

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 578.287

Исабек Айша Уранкызы

аспирант Института биотехнологии НАН КР

Худайбергенова Бермет Мерлисовна

доктор биологических наук, профессор, главный ученый секретарь НАН КР

Червякова Ольга Викторовна

кандидат биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности

Исабек Айша Уранкызы

КР Улуттук илимдер академиясынын Биотехнология институтунун аспиранты

Худайбергенова Бермет Мерлисовна

Биология илимдеринин доктору, профессор, КР Улуттук илимдер академиясынын башкы илимий катчысы

Червякова Ольга Викторовна

Биология илимдеринин кандидаты, профессор, Биологиялык коопсуздук көйгөйлөрү боюнча илимий-изилдөө институтунун башкы илимий кызматкери

Aisha Urankyzy IssabekPostgraduate Student, Institute of Biotechnology,
National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic**Bermet Merlisovna Khudaibergenova**Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Scientific Secretary,
National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic**Olga Viktorovna Chervyakova**Candidate of Biological Sciences, Professor, Chief Research Scientist,
Research Institute for Biological Safety Problems**ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ ВИРУСОВ
НОДУЛЯРНОГО ДЕРМАТИТА****ТҮЙҮНДҮҮ ДЕРМАТИТТИН РЕКОМБИНАНТТЫК ВИРУСТАРЫНЫН
ӨСҮҮ КАСИЕТТЕРИН ИЗИЛДӨӨ****STUDY OF CULTURAL PROPERTIES OF RECOMBINANT LUMPY SKIN DISEASE VIRUSES**

Аннотация. В работе проведено исследование культуральных свойств рекомбинантных штаммов вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота (LSDV), созданных на основе штамма Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ с нокаутом иммуномодулирующих генов (LSDV005, LSDV008, LSDV066, LSDV142) и вставкой гена IL-18. Репликативная активность вирусов оценивалась в культурах клеток LT, MDBK, SK, Vero и CT. Установлено, что все исследованные рекомбинантные вирусы сохраняют способность эффективно размножаться

в культурах LT и MDBK, формируя инфекционные титры, сопоставимые с исходным штаммом. Наибольшее снижение инфекционной активности наблюдалось у вирусов с множественными делециями, включающими ген LSDV066. Полученные результаты подтверждают, что вирус нодулярного дерматита является перспективной платформой для создания векторных вакцин, обладающей стабильностью и воспроизводимостью при генетических модификациях.

Ключевые слова: вирус нодулярного дерматита, рекомбинантные вирусы, иммуномодулирующие гены, культура клеток, векторные вакцины, репликация.

Аннотация. Бул иште бодо малдын түйүндүү дерматити вирусунун (LSDV) рекомбинанттык штамдарынын культуралык касиеттери изилденди. Изилдөө *Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ* штаммынын негизинде жүргүзүлүп, иммуномодуляциялоочу гендер (LSDV005, LSDV008, LSDV066, LSDV142) нокаутталып жана IL-18 гени киргизилген. Вирустардын репликативдүү активдүүлүгү LT, MDBK, SK, Vero жана CT клетка маданияттарында бааланды. Бардык изилденген рекомбинанттык вирустар LT жана MDBK клеткаларында натыйжалуу көбөйүү жөндөмүн сактап, баштапкы штаммга окшош инфекциялык титрлерди түзгөнү аныкталды. Эң чоң инфекциялык активдүүлүктүн төмөндөшү LSDV066 генин камтыган көп нокауттуу вирустарда байкалган. Алынган жыйынтыктар түйүндүү дерматит вирусу генетикалык модификациялар учурунда туруктуулугун жана репродукциялануучу касиеттерин сактаган перспективдүү вектордук вакцина платформасы экенин ырастайт.

Негизги сөздөр: түйүндүү дерматит вирусу, рекомбинанттык вирустар, иммуномодуляциялоочу гендер, клетка маданияты, вектордук вакциналар, репликация.

