

- hazide, a novel prodrug of AZT. *Nucleosides & Nucleotides*. 1999; 18(4-5): 901—6.
14. Selimova L.M., Kraevskiy A.A., Galegov G.A. Combination of phosphazide and crixivan inhibits replication of HIV-1 strains that are resistant to azidothymidine. *Doklady Akademii nauk*. 1999; 369(6): 847—9. (in Russian)
 15. Pokrovskiy V.V., ed. *Infection of AIDS: Clinic, Diagnostic, Treatment [ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение]*. Moscow: GEOTAR-Meditsina; 2000. (in Russian)
 16. Kravchenko A.V. The use of Nicavir as a compound part of antiretroviral therapy. *Meditsinskaya kafedra*. 2004; 2(10): 166—72. (in Russian)
 17. Yurin O., Kravtchenko A., Afonina L., Pokrovskiy V. Treatment of the patients with intolerance to AZT by phosphazid. In: *The drug therapy in HIV-infection: Proceedings of the 5th International Congress*. Glasgow. 2000; 14(Suppl. 4): 13.
 18. Ivanova E.S., Vorob'eva N.N. Triple antiretroviral therapy for HIV infection using Phosphazide. In: Orlov O.A., Koryukina I.P., eds. *Proceedings of the V (XIV) International Scientific Conference «Oncology — XXI Century. Health of the Nation — XXI Century» [Sbornik materialov V (XIV) Mezhunarodnoy nauchnoy konferentsii «Onkologiya — XXI vek. Zdorov'e natsii — XXI vek»]*. Spoleto; 2010. (in Russian)
 19. Kravchenko A.V., Kuimova U.A., Kanestri V.G., Gankina N.Yu., Serebrovskaya L.V. The use of phosphazide in HAART regimens for treating HIV and viral hepatitis C in patients previously treated for HCV. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(2): 64—72. (in Russian)
 20. Moshkovich G.F., Minaeva S.V., Varlova L.V., Goryaeva M.P., Gulyaeva S.S., Tikhonova E.V. Clinical and pharmacoeconomic results of the usage of various HIV reverse transcriptase inhibitors in the schemes of antiretroviral therapy of patients receiving therapy for the chronic hepatitis C virus. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(1): 34—9. (in Russian)
 21. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Kanestri V.G., Afonina L.Yu. et al. Minutes of regular check-up and treatment of patients with HIV infection. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2014; 6(Suppl.): 1—43. (in Russian)
 22. Bartlett J., Gallant J., Pham P. *Clinical aspects of HIV-infection*. Moscow: Valent; 2012. (in Russian)
 23. Pantelev A.M., Goliusova M.Yu., Kabanova V.I. The results of phosphazide (Nicavir) use in HIV patients coinfecting with TB. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2010; 2(2): 75—9. (in Russian)
 24. Ivanova E.S., Shmagel' N.G., Vorob'eva N.N. Nikavir in Chemoprevention Regimens for Vertical HIV Transmission. In: *Kasenga F.H., ed. Understanding HIV/AIDS Management and Care — Pandemic approaches in the 21st century*. Rijeka: InTech; 2011.
 25. Moshkovich G.F., Minaeva S.V. The results of a retrospective study of the use of Phosphazide and AZT to prevent transmission of HIV from mother to child. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2013; 5(1): 90—6. (in Russian)
 26. Moshkovich G.F., Minaeva S.V. Efficacy and safety of Phosphazide in alternative ART regimens in HIV infected patients. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2013; 5(4): 57—61. (in Russian)

Поступила 24.05.16

Принята в печать 11.10.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1.083.2

Гребенникова Т.В.^{1,2}, Сыроешкин А.В.², Чичаева М.А.², Эспер С.А.¹, Львов Д.К.¹

ПРИРОДНЫЕ ОЧАГИ ГРИППА А В ЗАПАДНОЙ АРКТИКЕ

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

²Медицинский институт Российского университета дружбы народов, 117198, г. Москва

Исследованы малые бухты птичьих арктических базаров Кольского полуострова (побережье Баренцева моря). Показано, что в бухтах под птичьим базаром в поверхностном микрослое (ПМС) и образцах аэрозоля обнаружена РНК вируса гриппа А. Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гриппа в составе ПМС и аэрозоля, первичная структура фрагментов подтвердила их идентичность в ПМС и морском аэрозоле. Предложен механизм переноса вирусов по пути поверхностный микрослой — морской аэрозоль. Составлена кинетическая схема взаимодействия вирус — хозяин — биоценоз, позволяющая математически моделировать численность вирусной популяции в зависимости от температуры.

Ключевые слова: *Западная Арктика; поверхностный микрослой; морской аэрозоль; вирус гриппа А; механизм переноса вирусов.*

Для цитирования: Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., Чичаева М.А., Эспер С.А., Львов Д.К. Природные очаги гриппа А в Западной Арктике. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 11-17.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-11-17>

Grebennikova T.V.^{1,2}, Syroeshkin A.V.², Chichaeva M.A.², Esper S.A.¹, Lvov D.K.¹

INFLUENZA A VIRUS IN THE WESTERN ARCTIC

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

²Institute for Medicine, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

Для корреспонденции: Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, зав. лаб. молекулярной диагностики Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Small bays of bird bazaars of the Arctic Kola Peninsula (Barents Sea) have been studied. RNA of influenza A virus was found in the surface microlayer (SM) and aerosol samples from the bays located beneath bird colonies. The nucleotide sequencing of the PCR fragments from the SM and the sea aerosol showed their identity for each bay. Virus transfer mechanism along the “surface microlayer – sea aerosol” path has been proposed. The kinetic scheme of the virus–host–environment interaction, which allows the dependence of the viral population size on the temperature to be simulated, has been developed.

