
В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛПАКОВ С.А., КОЛПАКОВА Е.П., 2017

УДК 578.823.91:578.53].083.2

Колпаков С.А., Колпакова Е.П.

АДАПТАЦИЯ ШТАММОВ РОТАВИРУСА ЧЕЛОВЕКА ГРУППЫ А К РЕПРОДУКЦИИ НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, г. Ростов-на-Дону

Заболеемость ротавирусным гастроэнтеритом в мире до сих пор не имеет тенденции к уменьшению. Создание эффективной вакцины позволит снизить, а в дальнейшем, возможно, и победить это опасное высококонтагиозное заболевание. Однако до сих пор не только в нашей стране, но и за рубежом не разработаны методики, позволяющие адаптировать и культивировать штаммы ротавируса человека группы А, стабильно дающие высокий «урожай» вирусного потомства на перевиваемых культурах клеток. Используя феномен обмена генов сегментированного генома ротавируса, за рубежом для создания ротавирусных вакцин пошли по пути использования реассортантных штаммов, представляющих собой результат совместного культивирования низкотитражных ($1-2 \cdot 10^6$ вирионов в 1 мл) штаммов ротавируса человека и штаммов ротавируса животных, например ротавируса обезьян SA-11 или ротавируса диареи телят Небраски, дающих относительно высокий «урожай» вирусного потомства ($1 \cdot 10^7-1 \cdot 10^8$). Понятно, что такие вакцинные композиции не смогут заменить полноценные вакцины из чисто человеческих штаммов ротавируса различных серотипов, но на сегодняшний день это тоже может быть выходом из создавшегося положения. В идеале же нужно иметь ротавирусные вакцины, включающие весь набор G- и P-серотипов ротавирусов, циркулирующих на данной территории их применения. В работе описана авторская методика адаптации и выращивания ротавирусов человека группы А на культуре перевиваемых клеток, позволяющая получать $5 \cdot 10^8$ вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Проведенная работа позволила впервые получить высокотитражные культивируемые штаммы ротавируса человека, которые могут быть использованы в качестве вакцинных штаммов, а также высокоактивных антигенов для конструирования диагностических тест-систем.

Ключевые слова: *ротавирус человека; адаптация; культура клеток; вакцинные штаммы ротавируса человека группы А.*

Для цитирования: Колпаков С.А., Колпакова Е.П. Адаптация штаммов ротавируса человека группы А к репродукции на перевиваемых культурах клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3): 138-143.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-138-143>*Kolpakov S.A., Kolpakova E.P.*

ADAPTATION OF HUMAN ROTAVIRUS STRAINS OF GROUP A TO THE REPRODUCTION IN PASSAGED CELL CULTURES

Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 34000, Russian Federation

The incidence of rotavirus gastroenteritis in the world still has no tendency to reduction. The development of an effective vaccine would reduce or, in the future, even defeat this highly contagious dangerous disease. However, both in Russia and abroad there is still no developed technique for adapting and cultivating strains of the human rotavirus A that would stably produce a high "yield" of virus progeny in transplanted culture cells. The phenomenon of gene exchange for the segmented genome of rotavirus was used by foreign researchers to create the rotavirus vaccine using reassortant strains which are the result of joint cultivation of low-titer ($1-2 \cdot 10^6$ virions per ml) human rotavirus strains and rotavirus strains of animals, such as monkey rotavirus SA-11 or Nebraska calf rotavirus diarrhea providing a relatively high "yield" of virus progeny ($1 \cdot 10^7-1 \cdot 10^8$). It is clear that such vaccine compositions will not be able to replace a full-fledged vaccine of human rotavirus strains of different serotypes, but they can be used for the time being as a solution to the problem. Ideally, a rotavirus vaccine is needed that includes the full set of G and P serotypes of rotaviruses circulating in the territory of their application.

The paper describes an original technique for adaptation and cultivation of human rotaviruses of group A on the culture of transplantable cells developed by the authors. This technique allows $5 \cdot 10^8$ virions to be obtained per 1 ml of culture fluid. High-titer cultivated strains of human rotavirus that can be used as vaccine strains were obtained, as well as highly-active antigens for the construction of diagnostic test-systems.

