

На правах рукописи

Ляпунова Наталья Андреевна

**ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
В ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЯХ КЛЕТОК ДИКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ –
РЕЗЕРВУАРНЫХ И СЛУЧАЙНЫХ ХОЗЯЕВ ВИРУСА**

03.02.02 – вирусология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ).

Научный руководитель: Хаснатинов Максим Анатольевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Научный консультант: Данчинова Галина Анатольевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Официальные оппоненты: Пахарукова Мария Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Чичерина Галина Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патологии насекомых, ФГБУН Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора

Защита состоится «25» июня 2021 г. в 9:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 336-60-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «_____» _____ 202__ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы

Клещевой энцефалит (КЭ) остаётся одной из наиболее опасных и широко распространённых природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Возбудителем заболевания является вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который относится к семейству *Flaviviridae* и передаётся человеку при укусах иксодовых клещей. В природе резервуарными хозяевами ВКЭ являются дикие млекопитающие мелких и средних размеров. В азиатской части Евразии основными резервуарами ВКЭ и прокормителями таёжных клещей являются красно-серая полёвка (*Myodes rufocanus*), полёвка-экономка (*Microtus oeconomus*), восточноазиатская лесная мышь (*Apodemus peninsulae*) и сибирский бурундук (*Tamias sibiricus*) [Злобин В. И., Горин О. З., 1996]. Отмечено, что заражённость восточноазиатских мышей, широко распространённых в Восточной Сибири, может превышать 20 % [Злобин В. И., Горин О. З., 1996; Балахонов С. В. и др., 2012]. Случайные хозяева вируса, например, рукокрылые и пресмыкающиеся, также способны поддерживать репродукцию ВКЭ, но в силу своей биологии они редко подвергаются нападению клещей в природе, поэтому не участвуют в циркуляции вируса [Süss J., 2003].

Показано, что даже при развитии генерализованной вирусемии многие резервуарные хозяева переносят инфекцию ВКЭ без клинических проявлений [Бахвалова В. Н. и др., 2007; Коренберг Э. И., 2013; Tonteri E. et al., 2013]. Однако, попадая в организм неадаптированных животных (случайных хозяев), в том числе и человека, вирус вызывает тяжёлое заболевание и в некоторых случаях гибель хозяина. В настоящее время до конца не выяснено, что обеспечивает устойчивость резервуарных хозяев к вирусной инфекции. Сравнительные исследования взаимодействия вируса со специфичными и случайными хозяевами могут дать ценную информацию об особенностях и закономерностях репродукции ВКЭ. Для этого необходимо проведение исследований на клеточном и молекулярном уровнях, что требует подходящих лабораторных моделей, прежде всего перевиваемых клеточных линий, которые являются одним из наиболее эффективных инструментов современной вирусологии.

Степень разработанности избранной темы

В настоящее время патогенез КЭ в человеческом организме и внутриклеточные механизмы репликации ВКЭ изучены довольно глубоко на лабораторных животных и в культурах клеток, моделирующих заболевание человека. Было показано, что во многом патогенное действие ВКЭ обусловлено развитием воспалительной реакции, угнетением систем врождённого иммунитета заражённой клетки и активацией каскада апоптоза [Крылова Н. В. и др., 2012; Gelpi E. et al., 2006; Růžek D. et al., 2009]. Однако об особенностях взаимодействия и адаптации вируса и его резервуарных хозяев известно гораздо меньше, и ещё меньше – о взаимодействии вируса и случайных хозяев. Установлено, что при инфекции мышевидных грызунов индуцируется экспрессия генов цитокинов Th2- и Th1-путей, причём для полевых мышей *Apodemus agrarius* была характерна активация интерлейкина-1 β [Бахвалова В. Н. и др., 2017]. При заражении культуры клеток рыжей полёвки (*Myodes glareolus*) – основного резервуара ВКЭ в Северной Европе – было выявлено, что ВКЭ индуцирует экспрессию противовирусных элементов врождённого иммунного ответа – интерферона- β и эффекторного белка Mx2 [Stoltz M. et al., 2011]. По экспериментальной инфекции случайных хозяев (летучие мыши, ящерицы) представлены работы в крайне ограниченном количестве [Gresikova-Kohutova M., Albrecht P., 1959; Nosek J. et al., 1961; Pavri K. M., Singh K. R., 1968; Sarkale P. et al., 2019]. Следует отметить, к настоящему моменту также не было проведено систематических сравнительных исследований репродукции ВКЭ в клеточных системах его резервуарных и случайных хозяев. Тем не менее, в указанных работах продемонстрирована способность животных, имеющих низкую вероятность контакта с ВКЭ в природе, к поддержанию репродукции клещевых флавивирусов *in vivo* и *in vitro*. Это делает случайных хозяев полезными моделями для проведения исследований по изучению способности вируса репродуцироваться в хозяевах, эволюционно далёких друг от друга, выявлению скрытых закономерностей циркуляции флавивирусов в природе, изучению адаптации переносимых клещами флавивирусов к различным хозяевам.

В последние годы в качестве наиболее перспективного инструмента в исследованиях зоонозных вирусных инфекций рассматривается создание новых модельных систем на основе культур клеток резервуарных хозяев инфекций [Gong M. et al., 2011; Stoltz M. et al., 2011; Bean A. G. et al., 2013; Eckerle I., Lenk M. et al., 2014; Mourya D. T. et al., 2013]. Однако разнообразие, доступность и степень изученности таких моделей ещё очень невелики. Созданная в Швеции клеточная линия эмбриональных фибробластов *M. glareolus* (VEFs) демонстрировала восприимчивость к вирусу [Stoltz M. et al., 2011], однако рыжие полёвки не являются резервуарными хозяевами для дальневосточного и сибирского субтипов ВКЭ, распространённых на большей части РФ. Вторая культура клеток получена в Японии от красно-серой полёвки (*Myodes rufocanus*) – резервуарного хозяина ВКЭ. Но, к сожалению, данная культура не была изучена в отношении её способности поддерживать репликацию ВКЭ и позиционирована как специфичная линия клеток для изоляции полёвочьих хантавирусов [Sanada T. et al., 2012]. Недавно в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск) был разработан ряд культур клеток наземных млекопитающих – хозяев трансмиссивных природно-очаговых инфекций. Прежде всего, это перевиваемая культура клеток почки восточноазиатской лесной мыши *A. peninsulae*, являющейся одним из основных прокормителей иксодовых клещей и резервуарным хозяином для возбудителей многих трансмиссивных инфекций, в том числе и для ВКЭ. Кроме того, была создана перевиваемая линия клеток почки сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905). Это животное в силу своего образа жизни в природе играет роль лишь случайного хозяина ВКЭ. Мы предположили, что эти новые культуры клеток могут служить моделями для изучения особенностей адаптации флавивирусов к внутриклеточной среде позвоночных хозяев вируса.

Цель исследования

Выявление особенностей и сравнение динамики основных стадий репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев (на моделях восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы).

Задачи исследования:

1. Сформировать и охарактеризовать рабочие стоки клеточных линий резервуарных (*A. peninsulae*) и случайных (*M. sibiricus*) хозяев вируса, верифицировать их видовую принадлежность на основе анализа фрагментов генома.
2. Оценить цитопатическое действие ВКЭ на культуры клеток резервуарных и случайных хозяев.
3. Сравнить динамику репликации внутриклеточной +РНК ВКЭ, синтеза вирусного полипротеина и репродукции инфекционного вируса в культурах клеток резервуарных и случайных хозяев вируса в ходе острой инфекции.
4. Провести сравнительное исследование репродукции инфекционного ВКЭ, репликации внутриклеточной +РНК и синтеза вирусного полипротеина в культурах клеток резервуарных и случайных хозяев вируса в ходе персистентной инфекции.
5. Охарактеризовать процесс адаптации ВКЭ к изучаемым линиям клеток млекопитающих на основе анализа генетических изменений, возникших во время персистентной инфекции.

Научная новизна работы

В результате выполнения данной работы на примере ВКЭ проведено сравнительное исследование репродукции клещевых флавивирусов в перевиваемых клеточных линиях восточноазиатской лесной мыши (ApnK) и сибирской ночницы (MdbK). Показано, что изучаемые клеточные линии могут быть использованы как стабильные *in vitro* модели репродукции ВКЭ в клетках млекопитающих – резервуарного и случайного хозяев вируса. Также впервые получены сравнительные данные о персистентной инфекции ВКЭ в перевиваемых клеточных линиях разных видов и экологических групп млекопитающих. Кроме этого, на примере культуры клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ показано, что сильное цитопатическое действие (ЦПД) вируса либо уничтожает популяцию клеток-хозяев, либо

приводит к освобождению клеточной линии от вирусной инфекции. В работе также была показана устойчивая циркуляция неинфекционной вирусной +РНК в клетках млекопитающих, не вырабатывающих инфекционный ВКЭ.

На примере перевиваемой линии клеток *A. peninsulae* установлено, что в процессе персистентной инфекции в клетках млекопитающих-резервуарных хозяев, в геноме ВКЭ появляются аминокислотные замены в белках E (D67N, E122Q, T175I, D203Y и T279K), NS1 (A157V), NS3 (V559L), NS4A (E33G), NS4B (T15K и E20K) и NS5 (A445V, L463R и D635A). На примере перевиваемой линии клеток *M. sibiricus* установлено, что в процессе персистентной инфекции в клетках млекопитающих – случайных хозяев в геноме ВКЭ появляются аминокислотные замены в белках M (H28Y), E (E155V, E155A, G159R, E201R, D203G, G278R, H282R), NS1 (G191S), NS3 (L487I), NS4A (N103I) и NS5 (H651N и L892V).

Впервые получены данные о специфической роли белков NS4A и NS4B в процессах адаптации ВКЭ к клеткам резервуарных и случайных хозяев. Впервые обнаружено, что белки С, NS2A и NS2B остаются неизменными на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при адаптации вируса к новым хозяевам.

Теоретическая значимость

В ходе работы созданы и описаны клеточные модели инфекции ВКЭ у мышевидных грызунов и рукокрылых, оценены особенности взаимодействия ВКЭ и разных видов млекопитающих на клеточном уровне, выявлены видоспецифичные изменения в геноме ВКЭ, происходящие в процессе адаптации к разным по своей роли хозяевам вируса. Полученные данные и разработки в дальнейшем можно будет применить при изучении механизмов, влияющих на эффективность репродукции и трансмиссии ВКЭ в природе, и использовать эти элементы клеточной биологии для разработки новых подходов к подавлению вируса.

