

**Тучинская Ксения Константиновна**

**ВЛИЯНИЕ НЕИНФЕКЦИОННЫХ ЧАСТИЦ  
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА НА ИММУННЫЙ ОТВЕТ И  
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

1.5.10 – Вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

**Научный руководитель:**

профессор, доктор биологических наук

**Карганова Галина Григорьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Злобин Владимир Игоревич** – Академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Костюшева Анастасия Павловна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетических технологий в создании лекарственных средств Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1 и на сайте <http://www.chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

**Белякова Алла Владимировна**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – переносимый клещами флавивирус, широко распространенный на территории Евразии. Только в РФ на эндемичных по клещевому энцефалиту (КЭ) территориях проживает более 60 миллионов человек, и границы его распространения постоянно расширяются. ВКЭ способен вызывать тяжелое заболевание с поражением ЦНС. Несмотря на наличие эффективных инактивированных цельновирионных вакцин, случаи КЭ регистрируются ежегодно, в том числе единичные случаи заболевания среди вакцинированных.

Помимо генетической гетерогенности, для вирусов характерна структурная гетерогенность. На примере разных вирусов показано, что различные по своей структуре неинфекционные вирусные частицы (ВЧ), образующиеся в процессе инфекции, способны вызывать активацию врожденного иммунного ответа, участвуют в формировании специфического иммунного ответа, могут индуцировать протективный иммунный ответ и даже могут быть ответственны за более тяжелое течение заболевания или хронизацию инфекции. Количество работ по изучению подобных структур и их роли в патогенезе и иммунном ответе ограничено.

Важными, но мало проработанными аспектами изучения структурной гетерогенности вирусной популяции является предполагаемая возможность ее влияния на эффективность профилактических и лечебных препаратов, направленных на взаимодействие с поверхностными белками.

### **Степень разработанности темы**

На данный момент для переносимых комарами флавивирусов показано, что помимо зрелых инфекционных вирионов в процессе инфекции также образуются незрелые неинфекционные ВЧ, содержащие непротессированный предшественник белка М, частично зрелые ВЧ и пустые формы.

Подвижность белка Е делает поверхность вирионов динамичной структурой, которая изменяется при изменении условий среды. Так, при +37°C поверхность вириона вируса денге становится «бугристой», а часть из них переходит в неинфекционную форму. При pH<6,4 также происходят конформационные перестройки белка Е с образованием неинфекционных ВЧ.

В процессе флавивирусной инфекции, а также при трансфекции клеток плазмидой, экспрессирующей структурные гликопротеины рgM и Е, могут образовываться пустые формы ВЧ. Структура таких ВЧ, лишенных нуклеокапсида, изучена и для ВКЭ. Структура незрелых ВЧ методом криоэлектронной микроскопии исследована только для флавивирусов, переносимых комарами, с довольно низким разрешением (9-25 Å) из-за гетерогенности этих структур. Для

флавивирусов денге и Зика показано, что незрелые ВЧ способны индуцировать врожденный иммунный ответ, а также ответственны за антителозависимое усиление инфекции, что делает их важным объектом исследований. Для ВКЭ изучена только структура зрелых инфекционных ВЧ. К началу нашего исследования было неизвестно, присутствуют ли незрелые формы ВЧ в популяции ВКЭ. Тем не менее, показано, что соотношение неинфекционных и инфекционных ВЧ для флавивирусов колеблется от 100 до 1000. Экспериментальных данных о том, от чего зависит это соотношение и как неинфекционные ВЧ влияют на течение инфекции, до нашего исследования не было получено.

**Целью** данной работы было изучение факторов, определяющих долю неинфекционных ВЧ в популяции ВКЭ, их влияние на вирулентность вируса и формирование иммунного ответа при экспериментальном КЭ, а также влияние отдельных типов неинфекционных ВЧ на эффективность вакцинных и противовирусных низкомолекулярных препаратов.

В соответствие с поставленной целью были сформированы следующие **задачи**:

1. Подобрать адекватные методы оценки соотношения неинфекционных и инфекционных ВЧ в популяции ВКЭ.
2. Установить факторы, которые могут влиять на соотношение неинфекционных и инфекционных ВЧ в популяции ВКЭ.
3. Охарактеризовать неинфекционные ВЧ, полученные путем термической обработки вирусных препаратов, оценить их влияние на формирование гуморального иммунного ответа и вирулентность вируса при экспериментальном КЭ, а также на эффективность вакцины против КЭ.
4. Получить и охарактеризовать незрелые неинфекционные ВЧ и оценить их влияние на формирование иммунного ответа при экспериментальном КЭ, а также на эффективность противовирусных препаратов.
5. Оценить влияние неинфекционных ВЧ в популяции широкого спектра штаммов ВКЭ на противовирусную активность низкомолекулярных соединений.

### **Научная новизна работы**

Впервые было показано, что соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ в популяции ВКЭ зависит от штамма вируса. Система репродукции, условия и длительность хранения вирусного материала оказывают влияние на долю неинфекционных ВЧ в популяции ВКЭ.

Впервые показано, что при увеличении доли неинфекционных ВЧ наблюдается более выраженный гуморальный иммунный ответ без влияния на течение заболевания. Впервые установлено, что наблюдается изменение бустерного ответа и сужение спектра индуцируемых

антител при инфицировании животных, вакцинированных инактивированной цельновирионной вакциной КЭ, вирусом с повышенной долей неинфекционных ВЧ.

Впервые изучены особенности формирования иммунного ответа при инфицировании животных препаратом незрелого ВКЭ: антитела к незрелому вирусу быстрее элиминируются и не обеспечивают защиту от повторного заражения ВКЭ. Впервые были получены данные о том, что в ответ на заражение препаратом незрелого вируса экспандированные клоны Т-клеток имеют как схожие со зрелым вирусом, так и отличные репертуары участков, определяющих комплементарность (complementarity-determining regions (CDRs)).

Впервые в экспериментах *in vitro* было показано, что неинфекционные ВЧ могут влиять на титры нейтрализующих антител и эффективность противовирусных соединений, направленных на взаимодействие с поверхностным белком Е.

### **Теоретическая и практическая и значимость работы**

Полученные новые данные важны при разработке профилактических и лечебных противовирусных препаратов, поскольку они позволяют пролить свет на природу соотношения неинфекционных и инфекционных ВЧ ВКЭ, а также на влияние неинфекционных ВЧ на течение инфекции и их участие в формировании иммунного ответа при КЭ. Данные о том, что неинфекционные ВЧ способны выступать в роли дополнительных мишеней как для противовирусных препаратов, так и для нейтрализующих антител *in vivo* и *in vitro*, являются новым шагом к стандартизации методов проведения подобных анализов.

### **Методология и методы исследования**

В работе были использованы классические и современные вирусологические, иммунохимические и молекулярно-генетические методы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Наличие большой доли неинфекционных ВЧ в популяции ВКЭ обусловлено структурным разнообразием ВЧ и зависит от штамма вируса.
2. Система репродукции вируса, стадия инфекции, а также условия и длительность хранения вирусного материала влияют на долю неинфекционных ВЧ в вирусном препарате.
3. Индуцируемый неинфекционными ВЧ гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ значительно отличается от иммунного ответа, индуцируемого при заражении препаратом нативного вируса.
4. Репертуар экспандированных Т-клеток при вирусной инфекции может быть изменен при заражении препаратом вируса с избыточным содержанием незрелых неинфекционных ВЧ.

5. Неинфекционные ВЧ ВКЭ способны конкурировать с инфекционными вирусными частицами при взаимодействии с антителами и противовирусными соединениями *in vitro* и *in vivo*.

6. Вирусные препараты, используемые для оценки противовирусной активности профилактических и лечебных препаратов, должны быть стандартизованы по содержанию неинфекционных ВЧ.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов и выводов представленной работы подтверждает воспроизводимость полученных результатов в нескольких экспериментах, использование различных подходов для решения задач, а также грамотный статистический анализ полученных данных.

#### **Личный вклад автора**

Личное участие автора в получении научных результатов заключалось в проведении анализа литературных источников по данной тематике, дизайне и постановке экспериментов, а также в анализе экспериментальных данных, подготовке к печати публикаций. Результаты, представленные в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10 – «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 2, 7, 10 паспорта специальности «Вирусология».

#### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на 9 международных и отечественных конференциях: конференции молодых ученых и специалистов «Биология, эпидемиология и вакцинопрофилактика инфекционных заболеваний» (Москва, 2016); конференции молодых ученых и специалистов «Фундаментальная и прикладная микробиология» (Москва, 2017); научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики инфекционных и онкологических заболеваний» (Москва, 2018); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2019» (Москва, 2019); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2020» (Москва, 2020); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современная иммунопрофилактика: вызовы, возможности, перспективы» (Москва, 2021); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2022» (Москва, 2022).

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы в рецензируемых научных изданиях, а также 6 тезисов - в сборниках международных конференций и 3 тезиса - в сборниках российских конференций (библиографических базах – Web of Science, Scopus, PubMed).

## Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 125 страницах и состоит из введения и 3-х глав основной части диссертации, включая: обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, а также заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, содержащий 201 источник. Работа иллюстрирована 10 таблицами и 51 рисунком.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Выявление факторов, влияющих на долю неинфекционных вирусных частиц в пробах ВКЭ

Большое значение в экспериментах по определению соотношения инфекционных и неинфекционных ВЧ в популяции имеет выбор метода их определения. В нашей работе был использован показатель  $Ig(\text{ГСЧ}/\text{БОЕ})$ , где ГСЧ – это число геномсодержащих ВЧ, определенное методом ПЦР в реальном времени, а БОЕ – титр инфекционного вируса, определенный методом бляшек в культуре клеток СПЭВ. Титр вируса был определен также *in vivo* на мышах линии BALB/c при подкожном введении и выражен в 50% летальной дозе ( $LD_{50}$ ).

На первом этапе мы оценили, насколько метод бляшек отражает количество инфекционных ВЧ. Для этого мы определили влияние времени адсорбции вирусных препаратов и отмывок от вируса после адсорбции при низкой множественности заражения (0,00003 БОЕ или 0,03 ГСЧ на клетку) (Рис. 1). В последней отмывке использовали протаминсульфат (п/с), который разрушает слабые взаимодействия между молекулами белков, липидов и нуклеиновых кислот.

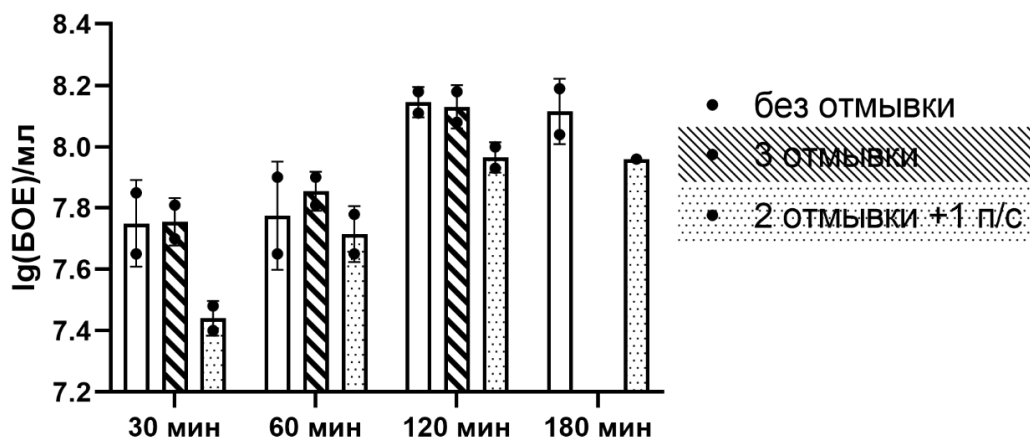


Рисунок 1 – Количество инфекционных ВЧ ( $Ig(\text{БОЕ}/\text{мл})$ ) в зависимости от времени адсорбции вируса на клетках СПЭВ и отмывок. п/с-протаминсульфат. Интервалы соответствуют стандартному отклонению,  $N=2$ .

Отмывка от вируса после адсорбции не влияла на результаты титрования ВКЭ штамма ЭК-328, тогда как использование в отмывке протаминсульфата снижало количество бляшек в предельном разведении (Рис. 1). Это говорит о том, что не все ВЧ проникают в клетку, а небольшая их часть остается прикрепленной к клеткам с помощью слабых взаимодействий.

Далее мы провели несколько экспериментов по определению инфекционного титра и доли неинфекционных ВЧ в отмывках после 1 часа адсорбции на клетках СПЭВ. Множественность заражения была  $10^3$  БОЕ ( $10^3$  ГСЧ) на клетку. Вирусный материал после 1 часа адсорбции обозначен как S1 (Рис. 2). Наблюдалось сохранение остаточной инфекционности в отмывках от вируса, а соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ в отмывках оставалось практически постоянным (Рис. 2). Только во второй отмывке наблюдалось повышенное содержание неинфекционных ВЧ (Рис. 2).

Следовательно, вместе с инфекционными ВЧ на клетках также сорбируются и неинфекционные ВЧ, которые конкурируют между собой и обладают различной сорбционной способностью.

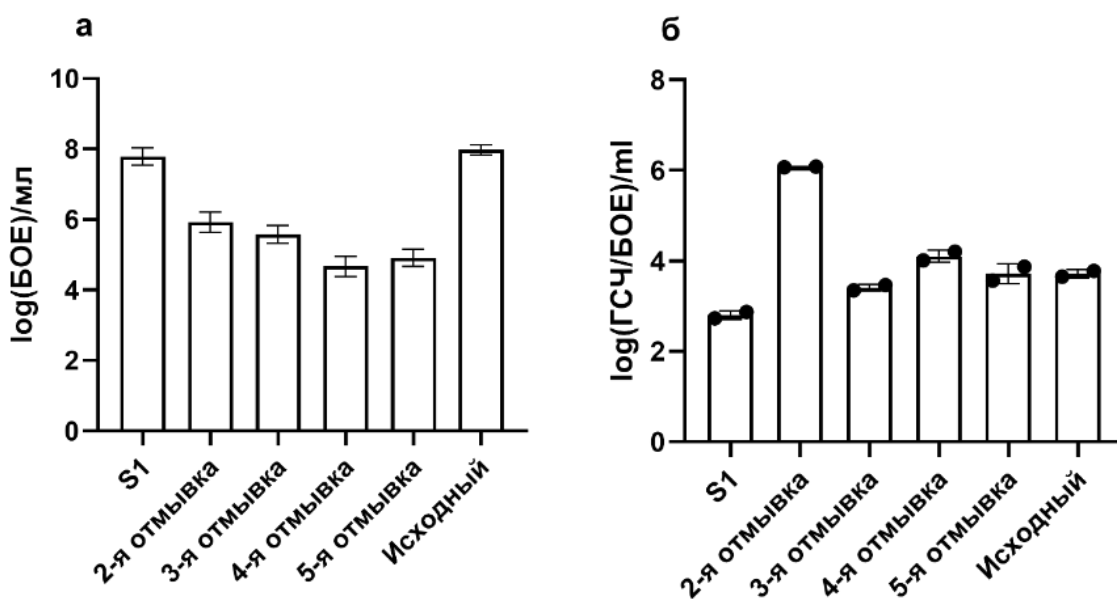


Рисунок 2 – Количество инфекционных ВЧ ( $\lg(\text{БОЕ}/\text{мл})$ ) (а) и соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ ( $\lg(\text{ГСЧ}/\text{БОЕ})$ ) (б) штамма ЭК-328 в КЖ инфицированных клеток после 1 часа адсорбции при  $+37^\circ\text{C}$  в 5 последовательных отмывках от вируса. Интервалы соответствуют стандартному отклонению,  $N=2$ .

С помощью проточной цитометрии была проведена оценка динамики количества инфицированных клеток через 24 и 72 часа после заражения средними (1 и 0,1 БОЕ/клетку) и низкими дозами ВКЭ штамма ЭК-328 (0,01; 0,001 БОЕ/клетку). Через 24 часа после заражения процент зараженных клеток в дозе 1 БОЕ/клетку был равен 20,0%, 0,001 – всего 1,5% (Рис. 3). Через 72 часа после заражения высокой дозой вируса количество зараженных клеток достигает 86%, а низкой дозой – 54% (Рис. 3). Корреляция между дозой вируса и процентом зараженных клеток не линейна и при высокой дозе увеличивалась значительно медленнее (Рис. 3).



Это говорит о том, что при высокой заражающей дозе не все инфекционные ВЧ проникают в клетки, а часть из них остается в КЖ, но при заражении низкой дозой вируса, большая доля инфекционных ВЧ, по-видимому, проникает в клетки. Так, число инфицированных клеток при низкой заражающей дозе практически равно количеству бляшек, т.е. все инфекционные ВЧ проникают в клетку и при определении титра по бляшкам мы приближаемся к истинному количеству инфекционных ВЧ, что говорит об адекватности выбранного нами метода.

Мы оценили, является ли соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ свойством штамма. Было проведено 5 независимых экспериментов, в которых размножили 4 штамма вируса, принадлежащих к трем основным подтипам ВКЭ, в культуре клеток СПЭВ и в мозге мышей.