Key words: *human rotavirus; adaptation; cell culture; vaccine strains of the human rotavirus A.*

For citation: Kolpakov S.A., Kolpakova E.P. Adaptation of human rotavirus strains of group A to the reproduction in passaged cell cultures. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(3): 138-143. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-138-143>

Для корреспонденции: Колпаков Сергей Анатольевич, канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, 344000, г. Ростов-на-Дону. E-mail: kolpakov1953@mail.ru

For correspondence: Sergey A. Kolpakov, Candidate of Medicine, senior researcher at the Laboratory of virology, microbiology, and molecular-biology research methods, Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov-on-Don, 34000, Russian Federation. E-mail: kolpakov1953@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 18 November 2016

Accepted 13 December 2016

Введение

Острые кишечные инфекции, несмотря на значительные успехи вирусологии, остаются чрезвычайно актуальными. Исследования отечественных и зарубежных авторов выявили ведущую роль ротавируса в возникновении большей части гастроэнтеритов инфекционной природы, особенно у детей до 2 лет. Ежегодная заболеваемость ротавирусным гастроэнтеритом в мире до сих пор не имеет тенденции к уменьшению и составляет 125 млн случаев, из которых около 1 млн заканчивается летально, что как нельзя лучше подтверждает актуальность этого вопроса, в том числе для экономически развитых стран. В США, например, регистрируется более 70 тыс. госпитализаций в год с оцененным экономическим ущербом более 1 млрд долл. [1—3]. На территории России доля ротавирусных гастроэнтеритов тоже достигает достаточно внушительных цифр — 44—47% от всех случаев инфекционной кишечной патологии. При этом до 5% всей детской смертности среди больных младше 5 лет связаны с ротавирусным гастроэнтеритом [4—9].

Бороться с этой инфекцией при помощи антибиотиков или каких-либо иных средств бесполезно, учитывая особенности возбудителя и практический опыт. Только широкий охват детского контингента вакцинацией по примеру коревой или полиовирусной способен изменить существующее положение [10—13]. С учетом этого создание ротавирусной вакцины является одной из приоритетных задач глобальной стратегии ВОЗ по снижению инфекционной заболеваемости и смертности на 2006—2015 гг. (Draft WHO/IWV/05.05).

Между тем создание ротавирусной вакцины невозможно без наличия адаптированных и хорошо растущих на перевиваемых культурах клеток аттенуированных штаммов ротавируса человека. Однако до сих пор не существует стандартных способов адаптации, дающих возможность культивировать ротавирусы человека в высоких титрах примерно $1 \cdot 10^8$ — $1 \cdot 10^{11}$ вирионов в 1 мл культуральной жидкости. Наша работа является попыткой восполнить этот пробел.

Материал и методы

Культуры клеток. В работе использовали культуру перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ), культивируемую в 80—100 мл среды 199 в стеклянных флаконах объемом 0,5 л с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС).

Вирусы. Фекальные 10% суспензии на растворе Хенкса готовили по обычной методике. Перед заражением плотный монослой клеток 3 раза промывали раствором Хенкса и настилали предварительно обработанные трипсином суспензии фекалий больных, в которых методом электронной микроскопии (ЭМ) были обнаружены ротавирусы. После контакта восстанавливали первоначальный объем питательной средой без сыворотки (поддерживающая среда) и оставляли в термостате при 37 °C до появления первых признаков деструкции клеточного монослоя.

Электронная микроскопия. Пробы от каждого пассажа контролировали 1 раз в сутки на наличие ротавируса методом ЭМ на микроскопе УМВ-100К при инструментальном увеличении 65 000—85 000. Использовали медные электронно-микроскопические сетки калибром 150—400 меш с нитроцеллюлозной пленкой-подложкой толщиной 50—70 Å, изготовленной по оригинальной авторской методике. Сетки с пробами «окрашивали» (контрастировали) 0,5% раствором уранилацетата.

Трипсин. Для «активации» ротавируса применяли лиофилизированный трипсин фирмы «AppliChem» с молекулярной массой 23,8 кД. Его же использовали как стандарт молекулярных масс.

Выделение РНК. РНК ротавируса выделяли как описано в работе [14] с незначительными авторскими модификациями.

Электрофорез. Вертикальный электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) (рН 8,8) с концентрирующим 4% гелем (рН 5,8) при токе 10 мА в течение 15—24 ч [15].

Электрофорез в агарозе. Электрофорез на стеклянных пластинах проводили в 2% агарозе рН 7,2. В качестве буфера использовали ФБР рН 7,8. Додecilсульфат натрия (ДСН) не использовали.

Диагностикумы. Для детекции ротавирусов, кроме ЭМ, использовали разработанный и выпускаемый нами коммерческий антительный эритроцитарный диагностикум Ротатест (ФСП-42-0425-4460-03) для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Диагностикум представляет собой 1% взвесь фиксированных глутаральдегидом эритроцитов барана, сенсibilизированных γ -глобулиновой фракцией асцитной жидкости белых крыс, иммунизированных ротавирусом обезьян SA-11. РНГА проводили микрометодом в объеме 75 мкл в планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками в соответствии с прилагаемой инструкцией по применению диагностикума Ротатест [4—6]. Тест-система позволяет дать ответ на наличие антигена ротавируса в течение 1,5—2 ч, при этом ее чувствительность составила 2—4 нг по вирусному белку.