Key words: *Western Arctic; surface microlayer; sea aerosol; influenza virus; virus transfer mechanism.*

For citation: Grebennikova T.V., Syroeshkin A.V., Chichaeva M.A., Esper S.A., Lvov D.K. Influenza A virus in the Western Arctic. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 11-17. (In Russ.).

DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-11-17](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-11-17)

For correspondence: Tatyana V. Grebennikova, Dr. Sci. (Biol.) Professor, corresponding member of RAS, Head of the Laboratory of molecular diagnosis, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «N.F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology», Moscow, 123098, Russian Federation.
E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Information about authors:

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 29 September 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

Вирус гриппа А широко распространен в природе, поражает млекопитающих и птиц и вызывает эпидемии, пандемии и эпизоотии. Этот вирус отличается высокой степенью вариабельности, особенно это касается двух поверхностных гликопротеинов вириона: гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). От диких птиц изолированы вирусы со всеми известными сочетаниями поверхностных белков, при этом инфекция у диких птиц протекает в виде энтерита без видимых признаков заболевания. Дикая птица является естественными хозяевами вируса гриппа А и имеют высокую степень адаптации к нему. Распространение вируса гриппа А с перелетными птицами и его эволюцию подробно изучали специалисты Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ранее [1, 2].

В данной работе мы оценивали выявление вируса гриппа А в образцах поверхностного микрослоя (ПМС) и аэрозолей биогеоценоза Западной Арктики. Аэрозоли попадают в атмосферу вследствие разнообразных процессов из различных источников. Среди них выделяют вулканическую активность, образование пыли при выветривании поверхности почв, генерацию солевых частиц при ветроволновом взаимодействии в океане и многие другие. Таким образом, атмосферный аэрозоль всегда представляет собой смесь частиц самого разнообразного происхождения. Мощность морского источника генерации солевого аэрозоля, оцениваемая в 5900 Мт/год, превышает мощности почвенного пылевого источника генерации 1—10 мкм аэрозолей почти в 6 раз, субмикронного почвенного пылевого аэрозоля — приблизительно в 24 раза, сульфатного аэрозоля почти в 40 раз и углеродного (включая сажевый) примерно в 70 раз [3]. Таким образом, потенциально 80% массы аэрозолей могут составлять морские аэрозоли. Механизмы генерации морских аэрозолей из ПМС (лопание пузырьков, возникающих в толще морской воды при газовыделении на дисперсной фазе, обрушение волн, прямой ветровой срыв капель воды с волнующейся поверхности моря) предполагают значительное сходство в композиции веществ между ПМС и морскими аэрозолями [4, 5]. Ранее были получены данные о захвате в аэрозоль при интенсивном волнении алюмосиликатных частиц, белковых частиц и бактерий [6—9].

В работе установлено наличие РНК вируса гриппа А в образцах ПМС, а также образцах морских аэрозолей, по-

лученных во время экспедиций в Западной Арктике. Секвенирование показало идентичность геномов вируса гриппа А, выделенного из образцов ПМС и морских аэрозолей соответственно. Предложена гипотеза о транспорте вируса гриппа А *in vivo* в составе аэрозолей по пути ПМС — воздух. На примере вируса гриппа А предложена кинетическая схема взаимодействия вирус—хозяин—биоценоз, позволяющая математически моделировать численность вирусной популяции в зависимости от температуры.

Методы

Места отбора проб. Пробы отбирали во время экспедиции на Кольском побережье Баренцева моря (июнь 2013 г.). Маршрут движения судна пролегал вдоль Кольского полуострова: Мурманск — мыс Чебрай — о-в Малый Олений — мыс Териберский — о-ва Гавриловские — о-в Большой Олений — архипелаг Семь островов. Все пробы упаковывали в герметичную тару и немедленно замораживали в жидком азоте.

Пробоотбор ПМС. Отбор ПМС проводили при помощи сетки Гаррета (толщина слоя ~1 мм) и пробоотборника [10].

Морские аэрозоли собирали на аналитические фильтры АФА-РМП-3 с помощью устройства, позволяющего проводить отбор проб на 3 фильтра одновременно [11]. Средняя скорость отбора проб составляла $16,0 \pm 0,1$ м³/ч. Отбор проб атмосферного аэрозоля осуществляли на ходу судна при необходимых направлениях относительно ветра (острые углы относительно оси судна) посредством принудительной прокачки воздуха через фильтры, установленные на форштевне судна. Использовали одновременно 3 фильтра при каждой установке. Временной интервал между постановкой и снятием фильтров составлял от 1 ч 16 мин до 4 ч 40 мин.

Подготовка фильтров для молекулярного анализа и выделение нуклеиновых кислот. Фильтры измельчали и помещали в раствор 6 М гуанидинтиоционата. Затем выделяли ДНК и РНК с использованием неорганического носителя SiO₂ [12].