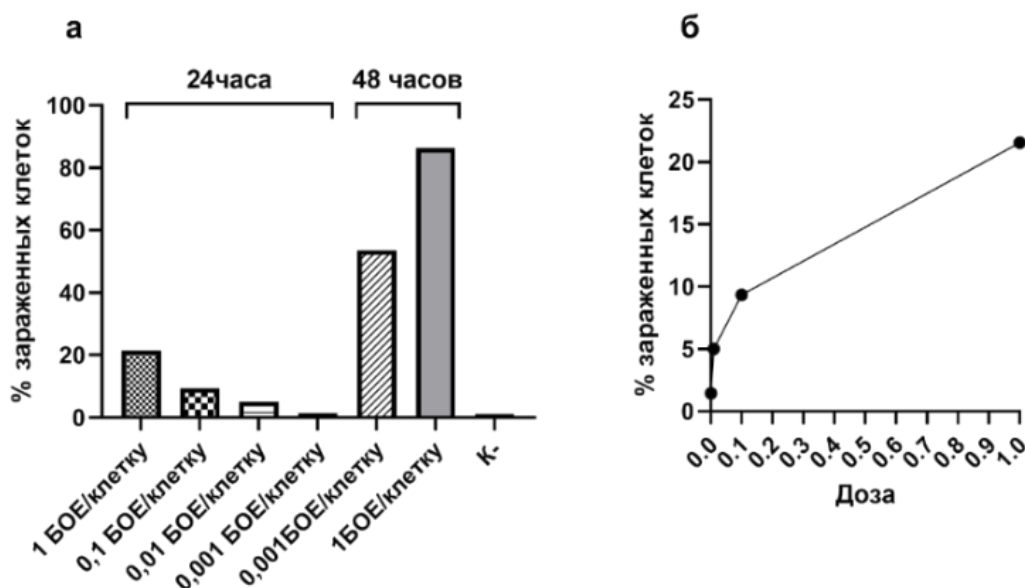


Рисунок 3 – Процент зараженных клеток при разной множественности заражения ВКЭ штамма ЭК-328 через 24 и 72 часа после адсорбции (а), зависимость между дозой вируса (БОЕ/клетку) на клетку и процентом зараженных клеток через 24 часа после заражения (б).

Показатель ГСЧ/БОЕ был стабилен для всех штаммов. После размножения в мозге мыши штаммы не различались по этому показателю. При сравнении вирусного потомства, полученного при размножении в культуре клеток СПЭВ, мы наблюдали значимые отличия штамма ЭК-328 от остальных исследуемых штаммов ВКЭ (Рис. 4). Для всех штаммов, кроме ЭК-328, в мозговых суспензиях соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ было выше, чем в КЖ инфицированных клеток СПЭВ.

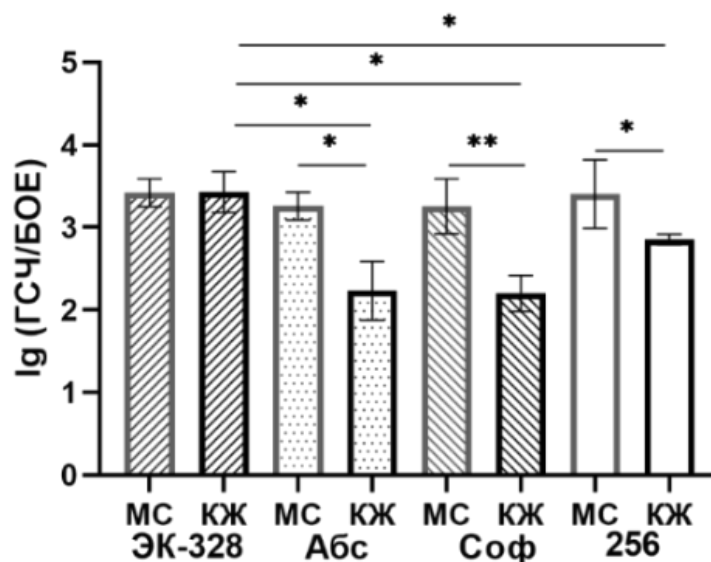


Рисунок 4 – Соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ (Ig(ГСЧ/БОЕ)) для штамма ЭК-328, Абсеттаров, Софьин и 256, после репродукции в культуре клеток СПЭВ (КЖ) и мозге мышей (МС). Интервалы соответствуют стандартному отклонению, N=5. Сравнения проводили по критерию Манна-Уитни.

Мы также исследовали пробы вируса одного штамма ЭК-328, полученного в разных культурах клеток млекопитающих (перевиваемая культура клеток почек свиньи СПЭВ, перевиваемая культура фибробластов мыши L-929; P388 – макрофагоподобные клетки мыши; ПФМ – первичная культура фибробластов мыши; ЭПВЧ – первичные эндотелиальные клетки из пупочной вены человека; предшественники нейрональных клеток человека, полученные из стволовых клеток) при высокой множественности заражения (10 БОЕ/клетку) и в культуре клеток клещей *Ixodes ricinus* IRE 19 при низкой множественности заражения (0,01 БОЕ/клетку) на разные сроки. Через 24 часа после заражения соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ снижалось относительно 12 часов, что соответствует выходу нового инфекционного вирусного потомства, а на отдаленные сроки соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ зависело от культуры клеток (Табл. 1).

Таблица 1 – Соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ (Ig(ГСЧ/БОЕ)) штамм ЭК-328 в КЖ клеток млекопитающих и клещей на разные сроки после заражения

Тип клеток	Наличие ЦПД	12 часов	24 часа	> 24 часов
СПЭВ	+	н.д.	3,4±0,1	4,0±0,2*
L-929	-	3,7±0,5	2,1±0,5	3,3±0,5*
P-388	-	3,4±0,5	1,6±0,5	1,0±0,5*
ПФМ	-	2,8±0,5	1,2±0,5	1,7±0,5*
ЭПВЧ	-	2,4±0,3	2,8±0,5	1,5±0,3**
Предшественники нейрональных клеток	-	3,0±0,1	2,9±0,1	3,7±0,2**
Клетки клещей IRE 19	-	4,7±0,5	2,5±0,5	1,3±0,5***

Таким образом, штамм вируса, стадия инфекции и система репродукции имеют принципиальное значение и влияют на долю неинфекционных ВЧ в пробах вируса.

## **2. Зависимость доли неинфекционных вирусных частиц от условий хранения вирусного материала**

Зрелые инфекционные вирионы флавивирусов образованы структурными белками С, М и Е. При этом на поверхности зрелых вирионов экспонирован только белок Е, который, как показано для комариных флавивирусов, обладает конформационной подвижностью при воздействии факторов окружающей среды (рН, температура). Ранее была изучена термостабильность штамма ЭК-328 ВКЭ и вариантов этого штамма, отличающиеся 1-2 аминокислотными заменами в поверхностном белке Е. Ускоренная инактивация для некоторых вариантов, как было показано с использованием методов молекулярной динамики, совпадала с повышенной подвижностью молекулы, которая определялась этими точечными аминокислотными заменами. Снижение инфекционности при термической обработке может быть связано как с разрушением вирионов, так и с изменением структуры поверхностных гликопротеинов.

В нашей работе после 30 минут экспонирования вирусного препарата штамма ЭК-328 при +56°С наблюдалось резкое падение инфекционности уже после 10 минутной инкубации и полное отсутствие инфекционного титра и сигнала в ИФА через 30 минут. Тем не менее, количество ГСЧ оставалось неизменным, а с помощью трансмиссионной электронной микроскопии обнаруживались цельные вирионы, что говорит о сохранности ВЧ. Т.е. термоинактивация связана с конформационными изменениями поверхностного белка Е.

При проведении аналогичного эксперимента при различных температурах (+37°С, +20°С и +4°С) мы наблюдали схожую картину, а также прямую корреляцию в падении инфекционности *in vitro* и *in vivo* для прогретых вирусных препаратов (Рис. 5). Таким образом, при термической обработке даже при низких температурных режимах происходит накопление в популяции ВЧ, содержащих геном и вирусную оболочку, которые являются неинфекционными.

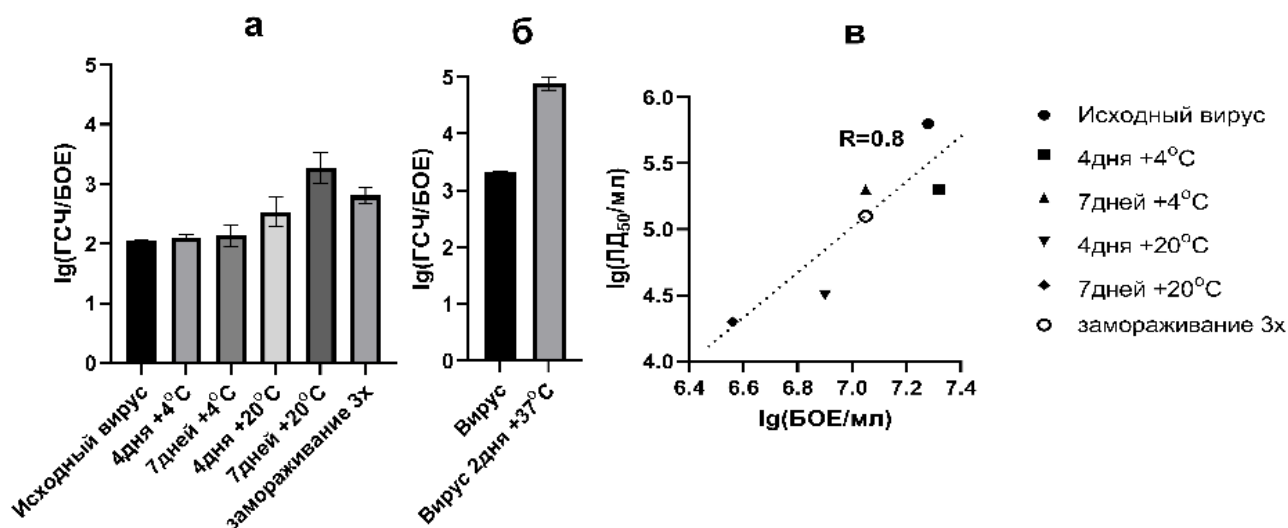


Рисунок 5 – Соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ (Ig(ГСЧ/БОЕ)) в пробах вируса штамма ЭК-328 при различных условиях хранения (а), (б). Корреляция между инфекционностью прогретых проб, определенной *in vivo* и *in vitro* (в). Интервалы соответствуют стандартному отклонению, N=2.