В работе показано, что ВКЭ способен репродуцироваться в полученных линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения. При этом вирусная репродукция эффективнее протекает в клеточной линии резервуарного хозяина как на уровне репликации РНК ВКЭ, так и на уровне продукции инфекционного ВКЭ. Кроме того, линия клеток *A. peninsulae* эффективно накапливает антиген ВКЭ, тогда как клеточная линия *M. sibiricus* продемонстрировала неспособность к его накоплению. Эти данные поднимают вопрос о реальном значении персистенции ВКЭ среди млекопитающих в естественных условиях, о роли этого явления в формировании природных очагов КЭ и о необходимости совершенствования подходов к изучению персистентной инфекции у млекопитающих.

Предложен оригинальный способ сравнительной оценки согласованности репродукции ВКЭ в различных культурах клеток. Способ основан на анализе корреляций между различными стадиями репродукции ВКЭ на разных сроках и при разной множественности инфекции. Способ может быть использован для оценки относительной адаптированности вирусов к внутриклеточной среде различных хозяев.

Практическая значимость

В ходе выполнения работы показана способность клеточной линии резервуарного хозяина *A. peninsulae* эффективно синтезировать антиген ВКЭ в течение длительного времени, что делает её подходящим перспективным субстратом для наработки вирусных антигенов, используемых в производстве вакцин и иммунодиагностикомов. По результатам исследований был разработан и защищён патентом способ получения монослойной перевиваемой линии клеток почки *A. peninsulae* для репродукции ВКЭ и производства вирусного антигена для вакцин и диагностических препаратов (Патент RU 2017117772).

Успешное изучение репродукции ВКЭ позволяет ожидать, что созданные клеточные линии восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы могут быть использованы для изоляции, изучения и наработки антигенов других зоонозных вирусных инфекций.

Полученные в результате работы нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank – KT983422.1, KT983423.1, MT984208.1, MT974474 – и могут быть использованы для изучения распространения, генетического разнообразия и популяционной структуры *A. peninsulae*, *M. sibiricus* и ВКЭ.

Методология и методы исследования

В данном исследовании изучалась эффективность репродукции ВКЭ в линиях клеток млекопитающих, играющих разную роль для его выживания в природе. Работа основана на использовании недавно разработанных в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ перевиваемых культур клеток почки восточноазиатской мыши *A. peninsulae* (ApnK) и сибирской ночницы *M. sibiricus* (MdbK). Изучение особенностей вирусной репродукции в новых клеточных линиях проводили с использованием ранее описанного изолята ВКЭ 92М, относящегося к Сибирскому субтипу [Хаснатинов М. А. и др., 2012]. В качестве референсной лабораторной модели выбрана широко используемая в исследованиях флавивирусов культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ.

В ходе исследования сначала были сформированы и охарактеризованы стабильные рабочие стоки культур клеток ApnK и MdbK. Далее на основе анализа фрагментов генома СутВ, d-loop и COI была подтверждена видовая принадлежность культур клеток. Затем было оценено цитопатическое действие ВКЭ на эти культуры клеток, и далее в серии параллельных экспериментов было проведено сравнение эффективности репродукции ВКЭ в клетках ApnK, MdbK и СПЭВ. Для этого были выбраны такие показатели, как динамика репликации вирусной РНК, динамика синтеза вирусного полипротеина и динамика накопления инфекционного вируса при высокой и низкой множественности инфекции (МИ) (соответственно, МИ = 10 и МИ = 0,1 БОЕ на клетку). Также в работе оценивалась согласованность протекания указанных этапов репродукции ВКЭ в каждой клеточной линии. В заключение был проведён анализ адаптивных генетических и фенотипических изменений в геноме ВКЭ, произошедших в линиях клеток ApnK и MdbK в процессе персистентной инфекции при низкой множественности заражения.

В работе использовались следующие основные методы:

- цитологические (культивирование клеток млекопитающих, изучение морфологии клеток с помощью световой микроскопии окрашенных препаратов);
- молекулярно-генетические (изучение фенотипических проявлений в культурах клеток млекопитающих, обратная транскрипция, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР), NGS-секвенирование, молекулярное клонирование фрагментов вирусного генома в плазмидных бактериальных векторах, T7-транскрипция);
- вирусологические и микробиологические (прямая микроскопия, оценка вирулентности и эффективности репродукции ВКЭ в клеточных моделях; иммуноферментный анализ (ИФА));
- статистические (корреляционный анализ *r*-Спирмена, критерий оценки статистической значимости различий Манна – Уитни, *t*-критерий Стьюдента, квартильный метод исключения выпадающих значений).

Положения, выносимые на защиту:

1. Культуры клеток ApnK и MdbK являются стабильными перевиваемыми клеточными линиями восточноазиатской лесной мыши и сибирской ночницы и могут быть использованы в качестве *in vitro* моделей клеток резервуарного и случайного хозяина ВКЭ соответственно.
2. Перевиваемая клеточная линия резервуарного хозяина (ApnK) поддерживает репродукцию ВКЭ с высокой эффективностью, тогда как в линии клеток случайного хозяина (MdbK) репродукция ВКЭ существенно угнетена.
3. В клетках млекопитающих возможно выявление неинфекционной внутриклеточной вирусной +РНК, по меньшей мере в течение 17 недель после заражения. При этом ни инфекционный вирус, ни антиген ВКЭ не синтезируются.
4. В процессе адаптации ВКЭ к клеткам *A. peninsulae* и *M. sibiricus* происходят видоспецифичные изменения в генах, кодирующих вирусные белки Е, NS4А и NS4В. Белки С, рrМ, NS2А и NS2В не играют определяющей роли при адаптации ВКЭ к исследуемым культурам клеток млекопитающих.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением экспериментов в строго контролируемых условиях. Каждый эксперимент был проведён по меньшей мере в трёх биологических воспроизведениях. На каждом этапе присутствовали

отрицательные и положительные контрольные образцы. В экспериментах по изучению эффективности репродукции ВКЭ в клеточных линиях млекопитающих в качестве референс-культуры использована хорошо охарактеризованная лабораторная модель – клеточная линия почки эмбриона свиньи СПЭВ, полученная из государственной коллекции клеточных линий. Для изучения персистентной инфекции в каждой культуре клеток были созданы 4 независимых эволюционных линии ВКЭ, при этом характеристики каждой эволюционной линии устанавливались в трёх независимых воспроизведениях. Статистическая обработка полученных данных была проведена с учётом критериев статистической значимости. Достоверность данных, полученных с помощью высокопродуктивного секвенирования, обеспечивается определением нуклеотидной последовательности генома каждого образца в двух независимых технических повторях, для того чтобы идентифицировать мутации, внесённые ошибками полимераз во время подготовки образцов к секвенированию.

По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 5 – в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 – в журналах, индексируемых в БД Web of Science.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на российских и зарубежных научных конференциях, в том числе на: научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезней человека», посвящённой 95-летию основания Омского НИИ природно-очаговых инфекций (Омск, 2016); IX Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017); Международной научно-практической конференции, посвящённой 20-летию научного сотрудничества между Россией и Монголией «Разные страны – общие проблемы природно-очаговых инфекций» (Иркутск, 2018); III Байкальской международной научной конференции «Природно-очаговые трансмиссивные инфекции» (Иркутск, 2018); International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance «IMED 2018» (Вена, Австрия, 2018); Международной конференции «Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе» (Иркутск, 2019); Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (Иркутск, 2019); IV Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных с международным участием «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 2020).

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены лично автором или при его непосредственном участии. Вклад автора заключается в планировании исследования, проведении экспериментов, обработке, анализе и оформлении полученных данных, публикации результатов исследований и представлении их на конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка использованной литературы; изложена на 134 страницах текста, иллюстрирована 8 рисунками и 10 таблицами. Список использованной литературы включает в себя 272 наименования, из них 71 – на русском языке, 201 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Перевиваемая адгезивная линия клеток почки *A. peninsulae* ApnK была получена в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск). В работе использовали сток клеток, прошедший 30 пассажей. Перевиваемая линия клеток почки *M. sibiricus* была установлена в ходе 20 серийных пассажей. Клеточная линия восточноазиатской лесной мыши в дальнейшем будет обозначаться как ApnK, а линия клеток летучей мыши – как MdbK. Видовая идентичность культуры ApnK установлена с помощью анализа нуклеотидной последовательности митохондриального гена цитохрома B (mtCytB, номер доступа GenBank –

КТ983422) и последовательности D-петли митохондриального генома (d-loop, КТ983423). Для подтверждения вида культуры клеток MdbK анализировали фрагмент митохондриального гена цитохромоксидазы 1 (COI). Для обеих культур клеток был ранее проведён контроль контаминации посторонними микроорганизмами. В ПЦР не выявлено: ВКЭ, хантавирусов, морбилливирусов (в т. ч. вируса чумы плотоядных), вируса бешенства, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Rickettsia* sp., *Mycoplasma* sp. Все полученные ПЦР-продукты очищали электрофорезом в 1%-м геле агарозы и секвенировали непосредственно по методу Сэнгера с помощью автоматического секвенатора с использованием коммерческого сервиса (Синтол, Москва).

Перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ приобретена в «Коллекции клеточных линий человека и животных для исследований в области вирусологии» (ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, г. Санкт-Петербург).

Клеточные монослои выращивали в культуральных планшетах (примерно 150 тыс. клеток на лунку). Затем клетки заражали препаратом вирусной суспензии. Заражение проводили с использованием изолята ВКЭ сибирского субтипа 92М [Хаснатинов М. А. и др., 2012], прошедшего 4 пассажа в сосунках белых мышей и 6 пассажей в клетках СПЭВ. Для изучения острой фазы инфекции, заражение культур клеток производили с расчётной МИ = 10 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали при температуре 37 °С в течение 1 часа. После этого инокулят удаляли, клетки промывали трижды средой RPMI 1640 без добавления эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и наслаивали сверху среду поддержки (RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и 2%-й ЭТС). Отбор образцов для оценки инфекционности, продукции антигена ВКЭ и внутриклеточной концентрации РНК ВКЭ положительной полярности (+РНК) производили сразу после нанесения среды поддержки (0 часов после заражения), а также через 4, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 часа и на 2-й, 3-й, 4-й и 5-й дни после заражения. Отбор был произведён также и на 16-й день инфекции. При отборе образцов клеток для выделения РНК среду поддержки удаляли, монослой клеток промывали стерильным фосфатно-солевым буфером (ФСБ; pH = 7,4), отделяли от дна лунки, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Эксперимент проведён в трёх независимых повторях.