Выделение ДНК и РНК из образцов объемной воды. Нуклеиновые кислоты из образцов объемной воды и ПМС выделяли быстрым методом без использования органических растворителей. Пробы центрифугировали при 18000 г. Осадок суспандировали в растворе 6 М

гуанидинтиоционата и выделяли с использованием неорганического носителя SiO₂ [12]. Элюцию ДНК и РНК проводили в 0,03 мл деионизованной воды.

Реакцию совмещенной обратной транскрипции-амплификации (ОТ-ПЦР) для определения РНК вируса гриппа А проводили в объеме 0,025 мл. К 0,005 мл РНК добавляли 0,02 мл реакционной смеси для ОТ-ПЦР, содержащей 10 мМ трис-НСl (рН 9,0 при 25°C), 50 мМ КСl, 0,1% тритон Х-1000, 0,25 мМ MgCl₂, 0,25 мМ каждого dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 0,0005 мл IRNase, 0,25 ед. Таq-полимеразы, 50 ед. MMLV-ревертазы.

Полимеразную реакцию для определения ДНК бактериопланктона выполняли в объеме 0,025 мл. К 0,005 мл ДНК добавляли 0,02 мл реакционной смеси для ПЦР, содержащей 67 мМ трис-НСl (рН 8,8 при 25°C), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% твина-20, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ каждого dNTP, 10 пмоль каждого праймера, 1,25 ед. Таq ДНК-полимеразы. Применяли методику «Hot start» с использованием антител к Таq ДНК-полимеразе. Температурный режим амплификации: 95°C — 30 с (для первого и последнего цикла 1 мин), 62°C — 30 с, полимеризация 72°C — 30 с (для первого и последнего цикла 1 мин). Соотношение циклов амплификации—реамплификации в гнездовой ПЦР 25:36.

Специфические праймеры. Использовали праймеры для определения и типирования вируса гриппа А [12] и

определения бактериопланктона [13].

Сиквенс ПЦР-фрагментов проводили с использованием тех же праймеров, которые применяли для ПЦР. Выполняли секвенирование фрагментов по двум цепям. Продукты ПЦР были очищены в геле с использованием набора для очистки продуктов ПЦР из геля (Geneclean) и секвенированы. Первичную последовательность определяли на автоматическом ДНК-секвенаторе (ABI 377, США) и анализировали с помощью компьютерных программ MacVector/AssemblyLign (Oxford Molecular Group, США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ Lasergene 6, MegEling («Lasergen Inc.», США). Построение филогенетической дендрограммы осуществляли на основе алгоритма Clustal W methods.

Результаты

Исследование, касающееся наличия вируса гриппа А в ПМС и аэрозоле, проводили в прибрежной морской зоне российской Западной Арктики. На Кольском полуострове узкие (до 3 м), но достаточно заглубленные (до 100 м) узкие бухты с отвесными скалистыми стенами (до 20 м) являются излюбленным местом для птичьих базаров. Классический пример — Леонтьевский базар на о-ве Харлов: 2850 гнезд (2008) чайки-моевки, 1840