### 3. Влияние избыточного количества неинфекционных вирусных частиц в пробе на инфекционный процесс и эффективность вакцины КЭ

Была проведена оценка влияния неинфекционных ВЧ, образующихся при нагревании при +20°C, на гуморальный иммунный ответ, течение инфекции (среднюю продолжительность жизни и инкубационный период) и эффективность вакцины КЭ. Для этого были взяты препараты прогретого вируса в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> и интактного вируса в дозе 1 и 100 ЛД<sub>50</sub>, а также их смесь 1:1.

Доза инфекционного вируса влияла на уровень сероконверсии, однако, не оказывала влияния на титры нейтрализующих антител в положительных сыворотках на 6-е сутки после заражения (Рис.6). При заражении смесью интактного вируса и вируса с избытком неинфекционных ВЧ наблюдалось значительное повышение уровня сероконверсии. Это говорит о том, что неинфекционные ВЧ могут выступать в роли дополнительных индукторов выработки противовирусных антител (Рис. 6).

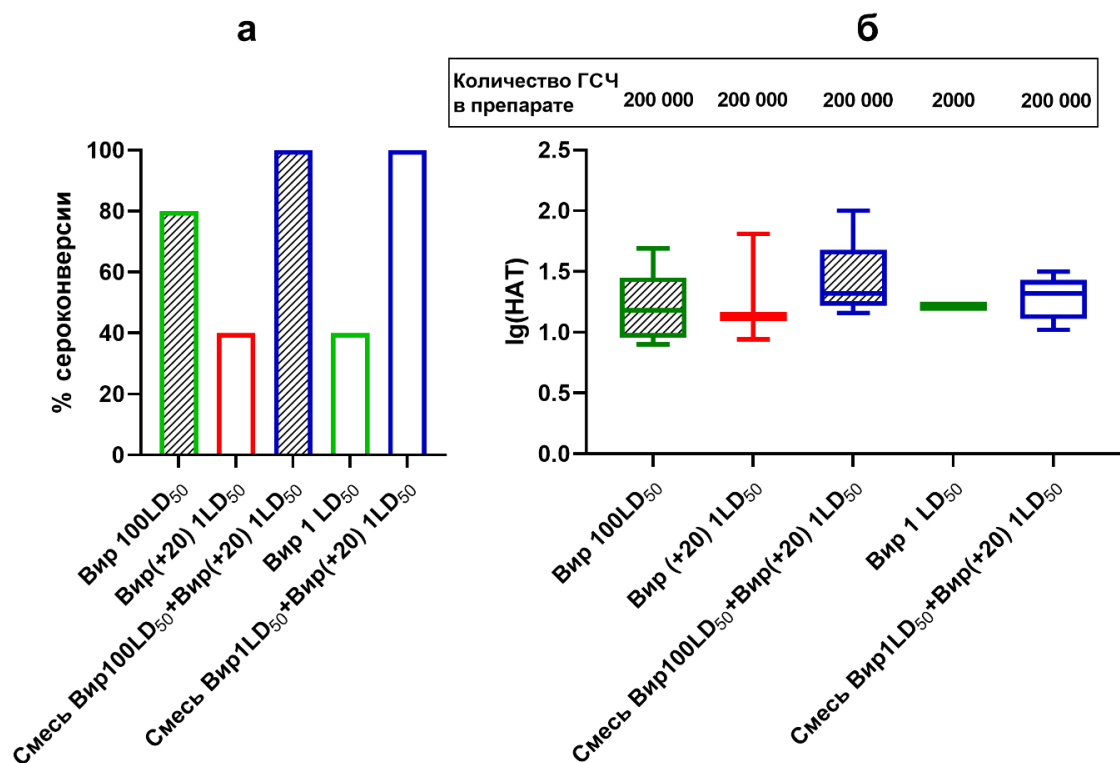


Рисунок 6 – Титры нейтрализующих антител и уровень сероконверсии на 6 сутки после заражения интактным ВКЭ (штамм ЭК-328), вирусом, прогретым при +20°С, и их смесь в разных концентрациях. Для расчёта среднего геометрического титра использовали данные положительных образцов. Сравнения проводили по критерию Манна-Уитни. N=5.

Не наблюдалось влияния неинфекционных ВЧ на динамику инфекции – среднюю продолжительность жизни и инкубационный период, и двукратная внутримышечная иммунизация вакциной «Клещ-Э-Вак» (1/10 человеческой дозы на мышь) была эффективна против всех исследуемых вирусных препаратов (Табл. 2).

Таблица 2 – Процент выживших мышей линии BALB/c, средняя продолжительность жизни (СПЖ) и инкубационный период (ИП)

Группа	Вакцина «Клещ-Э-Вак»	Доза вируса в инокуляте			% выживших животных	СПЖ (медиана; интервал)	ИП (медиана; интервал)
		ЛД <sub>50</sub>	БОЕ	ГСЧ			
Вак-Вак-Вир	+	100	10 000	<b>10<sup>5</sup></b>	100	-	-
Вир	-				33	12,0 (9; 18)	8,0 (7; 11)
Вак-Вак-Вир+20	+	1	300		75	-	-
Вир+20	-				8	15,0 (12; 16)	9,0 (8; 18)
Вак-Вак-Смесь (1:1)	+	100	10 000		92	-	-
Смесь (1:1)	-			42	15,5 (11; 18)	11,0 (9; 15)	
Вак-Вак-Вир	+	<b>1</b>	200	<b>5*10<sup>5</sup></b>	100	-	-
Вир	-				60	9,0 (8; 14)	13,0 (13; 19)
Вак-Вак-Вир (+37°С)	+		1000	<b>2*10<sup>8</sup></b>	100	-	-
Вир (+37°С)	-				57	13,0 (10; 13)	15,5 (15; 17)

Мы также не наблюдали влияния еще большей долей неинфекционных ВЧ, полученных в результате прогревания при +37°C, на выживаемость, среднюю продолжительность жизни и инкубационный период при инфицировании мышей ВКЭ штамм ЭК-328 в дозе 1ЛД<sub>50</sub>, а также на эффективность вакцины (Табл. 2). Суммируя данные по двум экспериментам с вирусом, прогретым при +20°C и +37°C, мы видим, что более значимым показателем, который влияет на течение инфекции, является доза вирулентного вируса, выраженная в ЛД<sub>50</sub>.

#### 4. Незрелые вирусные частицы ВКЭ

Другой тип неинфекционных ВЧ в популяции флавивирусов — это незрелые ВЧ, в состав вирионов которых входит нерасщепленный белок рgM.

Мы проанализировали в Крио-ЭМ очищенный, сконцентрированный инактивированный препарат ВКЭ штамма Софьин-Чумаков дальневосточного подтипа, в котором вместе со зрелыми вирионами также были выявлены незрелые ВЧ.

Были получены препараты с повышенным содержанием незрелых ВЧ путем добавления ацидотропных аминов на первом этапе репродукции вируса и охарактеризовали их с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, иммуноблота, а также по количеству общего числа частиц, содержащих геном, и по числу инфекционных ВЧ, определенных *in vivo* и *in vitro*. Количество ГСЧ в препаратах незрелого вируса значительно превышало инфекционный титр (Табл. 3). При этом нейроинвазивность, которая была определена как отношение lg(БОЕ/ЛД<sub>50</sub>), для остаточного инфекционного вируса в пробе незрелого вируса не отличалась от таковой для нативного вирусного препарата.

Таблица 3 – Характеристики образцов незрелого и зрелого ВКЭ

ВКЭ, штамм ЭК-328	Количество ГСЧ, lg(ГСЧ/мл)	Количество инфекционных ВЧ, lg(БОЕ/мл)	Соотношение ГСЧ к инфекционным ВЧ lg(ГСЧ/БОЕ)	Нейроинвазивность lg(БОЕ/ЛД <sub>50</sub> )
Незрелый	10,1±0,1	3,0±0,1	<b>7,0±0,2</b>	1,7±0,5
Зрелый	11,7±0,3	8,4±0,2	<b>3,3±0,3</b>	1,9±0,5

#### 5. Влияние незрелых неинфекционных вирусных частиц на инфекционный процесс и эффективность вакцины против КЭ

При подкожном заражении мышей линии BALB/c препаратами зрелого и незрелого вирусов и их смесью (1:1) наблюдали различия в уровне сероконверсии и титрах нейтрализующих антител. Так, при инфицировании препаратом незрелого вируса, в отличие от препарата зрелого вируса, снижение титров нейтрализующих антител наблюдалось уже на 14-е сутки. Напротив, при заражении смесью зрелого и незрелого вирусов сероконверсия была значительно выше, чем в двух других группах (Рис. 7). Это согласуется с ранее полученными

нами для прогретого вируса данными и говорит о том, что неинфекционные ВЧ в смеси со зрелыми способны индуцировать более мощный гуморальный иммунный ответ. Мы не наблюдали влияния незрелых ВЧ на течение инфекции (среднюю продолжительность жизни, инкубационный период и выживаемость). Таким образом, незрелые ВЧ были способны к индукции нейтрализующих антител на 6 день после заражения в количестве, сравнимом со зрелыми ВЧ, однако, титры нейтрализующих антител быстро снижались. Т.е. препараты зрелого и незрелого вирусов по-разному индуцируют иммунный ответ.

