

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-280>

© СТЕПАНЮК М.А., ЛЕГОСТАЕВ С.С., КАРЕЛИНА К.В., ТИМОФЕЕВА Н.Ф., ЕМЦОВА К.Ф., ОХЛОПКОВА О.В., ТАРАНОВ О.С., ПРОТОПОПОВ А.В., ТЕРНОВОЙ В.А., ЛОКТЕВ В.Б., СВЯТЧЕНКО В.А., АГАФОНОВ А.П., 2025



Выявление и характеристика вируса *Dezidougou* (род *Negevirus*) в комарах (*Ochlerotatus caspius*), собранных на территории Республики Саха (Якутия)

Степанюк М.А.¹, Легостаев С.С.¹, Карелина К.В.¹, Тимофеева Н.Ф.², Емцова К.Ф.¹, Охлопкова О.В.¹✉, Таранов О.С.¹, Протопопов А.В.², Терновой В.А.¹, Локтев В.Б.¹, Святченко В.А.¹, Агафонов А.П.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия;

²ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», 677000, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, Россия

Резюме

Введение. Мониторинг и исследование микроорганизмов, переносимых членистоногими, имеют важное значение. В последнее время с развитием методов секвенирования нового поколения (NGS) у насекомых идентифицировано множество ранее неизвестных вирусов.

Цель исследования. Изоляция вирусов из комаров отобранных в Республике Саха (Якутия), с последующим исследованием нового для России негевируса, выделенного из комаров вида *Ochlerotatus caspius*, включая определение его полной нуклеотидной последовательности, филогенетическую и вирусологические характеристики.

Материалы и методы. Изоляцию вируса *Dezidougou* проводили на культуре клеток C6/36 (*Aedes albopictus*). Электронную микроскопию осуществляли с использованием электронного микроскопа JEM 1400. Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей выполняли с применением метода NGS на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq, Illumina (США). Определение полногеномной нуклеотидной последовательности проводили секвенированием по методу Сэнгера. Филогенетический анализ выполняли с использованием базы данных GenBank и программ Vector NTI Advance 11, MEGA 11.

Результаты. Выделенный из комаров вирус эффективно реплицировался в клетках C6/36, вызывая их гибель. При этом он не размножался в использованных клеточных культурах млекопитающих. Выделенный вирус при интрацеребральном инфицировании мышей-сосунков не вызывал у них патологических проявлений. При электронно-микроскопическом исследовании очищенной вирусосодержащей суспензии было показано наличие сферических вирусных частиц диаметром 45–55 нм. Результаты полногеномного секвенирования идентифицировали его принадлежность к вирусу *Dezidougou*, впервые выделенному в Кот д'Ивуаре. Нуклеотидная последовательность генома штамма Yakutsk 2023 вируса *Dezidougou* была депонирована в базе данных GenBank (PP975071.1).

Заключение. Впервые в Российской Федерации был выделен и охарактеризован вирус *Dezidougou* рода *Negevirus*. Проведение дальнейших исследований распространенности негевирусов, их вирусологических особенностей, потенциального значения для здравоохранения и влияния на векторную компетентность переносчиков является важным и перспективным.

Ключевые слова: вирус *Dezidougou*; негевирусы; insect specific viruses; Республика Саха (Якутия)

Для цитирования: Степанюк М.А., Легостаев С.С., Карелина К.В., Тимофеева Н.Ф., Емцова К.Ф., Охлопкова О.В., Таранов О.С., Протопопов А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А., Агафонов А.П. Выявление и характеристика вируса *Dezidougou* (род *Negevirus*) в комарах (*Ochlerotatus caspius*), собранных на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 47–56. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-280> EDN: <https://elibrary.ru/pbmmdx>

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2019-1665 и Государственного задания 9/21.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use 2010. Протокол исследования одобрен Комитетом по Биозтике ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02 от 03.04.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-280>

Detection and characterization of the Dezidougou virus (genus *Negevirus*) in mosquitoes (*Ochlerotatus caspius*) collected in the Republic of Sakha (Yakutia)

Marina A. Stepanyuk¹, Stanislav S. Legostaev¹, Kristina V. Karelina¹, Nina F. Timofeeva², Ksenia F. Emtsova¹, Olesia V. Ohlopko^{1✉}, Oleg S. Taranov¹, Albert V. Protopopov², Vladimir A. Ternovoi¹, Valery B. Loktev¹, Victor A. Svyatchenko¹, Alexander P. Agafonov¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

²M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, 677000, Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russia

Abstract

Introduction. Monitoring and research on arthropod-borne microorganisms is important. Recently, with the development of next-generation sequencing methods, many previously unknown viruses have been identified in insects.

Aim of the study. Isolation of viruses from mosquitoes sampled in the Republic of Sakha (Yakutia), followed by the study of a new for Russia negevirus isolated from mosquitoes of the species *Ochlerotatus caspius*, including determination of its complete nucleotide sequence, phylogenetic and virological characteristics.

Materials and methods. Dezidougou virus isolation was performed on C6/36 (*Aedes albopictus*) cell culture. Electron microscopy was performed using a JEM 1400 electron microscope. Nucleotide sequence screening was performed by NGS on a high-throughput sequencer MiSeq, Illumina (USA). Full genome nucleotide sequence was determined by Sanger sequencing. Phylogenetic analysis was performed using GenBank database, using Vector NTI Advance 11 and MEGA 11 programs.