Abstract. This study investigated the cultural (growth) properties of recombinant strains of the lumpy skin disease virus (LSDV) of cattle, developed on the basis of the *Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ* strain with knockouts of immunomodulatory genes (LSDV005, LSDV008, LSDV066, LSDV142) and insertion of the IL-18 gene. The replicative activity of the viruses was evaluated in LT, MDBK, SK, Vero, and CT cell cultures. All recombinant viruses retained the ability to efficiently replicate in LT and MDBK cells, producing infectious titers comparable to those of the parental strain. The most pronounced reduction in viral infectivity was observed in multi-deletion mutants containing the LSDV066 gene knockout. These results confirm that the lumpy skin disease virus is a promising platform for the development of vector vaccines, demonstrating genetic stability and consistent replication capacity under genetic modifications.

Keywords: lumpy skin disease virus, recombinant viruses, immunomodulatory genes, cell culture, vector vaccines, replication.

Введение

Вакцинация остаётся ключевым инструментом контроля инфекционных болезней животных, позволяя существенно снизить их распространение и связанные с ними экономические потери [1]. В условиях активной глобализации, изменения климата и постоянного перемещения животных возрастает вероятность трансграничного распространения возбудителей, что подчёркивает необходимость разработки инновационных и более универсальных вакцинных препаратов [2]. Опыт последних эпизоотий демонстрирует, что даже при наличии зарегистрированных вакцин динамика инфекционных процессов может резко меняться, требуя оперативного

внедрения новых технологий с повышенной безопасностью и адаптивностью [3].

Одним из наиболее активно развивающихся направлений современной ветеринарной биотехнологии является конструирование векторных вакцин, обеспечивающих контролируемую экспрессию антигенов и формирование длительного защитного иммунитета [4]. Такие системы позволяют объединять в одном препарате антигены различных патогенов, создавая платформы для комплексной защиты животных от нескольких инфекций одновременно [5].

Среди возможных вирусных векторов особое внимание привлекают вирусы рода *Capripoxvirus*, включающие возбудителей

оспы овец (SPPV), оспы коз (GTPV) и нодулярного дерматита крупного рогатого скота (LSDV). Каприпоксвирусы обладают рядом биологических преимуществ: они ограничены в круге восприимчивых хозяев, безопасны для человека, имеют крупный и стабильный ДНК-геном, допускающий интеграцию гетерологичных генов, и способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [6, 7].

Эти особенности определили интерес исследователей к использованию каприпоксвирусов как универсальных платформ для создания рекомбинантных вакцин. Так, было продемонстрировано успешное применение *Goatpox virus*, экспрессирующего антигены вирусов чумы мелких жвачных (PPRV) и ящура (FMDV), что обеспечило формирование выраженного защитного иммунитета у коз [8]. Аналогичный подход реализован при создании рекомбинантного *Lumpy skin disease virus*, экспрессирующего антигены PPRV и вируса лихорадки Рифт-Валли (RVFV), обеспечившего иммунную защиту мелких жвачных животных [9]. В других работах сообщалось о создании каприпоксвирусных векторов, кодирующих антигены вирусов бешенства, оспы овец и *Brucella*, демонстрирующих стабильную экспрессию и выраженную иммуногенность [10–12].

Среди представителей рода *Capripoxvirus* именно вирус нодулярного дерматита (LSDV) рассматривается как наиболее перспективный объект для создания векторных конструкций. Его геном хорошо охарактеризован, он способен к стабильной репликации в клеточных культурах и допускает безопасное включение чужеродных генетических элементов [13, 14]. Таким образом, целью нашей работы являлось изучение культуральных свойств рекомбинантных штаммов LSDV, которые могут быть использованы в дальнейшем как вирусные векторы.