Через 3 месяца после заражения препаратом незрелого вируса выжившие животные не были защищены от вирулентного вируса того же штамма в дозе 100 ЛД<sub>50</sub>, хотя титры нейтрализующих антител в группах, зараженных вирулентным вирусом впервые и через 3 месяца после введения незрелого вируса, на 6-е сутки после заражения был одинаковым. В этом случае бустерного и защитного эффекта после предварительного введения незрелого вируса не наблюдалось.

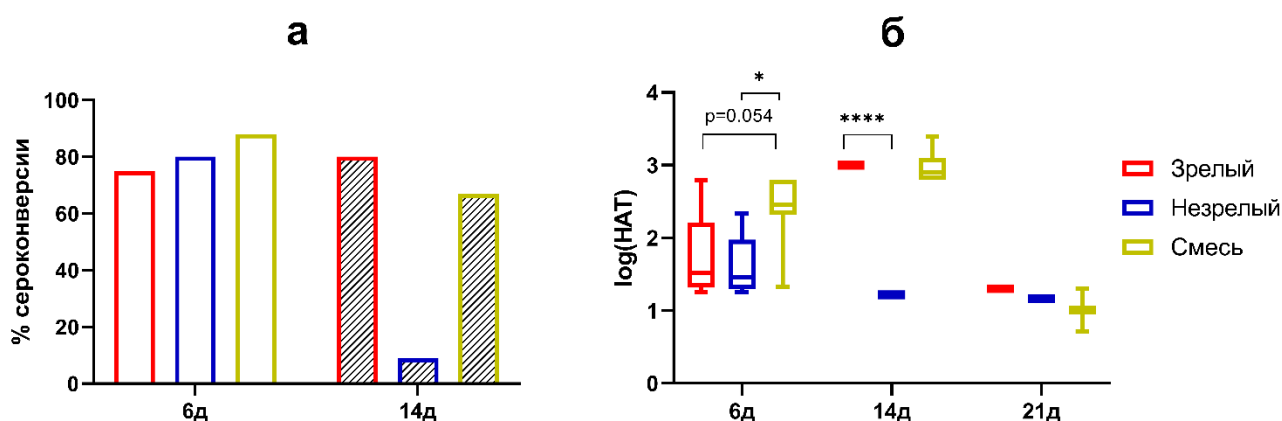


Рисунок 7 – Сероконверсия (а) и динамика титров нейтрализующих антител (б) на 6-е, 14-е и 21-е сутки после заражения препаратами зрелого вируса (красный), незрелого вируса (синий) и смесью зрелого и незрелого вирусов (фиолетовый). Для расчёта СГТ использовали данные положительных образцов. Сравнения выборок проводили по критерию Манна-Уитни (N=8-12).

Для более широкого понимания природы данных отличий совместно с лабораторией сравнительной и функциональной геномики ГНЦ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН мы исследовали изменения в репертуаре Т-клеточных рецепторов на 7-е сутки после заражения в сравнение с репертуаром Т-клеток наивных мышей до заражения и незараженных контрольных мышей с использованием высокопроизводительного секвенирования. На основании полученных данных мы видим, что количество ответивших клонов Т-клеток в крови у мышей, зараженных препаратами зрелого и незрелого вирусов, значительно отличаются от контроля (Рис. 8). При исследовании клеток селезенки было установлено, что как для зрелого, так и для незрелого вирусов мы наблюдали сдвиг иммунного ответа у зараженных животных в сторону CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-

лимфоцитов. На рисунке 9 кружками, соединенными между собой, представлены Т-клеточные рецепторы, которые имеют схожую рецепторную часть. Мы видим, что экспандированные клоны Т-клеток в ответ на заражение зрелым и незрелым вирусами имеют как схожие, так и отличные репертуары последовательностей CDR3.

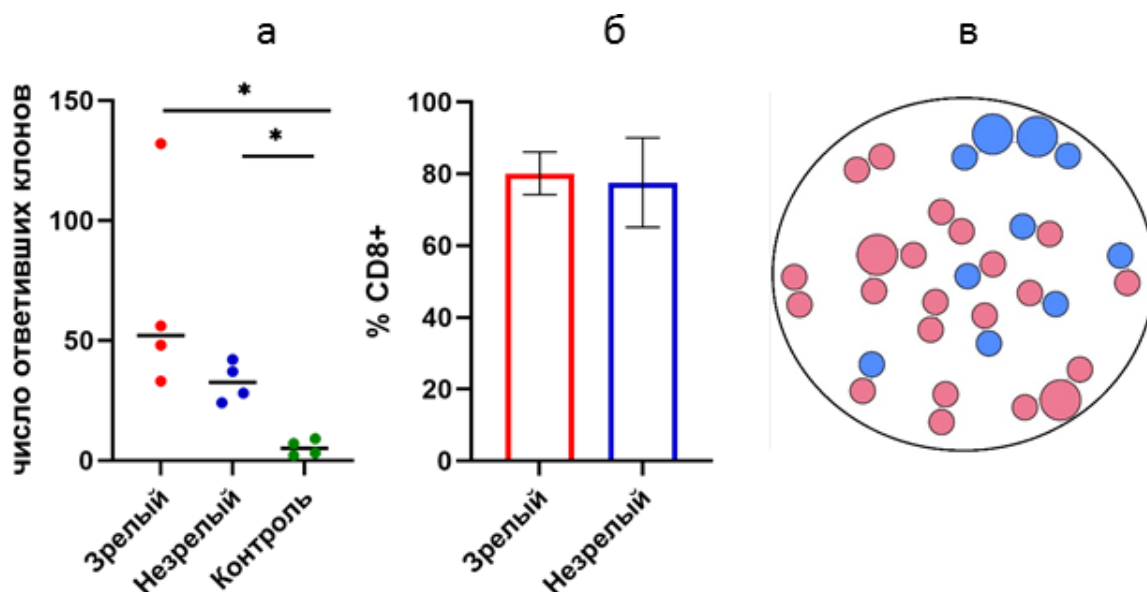


Рисунок 8 – Количество вирус-ассоциированных клонов Т-клеток, которые увеличили свою концентрацию в ответ на заражение препаратами зрелого и незрелого вирусов (а) и процентное соотношение CD8+ клеток по сравнению с CD4+ (б). Общие кластеры вирус-ассоциированных Т-клеток в ответ на заражение препаратами зрелого (красный) и незрелого (синий) вирусов (в). Сравнения проводили по критерию Манна-Уитни, N=4.

Мы также оценили влияние незрелых ВЧ на эффективность вакцины против КЭ. Препараты зрелого и незрелого вирусов были уравнены в дозе 10 ЛД<sub>50</sub>, соответственно, в пробе незрелого вируса количество ГСЧ было выше на 3lg (Табл. 4).

Таблица 4 – Процент выживших, средняя продолжительность жизни (СПЖ) и инкубационный период (ИП) в исследуемых группах

Группа	Вакцина «Клещ-Э-Вак»	Доза вируса в инокуляте			% выживших животных	СПЖ (медиана; интервал)	ИП (медиана; интервал)
		ЛД <sub>50</sub>	БОЕ	ГСЧ			
Вак-Вак-Вир	+	10	1000	20 000 000	100	-	-
Вир	-				13	12,0 (10; 15)	10,0 (7; 14)
Вак-Вак-Незрелый	+		7000	20 000 000 000	100	-	-
Незрелый	-				39	13,0 (10; 16)	9,5 (6; 14)

Вакцина показала 100% эффективность защиты как от зрелого, так и от остаточного инфекционного вируса в препарате незрелого вируса. Средняя продолжительность жизни и инкубационный период для групп, зараженных препаратами зрелого и незрелого вирусов, без предварительной вакцинации не различались (Табл. 4)



## **6. Характеристика бустерного ответа после вакцинации против ВКЭ в зависимости от дозы вирулентного вируса и количества неинфекционных вирусных частиц**

Одним из значимых показателей эффективности вакцины является бустерный ответ на введение вирулентного вируса в первые дни после заражения. Мы оценили титры нейтрализующих антител против вакцинного штамма Софьин и штамма ЭК-328 в сыворотках животных, двукратно иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак», до заражения (Рис. 9) и на вторые сутки после заражения препаратами вирусов с большим содержанием неинфекционных ВЧ: прогретого (Вир+37°С) и незрелого (Незрелый), которые были описаны выше.

Сероконверсия и титры нейтрализующих антител против вакцинного штамма Софьин были достоверно выше, чем против штамма ЭК-328, который использовался при разрешении. Бустерный ответ после разрешения ВКЭ штамм ЭК-328 наблюдался только в группе, зараженной интактным вирусом в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> (Рис. 9). В группе, разрешенной интактным вирусом в дозе 1 ЛД<sub>50</sub>, средние геометрические титры нейтрализующих антител до и после разрешения статистически не отличались. Это говорит о том, что для индукции выраженного бустера необходима определенная доза вирулентного вируса.

