. doi: 10.1128/CMR.00062–09.
11. Laenen L., Vergote V., Calisher C.H., Klempa B., Klingström J., Kuhn J.H., Maes P. Hantaviridae: Current Classification and Future Perspectives. *Viruses*. 2019;11:788. doi: 10.3390/v11090788.
12. Lundkvist A., Kallio-Kokko H., Sjölander K.B., Lankinen H., Niklasson B., Vaheri A., Vapalahti O. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: Identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *Virology*. 1996;216:397–406. doi: 10.1006/viro.1996.0075.
13. Mehanny M., Koch M., Lehr C.M., Fuhrmann G. Streptococcal Extracellular Membrane Vesicles Are Rapidly Internalized by Immune Cells and Alter Their Cytokine Release. *Front. Immunol.* 2020;11:80. doi: 10.3389/fimmu.2020.00080.
14. Mir M.A. Hantaviruses. *Clin. Lab. Med.* 2010;30:67–91. doi: 10.1016/j.cll.2010.01.004.
15. Pap E., Pállinger É., Pásztói M., Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: Microvesicle-based information transfer. *Inflamm. Res.* 2009;58:1–8. doi: 10.1007/s00011-008-8210-7.

16. Shakirova V., Martynova E., Saubanova A., Khaertynova I., Khaybullina S., Garanina E. Analysis of markers of renal damage in patients with hantaan hemorrhagic fever. *Pract. Med.* 2019;17:97–102. doi: 10.32000/2072-1757-2019-8-97-102.
17. Shkair L., Garanina E.E., Stott R.J., Foster T.L., Rizvanov A.A., Khaiboullina S.F. Membrane Microvesicles as Potential Vaccine Candidates. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:1142. doi: 10.3390/ijms22031142.
18. Stahl P.D., Raposo G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. *Physiology.* 2019;34:169–177. doi: 10.1152/physiol.00045.2018.
19. Sung J.H., Yang H.M., Park J.B., Choi G.S., Joh J.W., Kwon C.H., Chun J.M., Lee S.K., Kim S.J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant. Proc.* 2008;40:2649–2654. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.08.009.
20. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., Kurashova S.S., Balkina A.S., Tkachenko P.E., Kruger D.H., et al. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019;25:2325–2328. doi: 10.3201/eid2512.181649.