Материалы и методы

В исследовании был использован вирус нодулярного дерматита штамм *Dermatitis nodulares/2016/Atyrau/KZ* (Atyrau), который был получен из коллекции Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ), Казахстан. Также в работе были использованы ранее

полученные рекомбинантные вирусы нодулярного дерматита с нокаутом иммуномодулирующих генов: рекомбинантный вирус Atyrau-5 с делецией гена LSDV005; рекомбинантный вирус Atyrau-B с делецией гена LSDV008; рекомбинантный вирус Atyrau-N с делецией гена LSDV142; рекомбинантный вирус Atyrau-J(IL18) с нокаутом гена LSDV066 методом инсерции IL18; рекомбинантный вирус Atyrau-5J(IL18) с делецией генов LSDV005 и LSDV066 (инсерция IL18); рекомбинантный вирус Atyrau-BJ(IL18) с нокаутом генов LSDV008 и LSDV066 (инсерция IL18); рекомбинантный вирус Atyrau-5BJN(IL18) с нокаутом генов LSDV005, LSDV008, LSDV066 (инсерция IL18) и LSDV142.

Культуральные свойства вирусов были изучены на первично трипсинизированной культуре клеток тестикулы ягнят (LT), перевиваемой линии клеток почки крупного рогатого скота Madin-Darby (MDBK), перевиваемой линии эпителиальных клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero), перевиваемой линии клеток почки сайги (SK), первичной культуре клеток тестикулы теленка (СТ). Культуры клеток, использованные в работе, предоставлены Лабораторией клеточной биотехнологии НИИББ. Культуры клеток LT, SK, СТ культивировали в среде ПСП с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, Sigma, Сент-Луис), MDBK и Vero культивировали в среде DMEM также с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота при 37 °С в 5% CO₂. Вирусы были культивированы в средах с содержанием 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, в течении 4–7 суток при 37 °С в 5% CO₂. Чувствительность культур клеток к вирусам определяли методом последовательных пассажей. Монослойную культуру клеток заражали вирусами и культивировали до появления характерных морфологических изменений клеток. Инфекционную активность вирусов определяли в культуре клеток ТЯ методом микротитрования. Расчет инфекционной активности проводили по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/см³. Учет результатов микротитрования проводили на 10 сутки инкубирования.

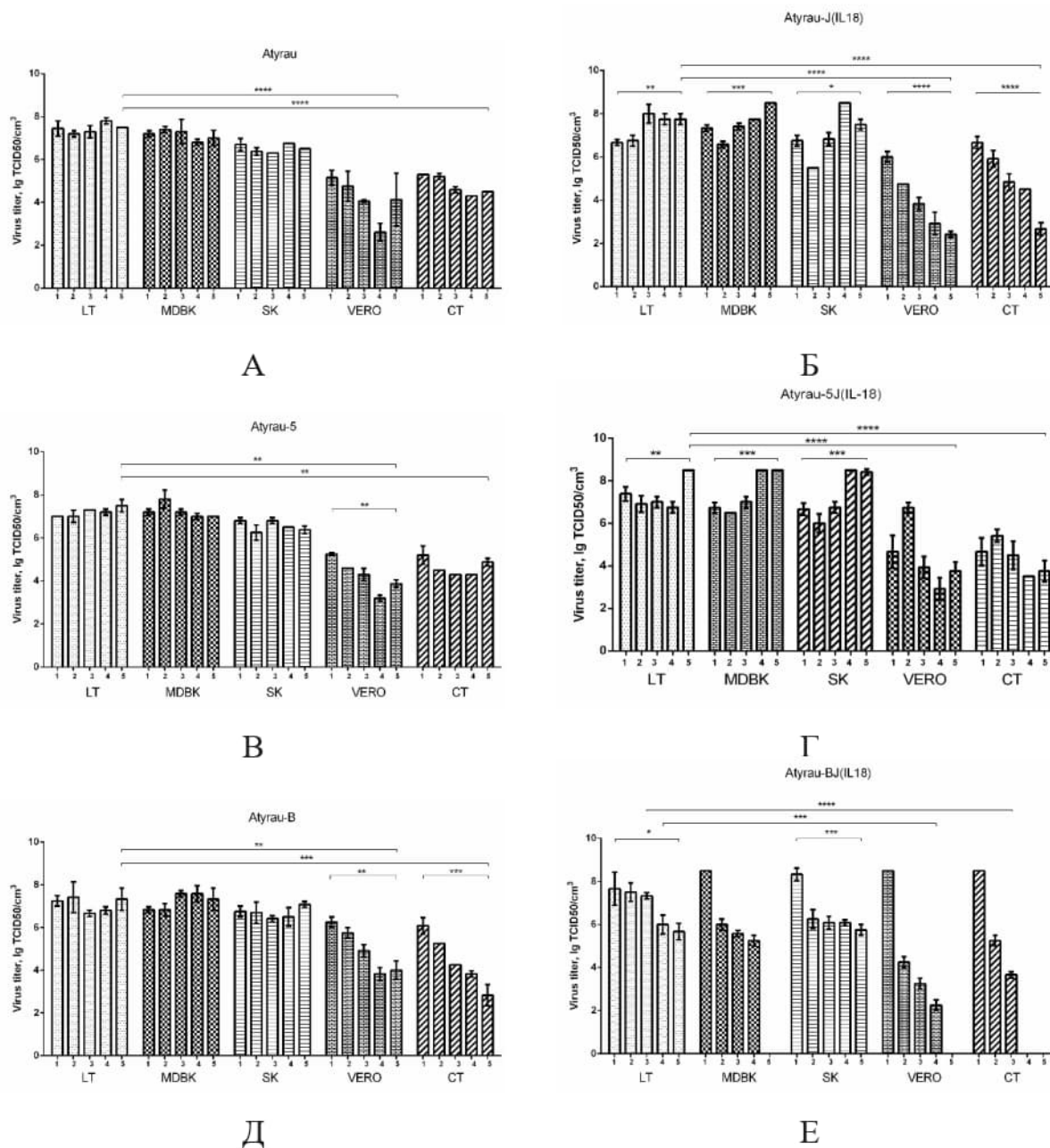
Статистический анализ экспериментальных данных и построение графиков вы-