Результаты

Для адаптации и дальнейшей работы были отобраны 56 фекальных суспензий, в которых методом РНГА в высоких титрах был обнаружен ротавирус группы А, а электронная микроскопия показала в этих пробах большое количество двухкапсидных вирионов ротавируса (рис. 1).

Критерий двухкапсидности является очень важным, так как только наличие второго капсида после нарезания протеолитическими ферментами делает ротавирус инфекционным и способным к дальнейшему размножению [16—18].

Исходя из этого культуры клеток заражали фекальными пробами, предварительно обработанными трипсином. Как правило, в пенициллиновый флакон брали 0,1 мл суспензии и разбавляли двукратно средой 199, добавляли 0,1 мл раствора трипсина и помещали в термостат

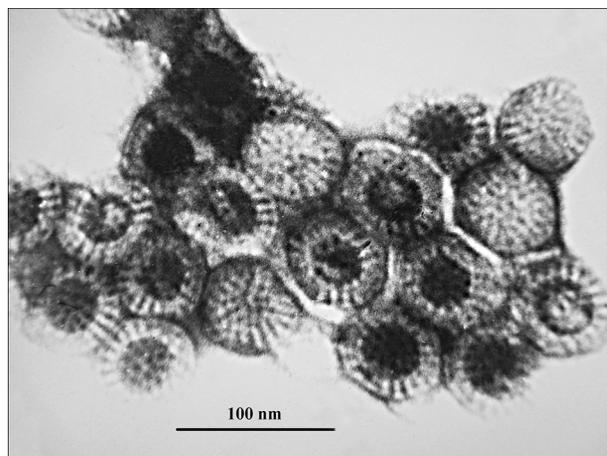


Рис. 1. Электронно-микроскопическая фотография: ротавирусы человека группы А. Негативное контрастирование. Ув. 200 000. Препарат С.А. Колпакова.

при 37 °С. Варьировали концентрациями трипсина от 10 до 500 мкг/мл с дискретностью 10 мкг/мл и временем контакта фекальных суспензий с ним от 5 мин до 1 ч с дискретностью 5 мин. После термостата наслаивали «активированные» суспензии на отмытый от ростовой среды плотный монослой клеток в течение 3—5 мин. Перед добавлением поддерживающей среды суспензии фекалий с трипсином из флакона не удаляли.

Однако при таком алгоритме заражения нам не удалось получить стабильные результаты: ротавирус обнаруживался только в заражении, а в первых и дальнейших пассажах уже не выявлялся. При этом в достаточно большом числе проб после 2-го пассажа с концентрацией трипсина 500 мкг/мл и 10 мин контактом с ним в термостате стало стабильно появляться цитопатическое действие (ЦПД), причем с каждым последующим пассажем время его появления сокращалось с 7—10 дней в заражении до 2 дней в 5—7-м пассаже и далее. Полная гибель клеток сопровождалась образованием однородной взвеси белкового характера, пенящейся при резком встряхивании. Контроль в РНГА заражений и пассажей показал почти полное отсутствие титров вируса, лишь в первой лунке реакция шла на 2—3+. Электронная микроскопия также показала отсутствие вирионов ротавируса.

Чтобы понять причину стабильного появления ЦПД на культуре клеток без обнаружения самих ротавирусов, мы изучили методом электрофореза в ПААГ белковый спектр указанных культуральных жидкостей и получили следующие результаты.

1. Во всех пробах (от заражения до 7 и более пассажей) были обнаружены «легкие» белки массой около 21 кД в зоне вирусных белков ротавируса группы А. В качестве контроля использовали культуральную жидкость после заражения клеток ротавирусом обезьян SA-11 (рис. 2, трек 11), а в качестве эталона — 0,2% раствор трипсина, молекулярная масса которого составляет 23,8 кД (рис. 2, трек 1; рис. 3, треки 1, 2).

2. Концентрация «легких» белков, судя по интенсивности окрашивания амидо черным, увеличивалась в некоторых

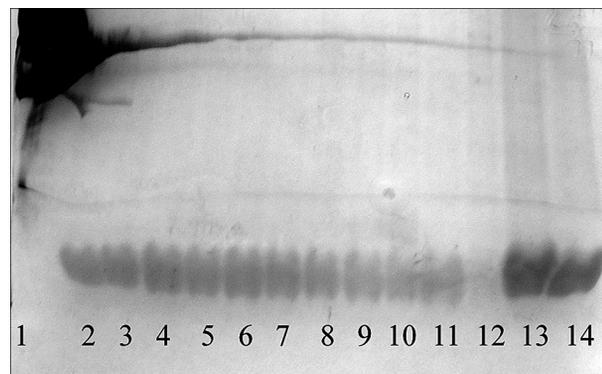


Рис. 2. Электрофореграмма культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ:

2—10 — 5-е пассажи проб № 13, 51, 53, 227, 240, 248, 268, 274, 279; 11 — положительный контроль — 12-й пассаж ротавируса обезьян SA-11; 12 — культуральная жидкость интактных клеток; 13, 14 — 7-е пассажи проб № 218 и 242; 1—0,2% трипсин (23,8 кД). ПААГ — 8%; ток — 10,0 мА; время — 16 ч; окраска — 1% раствор амидо черного.