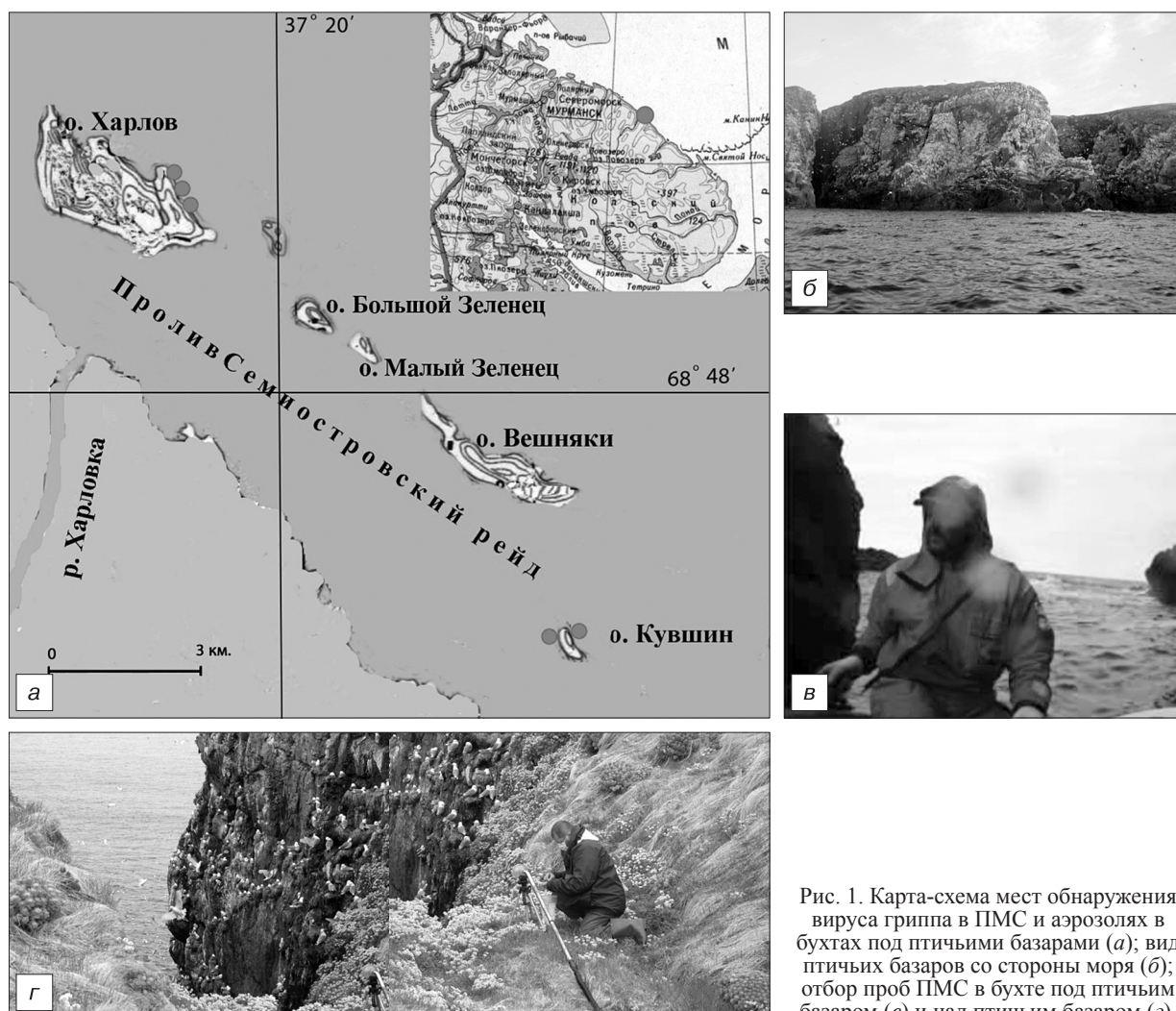


Рис. 1. Карта-схема мест обнаружения вируса гриппа в ПМС и аэрозолях в бухтах под птичьими базарами (а); вид птичьих базаров со стороны моря (б); отбор проб ПМС в бухте под птичьим базаром (в) и над птичьим базаром (г).

Результаты выявления РНК вируса гриппа в ПМС и аэрозоле в различных береговых зонах Западной Арктики

Место отбора проб	РНК вируса гриппа в ПМС		РНК вируса гриппа в аэрозоле		РНК вируса гриппа в объемной воде	
	—	+	—	+	—	+
О-в Большой Олений	11	0	11	0	13	0
О-в Малый Олений	11	0	10	0	12	0
Заповедник «Семь островов», о-в Харлов, 1-я бухта	0	12	2	10	14	0
Заповедник «Семь островов», о-в Харлов, 2-я бухта	0	11	3	8	13	0
Заповедник «Семь островов», о-в Харлов, 3-я бухта	0	10	2	8	14	0
Заповедник «Семь островов», о-в Кувшин, 1-я бухта	0	12	2	10	12	0
Заповедник «Семь островов», о-в Кувшин, 2-я бухта	1	10	3	8	13	0
Мыс Териберский	11	0	11	0	13	0
Мыс Чебрай	11	0	11	0	13	0
О-ва Гавриловские	10	0	11	0	13	0

особей тонкоклювовой кайры и 580 особей толстоклювовой кайры (рис. 1). Ограниченный водообмен и затруднения в диссипации морского аэрозоля позволили птицам птичьих базаров стать своеобразным локальным источником естественного «загрязнения» воды бухт.

Было отобрано 350 образцов, причем 110 составляли образцы аэрозолей, 110 — образцы ПМС и 130 — образцы объемной воды, отобранной на различной глубине. Далее пробы анализировали методом ПЦР. Для определения генома вируса гриппа А использовали ПЦР с последующим секвенированием. Вирус гриппа А в районах птичьих базаров — это удобный маркер. В пробах ПМС и аэрозолей над соответствующими поверхностями обнаружена также РНК вируса гриппа А (секвенированы гены нуклеопротеина).

В таблице суммированы результаты выявления вируса гриппа А в пробах ПМС и образцах аэрозолей. Как видно из таблицы, РНК вируса гриппа была выявлена в 5 бухтах на о-вах Харлов и Кувшин. Только в тех местах, где в образцах ПМС была обнаружена РНК вируса гриппа, там же была обнаружена РНК вируса гриппа в образцах аэрозолей. На о-вах Большой и Малый Олений, Гавриловских и на мысах Териберский и Чебрай не обнаружили РНК вируса гриппа ни в ПМС, ни в объемной воде, ни в аэрозолях. Это можно объяснить тем, что на данных островах не было заглубленных бухт, а поселения птиц малочисленны.

Полученные положительные пробы были объединены по принципу места и времени отбора. Секвенирование проводили для одной суммарной положительной пробы. На рис. 2 представлена филогенетическая дендрограмма, построенная на основе данных выравнивания первичных последовательностей гена нуклеопротеина. Сиквенс ПЦР-фрагмента показал, что в образцах ПМС и аэрозоля детектируются сегменты РНК, кодирующие белки нуклеопротеина, практически идентичные по нуклеотидной последовательности (см. рис. 2). Вероятно, вирус гриппа попал в морскую воду под птичьим базаром вместе с пометом и концентрировался в ПМС.

В случае вируса гриппа не была

исключена возможность того, что помет сдувало ветром со скал, таким образом, он попадал в аэрозоль и ПМС. Чтобы проверить, есть ли обратный восходящий поток биологических молекул из ПМС в аэрозоль, мы решили детектировать ДНК представителей гетеротрофного планктона. При обильном источнике органических веществ — птичьим помете — в воде бухт активно развивается гетеротрофный бактериопланктон. Хорошо известно, что до 40% биомассы бактериопланктона составляют представители рода *Mycobacterium*. Для контроля мы выявляли ДНК представителей этого рода в пробах ПМС и морских аэрозолей.