Results. The virus isolated from mosquitoes replicated efficiently in C6/36 cells, causing their death. However, it did not replicate in the mammalian cell cultures used. The isolated virus did not cause pathologic manifestations in suckling mice when infected intracerebrally. Electron microscopic examination of the purified virus-containing suspension showed the presence of spherical viral particles with a diameter of 45–55 nm. The results of full genome sequencing identified it as belonging to Dezidougou virus, first isolated in Côte d'Ivoire. The nucleotide sequence of the genome of Yakutsk 2023 strain of Dezidougou virus was deposited in GenBank (PP975071.1).

Conclusion. Dezidougou virus of genus *Negevirus* was isolated and characterized for the first time in the Russian Federation. Further studies on the prevalence of negeviruses, their virological features, potential importance for public health and their impact on vector competence of vectors are important and promising.

Keywords: *Dezidougou virus; negeviruses; insect specific viruses; Republic of Sakha (Yakutia)*

For citation: Stepanyuk M.A., Legostaev S.S., Karelina K.V., Timofeeva N.F., Emtsova K.F., Ohlopko O.V., Taranov O.S., Protopopov A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A., Agafonov A.P. Detection and characterization of the Dezidougou virus (genus *Negevirus*) in mosquitoes (*Ochlerotatus caspius*) collected in the Republic of Sakha (Yakutia). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(1): 47–56. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-280> EDN: <https://elibrary.ru/pbmmdx>

Funding. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2019-1665 and State Assignment 9/21.

Conflict of interest. The authors declare no apparent and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals according to the «Consensus author guidelines for animal use» 2010. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор (Protocol No. 02 of April 03, 2023).

Введение

Исторически сложился особый интерес к вирусам, инфицирующим членистоногих, из-за их участия в распространении вирусов, патогенных для человека и животных. Изначально под понятием «вирусы, специфичные для насекомых» (insect specific viruses, ISVs) подразумевали вирусы рода *Ortoflavivirus* (семейство *Flaviviridae*), способные реплицироваться только в клетках насекомых,

но при этом обладающие схожей организацией генома с ортофлавивирусами, патогенными для позвоночных [1, 2]. С развитием методов высокопроизводительного секвенирования были идентифицированы новые ISVs [3, 4]. К настоящему времени группа ISVs включает в себя представителей разных семейств: *Baculoviridae*, *Poxviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Polydnaviridae*, геном которых представлен двухцепочечной ДНК; *Parvoviridae* (одноцепочечная ДНК); *Reoviridae*, *Tetraviridae*,

Dicistroviridae, Nodaviridae, Picornaviridae, Flaviviridae (PHK(+)); Rhabdoviridae (PHK(-)) [1–5].

Представители рода *Negevirus* обнаружены в разных частях мира и инфицируют широкий круг гематофагов (комаров родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*, а также москитов рода *Lutzomyia*). В то же время негевirusы генетически близки с вирусами растений из родов *Cilevirus*, *Higrevirus* и *Blunervirus* (Kitaviridae), что позволило выдвинуть гипотезу о роли растений в естественном цикле передачи негевirusов [6, 7]. Род *Negevirus* носит название по первому полностью охарактеризованному изоляту *Negev virus* [6]. К негевirusам на сегодняшний день относятся более 36 видов вирусов, не включая 30 неклассифицированных вирусов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browse/>).

Вирус Dezidougou (DEZV) впервые был выделен в Институте Пастера (Дакар, Сенегал) из популяции комаров *Aedes aegypti*, собранных вблизи деревни Де-зидугу (Dezidougou), Кот-д'Ивуар в 1987 г. [6, 7]. Позже DEZV был обнаружен в разных частях света: Европа, Африка, Центральная и Южная Америка [6, 8, 9]. Вирионы негевirusов имеют сферическую форму диаметром 45–50 нм [6]. Геном негевirusов представлен несегментированной одноцепочечной РНК с положительным смыслом, размером 7–10 к.б. Большинство негевirusов имеют три открытые рамки считывания (open reading frame, ORF), фланкированные нетранслируемыми областями на 5'- и 3'-концах. Каждая ORF разделена короткими межгенными областями, наибольшая рамка ORF1 кодирует вирусную полимеразу, ORF2 – гликопротеин, а ORF3 – мембранные белки [7]. На конце вирусного генома присутствует поли-(А)-хвост длиной от 13 до 52 п.н. [6].

Цель работы – изоляция вирусов из комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), а также исследование нового для России вируса DEZV, выделенного из комаров вида *Ochlerotatus caspius*, включая определение его полной нуклеотидной последовательности, филогенетическую и вирусологическую характеристики.