пробах на порядок или более от заражения до 7-го пассажа (рис. 2, треки 13, 14). В виде контроля использовали культуральную жидкость незараженных клеток, в которой зона «легких» вирусных белков практически полностью отсутствовала (рис. 2, трек 12).

На основании полученных данных «легкие» белки массой 20,5 кД были идентифицированы нами как неструктурный гликопротеин ротавируса NSP4. Это объясняло появление ЦПД с полной гибелью клеточного монослоя, так как внутриклеточная экспрессия NSP4 приводит к нарушению структур межклеточных контактов, нарушению филаментозной структуры самой клетки, а также изменяет ионный баланс с нарушением резорбции воды, что и приводит к разрушению мембран и гибели клеток [19—23].

Таким образом, какая-то часть ротавирусных генов все-таки функционировала в зараженной культуре клеток. Электрофорез (ЭФ) в ПААГ подтвердил эту догадку. В культуральной жидкости зараженных клеток СПЭВ были обнаружены гены 6; 7; 8; 9 и 10, если сравнить их с геномным профилем ротавируса человека (рис. 4).

Слишком темный фон электрофореграмм РНК, представленных в статье, особенно треков с пробами, не является следствием небрежной или неумелой постановки

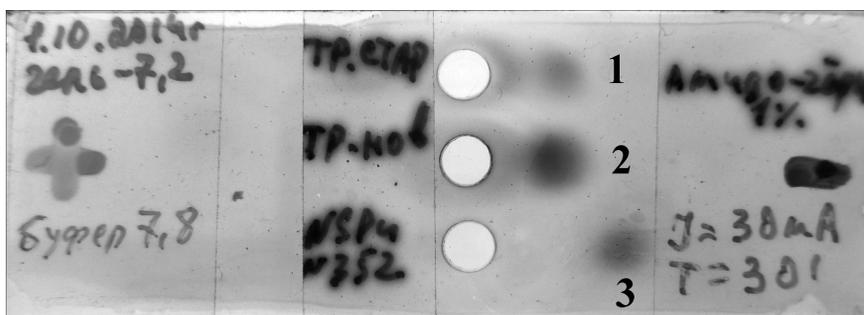


Рис. 3. Электрофореграмма 0,2% растворов трипсина: 1 — производства НПО «Биолар» выпуска 1988 г.; 2 — производства фирмы «AppliChem» выпуска 2013 г. (молекулярная масса — 23,8 кД); 3 — «легкий» белок молекулярной массой 20,5 кД (NSP4) — 5-й пассаж пробы № 352; агароза — 2% (рН 7,2); буфер — рН 7,8 без ДСН; окраска — 1% раствор амидо черного; ток — 38 мА, время — 30 мин.

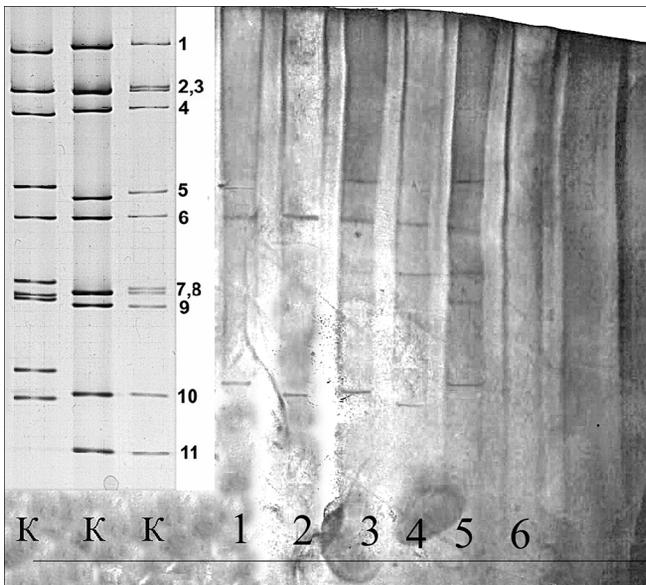


Рис. 4. Электрофореграмма РНК: ККК — трех культуральных штаммов ротавируса человека; 1—6 — 6 штаммов и разных проб культуральной жидкости, содержащих лишь часть генома ротавируса. ПААГ — 8%; ток — 10 мА; время — 18 ч. Препарат С.А. Колпакова.