Для изучения персистентной инфекции клетки выращивали в 25 см² культуральных флаконах и заражали с расчётной множественностью 0,1 БОЕ на клетку. Вирус адсорбировали при температуре 37 °С в течение 1 часа. После этого инокулят удаляли, клетки трижды промывали средой RPMI 1640 без добавления ЭТС и наслаивали сверху среду поддержки (RPMI 1640 с добавлением антибиотиков и 2%-й ЭТС). Ежедневно монослой клеток открепляли с помощью трипсина с добавлением 0,5 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и пассировали в соотношении 1:2. Всего было проведено 25 пассажей. Образцы собирали ежемесячно. При отборе образцов клетки аккуратно отделяли от среды поддержки, ресуспендировали в 100 мкл ФСБ и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Эксперимент проведён в четырёх независимых повторях.

Образцы культуральной среды в обоих экспериментах осветляли центрифугированием при 13 400 об./мин в течение 5 мин, аликвотировали и хранили при –80 °С до титрования БОЕ и выявления внеклеточного антигена ВКЭ. Иммуноферментный анализ проводили с использованием тест-системы «ИФА ТС АГ ВКЭ» (ФГУП «НПО «Микроген», Томск). Суммарную РНК выделяли из 100 мкл культуральной среды или из 100 мкл суспензии клеток млекопитающих после заражения. Выделение производили с помощью набора Рибо-Преп («Амплисенс», Москва) согласно инструкции производителя. Очищенную РНК до исследования хранили в изопропанолe при –80 °С. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора для обратной транскрипции Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США). Для количественной оценки эффективности репликации вирусной РНК был использован метод qПЦР со стандартами транскрибированной РНК *in vitro*. Количественную ПЦР проводили согласно методике М. Schwaiger, Р. Cassinotti (2003) с модификациями. Чтобы получить стандартные образцы, с геномной +РНК ВКЭ получали комплементарную ДНК, участок которой, содержащий целевой фрагмент, амплифицировали в ПЦР с использованием праймеров

10072F (5'-GCTTGGATGACCACAGAGGAC-3') и 11154R (5'-AGCGGGTGT TTTTCCG-3'). Полученный ампликон длиной 853 н.о. лигировали в плазмидный вектор pTZ57R-T/A. Далее проводили клонирование этой плазмиды в компетентных клетках *E. coli* DH5alpha. Отбор клонов производили с помощью ПЦР-скрининга с фланкирующими ПЦР-праймерами. Для исключения влияния конформации плазмиды на эффективность ПЦР стандартные образцы были линейаризованы рестриктазой PstI. Далее выполняли выделение плазмидной ДНК с последующим проведением T7 *in vitro* транскрипции РНК. Концентрацию синтезированной РНК оценивали спектрофотометрически. Количество копий РНК в одном микролитре раствора рассчитывали на основе известной нуклеотидной последовательности и известной концентрации вектора со вставкой.

Для оценки ЦПД ВКЭ полностью сформированные монослои клеток в 24-луночных планшетах инфицировали соответствующим штаммом ВКЭ с множественностью инфекции 1 БОЕ на клетку (МИ = 1). После 1 ч адсорбции при 37 °С инокуляты удаляли, а клетки заливали средой поддержки (RPMI 1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков, 2%-й ЭТС) и инкубировали в течение 5 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. По окончании инкубации клетки фиксировали 4%-м формальдегидом, промывали водой и окрашивали 0,05%-м раствором кристаллического фиолетового. Окрашенные клетки промывали водой, тщательно удаляли избыток влаги и высушивали на воздухе при комнатной температуре. После этого производили визуальную оценку ЦПД. Для оценки количества жизнеспособных клеток каждую лунку экстрагировали метанолом и измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 590 нм. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение оптической плотности экстрактов инфицированных монослоев к оптической плотности лунок с незаражёнными клетками и выражали в процентах. На каждой экспериментальной планшете были предусмотрены 4 независимые лунки отрицательного контроля (незаражённые клетки). Каждый тест также проводился в четырёх независимых повторях, на основе которых рассчитывали средние значения и 95%-й доверительный интервал.

Секвенирование полногеномной последовательности изолята 92М проводили по методу Сэнгера с помощью автоматического анализатора с использованием коммерческого сервиса («Синтол», Москва). Для этого получали набор перекрывающихся ампликонов, которые секвенировали с помощью фланкирующих и внутренних праймеров. Редактирование ридов, составление контигов и извлечение консенсусной последовательности выполняли вручную с помощью программы BioEdit 7.0.5.3 [Hall T. A., 1999].

Секвенирование образцов после персистентной инфекции производили на базе ЦКП «ПЦР-диагностика» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ (г. Иркутск) с помощью высокопроизводительного секвенатора NextSeq 550 (Illumina, США). Чтобы исключить из анализа ошибки полимераз в процессе пробоподготовки, формирования библиотек и секвенирующей реакции для каждого образца подготавливали две независимых пробы двухцепочечной ДНК. В анализе учитывали только те мутации, которые были представлены в обеих пробах. Обработку ридов проводили с помощью облачного сервиса BaseSpace Sequence Hub (Illumina, <https://basespace.illumina.com/dashboard>) с использованием программ FastQ и FastQC. Картирование ридов на геном ВКЭ и извлечение консенсусных последовательностей производили с помощью инструмента Burrows – Wheeler Alignment-MEM [Li H., 2013]. В качестве индексного генома использовали полногеномную последовательность изолята 92М. Анализ выполняли с использованием веб-платформы Galaxy [Afgan E. et al., 2018]. Для сравнительного анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали программу MegaX [Kumar S. et al., 2018].

В работе под стадиями репродукции ВКЭ подразумевались три ряда данных: динамика репликации РНК ВКЭ (на основе данных количественной ПЦР), динамика трансляции вирусного полипротеина (на основе определения белка Е с помощью ИФА) и динамика репродукции инфекционного ВКЭ (на основе титрования БОЕ). Корреляционный анализ репродуктивных стадий вируса в линиях клеток СПЭВ, ApnK и MdbK проводили попарно между этими показателями для каждой клеточной линии. Анализ был проведён как для острой (МИ = 10), так и для персистентной (МИ = 0,1) инфекции. При этом для более корректного

сравнения результатов острой инфекции время наблюдения было условно поделено на ранний (0–24 ч после заражения) и поздний (2–16 сут. после заражения) этапы инфекции. Данные, полученные на этих этапах, анализировались отдельно. Таким образом, для каждой клеточной линии были проанализированы три стадии репродукции в трёх временных интервалах.

Относительную согласованность стадий репродукции для каждой линии клеток оценивали по балльной системе. Баллы присваивали исходя из значений коэффициента корреляции r , а именно: при высокой степени статистической значимости ($p < 0,05$) количество баллов соответствовало значению r ; при низкой степени статистической значимости ($p > 0,05$) коэффициент r оценивался в 0 баллов. Степень сбалансированности стадий жизненного цикла вируса оценивали путём сложения баллов раннего и позднего этапов острой инфекции, а также баллов персистентной инфекции для соотношений РНК/инфекционный ВКЭ, РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ. Полученную сумму расценивали как «индекс репродуктивного баланса» ВКЭ и использовали для сравнения репродукции вируса в клеточных линиях СПЭВ, ApnK или MdbK.

Результаты представлены в виде средних значений трёх независимых воспроизведений эксперимента. Эффективность ПЦР выражали в процентах и рассчитывали по формуле:

$$(10^{[-1/k]} - 1) \times 100,$$

где k – угловой коэффициент (slope) стандартной кривой.

Соответствие определения концентрации ДНК линейной модели оценивали по коэффициенту детерминации R^2 , реакцию считали линейной при $R^2 > 0,98$. Для оценки точности измерения количества ДНК вычисляли коэффициент вариации CV (%) средних значений стандартной кривой после пяти независимых воспроизведений в ходе 5 тестов в разные дни (межтестовая точность). Для оценки вариабельности наблюдений рассчитывали стандартное отклонение средних значений. Выпадающие значения концентрации РНК исключали с помощью квартильного метода [Walpole R. E. et al., 2007]. Оценку статистической значимости межгрупповых различий производили с помощью t -критерия Стьюдента, а также с помощью критерия Манна – Уитни; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Зависимость показателей различных стадий жизненного цикла ВКЭ оценивали с помощью критерия ранговой корреляции r -Спирмена. Расчёты производили с помощью программы MS Office Excel 2003 (Microsoft Corp., США) и пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Формирование стоков культур клеток и верификация видовой принадлежности

Для создания клеточных моделей с однородными культуральными свойствами каждую из используемых клеточных линий (ApnK, MdbK и СПЭВ) пересеивали и наращивали в четырёх культуральных флаконах площадью 175 см^2 до плотности монослоя, визуальной оцениваемой в 90–100 %. Сразу по достижении требуемой плотности клетки открепляли от подложки (см. Материалы и методы), подсчитывали общее количество клеток в стоке, отбирали аликвоту $\sim 10^5$ клеток для верификации видовой принадлежности и концентрировали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 16 мл среды для заморозки, замораживали при -80°C с декрементом температуры 1°C в минуту и аликвотировали по 1 мл. Аликвоты хранили в жидком азоте в качестве рабочего стока. Общее количество клеток в рабочем стоке каждой культуры составляло порядка 1×10^8 клеток.

Для верификации вида клеток были определены и проанализированы фрагменты митохондриальных локусов CytB и d-loop для ApnK и COI – для MdbK. Идентификация таксономической принадлежности производилась с помощью поиска наиболее гомологичных последовательностей с помощью инструмента BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Наиболее близкородственными последовательностями оказались:

- 1) для ApnK-CytB – AB073806, *Apodemus peninsulae* изолят GC2-98 [Serizawa K. et al., 2002];
- 2) для ApnK-d-loop – AY588251, *Apodemus peninsulae*, ваучер образца «77»;
- 3) для MdbK-COI – JF442893, *Myotis brandtii brandtii* (син. *Myotis sibiricus*), ваучер образца «ZMMU S-171627».

Оценка цитопатического действия вируса клещевого энцефалита на клеточные линии резервуарного и случайного хозяев и на культуру клеток СПЭВ

При заражении с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку в культуре клеток СПЭВ первые проявления ЦПД вируса появлялись на 2-е сутки после заражения с множественностью инфекции. Это проявлялось в грануляции цитоплазмы и округлении формы некоторых из прикрепленных клеток и небольшом увеличении количества плавающих клеток и дебриса. На 3-и сутки после заражения ЦПД проявлялось в статистически значимом снижении жизнеспособных клеток, разрежении монослоя и появлении значительного количества дебриса. Через неделю после заражения патологические процессы усугублялись, монослой разрушался приблизительно на 2/3, а многие клетки имели неправильную форму с сильно гранулированной цитоплазмой.