Необходимо подчеркнуть, что морские представители рода *Mycobacterium* присутствуют как в ПМС, так и в приводном аэрозоле. Вынос представителей морского гетеротрофного бактериопланктона в приводный аэрозоль может быть обусловлен местным источником — морской поверхностью бухты птичьего базара.

Следует особо отметить, что РНК вируса гриппа А и ДНК гетеротрофных бактерий — представителей рода *Mycobacterium* обнаружены только в ПМС и аэрозоле. Нуклеиновые частицы отсутствуют в объемной воде, и, по-видимому, концентрация микроорганизмов в объемной воде достаточно низка. Такие наблюдения сделаны на нескольких птичьих базарах о-ов Харлов и Кувшин заповедника «Семь островов».

Следующим этапом было математическое моделирование межфазного переноса вируса гриппа А в природном биогеоценозе. Был использован подход так называемой химической кинетики. Данный подход использу-

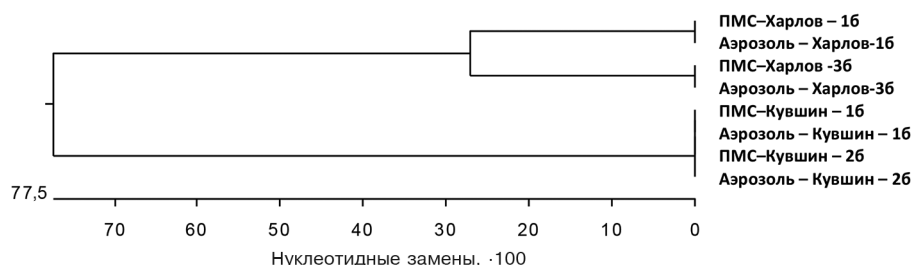


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма и таблица гомологии, построенные на основе данных выравнивания первичных последовательностей проб ПМС и морских аэрозолей в Леонтьевском базаре на о-ве. Харлов.

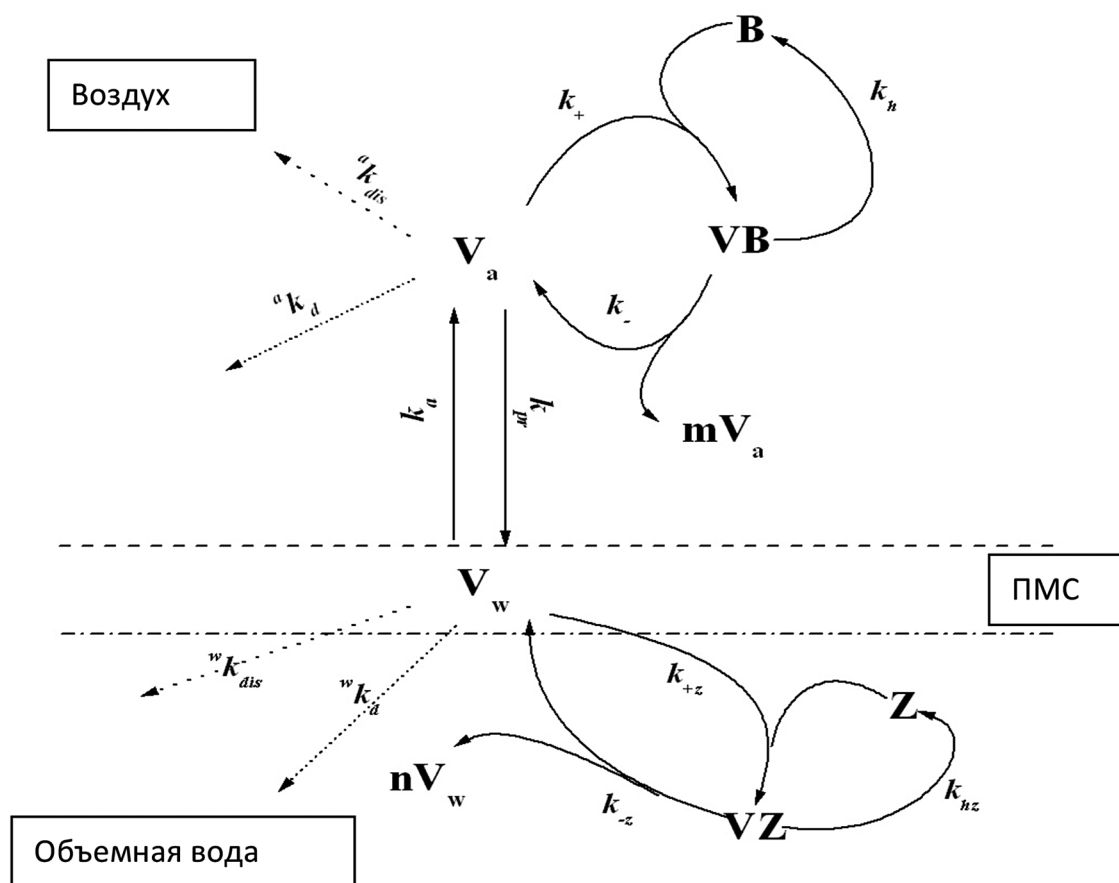


Рис. 3. Кинетическая схема взаимодействия вируса гриппа.
 V — вирус; Z — зоопланктон в ПМС; В — птицы; k — константы.