Материалы и методы

За полевой период 2023 г. на территории Республики Саха (Якутия) в Сайсарском (62.029955/129.668761) и Центральном районах (62.009133/129.744127) были отловлены комары в количестве 500 особей. Комаров транспортировали в сумках-холодильниках на влажной салфетке при температуре +4 °C и хранили при температуре –18–24 °C. Комаров сортировали по фенотипическим признакам и объединяли в пулы по 10 особей. Морфологическими ключами для определения рода служили: размер особи, цвет чешуек, длина лапок и строение ротового аппарата. Для определения вида комаров секвенировали фрагмент 16S рРНК и фрагмент гена *COI* митохондриального генома. Всего был исследован 51 пул комаров.

Перед гомогенизацией всех комаров промывали в 70% этаноле, а затем дважды водой для удаления потенциальных поверхностных микроорганизмов. Полученные пулы комаров *Ochlerotatus* sp. гомогени-

зировали в 300 мкл физиологического раствора на гомогенизаторе TissueLyser LT (Qiagen, Нидерланды).

Изоляцию вируса проводили на высокочувствительной для ISVs культуре клеток C6/36 (*Aedes albopictus*) [10–12]. Монослой выращивали до образования 80–90% конфлюентности в 24-луночной планшете (Greiner, Австрия) в среде DMEM F12 (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл (Gibco, США), в атмосфере с 5% CO₂ при температуре 28 °C. Культуру инфицировали отфильтрованными гомогенатами комаров и инкубировали на протяжении 7 сут, оценивая возможные проявления цитопатического эффекта (ЦПЭ). После этого планшеты с клеточными монослоями подвергали трем циклам замораживания/оттаивания, полученные суспензии осветляли от клеточного дебриса центрифугированием 8000g при 4 °C в течение 5 мин и использовали для выполнения пассажа (инфицирование свежих монослоев клеток C6/36 аналогично вышеописанному). После выявления выраженного вирусоспецифического ЦПЭ вирусными суспензиями инфицировали монослой клеток C6/36, выращенные в культуральных флаконах (Greiner, Австрия). Определение инфекционного титра полученной вирусосодержащей суспензии проводили по стандартной методике на культуре C6/36 микрометодом с регистрацией результатов микроскопией и МТТ-тестом [13, 14]. Расчет титра осуществляли по методу Спирмена–Кербера [15].

Световую микроскопию выполняли с использованием инвертированного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония), с фиксацией цифровой камерой Olympus SC50 (Olympus, Япония) при увеличении ×200 и цифровой обработкой в программе Cellsens Standard.

Для проведения электронной микроскопии вирусосодержащую культуральную среду осветляли от клеток центрифугированием при 8000g в течение 10 мин для удаления остатков клеточного дебриса. Вирус концентрировали с использованием концентратора для центрифуг VivaSpin (Sartorius, Германия) в течение 30 мин при 6000g. Концентрат ресуспендировали, фиксировали формалином и наносили в виде суспензий на медные сеточки, покрытые пленкой-подложкой из формвара и стабилизированные углеродом. Препараты окрашивали 1% водным раствором уранилацетата по общепринятой методике. Образцы исследовали при помощи электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Анализ и обработку изображения осуществляли с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Способность DEZV инфицировать клетки млекопитающих исследовали на перевиваемых культурах: HEK-293A (клетки почки эмбриона человека), Vero E6 (клетки почки зеленой марышки), а также СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи). Монослой клеток в культуральных флаконах Т-25 заражали 0,1 мл инокулята и инкубировали в поддерживающей среде

DMEM F12 с 2% FBS (фетальная бычья сыворотка) в течение 10 сут. Полученные клеточные лизаты тестируют на наличие инфекционного вирусного потовства титрованием на клеточной культуре C6/36.

Проверку восприимчивости животных к вирусу DEZV осуществляли на 2–3-дневных беспородных мышках-сосунках. Наблюдение за животными, инфицированными интрацеребрально 0,02 мл инокулята, проводили в течение 21 сут.

Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей ISVs проводили методом высокопроизводительного секвенирования. Тотальную РНК экстрагировали с помощью «Reagent Extract RNA» («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Водную фазу, полученную после добавления хлороформа и последующего центрифугирования, собирали и разбавляли 1 : 1 свежеприготовленным 70% этанолом и очищали на спин-колонках Cleanup Mini («Евроген», Россия) и обрабатывали Benzonaze (Merck, Германия) [16]. Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием модуля NEBNext Ultra Directional (New England Biolabs Inc., США) для синтеза первой цепи ДНК. Синтез второй цепи ДНК выполняли с использованием UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD Illumina (Lexogen, Австрия). Подготовленные dsDNA библиотеки анализировали на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Контиги были собраны *de novo* с использованием ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

Определение полной нуклеотидной последовательности РНК вируса DEZV проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя праймеры (Приложение 1), комплементарные фрагментам генома исследуемого вируса. Постановку ОТ-ПЦР осуществляли на термоблокере C1000 (Bio-Rad, США) в 15 мкл реакционной смеси. Полученные ампликоны разделяли методом

гель-электрофореза в 2% агарозном геле, в трис-ацетатном буфере («Евроген», Россия) с 0,1% бромида этидия (Sisco Research Laboratories, Индия).