В культуре клеток АрпК небольшие проявления ЦПД вируса появлялись на 5–7-й день после заражения в виде изменения морфологии клеток и разрежения монослоя, однако к 7-му дню инфекции выживали порядка 80 % клеток, а далее наблюдался медленный восстановительный рост монослоя.

В культуре клеток МdbК проявлений ЦПД не было заметно ни на ранних, ни на поздних сроках инфекции. Более того, через неделю после заражения отмечалась некоторая тенденция к увеличению количества жизнеспособных клеток в зараженных культурах по сравнению с контрольными.

Эффективность репликации вирусной РНК, синтеза вирусного антигена и репродукции инфекционного вируса при высокой множественности заражения в разных линиях клеток

Клеточная линия СПЭВ. В клетках СПЭВ статистически значимое нарастание концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ отмечено через 8 ч после заражения ($p = 0,0495$), далее наблюдалось плавное повышение до 16 ч, после чего концентрация внутриклеточной РНК стабилизировалась на уровне 8 lg копий/мкл (Рисунок 1А) и удерживалась на этом значении в течение первых суток инфекции. К исходу вторых суток инфекции концентрация +РНК внутри клеток СПЭВ продолжала нарастать и достигала пиковых значений 9,5 lg копий/мкл. После этого начиналось плавное снижение концентрации, и на 5–16-й день после заражения концентрация +РНК в клетках СПЭВ стабилизировалась на уровне ~7,3 lg копий/мкл. В целом можно отметить, что в течение первых 5 суток репродукции в клетках СПЭВ происходили три ступенчатых повышения концентрации +РНК ВКЭ: с 4 до 8 ч, с 12 до 16 ч и с 24 до 48 ч после заражения.

В течение первых суток после заражения выявляемое количество внеклеточного антигена ВКЭ было ниже пороговой величины (Рисунок 1Б). Заметное нарастание было отмечено через 2 суток инфекции: концентрация выросла в 20 раз по сравнению с первыми сутками. Через 3 дня концентрация достигла пикового значения: оптическая плотность на этой точке составила 2,4 ед. Далее, к 3-м и 4-м суткам количество вирусного антигена снизилось на 0,2 и 0,4 ед. соответственно. Через 16 дней концентрация увеличилась до 2,1 ед.

Статистически значимое увеличение количества инфекционного ВКЭ было отмечено через 16 ч после заражения ($p = 0,03$), что, вероятно, отражает синтез первой генерации инфекционных вирионов (Рисунок 1В). Делая измерения каждые 4 часа в течение первых суток после заражения, мы наблюдали последовательный рост концентрации инфекционного вируса. По истечении вторых суток было отмечено увеличение количества инфекционного ВКЭ до своего максимального значения (8,3 lg БОЕ/мл). Затем наблюдалось понижение концентрации на ~0,3–0,4 lg БОЕ/мл каждые сутки. Через 16 дней концентрация инфекционного вируса стала сопоставимой с таковой на точке 16 ч ($p = 0,08$).

Клеточная линия АрпК. В клетках восточноазиатской лесной мыши синтез +РНК ВКЭ происходил с существенной задержкой по сравнению с линией клеток СПЭВ: статистически значимое повышение концентрации до 5,3 lg копий/мкл отмечено только через 10 ч после заражения ($p = 0,0455$) (Рисунок 1А). Через 24 ч концентрация была ниже, чем в СПЭВ: 6,8 против 8,0 lg копий/мкл, хотя статистическая поддержка наблюдаемых различий была низкой ($p = 0,13$). Далее концентрация +РНК нарастала и через 3 дня после заражения статистически

значимо не отличалась от таковой для клеток СПЭВ (9,13 и 9,07 lg копий/мкл соответственно; $p = 0,8$). На этом уровне концентрация +РНК оставалась стабильной до 5 дней после заражения, после чего начинала плавно снижаться, достигая минимального значения 7,8 lg копий/мкл. В отличие от клеток СПЭВ, в АрпК отмечено только два ступенчатых нарастания концентрации +РНК – с 8 до 10 ч и с 24 до 48 ч после заражения. При этом на поздних сроках инфекции концентрация +РНК ВКЭ в этой культуре более стабильна, чем в клетках СПЭВ (9,2 против 7,4 lg копий/мкл соответственно; $p = 0,0495$).

Количество вирусного антигена, обнаруженное на 1-е сутки, было за пределами детекции (Рисунок 1Б). Через два дня количество антигена стало примерно в 8 раз выше, чем на предыдущей точке, и в 3 раза ниже, чем через 2 дня в клеточной линии СПЭВ. До 3-го дня инфекции нарастание концентрации внеклеточного антигена происходило с меньшей эффективностью, чем в линии клеток СПЭВ. Характер кривой роста АрпК повторял динамику изменения количества антигена в СПЭВ на протяжении всего эксперимента. Через 3 дня после заражения разница концентраций в АрпК и СПЭВ сократилась в 2 раза. Через 4 дня эти величины практически сравнялись: количество вирусного антигена в клетках АрпК превысило таковое в СПЭВ на 0,1 ед. На этой точке было достигнуто пиковое значение – 2,3 ед. На 5-е сутки было отмечено уменьшение концентрации вирусного антигена. Через 16 дней после заражения количество антигена увеличилось до уровня пикового значения, оставаясь выше, чем в СПЭВ на этой точке.

Синтез первой генерации инфекционных вирионов в клетках восточноазиатской лесной мыши так же, как и в СПЭВ, был отмечен через 16 ч после заражения ($p = 0,046$), но в меньшей концентрации (2,4 против 3,3 lg БОЕ/мл) (Рисунок 1В). Тем не менее, уже через 14 ч после заражения между концентрациями инфекционного ВКЭ в АрпК и СПЭВ наблюдались статистически значимые различия ($p = 0,046$) и продолжали отмечаться до 48 ч ($p = 0,046–0,049$). Заметно, что на этом промежутке репродукция ВКЭ в клетках АрпК идёт менее интенсивно по сравнению с репродукцией в СПЭВ. Через 3 дня после заражения количество инфекционного вируса в клетках АрпК оставалось ниже (7,6 против 8 lg БОЕ/мл), хотя статистическая поддержка наблюдаемых различий была низкой ($p = 0,3$). Далее началось плавное снижение концентрации, при этом через 4 дня отмечались статистически значимые различия с культурой клеток СПЭВ ($p = 0,049$). Через 5 дней после заражения значения концентрации инфекционного ВКЭ в обеих клеточных линиях составили 7,3 lg БОЕ/мл. Через 16 дней концентрация инфекционного вируса составила 6,3 lg БОЕ/мл, в то время как в клетках СПЭВ стала значительно меньше – 3,0 lg БОЕ/мл ($p = 0,043$).

Клеточная линия MbdK. В клетках сибирской ночницы через 10 ч после заражения наблюдалось статистически значимое ($p = 0,0455$) повышение концентрации +РНК до 5,9 lg копий/мкл (Рисунок 1А). В течение первых 24 часов концентрация плавно повышалась до 6,6 lg копий/мкл, что сопоставимо с концентрацией в клетках АрпК ($p = 0,8$). Однако далее репликация +РНК замедлялась и к исходу третьих суток достигала значения 7,5 lg копий/мкл, при этом различия с культурами СПЭВ и АрпК были статистически значимы ($p = 0,0495$). Изменения концентрации +РНК в клеточной линии *M. sibiricus* были линейны и не проявляли ступенчатого характера, выражаясь в плавном повышении концентрации.

Специфического нарастания концентрации вирусного антигена в этой клеточной линии обнаружено не было (Рисунок 1Б). Значения концентрации на всех временных точках находились за пределами отсекающего значения ОП.

Синтез первой генерации инфекционных вирионов в MbdK происходил с существенной задержкой по сравнению с культурами клеток СПЭВ и АрпК: статистически значимое повышение концентрации инфекционного ВКЭ до 2,8 lg БОЕ/мл отмечено только через 20 ч после заражения ($p = 0,046$) (Рисунок 1В). При сравнении концентрации инфекционного вируса в клетках MdbK с концентрациями в культурах СПЭВ и АрпК были выявлены статистически значимые различия на всех временных точках ($p = 0,043–0,049$) начиная с 16 ч. При этом продукция инфекционного ВКЭ в клеточной линии MdbK характеризовалась более низкими значениями. Уже через 16 ч после заражения количество инфекционного вируса в клетках MdbK статистически значимо отличалось от такового в СПЭВ и АрпК (Mdbk – 1,8 lg БОЕ/мл, СПЭВ – 3,3 lg БОЕ/мл ($p = 0,046$), АрпК – 2,4 lg БОЕ/мл ($p = 0,04$)), что, вероятно, обусловлено более

поздним синтезом первой генерации вирионов. Тем не менее, концентрация инфекционного ВКЭ в клеточной линии MdbK увеличивалась в течение первых 24 ч до 3,3 lg БОЕ/мл, оставаясь статистически значимо ниже таковой в клеточных линиях СПЭВ и ApnK (соответственно, 6,0 lg БОЕ/мл ($p = 0,046$) и 4,8 lg БОЕ/мл ($p = 0,043$)). Через 2 дня разница со СПЭВ и ApnK значительно возросла (соответственно, 8,3 и 7,4 lg БОЕ/мл ($p = 0,046$)), несмотря на то, что на этой точке было достигнуто максимальное значение для MdbK (5,5 lg БОЕ/мл). Через 3 дня после заражения кривая концентрации инфекционного ВКЭ культуре клеток *M. sibiricus* вышла на плато (5,2–5,4 lg БОЕ/мл).