опыта. Вирус во время адаптации к росту в чуждой для него клеточной среде методом многочисленных проб и ошибок «старается» так изменить свой геном, чтобы выжить и дать достаточное количество вирусного потомства. В процессе этой напряженной работы в клетках накапливается большое количество генетического материала с разбросом по молекулярным массам, которые по разным причинам не включаются в формирующиеся вирионы ротавируса человека. Именно эти «разнокалиберные» обломки РНК проявляются в треках с пробами после окрашивания нитратом серебра в виде равномерного неряшливого черного фона. Постепенно с окончанием

периода адаптации синтезируются только полноценные двухцепочечные гены ротавируса, и электрофореграмма приобретает вид, показанный на рис. 4 (треки ККК).

Поскольку гены ротавируса в пробах с концентрациями трипсина менее 500 мкг/мл не обнаруживались, мы предположили, что его просто недостаточно для полной (штатной) активации ротавируса, происходящей в естественных условиях. Поэтому базовая концентрация трипсина была увеличена до 2 мг в 1 мл. Далее проводили заражение клеточного монослоя, как описано выше, но использовали одну концентрацию трипсина 2 мг в 1 мл и время контакта с ним фекальной пробы 10 мин (самого трипсина, как и раньше, добавляли 0,1 мл). При этом после контакта с клеточным монослоем и добавления поддерживающей среды концентрация трипсина в ней составляла примерно 20 мкг в 1 мл.

Начиная с первого пассажа в таком режиме заражения стало стабильно появляться и нарастать ЦПД, причем с 3—5-го пассажа через 48 ч наблюдалась полная деструкция клеточного монослоя. Культуральная жидкость при этом оставалась розового цвета и была почти прозрачной, с легкой «белковой» опалесценцией. Контроль в РНГА с Ротатестом заражений и пассажей показал плавное нарастание титров с 1:2 в заражении до 1:32 в 5-м пассаже. При ЭМ этих проб в первых пассажах были выявлены отдельные ротавирусы и их капсомеры в виде тубулярных структур и отдельных пластов (рис. 5). Начиная с 3-го пассажа и далее постоянно обнаруживались как отдельные ротавирусы, так и их скопления (рис. 5, б; рис. 6).

На рис. 7 представлен ЭФ РНК двух штаммов ротавируса человека, адаптированных к росту на культуре перевиваемых клеток СПЭВ. По увеличению интенсивности окраски нитратом серебра отчетливо видно нарастание количества генетического материала штамма ротавируса человека № 218 от 2-го к 6-му пассажу (см. рис. 7, треки 1—5). Соответственно выросли титры ротавируса в РНГА и количество вирионов ротавируса, выявляемых при ЭМ.

Подобным образом нами были адаптированы 6 штаммов ротавируса человека, и 3 из них задепонированы в Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» под номерами депонента ГКВ № 2727, № 2728 и № 2729. Количество вирионов в поддерживающей среде до лиофилизации, по данным ЭМ, составило не менее $5 \cdot 10^8$ в 1 мл.

Геном всех штаммов ротавируса человека содержит 11 сегментов РНК, состоящих из 4 групп: 1-я группа — 4 сегмента, 2-я группа — 2 сегмента, 3-я группа — 3 сегмента, 4-я группа — 2 сегмента. По распределению сегментов РНК после ЭФ все адаптированные нами штаммы ро-