Реакцию секвенирования по Сэнгеру проводили с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), на автоматическом анализаторе 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали по прототипным последовательностям с использованием программного продукта UniproUGENE v. 1.48. Филогенетический анализ выполняли с использованием базы данных GenBank. Построение филогенетических деревьев выполняли в программах Vector NTI Advance 11 и MEGA 11. Филогенетические деревья были рассчитаны по методу максимального правдоподобия с использованием 500 реплик бутстрепа.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use 2010. Протокол исследования одобрен Комитетом по Биоэтике ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02 от 03.04.2023).

Результаты

При попытке изоляции вирусов из гомогенатов 51 пула комаров было выполнено 3 последовательных пассажа на культуре C6/36. При выполнении 3-го пассажа на монослое клеток C6/36, соответствующему одному из используемых для инфицирования пулов, на 5-е сутки инкубации было зарегистрировано возникновение цитопатических проявлений, усиливающихся при дальнейшем инкубировании. Для подтверждения наличия вызывающего литическую инфекцию вируса выполнили дополнительный 4-й пассаж на конфлюэнтном монослое C6/36. На **рис. 1** представлены микрофотографии, иллю-

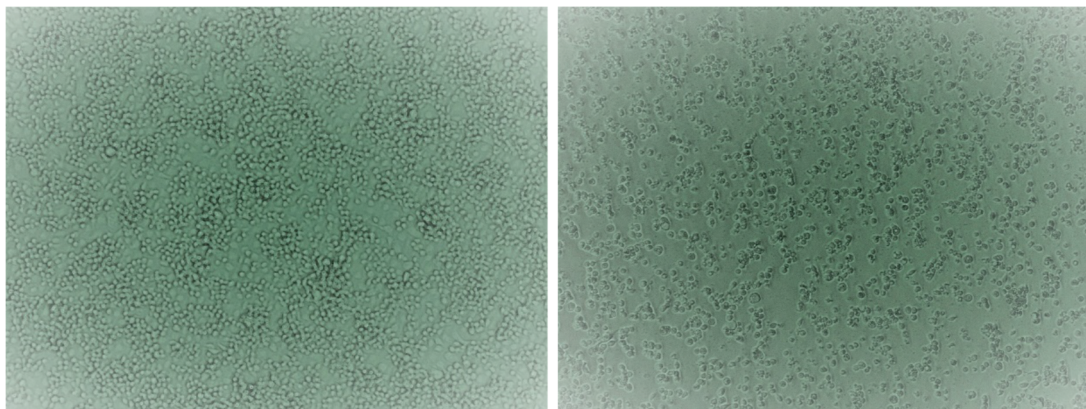


Рис. 1. Световая микроскопия (×200) культуры клеток C6/36, инфицированной штаммом DEZV Yakutsk 2023, через 120 ч после инфицирования.

Слева представлен контроль культуры клеток C6/36.

Fig. 1. Light microscopy (×200) of C6/36 cell culture infected with DEZV Yakutsk 2023 strain 120 hours after infection.

On the left is a control of C6/36 cell culture.

стрирующие наличие выраженного вирусоспецифического ЦПЭ, приводящего к 6-м суткам после инфицирования к 100% гибели клеток. Инфекционная активность выделенного вирусного изолята была определена титрованием на клеточной культуре С6/36 и составила $7,1 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. Для определения формы и размеров вирусных частиц проводили электронно-микроскопическое исследование. Негативно окрашенная суспензия вируса содержала частицы преимущественно диаметром 48–52 нм, округлой формы, с более электронно-плотной областью в центральной части (**рис. 2**).

Для определения потенциальной способности выделенного вирусного изолята реплицироваться в клетках млекопитающих инфицировали клеточные культуры Vero E6, НЕК-293А и СПЭВ с множественностью $10 \text{ ТЦД}_{50}/\text{кл}$ и инкубировали в течение 10 сут. Вирусоспецифического воздействия на клеточные культуры не было выявлено. Клеточные лизаты вышеуказанных культур были подвергнуты титрованию на культуре С6/36. Инфекционного вируса не обнаружили. Полученные результаты доказывают неспособность выделенного вирусного изолята реплицироваться в использованных клетках млекопитающих.

Для выявления возможных патогенных свойств выделенного вируса инфицировали мышей-сосунков. Показано, что интрацеребральное инфицирование дозой $10^5 \text{ ТЦД}_{50}/\text{мышь}$ не вызывало каких-либо клинических проявлений инфекции за весь период наблюдения (21 сут).

Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей суммарной РНК из инфицированных клеток С6/36 методом секвенирования нового поколения (NGS) позволило идентифицировать фрагмент нуклеотидной последовательности, соответствующей

ORF1 генома негевируса Dezidougou. Длина фрагмента составляла 471 п.н. с количеством прочтений 1465, степенью покрытия 293. Для определения полной нуклеотидной последовательности негевируса DEZV проводили секвенирование по Сэнгеру. Геном представляет собой несегментированную одноцепочечную РНК с положительным смыслом, размером 9010 п.н., имеет три открытые рамки считывания. Экспериментально определенная последовательность была депонирована в базе данных GenBank под номером: PP975071.1. Сходство нуклеотидной последовательности выделенного варианта DEZV Yakutsk 2023 с известными изолятами негевирусов приведено в **таблице**. Наиболее высокий уровень сходства (92%) по нуклеотидной последовательности DEZV Yakutsk 2023 показал в сравнении с изолятом из *Coquillettidia richiardii* из Германии (DEZV OP576003). Аналогичный показатель в сравнении с вариантом DEZV, выделенным в Испании (MT096525), составил 86%. Уровень сходства с нуклеотидными последовательностями других негевирусов был следующим: с Kustavi Negevirus (ON949944, Испания) – 69,6%, Utsjoki Negevirus 3 (ON955101, Финляндия) – 72,1%, Wallerfield virus (KX518839, Панама) и Uxmal virus (MH719095.1, Мексика) – 68%. Наличие большого количества аминокислотных замен свидетельствует о существенном генетическом разнообразии негевирусов.