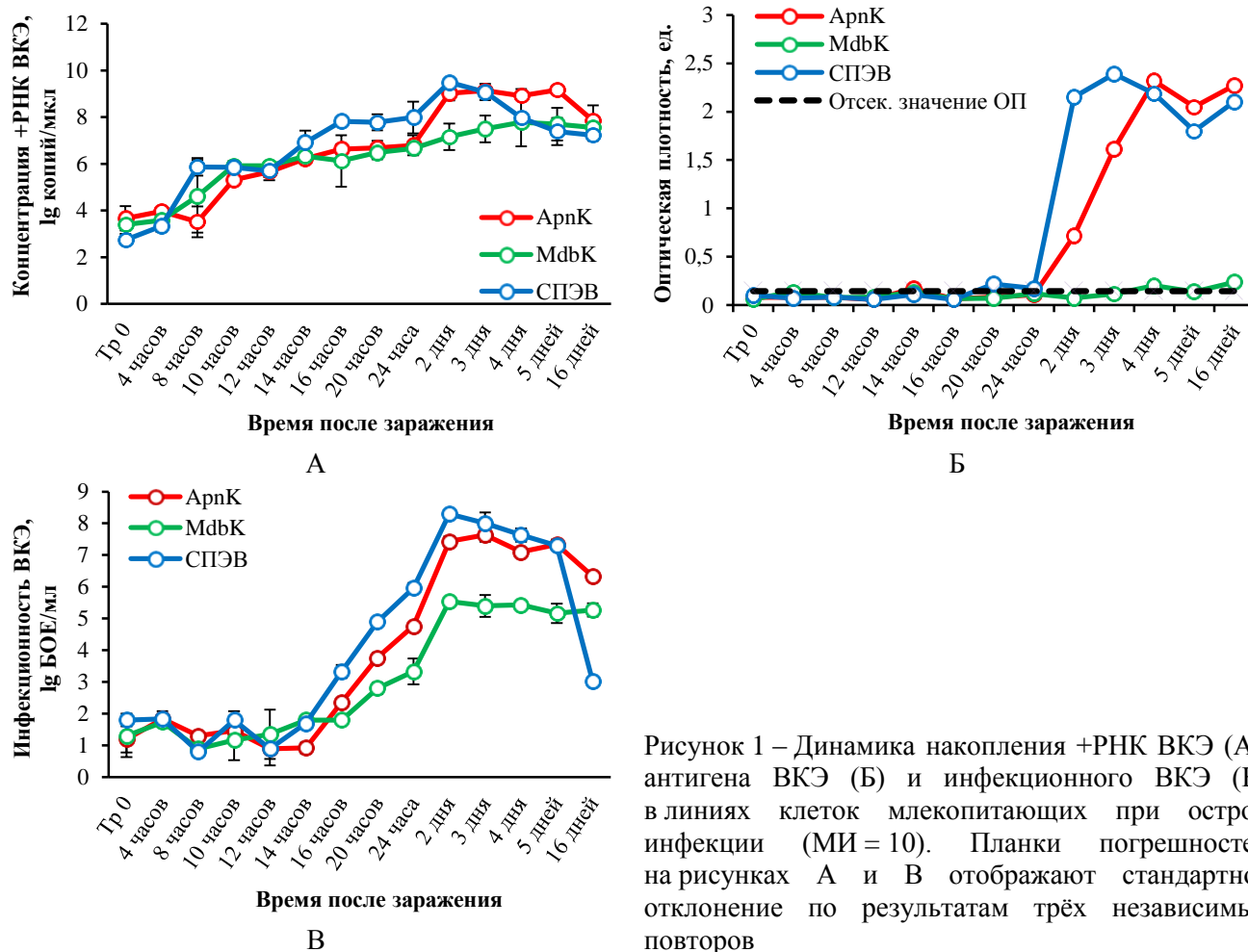


Рисунок 1 – Динамика накопления +РНК ВКЭ (А), антигена ВКЭ (Б) и инфекционного ВКЭ (В) в линиях клеток млекопитающих при острой инфекции (МИ = 10). Планки погрешностей на рисунках А и В отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

Таким образом, ВКЭ способен репродуцироваться в линиях клеток резервуарного и случайного хозяев при высокой множественности заражения. При этом вирусная репродукция эффективнее протекает в клеточной линии резервуарного хозяина как на уровне репликации РНК ВКЭ, так и на уровне продукции инфекционного ВКЭ. Кроме того, в ходе проведённого эксперимента клеточная линия случайного хозяина продемонстрировала неспособность к накоплению вирусного белка.

Эффективность репликации вирусной РНК, синтеза вирусного антигена и репродукции инфекционного вируса при длительной инфекции с низкой множественностью заражения в разных линиях клеток

Клеточная линия СПЭВ. В клеточной линии СПЭВ статистически значимое нарастание концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ до 7,7 lg копий/мкл отмечено через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Следует отметить, что начиная со 2-й недели клеточный монослой начал разрушаться, что, вероятно, было вызвано цитопатическим действием вируса. В ходе дальнейшего эксперимента внутриклеточная +РНК ВКЭ была обнаружена на 9-й, 17-й и 20-й неделях в значениях, сопоставимых друг с другом ($p = 0,3$) (Рисунок 2А).

Динамика накопления внеклеточного антигена характеризовалась значительным подъёмом концентрации через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$) до 2,0 ед. (Рисунок 2Б). На дальнейших этапах эксперимента антиген в клеточной линии СПЭВ не выявлялся.

Статистически значимое повышение концентрации инфекционного вируса было отмечено через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Через 2 недели эффективность продукции инфекционного вируса значимо снизилась с 5,9 до 3,9 lg БОЕ/мл ($p = 0,02$), что сопровождалось началом разрушения клеточного монослоя. К концу 3-й недели живых клеток СПЭВ во флаконах практически не осталось (не показано). В ходе дальнейшего эксперимента инфекционный вирус в этой клеточной линии не обнаруживался (Рисунок 2В).

Клеточная линия ArpK. В клетках восточноазиатской лесной мыши статистически значимое повышение концентрации внутриклеточной +РНК ВКЭ до 8,7 lg копий/мкл наблюдалось через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$) (Рисунок 2А). Синтез геномных копий +РНК ВКЭ происходил эффективнее по сравнению с культурой СПЭВ, причём различия были статистически значимы ($p = 0,02$). Пиковой отметки концентрация достигла через 2 недели после заражения, статистически значимо не отличаясь от значения на предыдущей точке ($p = 0,6$). Далее эффективность репликации начала снижаться: через 3 недели после заражения концентрация упала до 7,8 lg копий/мкл, а через 4 недели достигла значения 5,7 lg копий/мкл. Затем эффективность репликации начала увеличиваться и стабилизировалась на уровне ~7,8 lg копий/мкл до конца эксперимента. На точках 9, 17 и 20 недель количество геномных копий вирусной +РНК было приблизительно в 10 000 выше, чем в СПЭВ на этих же точках.

В отличие от СПЭВ, клеточная линия ArpK показала высокую способность к продукции вирусного антигена (Рисунок 2Б). Статистически значимое нарастание концентрации до 1,8 ед. отмечено в первую неделю после заражения ($p = 0,03$), при этом различия со СПЭВ на этой точке были статистически значимы ($p = 0,03$). Через 2 недели концентрация снизилась в 2 раза, через 3 недели – в 4,5 раза. В ходе дальнейших наблюдений вирусный антиген выявляли в невысоких концентрациях, сопоставимых друг другу, через 4, 9, 12, 17 и 20 недель инфекции ($p = 0,1-0,9$). Через 24 и 25 недель значения концентрации внеклеточного антигена были ниже предела детекции.

Статистически значимое нарастание концентрации инфекционного ВКЭ в ArpK наблюдалось через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$), значение которой было сопоставимо с концентрацией в СПЭВ (6,4 против 5,9 lg БОЕ/мл; $p = 0,06$) (Рисунок 2В). Через 2 недели разница концентраций в ArpK и СПЭВ статистически значимо увеличилась ($p = 0,02$) из-за резкого снижения эффективности продукции инфекционного вируса в клетках СПЭВ. В отличие от СПЭВ, последующее уменьшение количества инфекционного вируса имело плавный ступенчатый характер: первое статистически значимое снижение было отмечено с 1-й по 3-ю неделю ($p = 0,02$), второе – с 12-й по 24-ю неделю ($p = 0,02$). Через 25 недель после заражения в ArpK снова наблюдался рост концентрации инфекционного ВКЭ, хотя статистически значимых отличий от концентрации на 24-й неделе обнаружено не было ($p = 0,4$).

Клеточная линия MbdK. В клетках сибирской ночницы концентрация внутриклеточной +РНК ВКЭ статистически значимо нарастала через 1 неделю после заражения ($p = 0,02$). Синтез геномных копий вирусной +РНК в этой точке проходил более интенсивно по сравнению с культурой СПЭВ (Рисунок 2А); наблюдаемые различия были статистически значимы (8,5 против 7,7 lg копий/мкл; $p = 0,02$). Кривая изменения количества концентрации вирусной +РНК повторяла характер изменения в клеточной линии ArpK: различия с высокой статистической поддержкой были обнаружены только на двух точках – 2 и 9 недель после заражения ($p = 0,02$). При сравнении значений концентрации со значениями в культуре СПЭВ различие составило 3 порядка в точке 9 недель и 4 порядка – в точках 17 и 20 недель.

Рост концентрации внеклеточного антигена до 0,5 ед. в MdbK наблюдался через 1 неделю после заражения, различия со СПЭВ и ArpK были статистически значимы ($p = 0,02$ и $p = 0,03$ соответственно) (Рисунок 2Б). Накопления антигена ВКЭ не происходило: значения концентрации на подавляющем большинстве временных точек были ниже отсекающего значения ОП. В детектируемых количествах антиген был выявлен через 4 недели (0,2 ед.) и 25 недель после заражения (0,3 ед.), причём концентрация через 4 недели статистически значимо отличалась от таковой в культуре клеток ArpK ($p = 0,02$).

Так же, как в клеточных линиях СПЭВ и ApnK, в MdbK статистически значимое увеличение концентрации инфекционного вируса было отмечено через 1 неделю после заражения (5,4 lg БОЕ/мл; $p = 0,02$) (Рисунок 2В). Инфекционный ВКЭ обнаруживался на этой точке в меньшем количестве по сравнению со СПЭВ и ApnK, при этом разница была статистически значима (5,9 lg БОЕ/мл ($p = 0,03$) и 6,4 lg БОЕ/мл ($p = 0,02$) соответственно). Несмотря на то, что через 2 недели продукция инфекционного ВКЭ замедлилась, разница концентраций в MdbK и СПЭВ увеличилась в пользу MdbK (5,0 против 3,9 lg БОЕ/мл) с высокой степенью статистической значимости ($p = 0,02$). При сравнении концентрации инфекционного вируса в MdbK с таковой в ApnK также были подтверждены статистически значимые отличия ($p = 0,02$). Дальнейшие изменения количества инфекционного вируса в MdbK носили линейный характер: на протяжении всего времени эксперимента концентрация стабильно удерживалась на уровне 4,8–5,4 lg БОЕ/мл. Более низким значением характеризовалась концентрация на 20-й неделе после заражения, статистически значимо отличаясь от таковой на 17-й неделе (3,6 против 5,2 lg БОЕ/мл; $p = 0,04$). Вероятно, снижение количества инфекционного ВКЭ на этой точке обусловлено высоким стандартным отклонением. При сравнении значений эффективности репродукции ВКЭ в клеточных линиях MdbK и ApnK с 3-й по 25-ю недели статистически значимых различий выявлено не было ($p = 0,08–0,8$).