ется в медицине, биохимии, химии и вирусологии. Мы применили его для описания прибрежного биогеоценоза. Модель составлена по принципу квазихимической кинетической схемы, что определено условиями межфазного переноса макромолекулы (вируса). Предполагается, что скорость каждого процесса (одной стадии) прямо пропорциональна содержанию в среде вируса и взаимодействующих компонентов. Модель изображается в виде графа, где вверху указывается состояние молекулы вируса (фаза, свободное или связанное состояние), а ребрами обозначены направления протекания процессов переноса и трансформации вируса. Практически все представленные процессы не являются равновесными. Каждому процессу (обратимому или необратимому) поставлена во взаимно-однозначное соответствие константа — вероятность или частота процесса (рис. 3).

Обсуждение

Обогащение ПМС загрязняющими веществами хорошо известно. «Обратный» (по отношению к атмосферным выпадениям) путь транспорта тяжелых металлов в составе аэрозолей по пути ПМС — воздух был также описан [11]. Важно отметить, что в ПМС морской воды происходит концентрирование загрязняющих веществ различной химической природы: гидрофобных, липофильных и амфифильных соединений [14], тяжелых металлов [11] как за счет фракционирования и флотационных процессов, так и за счет поверхностно-активных свойств комплексов

металлов с органическими лигандами. Морские аэрозоли в основном образуются при лопании пузырьков, возникших в толще морской воды при газовыделении на дисперсной фазе или при обрушении волн [15]. Так, химические вещества не остаются в морской среде в усредненных низких концентрациях, но «возвращаются» с ветровыми потоками в прибрежные зоны активной жизнедеятельности человека в концентрированном состоянии [16]. Таким образом, реализуется механизм самоочистения морской среды посредством переноса вещества из поверхностного морского слоя океанов и морей через морской аэрозоль в береговые ландшафты [17].

В настоящее время уделяется большое внимание изучению вирусов и бактерий морей и океанов [18—20]. Однако не поднимался вопрос о том, могут ли морские микроорганизмы перемещаться с поверхности океана в приводный аэрозоль. Результаты данной работы показывают массоперенос биологических частиц (РНК вирусов и ДНК бактерий) непосредственно с поверхности моря (ПМС) в нижнюю атмосферу (морской аэрозоль). В работе особое внимание было уделено распределению биологических частиц в объемной воде, ПМС и морских аэрозолях. В объемной воде не было найдено нуклеиновых кислот. По нашему мнению, это произошло из-за очень низкого их содержания в объемной воде. Как и в случае тяжелых металлов и других химических частиц, вирусы и бактерии концентрируются в ПМС, где и были определены их нуклеиновые кислоты. Также необходи-

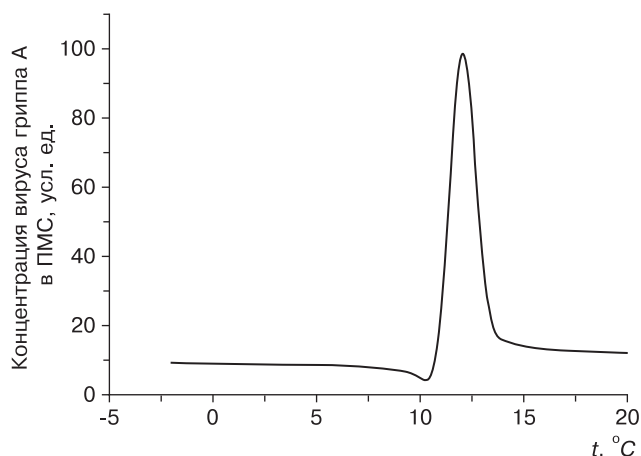


Рис. 4. Зависимость концентрации вируса гриппа А в ПМС от температуры согласно численному решению кинетической модели.

мо подчеркнуть, что первичная структура определяемых нуклеиновых кислот из ПМС и морского аэрозоля имела высокий процент гомологии. Данный факт может косвенно доказывать, что существует путь переноса вирусов и бактерий в направлении ПМС — морской аэрозоль.

Наличие РНК вируса гриппа А, а также определение ее в морском аэрозоле позволили нам предположить, что ее целостность говорит о том, что она находится в составе вирусных частиц. Ранее мы показали *in vitro*, что вирус гриппа и другие вирусы дольше сохраняются в рачках *Daphnia magna* до 3 сут не только в водной среде, но и в аэрозоле над поверхностью (результаты не опубликованы). Возможно, в морских биоценозах также реализуется стабилизация вирусных частиц в составе морского бактериопланктона или зоопланктона. Конечно, данное предположение необходимо дополнительно изучать и доказывать. Чтобы учесть все многообразие возможных путей переноса вируса гриппа в морском биогеоценозе, была рассчитана кинетическая модель, включающая взаимодействие вируса гриппа А с различными составляющими биогеоценоза (см. рис. 3).