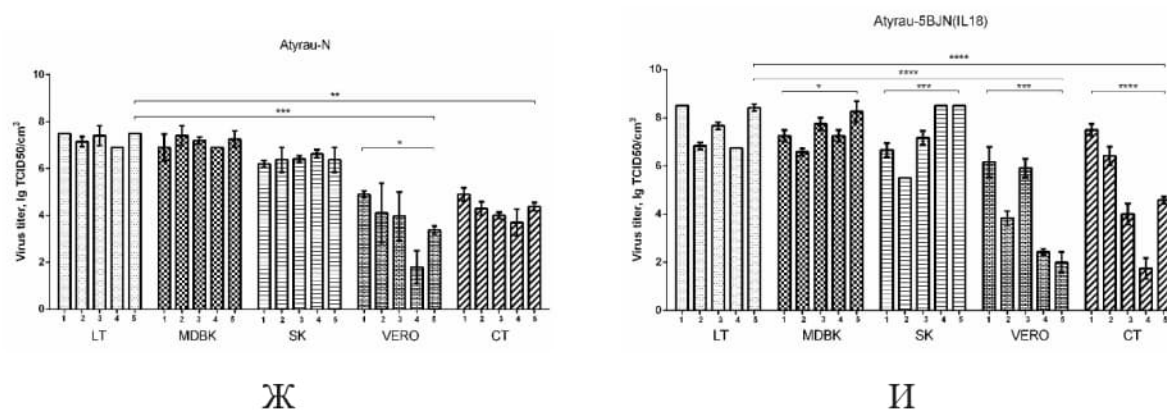
полнялись с использованием Graphpad Prism версии 6.0 и Microsoft Excel 2021 MSO.

Результаты

Для оценки влияния генетических модификаций на репликативную активность и культуральные характеристики рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита крупного рогатого скота был проведён срав-

нительный анализ исходного штамма Atyrau и полученных на его основе рекомбинантных вирусов с нокаутом иммуномодулирующих генов. Основное внимание уделялось определению динамики накопления вируса и изменению его инфекционной активности в различных культурах клеток, отличающихся по происхождению и восприимчивости к вирусу.