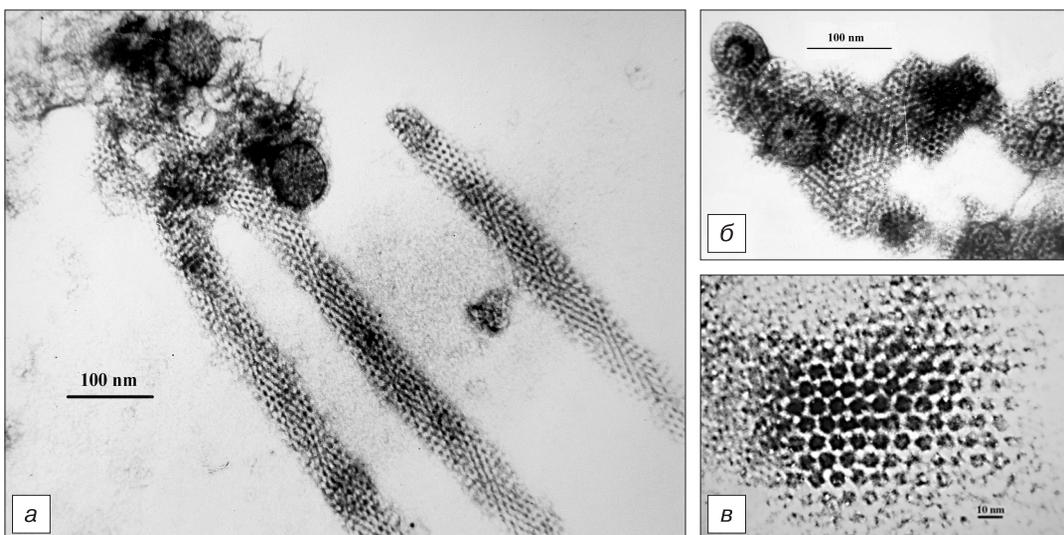


Рис. 5. Электронно-микроскопическая фотография: а и б — культуральные ротавирусы человека группы А с капсомерами в виде тубулярных структур и пластов; в — отдельные пластины капсомеров ротавируса человека. Негативное контрастирование.

Ув. 200 000. Препарат С.А. Колпакова.

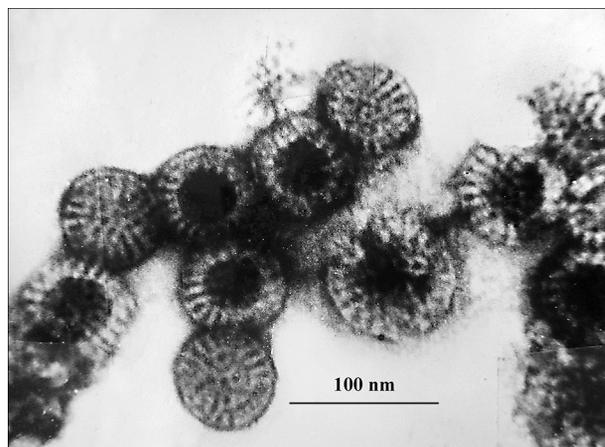


Рис. 6. Электронно-микроскопическая фотография: культуральные ротавирусы человека группы А. Ув. 200 000. Негативное контрастирование. Препарат С.А. Колпакова.

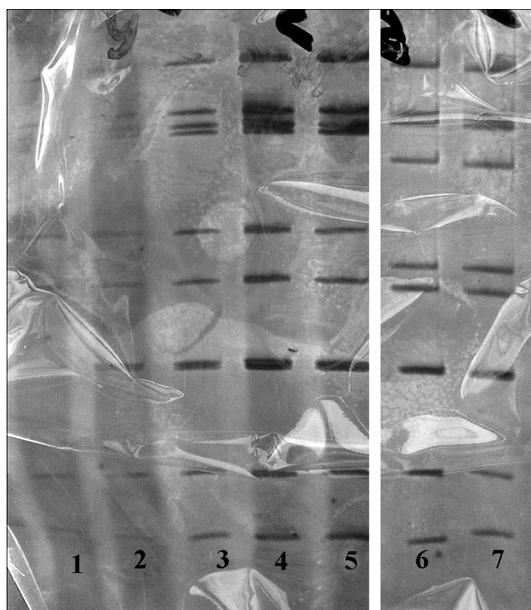


Рис. 7. Электрофореграмма РНК: 1—5 — культурального штамма ротавируса человека № 218; 6—7 — культурального штамма ротавируса человека № 356 (2-й и 3-й пассажи). ПААГ — 8%; ток — 10 мА; время — 18 ч. Препарат С.А. Колпакова.

тавируса, включая задепонированные, можно однозначно отнести к группе А ротавируса человека (см. рис. 4, ККК).

Дальнейшее повышение количества трипсина вопреки нашему желанию не приводило к повышению количества ротавируса в культуральной жидкости больше чем $5 \cdot 10^8$ в 1 мл. Концентрации трипсина выше 2 мг/мл при наслоении на монослой вызывали деструкцию клеточного пласта с распадом на отдельные клетки. При этом вирус или переставал расти вообще, или его концентрация резко падала, что тоже не решало проблемы. Для увеличения количества культурального ротавируса человека необходимо было найти какое-либо другое решение, и исследования в этом направлении были продолжены.

Обсуждение

Таким образом, в результате проведенной работы нам удалось адаптировать к росту на перевиваемой культуре клеток

СПЭВ штаммы ротавируса человека. Несмотря на недостаточно высокие титры $2 \cdot 10^8$ — $5 \cdot 10^8$ в 1 мл, они вполне могут в будущем послужить прототипными штаммами для ротавирусной вакцины. Они же могут положить начало созданию национальной коллекции культивируемых штаммов ротавируса человека, которая в настоящее время отсутствует.