Были учтены следующие процессы: захват вирусных частиц из ПМС в аэрозоль (данные лабораторных экспериментов и натурных исследований) — константа скорости процесса k_a ; оседание вирусосодержащих частиц на поверхность воды из воздуха (константа скорости k_{pr}); различные виды денатурации макромолекул вирусных частиц в воде (константа скорости ${}^w k_d$) и воздухе (константа скорости ${}^a k_d$); гидро- и аэродинамическое рассеяние вирусных частиц (константы ${}^w k_{dis}$ и ${}^a k_{dis}$); инфицирование птицы (вероятность процесса k_+); прекращение выделения вируса (вероятность k_h); размножение вируса — вирусывыделение из инфицированной птицы (коэффициент размножения m , вероятность k_-); захват вирусной частицы гидробионтом (вероятность k_{+z}); возможная элиминация вирусной частицы гидробионтом (вероятность k_{hz}); персистирование вирусной частицы в гидробионте (вероятность k_{-z}).

Данная схема описывает следующее кинетическое уравнение:

$$V_w = \frac{mkVB}{a^0 k_d \exp(aE_d/RT) - {}^0 k_d \exp(aE_d/RT)}$$

Хорошо известно, что кинетические схемы с двумя и более циклами генерации/ассимиляции субстрата

при решении относительно управляющего параметра (концентрации, температуры и т. д.) дают триггерные решения, т. е. резкое изменение управляемого параметра. Мы показали пример получения такого решения для зависимости концентрации вируса гриппа в ПМС от температуры. Численное решение данного уравнения приводит к заключению, что в зависимости от температуры могут изменяться условия биоценоза (температура воздуха и воды, изменение соотношения численности зоопланктона, птиц и т. д.), а, следовательно, концентрации вируса в ПМС. На рис. 4 представлена зависимость концентрации вируса гриппа А в ПМС от температуры. Как видно из рисунка, при потеплении до 13°C можно ожидать всплеск концентрации вируса гриппа А в ПМС в природных биоценозах Западной Арктики. Подобные исследования для вирусов, вируса гриппа в частности, могут дать новые знания о распространении вирусов и возможности давать эпидемиологический прогноз в зависимости от того или иного параметра (в данном случае климатического, температуры), что может быть полезным в обеспечении биобезопасности РФ, особенно в условиях интенсивного освоения российской Арктики.

Заключение

В Западной Арктике (побережье Баренцева моря) в бухтах под птичьими базарами в ПМС обнаружена РНК вируса гриппа А, идентичная по нуклеотидной последовательности выявленной в составе аэрозоля, что было подтверждено секвенированием. Предложен механизм возможного переноса вирусов по пути объемная вода — поверхностный микрослой — морской аэрозоль. Согласно кинетическому моделированию, потепление климата Арктики может привести к резкому увеличению концентрации вирусов в водной среде. Необходимо дальнейшее изучение состава ПМС и аэрозоля морских биоценозов, в том числе в Западной Арктике, особенно важен мониторинг вирусов в местах массового скопления птиц.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1, 3—11, 14, 15, 17—20 см. REFERENCES)

2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А (H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии*. 2010; 54 (3): 4—9.
12. Киреев Д.Е., Аканина Д.С., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Разработка тест-систем для выявления и типирования вируса гриппа А на основе полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(4): 7—22.
13. Потапова Н.И., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Краснова М.А., Скотникова О.И., Алипер Т.И. и др. Разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для дифференциальной диагностики микобактерий. *Вестник Российского Университета Дружбы Народов*. 2004; 28(4): 300—8.
16. Лесников Е.В., Чичаева М.А., Лапшин В.Б., Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В. Биоаэрозоль атлантического океана и способ мониторинга аэрозоля в нанодиапазоне размерностей. *Естественные и технические науки*. 2010; (5): 349—55.

REFERENCES

1. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G. et al. Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005—2008). *Avian Dis.* 2010; (54): 483—95.

2. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M. Yu., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. Distribution of a new pandemic influenza virus A (H1N1)v in Russia. *Voprosy virusologii*. 2010; 54 (3): 4—9. (in Russian)
3. Qureshi A., MacLeod M., Hungerbühler K. Modeling aerosol suspension from soils and oceans as sources of micropollutants to air. *Chemosphere*. 2009; 77(4): 495—500.
4. Bac V.T., Hien P.D. Regional and local emissions in red river delta, Northern Vietnam. *Air Qual. Atmos. Health*. 2009; 2(3): 157—67.
5. Psillakis E., Cheng J., Hoffmann M.R., Colussi A.J. Enrichment factors of perfluoroalkyl oxoanions at the air/water interface. *J. Phys. Chem. A*. 2009; 113(31): 8826—9.
6. Fleming L.E., Bean J.A., Kirkpatrick B., Cheng Y.S., Pierce R., Naar J. et al. Exposure and effect assessment of aerosolized red tide toxins (brevetoxins) and asthma. *Environ. Health Perspect*. 2009; 117(7): 1095—100.
7. García-Flor N., Dachs J., Bayona J.M., Albaigés J. Surface waters are a source of polychlorinated biphenyls to the coastal atmosphere of the North-Western Mediterranean Sea. *Chemosphere*. 2009; 75(9): 1144—52.
8. Paytan A., Mackey K.R., Chen Y., Lima I.D., Doney S.C., Mahowald N. et al. Toxicity of atmospheric aerosols on marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106(12): 4601—5.
9. Horemans B., Krata A., Buczynska A.J., Dirlu A.C., Van Meel K., Van Grieken R. et al. Major ionic species in size-segregated aerosols and associated gaseous pollutants at a coastal site on the Belgian North Sea. *J. Environ. Monit.* 2009; 11(3): 670—7.
10. Procedure for sampling the sea-surface microlayer. *Intergovernmental Oceanographic Commissions. Manuals and Guides*. Vol. 15. UNESCO; 1985.
11. Goncharuk V.V., Lapshin V.B., Chichaeva M.A., Matveeva I.S., Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V. et al. Heavy metals, aluminum, and arsenic in aerosols of the world ocean. *J. Water Chem. Technol.* 2012; 34(1): 1—10.
12. Kireev D.E., Akanina D.S., Grebennikova T.V., Zaberezhnyy A.D., Shchelkanov M. Yu., L'vov D.K. The development of test systems for the detection and typing of influenza A virus by polymerase chain reaction. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(4): 7—22. (in Russian)
13. Potapova N.I., Grebennikova T.V., Zaberezhnyy A.D., Krasnova M.A., Skotnikova O.I., Aliper T.I. et al. Development of test-systems based on polymerase chain reaction (PCR) in real time for the differential diagnosis of Mycobacterium. *Vestnik Rossiyskogo Universiteta Druzhby Narodov*. 2004; 28(4): 300—8. (in Russian)
14. Desboeufs K.V., Sofikitis A., Losno R., Colin J.L., Ausset P. Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere*. 2005; 58(2): 195—203.
15. Deane G.B., Stokes M.D. Scale dependence of bubble creation mechanisms in breaking waves. *Nature*. 2002; 418(6900): 839—44.
16. Lesnikov E.V., Chichaeva M.A., Lapshin V.B., Grebennikova T.V., Syroeshkin A.V. Bioaerosols Atlantic Ocean and a method for monitoring an aerosol nanoscale dimensions. *Estestvennye i tekhnicheskie nauki*. 2010; (5): 349—55. (in Russian)
17. Goncharuk V.V., Samsoni-Todorov A.O., Taranov V.V., Lapshin V.B., Chichaeva M.A., Syroeshkin A.V. et al. The system of the efficient monitoring of air quality in maritime cities and health resort areas: Pollution of the nearwater layer of the atmosphere with sea aerosols. *J. Water Chem. Technol.* 2012; 34(2): 79—87.
18. Kimura K., Tomaru Y. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine diatom *Chaetoceros* sp. strain SS628-11 isolated from western Japan. *PLoS One*. 2013; 8(12): e82013.
19. Mizuno C.M., Rodriguez-Valera F., Kimes N.E., Ghai R. Expanding the marine virosphere using metagenomics. *PLoS Genet*. 2013; 9(12): e1003987.
20. Martinez J.M., Swan B.K., Wilson W.H. Marine viruses, a genetic reservoir revealed by targeted viromics. *ISME J*. 2014; 8(5): 1079—88.

Поступила 29.09.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.891:578.11.083.2

Кузнецова Т.В.^{1,2}, Смирнова М.С.¹, Леонович О.А.¹, Гордейчук И.В.¹, Бирюкова Ю.К.¹, Зылькова М.В.¹, Тыньо Я.Я.¹, Белякова А.В.¹, Шевелев А.Б.¹

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА-АНТИГЕНА NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

¹ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва;²National institute of Public Health development, 11619, Tallinn, Estonia

Задача создания универсальной платформы для получения доступных рекомбинантных продуцентов вирусных белков, обладающих иммуногенными свойствами, до настоящего времени не решена и по-прежнему актуальна. Высокая токсичность вирусных белков для клеток-хозяев, низкий уровень продукции, аномальный фолдинг целевых продуктов часто создают непреодолимые препятствия для конструирования продуцентов вирусных белков. В данной работе разработан новый метод конструирования и скрининга банков делеционных производных генов вирусных антигенов, обеспечивающий возможность создания их искусственных производных, адаптированных для экспрессии в клетках микробных продуцентов. В основе лежит метод ПЦР-амплификации фрагментов целевого гена с использованием системы вырожденных и адаптерных праймеров, позволяющий предотвратить самопроизвольное образование дуплексов (димеров) в отсутствие матричной ДНК. Для отбора делеционных производных, пригодных для экспрессии *in vivo*, полученные *in vitro* фрагменты клонированы в вектор прямой селекции rQL30, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli* со встроенным полилинкером с мутацией смещения трансляционной рамки считывания. С использованием скринингового подхода на основе этого метода сконструирован искусственный вариант гена белка NS5A вируса гепатита С (ВГС), обладающий оптимальными биотехнологическими характеристиками. В работе использованы 27 образцов NS5A ВГС длиной 1670 п. н. Получен банк фрагментов исходного гена в форме смеси продуктов ПЦР. Отобрано 40 клонов с размером вставки от 50 до 700 п. н. путем клонирования фрагментов в вектор прямой селекции rQL30. Клоны протестированы на уровень β-галактозидазной активности и иммуногенные свойства. В результате отобран клон, продуцирующий растворимый белок массой около 114 кДа, накапливающийся с выходом до 0,3% от общего содержания белка в клетке и показавший положительную реакцию с антителами сыворотки крови больных, инфицированных ВГС генотипа 1b, но не с сыворотками здоровых доноров.

Для корреспонденции: Бирюкова Юлия Константиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова», 142782, г. Москва. E-mail: kudykina_yuliya@mail.ru