В группах, зараженных препаратами незрелого (Незрелый 10ЛД<sub>50</sub>) или прогретого вирусов (Вирус (+37) 1ЛД<sub>50</sub>), средние геометрические титры нейтрализующих антител на 2-е сутки после заражения статистически достоверно снизились по сравнению с титрами нейтрализующих антител после вакцинации до заражения как против штамма Софьин ( $p=0,038$  для незрелого вируса и  $p=0,015$  для прогретого при +37°С), так и против штамма ЭК-328 (для незрелого вируса ( $p=0,02$ )) (Рис. 9).

Это говорит о том, что неинфекционные ВЧ не способны индуцировать полноценный иммунный ответ, а, напротив, забирают на себя уже имеющиеся антитела, которые ранее были выработаны против вакцины.

Т.к. ранее мы увидели, что незрелые ВЧ *in vivo* забирают на себя часть вируснейтрализующих антител, которые выработались в ответ на иммунизацию вакциной «Клещ-Э-Вак», мы оценили влияние незрелых неинфекционных ВЧ на нейтрализующую активность антител в экспериментах *in vitro*. Для этого мы использовали сыворотки полученных после двукратной иммунизации животных вакциной против ВКЭ, а также гипериммунные асцитные жидкости, полученные при иммунизации животных препаратами зрелого и незрелого вирусов.

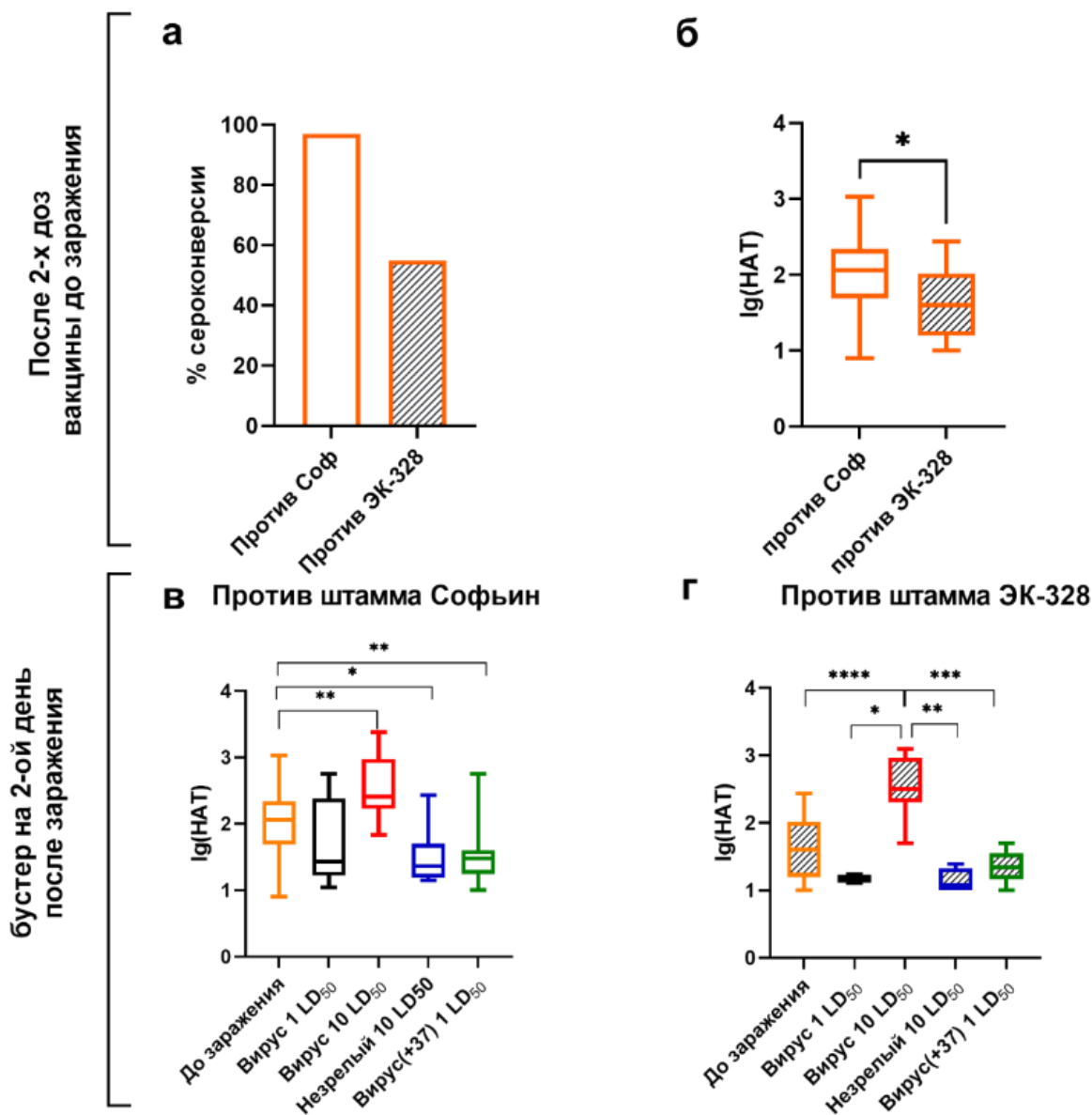


Рисунок 9 – Уровень сероконверсии и средние геометрические титры нейтрализующих антител в сыворотках мышей, двукратно иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак» (оранжевый), против штаммов ЭК-328 и Соффин до заражения (а,б) и на 2 сутки после заражения (в,г) препаратами зрелого вируса в дозе 1 ЛД<sub>50</sub> (черный) и 10 ЛД<sub>50</sub> (красный), препаратом незрелого вируса в дозе остаточного инфекционного вируса 10 ЛД<sub>50</sub> (синий) и препаратом прогретого вируса в дозе остаточного инфекционного вируса 10 ЛД<sub>50</sub> (зеленый). Для расчёта среднего геометрического титра использовали данные положительных образцов. Сравнения проводили по критерию Манна-Уитни (N=7-10).

Наиболее выраженное снижение титров нейтрализующих антител в реакции нейтрализации со зрелым, незрелым вирусами и их смесью (1:1 и 1:10) наблюдалось в сыворотках вакцинированных животных (Рисунок 10а), что подтверждает наши данные, полученные *in vivo*. Таким образом незрелые ВЧ забирают на себя нейтрализующие антитела, присутствующие в сыворотках вакцинированных животных.

При исследовании гипериммунных асцитных жидкостей, полученных к препарату незрелого вируса, мы обнаружили, что антитела к незрелому вирусу способны эффективно

нейтрализовать зрелый вирус (Рисунок 10в), а антитела к зрелому вирусу эффективно нейтрализуют остаточный инфекционный вирус в препарате незрелого вируса (Рисунок 10б). Снижение титров нейтрализующих антител при добавлении незрелого вируса к зрелому как в соотношении 1:1, так и в соотношении 1:10, наблюдалось во всех исследуемых сыворотках, однако, в гипериммунных асцитных жидкостях, полученных против препарата незрелого вируса, снижение было более выраженным (Рисунок 10б, в). Очевидно, что аффинность антител к незрелому вирусу в данном случае выше, поэтому большая часть антител расходуется именно на взаимодействие с ним.

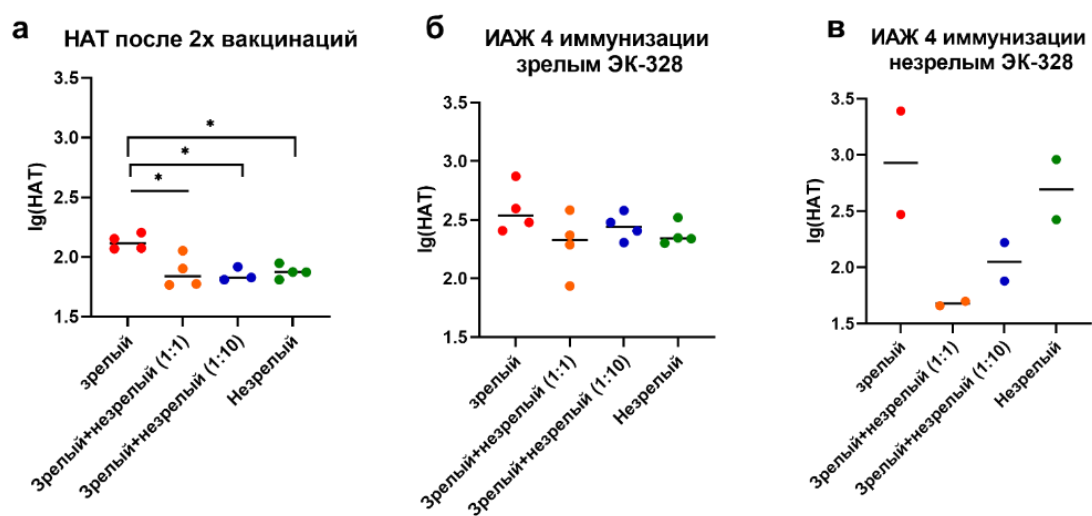


Рисунок 10 – Средние геометрические титры нейтрализующих антител в реакции нейтрализации против препаратов зрелого (красный), незрелого вирусов (зеленый) и смеси зрелого и незрелого вирусов в соотношении 1:1 (оранжевый) и 1:10 (синий) с сыворотками мышей, двукратно иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак» (а), и с гипериммунными асцитными жидкостями (ИАЖ), полученными против зрелого (б) и незрелого (в) ВКЭ штамма ЭК-328. Сравнения проводили по критерию Манна-Уитни.