Статистический анализ проводился с использованием обычного однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста множественных сравнений Тьюки. Значимыми считались значения $P < 0,05$. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,005$, *** — $p < 0,0005$, **** — $p < 0,00001$

Рисунок 1 – Репродуктивная активность вирусов нодулярного дерматита в различных культурах клеток

Сравнительный анализ культуральных свойств исходного и рекомбинантных вирусов нодулярного дерматита показал (рис. 1), что все исследованные штаммы обладали способностью эффективно реплицироваться в клеточных культурах LT, MDBK и SK, демонстрируя различия в уровне накопления вируса, зависящие от как типа клеточной линии, так и характера генетических модификаций. Наиболее высокие титры вируса наблюдались в культуре клеток LT, где репликация исходного штамма Atyrau достигала $8,0\text{--}8,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$. Рекомбинантные варианты с одиночными делениями (Atyrau-5, Atyrau-B, Atyrau-N) характеризовались умеренным снижением инфекционной активности по сравнению с исходным вирусом.

Более выраженное снижение репликативной способности отмечено у вирусов с нокаутом гена LSDV066, который был достигнут методом инсерции нуклеотидной последовательности гена кодирующего бычий интерлейкин-18. Так, вирус Atyrau-J(IL18) формировал достоверно меньшие титры в культурах MDBK и SK ($p < 0.01$), что может свидетельствовать о влиянии этого гена на внутриклеточные механизмы вирусного воспроизводства. Аналогичное снижение наблюдалось у рекомбинантных вирусов с двойными и множественными делециями (Atyrau-5J(IL18), Atyrau-BJ(IL18) и Atyrau-5BJN(IL18)), где накопление вируса в ряде

культур (особенно MDBK и CT) было достоверно ниже по сравнению с родительским штаммом ($p < 0.001$).

Клеточные линии Vero и CT демонстрировали наименьшую чувствительность ко всем исследованным вирусам, при этом титры в среднем были на $1,0\text{--}1,5 \lg \text{TCID}_{50}/\text{cm}^3$ ниже, чем в культурах LT и MDBK. В целом, структура полученных данных указывает на то, что оптимальными системами для культивирования как исходных, так и рекомбинантных штаммов LSDV остаются культуры LT и MDBK, обеспечивающие наибольшие значения инфекционной активности.

Сопоставление между штаммами показало, что наибольшее снижение вирусного титра наблюдается при сочетанных делециях иммуномодулирующих генов, особенно в конструкциях, включающих LSDV066. Эти результаты свидетельствуют о том, что данный ген, вероятно, играет не только роль в подавлении противовирусного ответа, но и опосредованно влияет на эффективность вирусной репликации в чувствительных культурах клеток.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что модификации генома вируса нодулярного дерматита крупного рогатого скота, направленные на удаление отдельных иммуномодулирующих генов и вставку гена IL-18, по-разному влияют на реплика-

тивную активность вируса в различных типах клеточных культур. Наиболее выраженные различия наблюдались в культурах LT и MDBK, где рекомбинантные вирусы демонстрировали стабильное накопление инфекционного титра, сопоставимого или лишь незначительно уступающего исходному штамму Atyrau. Это указывает на сохранение у большинства полученных рекомбинантов способности эффективно заражать клетки и проходить полный цикл репликации.

Снижение инфекционной активности, отмеченное для некоторых штаммов с множественными делециями, вероятно, связано с потерей определённых регуляторных функций, обеспечивающих оптимальное взаимодействие вируса с клеточными механизмами хозяина. Следует отметить, что культура клеток Vero продемонстрировала низкую восприимчивость ко всем исследованным штаммам, что соответствует известным особенностям этого типа клеток при работе с каприпоксвирусами. Напротив,

культуры LT и MDBK могут рассматриваться как оптимальные системы для анализа роста и тестирования рекомбинантных вариантов LSDV, что подтверждает их универсальность для исследований вирусов крупного рогатого скота и овец [7, 14].