На **рис. 3** представлено филогенетическое дерево с выделенным нами DEZV Yakutsk 2023 и негевирусами. Наиболее близким к DEZV Yakutsk 2023 является прототипный Dezidougou virus strain 8345 (OP576003.1) из Германии с уровнем идентичности 91,95%. Из других негевирусов наиболее близкими являются вирусы, выделенные в Финляндии (Utsjoki Negevirus 1, ON949947), Castlereas virus в Австралии (KX886280) и Ying Kou virus в Китае (isolate NC 040636.1) с уров-

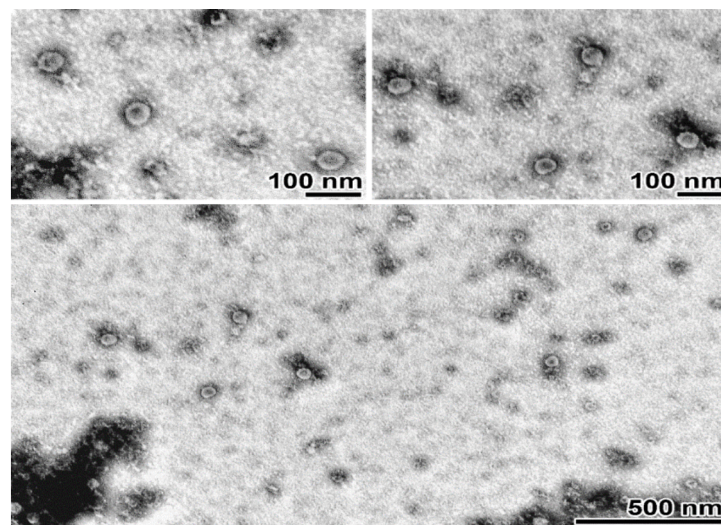


Рис. 2. Просвечивающая электронная микроскопия очищенной суспензии вируса.

Частицы округлой формы диаметром 45–55 нм и электронно-плотной областью в центральной части. Контрастирование 2% уранилацетатом. Бар указан на снимках.

Fig. 2. Transmission electron microscopy of a purified virus suspension.

Rounded particles with a diameter of 45–55 nm and an electron-dense region in the central part. Contrasted with 2% uranyl acetate. The scale is indicated on images.

Таблица. Уровни сходства (%) нуклеотидной/выведенной аминокислотной последовательностей штамма DEZV Yakutsk 2023 в сравнении с наиболее близкими штаммами негевиров

Table. Levels of homology (%) of nucleotide/derived amino acid sequences of strain DEZV Yakutsk 2023 in comparison with the closest negevirus strains

Название штамма Name of strain	GenBank	Страна Country	Год Year	Нуклеотидная последовательность, % Nucleotide sequence, %	Аминокислотная последовательность, % Amino acid sequence, %
Dezidougou virus strain 8345	OP576003.1	Германия Germany	2014	91,95	98,40
Dezidougou virus strain ArA 20086	JQ675604.1	Кот-д'Ивуар Côte d'Ivoire	1984	85,22	96,27
Dezidougou virus strain DEZI/ <i>Aedes africanus</i> /SEN/ DAK-AR-41524/1984	KY968698.1	Сенегал Senegal	1984	86,24	96,18
Dezidougou virus isolate FTA2-3	MT096525.1	Испания Spain	2015	86,08	96,44
Kustavi Negevirus isolate FIN/VS-2018/100	ON949944.1	Финляндия Finland	2017	69,61	71,62
Agua Salud Negevirus isolate PA-2013-MP416-PP	MK959116.1	Панама Panama	2013	67,31	57,38
Wallerfield virus strain TR7904	NC_023440.1	Тринидад и Тобаго Trinidad and Tobago	2009	67,84	61,27
Wallerfield virus isolate PA-2013-MP416-PP	MK959117.1	Панама Panama	2013	68,16	61,45
Uxmal virus isolate UXMV-M985	MH719095.1	Мексика Mexico	2007	68,57	60,58
Utsjoki Negevirus 3 isolate FIN/L-2018/06	ON955101.1	Финляндия Finland	2015	72,14	82,15
Culex Biggie-like virus strain CBigVL/Kern	MH188028.1	США USA	2016	70,88	55,19
Culex negev-like virus 3 strain mos172X44875	NC_035129.1	Австралия Australia	2015	70,00	55,30
Tanay virus isolate 11-3, complete genome	KF425262.1	Филиппины Philippines	2005	70,02	52,82
Goutanap virus 16GH1	LC504569.1	Гана Ghana	2016	68,85	56,00

нем сходства 72,1–72,4% по нуклеотидным последовательностям.