Таким образом, неинфекционные ВЧ, способные к индукции антител, могут также выступать в роли дополнительных мишеней для антител.

Мы также оценили спектр нейтрализующих антител, индуцируемых препаратами зрелого и незрелого вирусов. По данным тепловой карты мы видим, что гипериммунная асцитная жидкость к незрелому вирусу сравнительно хуже нейтрализует отдельные штаммы вируса (Рис. 11). Таким образом, незрелые ВЧ могут приводить к изменению спектра индуцируемых ими антител.

Незрелые ВЧ, присутствующие в популяции ВКЭ, могут снижать титры нейтрализующих антител, а степень их снижения может быть связана со способом получения сыворотки. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что незрелые ВЧ действительно могут играть роль дополнительных мишеней для нейтрализующих антител, причем этот эффект доказан нами как *in vivo*, так и *in vitro*.

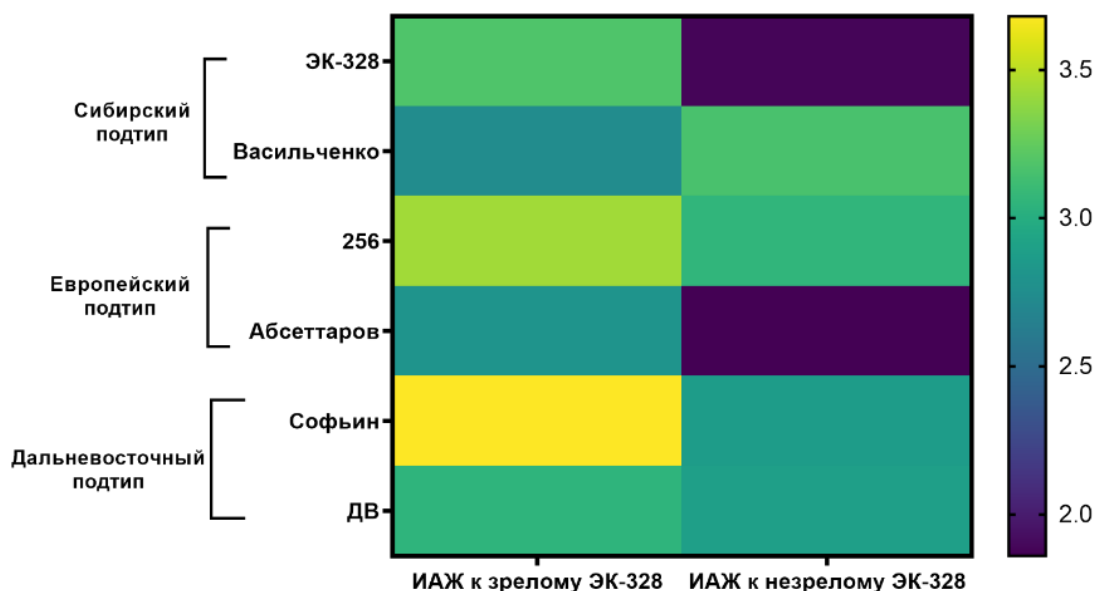


Рисунок 11 – Средние геометрические титры нейтрализующих антител в гипериммунных асцитных жидкостях (ИАЖ), полученных к препаратам зрелого и незрелого вирусов против разных штаммов ВКЭ.

**7. Влияние избыточного количества неинфекционных вирусных частиц на эффективность противовирусных соединений, направленных на взаимодействие с поверхностным белком E.**

Было изучено влияние неинфекционных ВЧ на анализ эффективной концентрации противовирусных препаратов, которые ранее были подобраны методами молекулярного моделирования по их способности взаимодействовать с бета-о-карманом белка E.

Мы исследовали противовирусную активность двух 4-аминопиримидин N-оксидов с различными боковыми радикалами ( $7o$  и  $7z$ ) против разных штаммов ВКЭ, в том числе штамма Абсеттаров и 256, которые не отличались по аминокислотной последовательности белка E, но отличались по доле неинфекционных ВЧ в популяции (Табл. 5). Для подавления 50% бляшек штамма 256 потребовалось значительно большее количество исследуемых соединений ( $EC_{50}$ ). Таким образом, избыток неинфекционных содержащих геном ВЧ может быть причиной значимых различий в эффективности химических соединений.

Таблица 5 – Соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ ( $lg(ГСЧ/БОЕ)$ ) в пробах разных штаммов ВКЭ и  $EC_{50}$  исследуемых соединений.

Штамм	Абсеттаров	256	Васильченко	ТВ08-Т2546	Лесопарк	ЭК-328	ДВ-936к
$lg(ГСЧ/БОЕ)$	<b>1,0±0,4</b>	<b>4,5±0,7</b>	1,2±0,4	2,7±0,6	1,7±0,6	2,3±0,5	2,9±0,5
Соединение	Эффективная концентрация исследуемых соединений, $EC_{50}$ , $\mu M$						
Соединение $7o$	<b>8,0 ± 3,0</b>	<b>21,0 ± 2,0</b>	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,4	6,5 ± 0,1	12,0 ± 1,0	7,4 ± 0,3
Соединение $7z$	<b>4,0 ± 1,0</b>	<b>26 ± 2,0</b>	4,3 ± 0,3	3,3 ± 0,4	9,0 ± 1,0	10,1 ± 0,9	4,3 ± 0,1

Исследование противовирусной активности другого класса низкомолекулярных противовирусных соединений на основе изоксазола (адамантилметилловые эфиры 5-аминоизоксазол-3-карбоновой кислоты) 4j и 4o с препаратами зрелого, незрелого вируса и их смеси показало, что присутствие незрелых ВЧ значительно повышает показатель  $EC_{50}$ . Так, для более эффективного против штамма ЭК-328 соединения 4o наблюдалось дозозависимое снижение противовирусной активности с увеличением концентрации незрелого вируса в пробе (Рис. 12). Менее эффективное соединение 4j при добавлении незрелого вируса полностью утрачивало свою противовирусную активность.

Таким образом, присутствие большого количества незрелых ВЧ в образце вируса может дозозависимо или полностью элиминировать противовирусную активность соединений, направленных на взаимодействие с белком Е, в тесте, основанном на уменьшении количества бляшек или ЦПД под действием соединения.

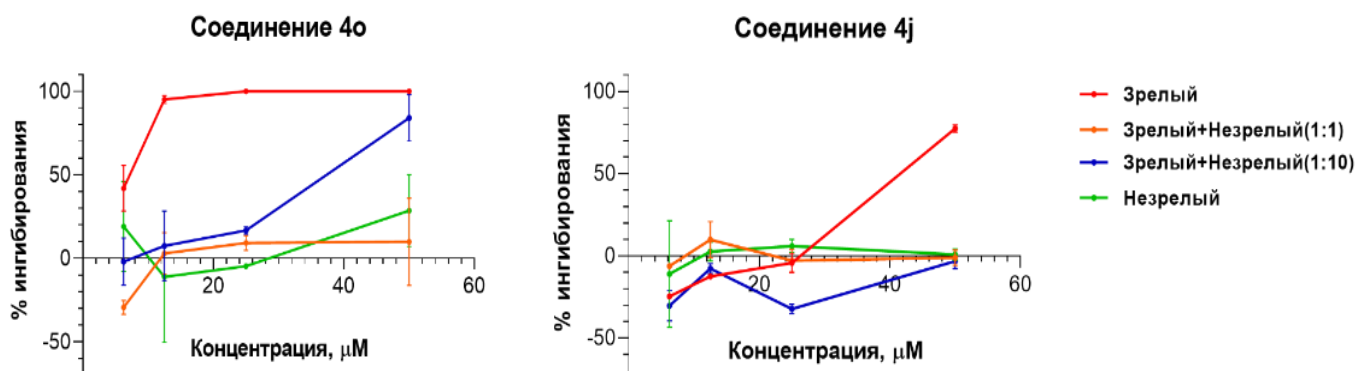


Рисунок 12 – Противовирусная активность 4j и 4o против зрелого, незрелого и смеси препаратов ВКЭ. Противовирусная активность представлена как процент уменьшения количества бляшек по сравнению с контролем (Зрелый вирус + DMSO). Интервалы соответствуют стандартному отклонению. N=2.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что соотношение количества геномсодержащих и инфекционных ВЧ значительно варьирует в пределах от 100 до 10 000 для разных штаммов ВКЭ и даже проб одного штамма, полученных при разных условиях.

Титрование методом бляшек в культуре клеток СПЭВ адекватно отражает количество инфекционных ВЧ в образце.