Заключение

Проведённое исследование показало, что рекомбинантные штаммы вируса нодулярного дерматита с нокаутом иммуномодулирующих генов сохраняют способность к эффективной репликации в чувствительных культурах клеток, прежде всего LT и MDBK.

В целом, наблюдаемые закономерности подтверждают, что использование платформы вируса нодулярного дерматита остаётся перспективным направлением для разработки векторных вакцин. Сохранение стабильной репликации при наличии генетических модификаций указывает на устойчивость генома LSDV к вставкам и делециям, что открывает возможности для его дальнейшего конструирования с целью доставки гетерологичных антигенов других возбудителей.

Список литературы

1. Rodrigues C.M.C., Plotkin S.A. Impact of vaccines: health, economic and social perspectives // *Frontiers in Microbiology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1526. – DOI: 10.3389/fmicb.2020.01526.
2. Namazi F., Khodakaram T. Lumpy skin disease, an emerging transboundary viral disease: A review // *Journal of Veterinary Science*. – 2021. – Vol. 22, No. 4. – P. e56. – DOI: 10.4142/jvs.2021.22.e56.
3. Chouhan C.S., et al. Epidemiology and economic impact of lumpy skin disease in cattle // *Tropical Animal Health and Production*. – 2022. – Vol. 54, No. 3. – P. 144. – DOI: 10.1007/s11250-022-03044-4.
4. Gómez C.E., et al. New approaches to poxvirus-based vaccine vectors // *Vaccines*. – 2022. – Vol. 10, No. 6. – P. 904. – DOI: 10.3390/vaccines10060904.
5. Mercer A.A., Schmidt F.I. Poxvirus vectors in veterinary vaccinology // *Vaccines*. – 2023. – Vol. 11, No. 5. – P. 1025. – DOI: 10.3390/vaccines11051025.
6. Wallace D.B., Buller R.M.L. Capripoxviruses as vaccine vectors // *Expert Review of Vaccines*. – 2021. – Vol. 20, No. 4. – P. 421–435. – DOI: 10.1080/14760584.2021.1885399.
7. Tulman E.R., et al. Genome of lumpy skin disease virus // *Journal of Virology*. – 2001. – Vol. 75, No. 15. – P. 7122–7130. – DOI: 10.1128/JVI.75.15.7122-7130.2001.
8. Li J., et al. A recombinant capripoxvirus expressing the F protein of PPRV and the P12A3C of FMDV // *Virology*. – 2023. – Vol. 584. – P. 189–197. – DOI: 10.1016/j.virol.2023.05.006.
9. Boshra H., et al. Development of a multivalent capripoxvirus-vectored vaccine candidate for PPR and RVF // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12, No. 7. – P. 805. – DOI: 10.3390/vaccines12070805.
10. Chauhan R.S., et al. Capripoxvirus-based rabies recombinant vaccine candidate induces protective immunity // *Vaccine*. – 2021. – Vol. 39, No. 44. – P. 6543–6552. – DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.09.064.
11. Chervyakova O. Capripoxvirus vectors for vaccine development: A review // *Veterinary Microbiology*. – 2020. – Vol. 245. – P. 108705. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2020.108705.

12. Munyanduki H., Mwanza P. Advances in recombinant poxvirus vector vaccines for livestock diseases // *Vaccines*. – 2024. – Vol. 12, No. 3. – P. 345. – DOI: 10.3390/vaccines12030345.
13. Tuppurainen E.S.M., et al. Lumpy skin disease: A review of current knowledge and gaps // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2020. – Vol. 7. – P. 450. – DOI: 10.3389/fvets.2020.00450.
14. Sprygin A., et al. Progress in lumpy skin disease research: Pathogenesis, molecular biology, and control // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 7. – P. 1421. – DOI: 10.3390/v14071421.
15. Modethed W., et al. Recent LSDV outbreaks and implications for vaccine development // *Veterinary Sciences*. – 2025. – Vol. 12, No. 2. – P. 189. – DOI: 10.3390/vetsci12020189.