Обсуждение

За последние десятилетия было обнаружено большое число вирусов насекомых, которые входят в различные семейства, включая вирусы, относящиеся к негевирсам.

Выделенный нами из пулов комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), вирус эффективно реплицировался в клетках C6/36 (*Aedes albopictus*), вызывая их гибель. При этом он был не способен инфицировать и размножаться в клеточных культурах млекопитающих (Vero E6, HEK-293A и СПЭВ). Выделенный вирус при интрацеребральном инфицировании высокой дозой не вызывал патологических проявлений у мышей-сосунков. Результаты полногеномного секвенирования определили его принадлежность к негевирсам, наибольший уро-

вень гомологии был отмечен с Dezidougou virus, впервые выделенным в Кот-д'Ивуаре. При электронно-микроскопическом исследовании очищенной вируссодержащей суспензии показано наличие характерных для негевиров сферических вирусных частиц диаметром 45–55 нм. В ряде исследований негевиров было показано, что эти вирусы размножаются только в клетках членистоногих и не реплицируют в клетках позвоночных. Так, в работе [6] с вирусами Negev (NEGV), Piura (PIUV), Dezidougou (DEZV), Ngewotan (NWTV), Loreto (LORV) и Santana (SANV) авторы инфицировали клеточные культуры C6/36, Vero и BHK-21, а также новорожденных мышей (внутрибрюшная инокуляция). Все перечисленные вирусы были способны реплицироваться лишь в клетках C6/36 и не вызывали заболевания сосунков, что согласуется с результатами настоящего исследования.

Род *Negevirus* состоит из разнообразной группы специфичных для насекомых вирусов, с геномом,

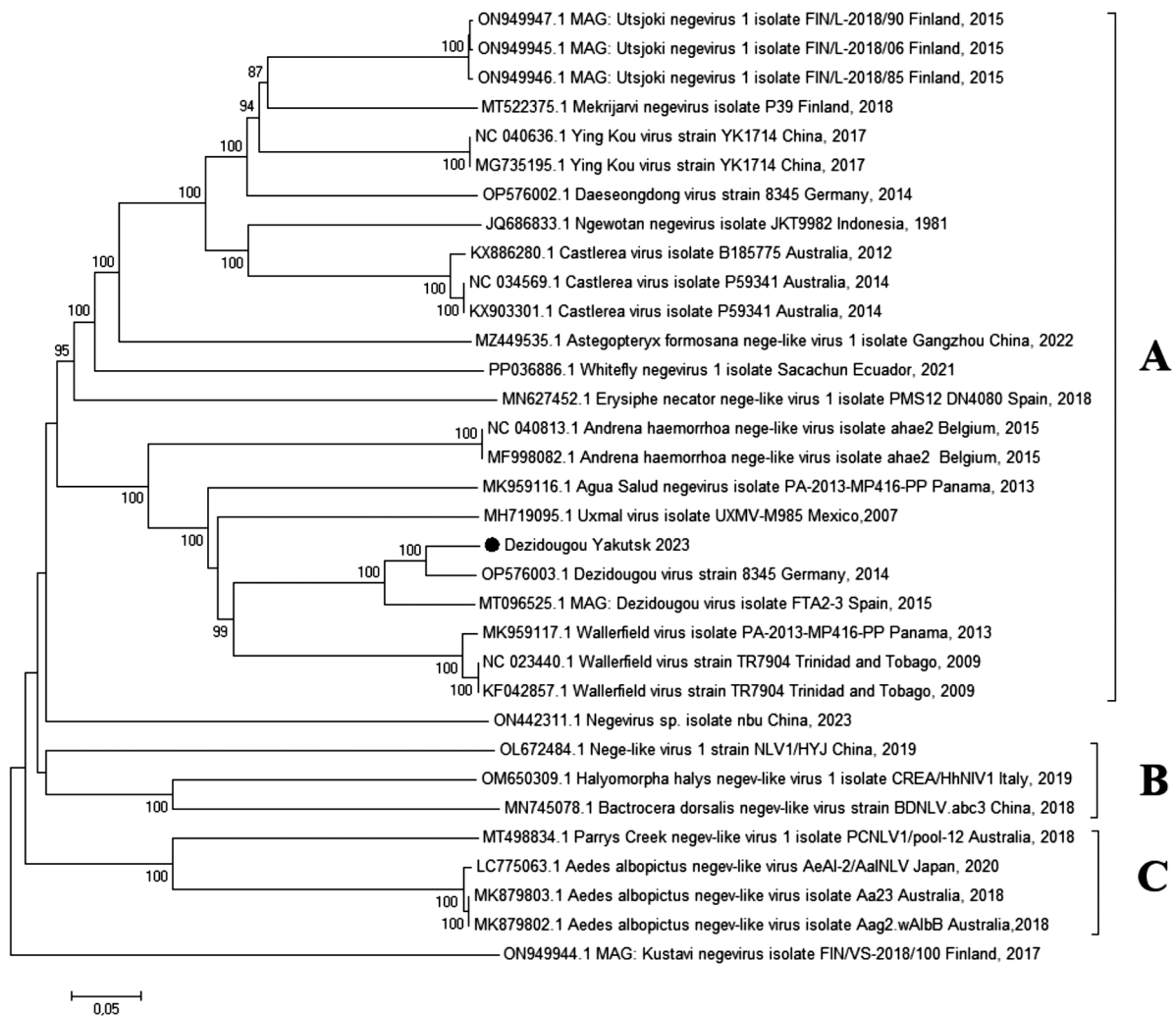


Рис. 3. Филогендограмма, отображающая анализ максимального правдоподобия полноразмерных вирусных последовательностей DEZV и других негевировусов.