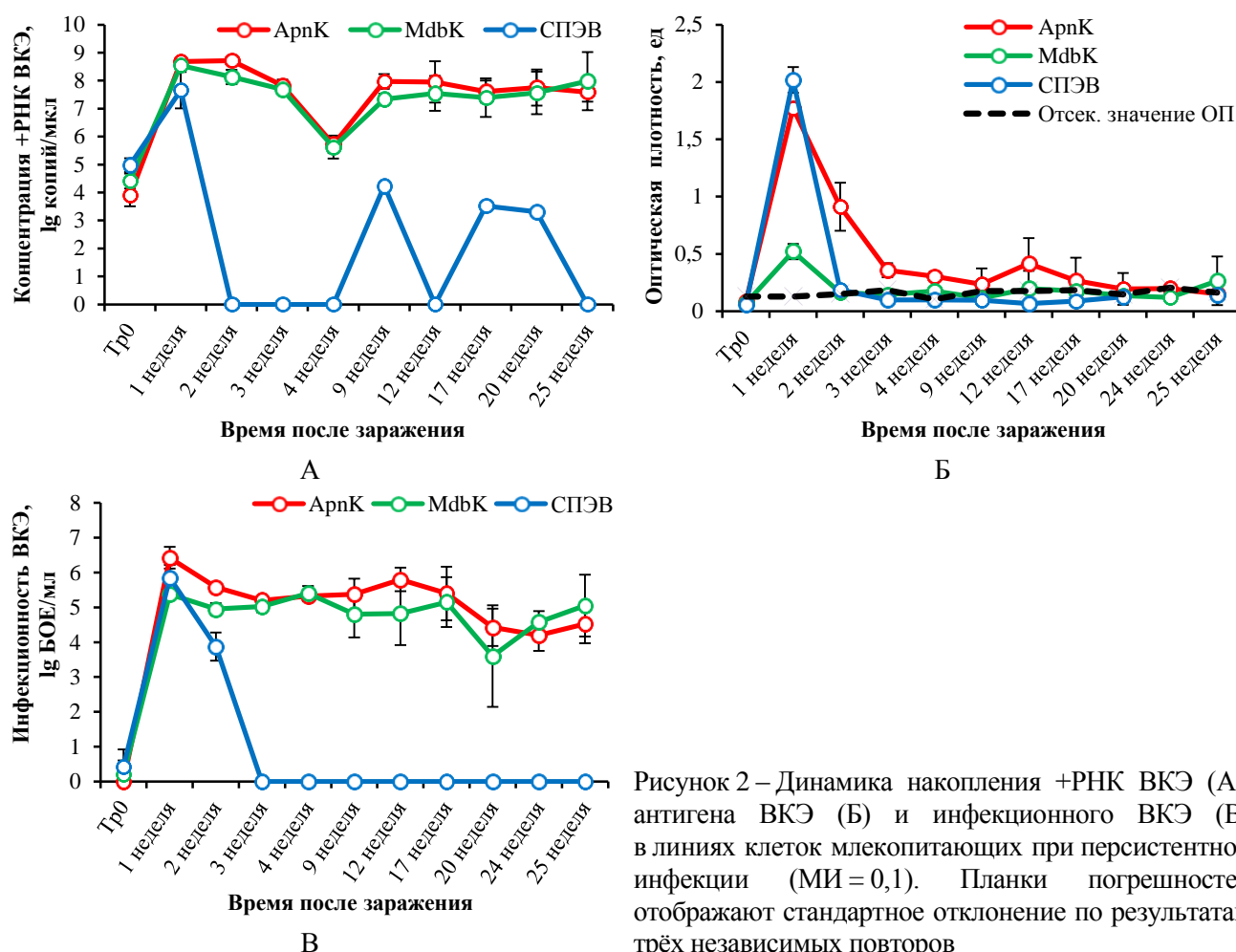


Рисунок 2 – Динамика накопления +РНК ВКЭ (А), антигена ВКЭ (Б) и инфекционного ВКЭ (В) в линиях клеток млекопитающих при персистентной инфекции (МИ = 0,1). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение по результатам трёх независимых повторов

Таким образом, клеточные линии резервуарного и случайного хозяев поддерживают персистенцию ВКЭ на протяжении по меньшей мере 6 месяцев при низкой множественности заражения. Эффективность процессов репликации РНК ВКЭ и продукции инфекционного ВКЭ была сопоставима в этих клеточных линиях, однако линия клеток летучей мыши продемонстрировала неспособность к накоплению антигена ВКЭ. Линия клеток СПЭВ не поддерживает продукцию жизнеспособного вируса при персистентной инфекции.

Оценка согласованности стадий жизненного цикла вируса клещевого энцефалита в разных культурах клеток

В клеточной линии СПЭВ коэффициент корреляции r между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,6 ($p = 0,06$) на ранней и 1 ($p = 0,0001$) – на поздней стадии острой инфекции (Таблица 1). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент был равен 0,5 ($p = 0,2$). Поскольку статистически значимая корреляция отмечается только на поздней стадии острой инфекции, сбалансированность процессов вирусной репликации и продукции инфекционного вируса в этом периоде инфекции соответствовала значению r и составила 1 балл. В итоге репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 1.

При оценке согласованности между эффективностью репликации РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина коэффициент корреляции составил 0,8 ($p = 0,04$) на поздней стадии острой инфекции (Таблица 1). Коэффициент r соответствующих стадий не был определён для ранней стадии острой инфекции и персистентной инфекции в силу неэффективности процесса вирусной трансляции на этих этапах в линии клеток СПЭВ: значения концентрации антигена ВКЭ были за пределами пороговой величины (Рисунки 1Б, 2Б). Потому согласованность рассматриваемых показателей составила 0 баллов в обоих случаях. При поздней стадии острой инфекции сбалансированность процессов соответствовала значению r и составила 0,8 балла. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин был равен 0,8.

Оценка согласованности между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ в клеточной линии СПЭВ показала идентичный результат: репродуктивный баланс стадий был равен 0,8. В итоге индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии СПЭВ составил 2,6 (Таблица 1).

Таблица 1 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток СПЭВ

Стадии репродукции	СПЭВ, период инфекции и вирусная нагрузка	r	p	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,6	0,06	0	1
	Поздний, МИ = 10	1	0,0001	1	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,5	0,2	0	
РНК/полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,8
	Поздний, МИ = 10	0,8	0,04	0,8	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Полипротеин/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,8
	Поздний, МИ = 10	0,8	0,04	0,8	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Индекс репродуктивного баланса СПЭВ					2,6

Примечание (здесь и в Таблицах 2, 3): при высокой статистической значимости корреляции ($p < 0,05$) согласованность процессов (первый столбец) выражается количеством баллов, соответствующих коэффициенту r . При низкой статистической значимости ($p > 0,05$) коэффициент r оценивается в 0 баллов. Репродуктивный баланс стадий жизненного цикла ВКЭ оценивается путём сложения баллов разных периодов инфекции для попарно анализируемых процессов: РНК/инфекционный ВКЭ, РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ. Общий «индекс репродуктивного баланса» ВКЭ рассчитывали как сумму баллов трёх стадий репродукции.

В клеточной линии АрпК коэффициент корреляции между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,69 ($p = 0,03$) как на ранней, так и на поздней стадиях острой инфекции (Таблица 2). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент составил 0,73 ($p = 0,008$). Таким образом, во всех трёх периодах

инфекции сбалансированность этих процессов равнялась значению r и составила 0,69, 0,69 и 0,73 балла соответственно. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 2,11.

При оценке согласованности между эффективностью репликации РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина коэффициент корреляции составил 0,1 ($p = 0,1$) на поздней стадии острой инфекции (Таблица 2). Для ранней стадии острой инфекции анализ соответствующих стадий не проводился в силу неэффективности процесса трансляции на этом этапе: значения концентрации антигена ВКЭ в линии клеток АрпК, аналогично таковой в СПЭВ, были за пределами пороговой величины (Рисунок 1Б). В то же время на поздней стадии острой инфекции корреляция была статистически незначима. Потому согласованность рассматриваемых показателей составила 0 баллов для обоих периодов инфекции. При персистентной инфекции коэффициент r был равен 0,9 ($p = 0,001$). Сбалансированность процессов при персистентной инфекции равнялась значению r и составила 0,9 балла. В итоге репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин был равен 0,9.

Согласованность между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ в клеточной линии АрпК оценивалась аналогичным образом: статистически значимая корреляция была обнаружена только при персистентной инфекции. Репродуктивный баланс стадии был равен 0,74. Итоговый индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии АрпК составил 3,8 (Таблица 2).

Таблица 2 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток АрпК

Стадии репродукции	АрпК, период инфекции и вирусная нагрузка	r	p	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,69	0,03	0,69	2,11
	Поздний, МИ = 10	0,69	0,03	0,69	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,73	0,008	0,73	
РНК/полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,9
	Поздний, МИ = 10	0,1	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,9	0,001	0,9	
Полипротеин/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0,74
	Поздний, МИ = 10	0,03	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,74	0,007	0,74	
Индекс репродуктивного баланса АрпК					3,75

Примечание: см. примечание к Таблице 1.

В клеточной линии MdbK коэффициент корреляции между эффективностью репликации РНК ВКЭ и продукцией инфекционного ВКЭ составил 0,9 ($p = 0,002$) на ранней и 0,2 ($p = 0,1$) – на поздней стадии острой инфекции (Таблица 3). При персистентной инфекции соответствующий коэффициент был равен 0,3 ($p = 0,2$). Статистически значимая корреляция выявлена только на ранней стадии острой инфекции. Таким образом, сбалансированность процессов вирусной репликации и продукции инфекционного ВКЭ на этом периоде инфекции составила 0,9 балла. Репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/инфекционный вирус был равен 0,9.

Корреляционный анализ между репликацией РНК ВКЭ и трансляцией вирусного полипротеина не проводился, как и между трансляцией вирусного полипротеина и продукцией инфекционного ВКЭ. В силу неэффективности процесса вирусной трансляции в этой клеточной линии (Рисунки 1Б, 2Б) согласованность рассматриваемых показателей была равна 0 баллов на каждом периоде инфекции. В итоге репродуктивный баланс соотношения стадий РНК/полипротеин и полипротеин/инфекционный ВКЭ был равен 0 в обоих случаях.