Всего было получено 6 штаммов различных электрофотетипов ротавируса человека, дающих стабильно высокий «урожай» вирусного потомства до 25—39-го пассажа (срок наблюдения). Три из них, как указано выше, задепонированы в Государственной коллекции вирусов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 10—13, 15—23 см. REFERENCES)

1. Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. *Ротавирусная инфекция (Методические рекомендации)*. М.; 1989.
4. Колпаков С.А., Зарубинский В.Я. Разработка эритроцитарного препарата для диагностики ротавирусных инфекций. В кн.: Новохатский А.С., ред. *Проблемы медицинской и санитарной микробиологии города*. Ростов-на-Дону; 1987.
5. Зарубинский В.Я., Колпаков С.А. Применение реакции непрямой геммагглютинации для диагностики ротавирусного гастроэнтерита. *Вопросы вирусологии*. 1989; 34(2): 250—4.
6. Симованьян Э.Н., Ловердо Р.Г., Зарубинский В.Я., Колпаков С.А., Авроров В.П. Клиника, диагностика и лечение ротавирусной инфекции у детей раннего возраста. *Педиатрия*. 1989; (2): 47—50.
7. Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии Вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 154—9.
8. Куличенко Т.В. Лечение и вакцинопрофилактика ротавирусной инфекции у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2007; 4(1): 42—7.
9. Таточенко В.К., Озеретский Н.А., Федоров А.М., ред. *Иммунопрофилактика-2011*. 3-е изд. М.: ИПК «Контент-пресс»; 2011.
14. *Ротавирусный гастроэнтерит. Противоэпидемические мероприятия. Пособие для врачей*. Нижний Новгород; 1999.

REFERENCES

1. Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis AMS USSR. *Rotavirus Infection (Guidelines) [Rotavirusnaya infektsiya (Metodicheskie rekomendatsii)]*. Moscow; 1989. (in Russian)
2. Ogilvie I, Khoury H, El Khoury A.C., Goetghebeur M.M. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness. *Hum. Vaccin*. 2011; 7(5): 523—33.
3. Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001—2006. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2008; 83(47): 421—5.
4. Kolpakov S.A., Zarubinskiy V.Ya. Development of Packed red blood cells of the drug for the diagnosis of rotavirus infections. In: Novokhatskiy A.S., ed. *Problems of Medical and Sanitary Microbiology of the City [Problemy meditsinskoy i sanitarnoy mikrobiologii goroda]*. Rostov-na-Donu; 1987. (in Russian)
5. Zarubinskiy V.Ya., Kolpakov S.A. Application of the reaction of indirect hemagglutination for the diagnosis of rotavirus gastroenteritis. *Voprosy virusologii*. 1989; 34(2): 250—4. (in Russian)
6. Simovan'yan E.N., Loverdo R.G., Zarubinskiy V.Ya., Kolpakov S.A., Avrorov V.P. Clinic, diagnostics and treatment of rotavirus infection in children of early age. *Pediatriya*. 1989; (2): 47—50. (in Russian)
7. Alekseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Rotavirus infection of man. The Strategy of Vaccination. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 154—9. (in Russian)
8. Kulichenko T.V. Treatment and vaccine prevention of rotaviral infection in children. *Pediatricheskaya farmakologiya*. 2007; 4(1): 42—7. (in Russian)
9. Tatochenko V.K., Ozeretskiy N.A., Fedorov A.M., eds. *Immunization-2011 [Immunoprofilaktika-2011]*. 3-rd ed. Moscow: IPK «Kontent-press»; 2011. (in Russian)
10. Angel J., Franco M.A., Greenberg H.B. Rotavirus immune responses and correlates of protection. *Curr. Opin. Virol*. 2012; 2(4): 419—25.
11. Soares-Weiser K., Maclehoze H., Bergman H., Ben-Aharon I., Nagpal S., Goldberg E. et al. Vaccines for preventing rotavirus diarrhoea: vaccines in use. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2012; (2): CD008521.