Последовательность, охарактеризованная в этом исследовании, выделена символом (●). А, В и С – основные ветви негевировусов.

Fig. 3. Phylogenogram showing the maximum likelihood analysis of full-length viral sequences of DEZV and viruses of the genus Negevirus.

The sequence characterized in this study is highlighted with the symbol (●). A, B, and C are the main branches of negevirus.

представленным одноцепочечной (+)РНК, выделенной от комаров и москитов-флеботомин в Бразилии, Колумбии, Перу, Панаме, США, Германии, Испании и Непале. Данные вирусы были изолированы из пупов комаров, собранных в полевых условиях, что позволяет предположить их довольно широкую распространенность среди комаров в природе. Для большинства негевировусов характерны высокая генетическая изменчивость и наличие межвидовой передачи. Негевировусы широко географически распространены и имеют разнообразный круг хозяев среди насекомых – комары родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*, москиты рода *Lutzomyia* и др. [17, 18]. Наши результаты о выделении DEZIV в Республике Саха (Якутия) в России подтверждают данные о широком географическом распространении негевировусов.

Биологическое и потенциальное значение для здравоохранения негевировусов еще предстоит определить. Поскольку негевировусы изначально были выделены из отобранных в природе комаров разных родов, которые являются переносчиками арбовирусов, то существует возможность влияния негевировусной инфекции на восприимчивость и векторную компетентность переносчиков к вирусным патогенам позвоночных. Так, экспериментально, на *Ae. aegypti* было показано, что инфицирование комаров определенными штаммами бактериального эндосимбионта *Wolbachia* препятствует репликации вируса денге и снижает компетентность переносчика [18, 19]. И если бактериальный эндосимбионт может изменить компетентность комара-переносчика к арбовирусам, то вполне вероятно, что вирусный симбионт тоже может оказывать аналогичный эффект. Счита-

ется, что ISVs также могут потенциально использоваться в качестве агентов биологического контроля с предполагаемым исключением суперинфекции патогенными для человека арбовирусами и поддержания эффекта в природе посредством транс-вариальной передачи [20]. В недавней работе показано, что негевиреус Piuga эффективно ингибирует репликацию вируса Зика в клетках насекомых. Коинфицирование клеток C6/36 с PIUV приводило к 10 000-кратному снижению инфекционного титра вируса Зика по сравнению с моноинфицированными вирусом Зика клетками. В то же время вирус Зика не был способен ингибировать репликацию PIUV [21]. Е. Patterson и соавт. [22] продемонстрировали, что вирус Negev ингибирует репликацию арбовирусов Чикунгунья и восточного энцефалита лошадей, относящихся к роду *Alphavirus*, в коинфицированных клетках комаров. Другими исследователями было показано, что специфичный для насекомых *Culex Flavivirus* (CxFV) Izabal не подавлял репликацию вируса Западного Нила (ВЗН) в клетках C6/36 и комарах *Culex quinquefasciatus*. Особенно важно, что трансмиссионная эффективность в отношении ВЗН была усилена у инфицированных CxFV комаров [23].

Ранее экспериментально было показано, что негевиреусы обнаруживаются в слюнных железах насекомых и, значит, существует потенциальная возможность передачи вируса позвоночному хозяину во время кормления [24, 25]. Следовательно, люди и другие позвоночные могут иметь контакт с негевиреусами, что повышает вероятность некоторых из них адаптироваться и, в конечном итоге, сформироваться уже как условный патоген позвоночных. Существует обоснованное предположение о том, что многие вирусы позвоночных, передающиеся членистоногими, первоначально были специфичными для насекомых [7]. Предположение о том, что ISVs являются предками арбовирусов, делает эти вирусы потенциальным инструментом для изучения эволюции перехода от одного хозяина к другим.

Заключение

Впервые на территории Российской Федерации в пуле комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), был идентифицирован и выделен вирус, относящийся к негевиреусам. Выделенный штамм негевиреуса DEZV Yakutsk 2023 эффективно реплицировался в клетках C6/36 (*Ae. albopictus*), вызывая их гибель. При этом он был не способен инфицировать и размножаться в использованных клеточных культурах млекопитающих и не вызывал патологических проявлений у мышей-сосунков при интрацеребральном инфицировании. Методом NGS и секвенированием по методу Сэнгера установлена полная нуклеотидная последовательность вирусного генома DEZV Yakutsk 2023 и проведен филогенетический анализ.