Итоговый индекс репродуктивного баланса всех стадий жизненного цикла ВКЭ в клеточной линии MdbK составил 0,9 (Таблица 3).

Таблица 3 – Оценка сбалансированности стадий репродукции ВКЭ в линии клеток MdbK

Стадии репродукции	MdbK, период инфекции и вирусная нагрузка	<i>r</i>	<i>p</i>	Согласованность процессов (баллы)	Репродуктивный баланс стадий
РНК/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	0,9	0,002	0,9	0,9
	Поздний, МИ = 10	0,2	0,1	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	0,3	0,2	0	
РНК/полипротеин	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0
	Поздний, МИ = 10	–	–	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Полипротеин/инфекционный ВКЭ	Ранний, МИ = 10	–	–	0	0
	Поздний, МИ = 10	–	–	0	
	Персистенция, МИ = 0,1	–	–	0	
Индекс репродуктивного баланса MdbK					0,9

Примечание: см. примечание к Таблице 1.

Таким образом, сравнивая полученный в разных линиях клеток индекс репродуктивного баланса (СПЭВ – 2,6; АрпК – 3,8; MdbK – 0,9), мы можем прийти к выводу, что в клеточной линии восточноазиатской лесной мыши процессы репликации РНК ВКЭ, трансляции вирусного полипротеина и продукции инфекционного вируса в наибольшей степени согласованы между собой.

Изменения в геноме вируса клещевого энцефалита

На первом этапе нами был секвенирован полный геном исходного изолята 92М. Нуклеотидная последовательность депонирована в GenBank с номером доступа MT974474. Длина генома составила 10922 н.о., геном содержит 5'-НТР длиной 133 н.о., открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин и 3'-НТР длиной 545 н.о. Вирус относится к сибирскому субтипу, эволюционная линия «Васильченко». В геноме отмечены вырожденные нуклеотиды в позициях 510 (s), 515 (y), 886 (y), 3362 (r), 7974 (k), 8139 (r) и 9229 (r). Это может служить признаком незавершённой адаптации изолята к культуре клеток СПЭВ, используемой для рутинного пассирования вируса.

С использованием генома исходного варианта 92М в качестве референс-генома собраны 8 полногеномных последовательностей линий ВКЭ, независимо друг от друга персистировавших в течение 25 недель в культурах клеток резервуарного и случайного хозяев. Эволюционные линии ВКЭ из клеток *A. peninsulae* АрпК обозначены А1, А2, А3 и А4; линии из клеток *M. sibiricus* MdbK – М1, М2, М3 и М4. Генетические дистанции между персистентными вариантами и исходным геномом варьировали от 0,00064 до 0,00083 нуклеотидных замен на сайт (Таблица 4).

Существенных различий ни во внутри-, ни в межгрупповой разнообразии вариантов отмечено не было: генетическая дистанция в парах «АрпК group» – 92М и «MdbK group» – 92М составила 0,00015 и 0,0017 замен на сайт соответственно. Межгрупповая дистанция «АрпК group» – «MdbK group» составляет 0,00003 замены на сайт. Всего выявлено 44 вариабельные нуклеотидные позиции, в которых произошло в среднем 7,25 мутации на геном в линиях А1–А4 и по 6,25 мутации на геном в линиях М1–М4.

Таблица 4 – Генетическая вариабельность ВКЭ 92М после персистенции в культурах клеток AprnK и MdbK

Эволюционные линии ВКЭ	Количество нуклеотидных замен	Среднее количество нуклеотидных замен в группе	Генетическая дистанция к 92М*	Средняя групповая дистанция к 92М
A1	10	7,25	0,00046	0,00055
A2	5		0,00028	
A3	7		0,00073	
A4	7		0,00073	
M1	6	6,25	0,00064	0,00057
M2	10		0,00083	
M3	4		0,00055	
M4	5		0,00028	

Примечание: * – указано количество нуклеотидных замен на сайт между соответствующей последовательностью и последовательностью изолята 92М. Анализ выполнен с использованием модели Maximum Composite Likelihood с использованием 1, 2 и 3 кодонов. Двусмысленные и сомнительные позиции исключены из анализа. Итоговый набор данных включал 10 907 позиций. Анализ выполнен с помощью MEGA X.

Изменения в структуре белков вируса клещевого энцефалита

Перечень обнаруженных мутаций и (при наличии) соответствующих аминокислотных замен приведён в Таблице 5. В целом можно отметить, что в каждой группе нуклеотидные мутации произошли, по меньшей мере, в одной линии в 3'- и в 5'-НТР, а также в большинстве генов, кодирующих вирусные белки. Однако, гены, кодирующие белки С и NS2B, остались неизменёнными на нуклеотидном уровне во всех исследованных изолятах ВКЭ.

Интересно, что мутации в геномных позициях E2169, E2202, E2241, E2397 и E2398 обнаруживались во всех 8 исследованных изолятах. Возможно, это следствие изменения генотипа ВКЭ при адаптации к культуре клеток СПЭВ в процессе формирования рабочего стока вируса. Все эти мутации локализованы в пределах белка Е, однако только одна из них приводит к аминокислотной замене в белке (a2398c → M476L). Поскольку для выяснения происхождения этих мутаций требуются дополнительные исследования, они были исключены из дальнейшего анализа.

Таблица 5 – Локализация и состав нуклеотидных и аминокислотных замен, возникших за время персистенции изолята ВКЭ 92М в клеточных линиях AprnK и MdbK

Локус	Позиция	Исходный нуклеотид	Мутация	Проявление в линиях	Изменяемая аминокислота
5'-НТР	85	t	c	A3, A4, M2, M3, M4	–
prM	717	t	c + t (Y)	A1	silent
M	829	c	t	M2	H28Y
M	906	c	t	A3	silent
E	1098	t	c + t (Y)	M4	silent
E	1171	g	a	A1	D67N
E	1278	c	t	M1	silent
E	1336	g	c	A3	E122Q
E	1436	a	t, c	M1, M3	E155V, A
E	1447	g	a + g (R)	M4	G159R
E	1496	c	t	A4	T175I
E	1573	g	a	M2	E201R
E	1579	g	t	A2	D203Y
E	1580	a	g	M1	D203G
E	1800	t	a	M1	silent
E	1804	g	a	M3	G278R
E	1808	c	a	A4	T279K

Продолжение таблицы 5

Локус	Позиция	Исходный нуклеотид	Мутация	Проявление в линиях	Изменяемая аминокислота
E	1817	a	g	M4	H282R
E	2169	c	t	A1–A4, M1–M4	silent
E	2202	c	t	A1–A4, M1–M4	silent
E	2241	c	t	A1–A4, M1–M4	silent
E	2286	c	t	M2	silent
E	2316	c	c + t (Y)	A1	silent
E	2397	t	c	A1–A4, M1–M4	silent
E	2398	a	c	A1–A4, M1–M4	M476L
NS1	2613	g	a + g (R)	A1	silent
NS1	2930	c	t	A1	A157V
NS1	3031	g	a	M2	G191S
NS1	3060	c	t	A1	silent
NS1	3202	c	t	A4	silent
NS2A	3822	t	c + t (Y)	A2	silent
NS3	5172	g	a + g (R)	A3	silent
NS3	5304	g	a + g (R)	A2	silent
NS3	6058	c	a	M2	L487I
NS3	6274	g	g + c (S)	A4	V559L
NS4A	6560	a	g	A3, A4	E33G
NS4A	6660	t	a	A3	silent
NS4A	6770	a	t	M2, M3, M4	N103I
NS4B	6953	c	a	A4	T15K
NS4B	6967	g	a	A1, A2, A3	E20K
NS5	8999	c	c + t (Y)	A4	A445V
NS5	9053	t	g + t (K)	A1	L463R
NS5	9147	t	c+t (Y)	M2	silent
NS5	9569	a	a + c (M)	A1	D635A
NS5	9616	c	a + c (M)	M2	H651N
NS5	10339	t	g	M2	L892V
3'-HTP	10430	a	c	M1	–
3'-HTP	10458	a	g	A2	–
3'-HTP	10586	a	g	A1, M1	–

В процессе персистентной инфекции в клетках АрпК в геноме ВКЭ появились мутации, приводящие к аминокислотным заменам в белках E, NS1, NS3, NS4A, NS4B и NS5 (Таблица 6). В белке M изменений при адаптации к АрпК не возникло. В белке E выявлены аминокислотные замены D67N (линия A1), E122Q (A3), T175I (A4), D203Y (A2) и T279K (A4). Каждая из замен приводит к изменению класса аминокислоты, относительному повышению заряда и/или изменению гидрофобности участка белка. В белках NS1 и NS3 произошло по одной замене, не приводящей к изменению физико-химических свойств белка (A157V и V559L соответственно). В белке NS4A в двух линиях (A3 и A4) отмечена замена E33G, приводящая к повышению относительного заряда и гидрофобности соответствующего участка белка. Изменения в белке NS4B отмечены во всех 4 линиях, персистировавших в клетках АрпК. Замена T15K произошла в линии A4, а замена E20K обнаружена в остальных трёх линиях A1–A3. Обе замены приводят к изменению класса аминокислоты и заряда соответствующей позиции. В белке NS5 произошла одна замена в линии A4 (A445V) и две замены в линии A1 (L463R и D635A).

При адаптации к клеткам MdbK появились мутации в белках M (H28Y), E (E155V, E155A, G159R, E201R, D203G, G278R H282R), NS1 (G191S), NS3 (L487I), NS4A (N103I) и NS5

(H651N и L892V). По сравнению с ArpK отмечаются более частые изменения в белке E, приводящие, как правило, к изменению гидрофобности и повышению заряда мутировавших позиций. Наиболее специфичными для MdbK оказались изменения в белках E и NS4A. В белке E в двух линиях ВКЭ произошла замена аспарагиновой кислоты на глицин в позиции 203, а в белке NS4A у трёх линий выявлена замена аспарагина на изолейцин, что приводит к сильному повышению гидрофобности позиции 103. В отличие от ArpK, при адаптации к MdbK не произошло изменений в белке NS4B.

В белках C и NS4B аминокислотные замены отсутствовали, поскольку они, как отмечено ранее, остались интактными на нуклеотидном уровне. Белки prM и NS2A, несмотря на наличие нуклеотидных мутаций, не претерпели изменений в аминокислотном составе ни в одной из клеточных линий.