При высокой множественности заражения (1-10 БОЕ на клетку) не все инфекционные ВЧ проникают в клетки. Экспериментально доказано, что это не обусловлено нечувствительностью части клеток к вирусу, а связано с конкуренцией между инфекционными и неинфекционными ВЧ за молекулы неспецифического и специфического рецепторов.

Соотношение инфекционных и неинфекционных ВЧ, определяемое как  $Ig(ГСЧ/БОЕ)$ , зависит от ряда факторов: системы репродукции вируса, цикла репродукции вируса в конкретной культуре клеток и условий хранения вирусного материала. Было показано, что штаммы отличаются по этому показателю, что позволяет предположить, что варианты ВКЭ, которые циркулируют в природе, также могут отличаться по структурной гетерогенности.

Мы показали, что термоинактивация не приводит к разрушению вирионов ВКЭ, а связана с изменениями конформационной структуры поверхностных белков, в результате чего в популяции вируса появляются неинфекционные ВЧ, содержащие геном и обладающие отличными от зрелого вируса антигенными характеристиками.

Неинфекционные ВЧ не влияли на течение инфекции при заражении мышей линии BALB/c. При определенном соотношении инфекционных и неинфекционных ВЧ наблюдается гуморальный иммунный ответ со 100% сероконверсией при однократном введении препарата вируса. Эти данные могут быть использованы при разработке вакцин и усовершенствовании уже имеющихся вакцинных препаратов.

Незрелые неинфекционные ВЧ, полученные с помощью добавления ацидотропных аминов в КЖ на ранних стадиях репродукции, также, как и термоинактивированные неинфекционные ВЧ, после заражения не влияли на тяжесть и динамику заболевания КЭ при заражении мышей, но при заражении смесью зрелого и незрелого вирусных препаратов наблюдали повышение титров нейтрализующих антител и увеличение сероконверсии на 6 сутки после заражения.

Исследование гипериммунных асцитных жидкостей, полученных при иммунизации препаратами зрелого и незрелого вирусов, показало, что зрелые и незрелые ВЧ индуцируют разный спектр нейтрализующих антител.

При исследовании Т-клеточного иммунного ответа с помощью высокопроизводительного секвенирования было показано, что в ответ на заражение препаратами зрелого и незрелого вирусов Т-клеточный иммунный ответ при экспериментальном КЭ сдвинут в сторону CD8+ Т-

клеток. Мы выявили отличия в последовательностях CDR3 вирус-ассоциированных Т-клонов при заражении исследуемыми препаратами вируса.

Таким образом, иммунный ответ на заражение препаратами зрелого и незрелого вирусов имеет значительные отличия. Природные штаммы, очевидно, могут различаться по доле незрелых ВЧ в популяции, а заражение вирусами с большой долей незрелых ВЧ может приводить к слабой индукции иммунного ответа с измененным спектром антител, и можно ожидать различие вариантов вируса по уровню защиты от повторного заражения.

Нам удалось показать, что инактивированная цельновиральная вакцина КЭ эффективна против препаратов вируса с избыточным содержанием неинфекционных ВЧ как полученных при прогревании вируса, так и при добавлении ацидотропных аминов. При этом неинфекционные ВЧ в популяции вирулентного ВКЭ при экспериментальном КЭ влияют на бустерный эффект у вакцинированных животных: снижают количество нейтрализующих антител и изменяют спектр нейтрализующих антител, индуцированных в ответ на заражение.

Помимо эффекта *in vivo*, мы показали, что незрелые неинфекционные ВЧ влияют на противовирусную активность антител и эффективность разрабатываемых лечебных низкомолекулярных ингибиторов ВКЭ в исследованиях *in vitro*. Неинфекционные незрелые ВЧ конкурируют со зрелыми ВЧ за противовирусные антитела и соединения, ингибирующая активность которых связана с взаимодействием с поверхностным гликопротеином вируса. Полученные данные демонстрируют, что при оценке эффективности противовирусных препаратов, необходима стандартизация вирусных препаратов с учетом их структурной гетерогенности.

## ВЫВОДЫ

1. Соотношение количества геном-содержащих и инфекционных вирусных частиц для вируса клещевого энцефалита варьирует от 100 до 10000 и зависит от штамма вируса, от системы репродукции и стадии цикла репродукции вируса.

2. Термоинактивация ВКЭ не приводит к снижению числа геном-содержащих вирусных частиц, но увеличивает число неинфекционных вирионов, избыточная доля которых в популяции не влияет на тяжесть и летальность при экспериментальном КЭ. При определенном соотношении неинфекционных и инфекционных вирусных частиц значительно увеличивается сероконверсия на ранние сроки после заражения.

3. Незрелые неинфекционные вирусные частицы индуцируют краткосрочный синтез нейтрализующих антител и не индуцируют протективный иммунный ответ. Препараты зрелого и незрелого вирусов в ответ на заражение *in vivo* индуцируют увеличение концентрации вирус-

ассоциированных клонов Т-клеток, относящихся, в основном, к популяции CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, со схожими и отличными аминокислотными последовательностями CDR3.

4. Неинфекционные вирусные частицы выступают в роли дополнительных мишеней для нейтрализующих антител и противовирусных соединений, направленных на взаимодействие с поверхностным белком Е ВКЭ, снижая их противовирусную активность в опытах *in vitro*.

5. Инактивированная цельновирионная вакцина КЭ эффективно защищает от заражения ВКЭ с избыточным содержанием неинфекционных вирусных частиц при экспериментальном КЭ, при этом бустерный эффект в ответ на заражение у вакцинированных животных значительно снижен.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

Следующим этапом в исследовании неинфекционных вирусных частиц ВКЭ будет более детальное изучение отдельных типов частиц, образующихся при репродукции ВКЭ в разных системах, и исследование структурной гетерогенности вариантов ВКЭ, циркулирующих в природе. Для изучения незрелых вирусных частиц в природной популяции необходим подбор моноклональных антител, которые будут дифференцировать зрелые и незрелые вирусные частицы. Необходим выбор и отработка методов для определения доли пустых форм в популяции ВКЭ. Отдельным направлением для развития данной тематики является изучение экзосом, которые также могут образовываться в процессе инфекции КЭ.

Важной задачей также является изучение в Крио-ЭМ структуры инфекционных и неинфекционных вирусных частиц разных штаммов ВКЭ, а также вариантов вируса с точечными аминокислотными заменами, которые могут влиять на конформационные изменения поверхностного гликопротеина, и установление логической связи между структурой, подвижностью поверхностных белков и биологическими свойствами вируса.

Одним из важных направлений является также дальнейшая разработка более эффективных вакцинных препаратов, в том числе и на основе субвирусных частиц. Описанные в диссертационной работе исследования создают основу для использования неинфекционных вирусных частиц в качестве дополнения к новым, более эффективным разрабатываемым вакцинным препаратам. Данные о том, что разные по своей структуре вирусные частицы могут индуцировать различный спектр вирус нейтрализующих антител, говорят о необходимости проведения дополнительных экспериментов при приготовлении инактивированных вакцин, а также исследования структурной гетерогенности вирусных частиц, присутствующих в вакцинных препаратах. Полученные нами данные о влиянии неинфекционных вирусных частиц на бустерный иммунный ответ у вакцинированных животных также требует дальнейшего изучения на других штаммах ВКЭ.



## СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Тучинская К.К. Разработка метода оценки структурной гетерогенности популяции разных штаммов вируса клещевого энцефалита** / Тучинская К.К., Волок В.П., Илларионова В.В., Ковалева О.И. // Патогенез – 2018. – Т. 16 – № 3 – С.108–111. DOI:10.25557/2310-0435.2018.03.108-111, РИНЦ (БАК).
2. **Dueva E. V. Spectrum of antiviral activity of 4-aminopyrimidine N-oxides against a broad panel of tick-borne encephalitis virus strains** / Dueva E. V., Tuchynskaya K.K., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Sedenkova K.N., Averina E.B., Palyulin V.A., Karganova G.G. // Antiviral Chemistry and Chemotherapy – 2020. – Т. 28 – С.1–10. DOI: 10.1177/2040206620943462, IF 2,7 Scopus.
3. **Tuchynskaya K. Experimental assessment of possible factors associated with tick-borne encephalitis vaccine failure** / Tuchynskaya K., Volok V., Illarionova V., Okhezin E., Polienko A., Belova O., Rogova A., Chernokhaeva L., Karganova G. // Microorganisms – 2021. – Т. 9 – № 6 – С.1–21. DOI: 10.3390/microorganisms9061172, IF 4,152 WoS.
4. **Tuchynskaya K.K. Effect of immature tick-borne encephalitis virus particles on antiviral activity of 5-aminoisoxazole-3-carboxylic acid adamantylmethyl esters** / Tuchynskaya K.K., Fomina A.D., Nikitin N.A., Illarionova V.V., Volok V.P., Kozlovskaya L.I., Rogova A.A., Vasilenko D.A., Averina E.B., Osolodkin D.I., Karganova G.G. // Journal of General Virology – 2021. – Т. 102 – № 9 – С.001658. DOI: 10.1099/jgv.0.001658, IF 3.376 WoS.