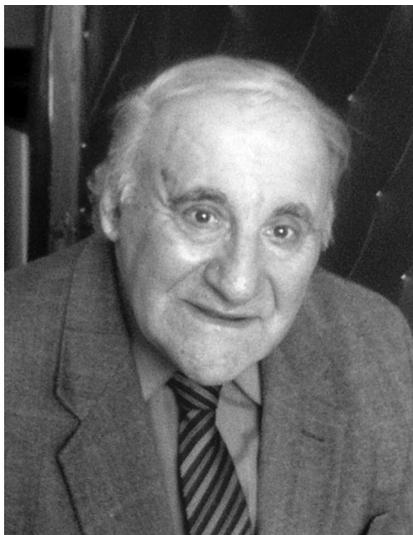
12. Grading of scientific evidence — Tables 1—4: Does RV1 and RV5 induce protection against rotavirus morbidity and mortality in young children both in low and high mortality settings? Available at: http://www.who.int/immunization/position_papers/rotavirus_grad_rv1_rv5_protection.pdf
13. Giaquinto C., Dominiak-Felden G., Van Damme P., Myint T.T., Maldonado Y.A., Spoulou V. et al. Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: a systematic review of the experience in industrialized countries. *Hum. Vaccin.* 2011; 7(7): 734—48.
14. Rotavirus Gastroenteritis. *Anti-epidemic Measures. Manual for Doctors [Rotavirusnyy gastroenterit. Protivoepidemicheskie meropriyatiya. Posobie dlya vrachej]*. Nizhny Novgorod; 1999. (in Russian)
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature.* 1970; 227(5259): 680—5.
16. Almeida J.D., Hall T., Banatvala J.E., Totterdell B.M., Chrystie I.L. The effect of trypsin on the growth of rotavirus. *J. Gen. Virol.* 1978; 40(1): 213—8.
17. Graham D.Y., Estes M.K. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biologic mechanism. *Virology.* 1980; 101(2): 432—9.
18. Ramia S., Sattar S.A. Proteolytic enzymes and rotavirus SA-11 plaque formation. *Can. J. Comp. Med.* 1980; 44(2): 232—6.
19. Estes M.K., Morris A.P. A viral enterotoxin: a new mechanism of virus induced pathogenesis. In: Paul P.S., Francis D.H. *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers; 1999.
20. Zhang M., Zeng C.Q., Morris A.P., Estes M.K. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11663—70.
21. Pérez J.F., Chemello M.E., Liprandi F., Ruiz M.C., Michelangeli F. Oncosis in MA104 cells is induced by rotavirus infection through an increase in intracellular Ca²⁺ concentration. *Virology.* 1998; 252(1): 17—27.
22. Tian P., Estes M.K., Hu Y., Ball J.M., Zeng C.Q., Schilling W.P. The rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 mobilizes Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 1995; 69(9): 5763—72.
23. Morris A.P., Scott J.K., Ball J.M., Zeng C.Q., O'Neal W.K., Estes M.K. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca²⁺-mediated I(–) influx into intestinal crypts of CF mice. *Am. J. Physiol.* 1999; 277(Pt. 1): G431—44.

Поступила 18.11.16

Принята в печать 13.12.16

ЮБИЛЕИ

ГЕОРГИЙ АРТЕМЬЕВИЧ ГАЛЕГОВ (к 85-летию со дня рождения)



29 декабря 2016 г. исполнилось 85 лет вирусологу и биохимику, одному из ведущих отечественных специалистов в области химиотерапии вирусных инфекций, доктору биологических наук (1971), профессору (1976), лауреату Премии Совета Министров СССР (1985), лауреату Государственной премии Российской Федерации (2000) Г.А. Галегову.

Г.А. Галегов в 1956 г. окончил лечебный факультет I Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. В студенческие годы работал на кафедре биохимии под руководством С.Р. Мордашева, С.С. Дебова и Т.Т. Березова (позже академики АМН). В 1956 – 1959 гг. – старший лаборант, в 1959 – 1963 гг. – младший научный сотрудник Института биологической и медицинской химии АМН. С 1963 г. работает в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН: старшим научным сотруд-

ником (1963 – 1966), с 1966 г. по настоящее время руководителем лаборатории химиотерапии вирусных инфекций, с 1990 г. руководителем отдела общей вирусологии, затем одновременно являясь профессором кафедры вирусологии факультета последипломного образования ММА.

Под руководством и при непосредственном участии Г.А. Галегова выполнены исследования, посвященные направленному ингибированию репродукции вирусов на основе модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов, доказана высокая противовирусная активность комбинаций химиопрепаратов с различным механизмом действия против вируса гриппа (производные адамантана, интерферон и модифицированные нуклеозиды). Г.А. Галегов принимал активное участие в разработке средств лекарственной терапии ВИЧ-инфекции на основе ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, он один из авторов препарата никавир – фосфазид (1986 – 2001), широко используемого для лечения пациентов с ВИЧ в нашей стране. Им детально изучена противовирусная активность новых производных нетропсина, подавляющего лекарственно-устойчивые к базовым препаратам вирусы герпеса человека (2002 – 2006). Г.А. Галегов – председатель проблемной комиссии по химиотерапии вирусных инфекций Научного совета по вирусологии при Президиуме РАМН, член редколлегий отечественных и зарубежного журналов. Высокая научная компетентность, основательность, организованность, профессиональная честность, принципы работы, отношение к делу и возникающим проблемам вызывают глубокое уважение его коллег.

Г.А. Галегов – автор и соавтор 46 патентов, в том числе зарегистрированных за рубежом. Награжден орденом Трудового Красного Знамени и медалями.

Коллеги и члены редколлегии журнала «Вопросы вирусологии» поздравляют Г.А. Галегова с юбилеем и желают ему здоровья и новых творческих успехов.