Таким образом, при адаптации ВКЭ к клеточной линии резервуарного хозяина ArpK наиболее видоспецифичные по клетке-хозяину изменения произошли в белках NS4A и NS4B. При адаптации к клеточной линии случайного хозяина MdbK были более характерны замены в белках E и NS4A. Однако ни одна замена не была абсолютно необходимой для адаптации к любой из клеточных линий.

Таким образом, в линии клеток как резервуарного, так и случайного хозяев происходят генетические и фенотипические изменения генома ВКЭ в ходе его адаптации к внутриклеточной среде и поверхностным клеточным рецепторам этих млекопитающих. Видоспецифичные для линии клеток *M. sibiricus* мутации вирусного генома затрагивают как структурные (белок E), так и неструктурные его части (белок NS4A), тогда как для клеточной линии *A. peninsulae* видоспецифичные мутации выявлялись только в неструктурной части (белки NS4A и NS4B).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Созданные перевиваемые клеточные линии *A. peninsulae* и *M. sibiricus* являются новыми инструментами для проведения *in vitro* исследований по изучению жизнедеятельности ВКЭ и других флавивирусов в естественных условиях. Полученные в результате работы данные указывают на то, что новые линии клеток поддерживают вирусную репродукцию как при острой, так и при персистентной инфекции, несмотря на то, что сами млекопитающие выполняют разную роль для ВКЭ в природе. Следует отдельно подчеркнуть, что из трёх исследованных клеточных линий клеточная линия резервуарного хозяина ArpK продемонстрировала наибольшую перmissiveность для репродукции ВКЭ, что обусловлено высокой выживаемостью клеток при цитопатическом действии вируса, высокой продуктивностью и наибольшей согласованностью всех стадий вирусной репродукции, а также способностью к поддержанию персистенции ВКЭ.

В результате изучения адаптивных изменений, произошедших в геноме ВКЭ в клеточных линиях резервуарного и случайного хозяев в ходе персистентной инфекции, были выявлены мутации в структурных (только для MdbK) и неструктурных (и ArpK, и MdbK) частях вирусного генома. Есть вероятность, что отмеченные при адаптации к линии клеток *M. sibiricus* изменения в белке E ВКЭ являются причиной отсутствия в ней вирусного антигена при персистентной инфекции: изменённый белок попросту не детектируется тест-системой. Исходя из возможных функций небольших гидрофобных белков NS4A и NS4B можно предположить, что замены в них могли сыграть роль в усилении поддержания синтеза вирусной РНК. Это согласуется с полученными результатами по репликации РНК ВКЭ для линий клеток ArpK и MdbK, в которых она протекала с высокой эффективностью на протяжении всего эксперимента.

Особое внимание обращает на себя тот факт, что ни одна из обнаруженных мутаций не является облигатной для адаптации к той или другой клеточной системе. Например, наиболее специфичная для ВКЭ, персистировавшего в клетках ArpK, мутация E20K в белке NS4B обнаруживается у 3 из 4 эволюционных линий ВКЭ, все остальные мутации встречаются в единичных случаях. В случае с клеточной линией MdbK наблюдается подобная картина: наиболее специфичная мутация N103I в NS4A встречается у трёх вариантов ВКЭ (M2–M4), тогда как вариант M1 вообще не содержит замен в этом белке. Остальные мутации также встречаются в единичных случаях. Необходимо, однако, отметить, что при адаптации к клеткам ArpK в каждой эволюционной линии ВКЭ происходила по меньшей мере одна мутация

в белке E и одна – в белке NS4B; вдобавок в 50 % случаев появилась замена в белке NS4A. При адаптации к клеткам MdbK в каждой линии ВКЭ возникала одна мутация в белке E и в 75 % случаев – мутация в белке NS4A. Вероятно, именно эти белки играют ключевую роль в приспособлении ВКЭ к исследуемым клеткам млекопитающих.

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что культуры клеток ArpK и MdbK являются адгезивными перевиваемыми линиями клеток, обладают стабильными культуральными характеристиками, принадлежат видам *Apodemus peninsulae* и *Myotis sibiricus* соответственно и могут быть использованы в качестве лабораторных моделей резервуарного (ArpK) и случайного (MdbK) позвоночных хозяев ВКЭ в вирусологических исследованиях.

2. Показано, что при средней множественности инфекции (1 БОЕ на клетку) культура клеток ArpK проявляет выраженный цитопатический ответ на вирусную инфекцию, однако отличается высоким (> 80 %) уровнем выживаемости клеток. Культура клеток MdbK является наименее чувствительной к заражению ВКЭ, цитопатическое действие вируса не выражено, гибели клеток вследствие заражения ВКЭ не происходит.

3. При высокой множественности заражения (10 БОЕ на клетку) в культуре клеток ArpK репродукция ВКЭ происходит более равномерно по сравнению с клеточной линией СПЭВ, что проявляется в сглаженной динамике синтеза внутриклеточной вирусной +РНК, продукции инфекционного вируса и накоплении вирусного антигена в культуральной среде. При этом итоговая эффективность всех процессов остаётся высокой. В культуре клеток MdbK отмечено общее снижение эффективности репродукции ВКЭ, что проявляется как в замедлении синтеза, так и в снижении итогового количества вирусной +РНК, инфекционного вируса и вирусного антигена.

4. При низкой множественности заражения (0,1 БОЕ на клетку) ВКЭ способен персистентно инфицировать линии клеток ArpK и MdbK на протяжении 6 месяцев. При этом динамика синтеза +РНК ВКЭ и динамика продукции инфекционного вируса в ArpK и MdbK сопоставимы, однако продукция вирусного антигена в MdbK многократно ниже, а цитопатическое действие вируса сильнее, чем в ArpK. Продемонстрировано, что ВКЭ не способен персистентно репродуцироваться в клеточной линии СПЭВ, однако в выживших клетках СПЭВ вирусная +РНК выявляется на протяжении, по меньшей мере, 17 недель после заражения.

5. Установлено, что при адаптации ВКЭ к клеточной линии резервуарного хозяина ArpK наиболее видоспецифичные по клетке-хозяину изменения происходят в белках NS4A и NS4B. При адаптации к клеточной линии случайного хозяина MdbK более характерны замены в белках E и NS4A. Белки C, ргМ, NS2A и NS2B остаются не вовлечёнными в процесс адаптации ни в одной из исследованных клеточных линий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В научных журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. Применение метода ПЦР в реальном времени для диагностики инфекций, передающихся иксодовыми клещами / А. В. Ляпунов, М. А. Хаснатинов, Э. Л. Манзарова, **Н. А. Болотова** [и др.] // Бюл. ВШЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1, № 6 (112). – С. 161–166. – DOI: 10.12737/23810.

2. Replication of RNA of tick-borne encephalitis virus in new transferable cell lines of the natural host *Apodemus peninsulae* / М. А. Khasnatinov, **N. A. Bolotova**, K. S. Milovidov [et al.] // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2018. – V. 33, № 1. – P. 49-54. <https://doi.org/10.3103/S0891416818010068>.

3. Novel cell line derived from natural host *Apodemus peninsulae* for in-vitro studies of tick-borne encephalitis virus / М. Khasnatinov, **N. Liapunova**, I. Solovarov, G. Danchinova // International Journal of Infectious Diseases. – 2019. – Vol. 79, N S1. – P. 138. – DOI: 10.1016/j.ijid.2018.11.338.

4. **Ляпунова, Н. А.** Оптимизация методики количественной ОТ-ПЦР для оценки концентрации геномной +РНК вируса клещевого энцефалита / **Н. А. Ляпунова**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова // Acta Biomedica Scientifica. – 2019. – Т. 4, № 5. – С. 116–121. – DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.18.

5. **Ляпунова, Н. А.** Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток сибирской ночницы *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905) / **Н. А. Ляпунова**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова // Acta Biomedica Scientifica. – 2020. – Т. 5, № 6. – С. 271–275. – DOI: 10.29413/ABS.2020-5.6.36.

Публикации в иных изданиях

6. Количественная оценка репликации РНК вируса клещевого энцефалита в клетках естественного хозяина *Apodemus peninsulae* / М. А. Хаснатинов, **Н. А. Болотова**, К. С. Миловидов [и др.] // Национальные приоритеты России. – 2016. – № 4 (22). – С. 108–111.

7. **Ляпунова, Н. А.** Аутэкологические аспекты ко-адаптации ВКЭ и позвоночных хозяев – экспериментальный подход / **Н. А. Ляпунова**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания : сб. тез. Всерос. науч. конф. с международным участием. – 2019. – С. 122–125.

8. **Ляпунова, Н. А.** Новая перевиваемая линия клеток восточной ночницы *Myotis petax* (Hollister 1912) и ее использование в фундаментальных биомедицинских исследованиях / **Н. А. Ляпунова**, М. А. Хаснатинов, Г. А. Данчинова // Перспективы развития биомедицинских технологий в Байкальском регионе : сб. тез. Междунар. науч. конф. – 2019. – С. 52–53.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

3'-НТР	– 3'-нетранслируемый регион генома ВКЭ
5'-НТР	– 5'-нетранслируемый регион генома ВКЭ
ApnK	– перевиваемая культура клеток почки восточноазиатской лесной мыши
C	– капсидный белок ВКЭ
COI	– ген цитохромоксидазы 1
CytB	– ген цитохрома B
d-loop	– ген D-петли
E	– оболочечный белок ВКЭ
MdbK	– перевиваемая культура клеток почки сибирской ночницы
NGS	– высокопроизводительное секвенирование (англ. next generation sequencing)
NS1	– неструктурный белок ВКЭ NS1
NS2A	– неструктурный белок ВКЭ NS2A
NS2B	– неструктурный белок ВКЭ NS2B
NS3	– неструктурный белок ВКЭ NS3
NS4A	– неструктурный белок ВКЭ NS4A
NS4B	– неструктурный белок ВКЭ NS4B
NS5	– неструктурный белок ВКЭ NS5
БОЕ	– бляшкообразующая единица
ВКЭ	– вирус клещевого энцефалита
ИФА	– иммуноферментный анализ
КЭ	– клещевой энцефалит
МИ	– множественности инфекции
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СПЭВ	– перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи
ФСБ	– фосфатно-солевой буфер
ЦПД	– цитопатическое действие
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат
ЭТС	– эмбриональная телячья сыворотка

Подписано в печать ###.##.2021. Бумага офсетная. Формат 60×84¹/₁₆.

Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0

Тираж 100 экз. Заказ № ###-21.

РИО ИНЦХТ

(Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)