Дальнейшее исследование распространенности негевиреусов, их вирусологических особенностей,

потенциального значения для здравоохранения и влияния на векторную компетентность переносчиков представляется важным и перспективными.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kuno G. A survey of the relationships among the viruses not considered arboviruses, vertebrates, and arthropods. *Acta Virol.* 2004; 48(3): 135–44.
2. Calzolari M., Zé-Zé L., Vázquez A., Sánchez Seco MP., Amaro F., Dottori M. Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40: 381–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.032>
3. Roundy CM., Azar SR., Rossi SL., Weaver SC., Vasilakis N. Insect-specific viruses: a historical overview and recent developments. *Adv. Virus Res.* 2017; 98: 119–46. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.10.001>
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses.* 2015; 7(4): 1927–59. <https://doi.org/doi: 10.3390/v7041927>
5. Carvalho V.L., Long M.T. Insect-specific viruses: an overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. *Virology.* 2021; 557: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.007>
6. Vasilakis N., Forrester N.L., Palacios G., Nasar F., Savji N., Rossi SL., et al. Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2475–88. <https://doi.org/10.1128/JVI.00776-12>
7. Nunes M.R.T., Contreras-Gutierrez M.A., Guzman H., Martins L.C., Barbirato M.F., Savit C., et al. Genetic characterization, molecular epidemiology, and phylogenetic relationships of insect-specific viruses in the taxon Negevirus. *Virology.* 2017; 504: 152–67. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.022>
8. Auguste A.J., Carrington C.V.F., Forrester N.L., Popov V.L., Guzman H., Widen S.G., et al. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from *Culex* (*Culex*) declarator mosquitoes in Trinidad. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 2): 481–5. <https://doi.org/10.1099/vir.0.058412-0>
9. Truong Nguyen P.T., Culverwell C.L., Suvanto M.T., Korhonen E.M., Uusitalo R., Vapalahti O., et al. Characterisation of the RNA virome of nine *Ochlerotatus* species in Finland. *Viruses.* 2022; 14(7): 1489. <https://doi.org/10.3390/v14071489>
10. da Silva Ribeiro A.C., Martins L.C., da Silva S.P., de Almeida Medeiros D.B., Miranda K.K.P., Nunes Neto J.P., et al. Negevirus isolated from mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Virol. J.* 2022; 19(1): 17. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01743-z>
11. Hermanns K., Marklewitz M., Zirkel F., Overheul G.J., Page R.A., Loaiza J.R., et al. Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *J. Gen. Virol.* 2020; 101(1): 96–104. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001344>
12. Auguste A.J., Langsjoen R.M., Porier D.L., Erasmus J.H., Bergren N.A., Bolling B.G., et al. Isolation of a novel insect-specific flavivirus with immunomodulatory effects in vertebrate systems. *Virology.* 2021; 562: 50–62. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.07.004>
13. Svyatchenko V., Nikonov S., Mayorov A., Gelfond M., Loktev V. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2021; 33: 102112. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112>
14. Toth K., Spencer J., Dhar D., Sagartz J., Buller R., Painter G., et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008; 105(20): 7293–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800200105>
15. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. On the calculation of TCID₅₀ for quantitation of virus infectivity. *Virol. Sin.* 2021; 36(1): 141–4. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>
16. Rodgers MA., Wilkinson E., Vallari A., McArthur C., Sthrelley L., Brennan CA., et al. Sensitive next-generation sequencing method reveals deep genetic diversity of HIV-1 in the Democratic Republic of the Congo. *J. Virol.* 2017; 91(6): e01841-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01841-16>

17. Walker T., Jeffries C.L., Mansfield K.L., Johnson N. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit. Vectors*. 2014; 7: 382. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-382>
18. Müller G., Schlein Y. Plant tissues: the frugal diet of mosquitoes in adverse conditions. *Med. Vet. Entomol.* 2005; 19(4): 413–22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00590.x>
19. Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009; 139(7): 1268–78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
20. Öhlund P., Lundén H., Blomström A.L. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes*. 2019; 55(2): 127–37. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-01629-9>
21. Carvalho V.L., Prakoso D., Schwarz E.R., Logan T.D., Nunes B.T.D., Beachboard S.E., et al. Negevirus Piura suppresses Zika virus replication in mosquito cells. *Viruses*. 2024; 16(3): 350. <https://doi.org/10.3390/v16030350>
22. Patterson E.L., Kautz T.F., Contreras-Gutierrez M.A., Guzman H., Tesh R.B., Hughes G.L. Negevirus reduce replication of alphaviruses during coinfection. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0043321. <https://doi.org/10.1128/JVI.00433-21>
23. Kent R.J., Crabtree M.B., Miller B.R. Transmission of West Nile virus by *Culex quinquefasciatus* say infected with *Culex Flavivirus* Izabal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(5): e671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000671>
24. Higgs S., Beaty B.J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Marquardt M.C., ed. *Biology of Disease Vectors*. New York: Elsevier Academic Press; 2005: 167–85.
25. Guerrero D., Cantaert T., Missé D. Aedes mosquito salivary components and their effect on the immune response to arboviruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 407. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407>

Информация об авторах:

Степанюк Марина Алексеевна – младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: stepanyuk_ma@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>

Легостаев Станислав Сергеевич – стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6202-445x>

Карелина Кристина Вячеславовна – стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: karelina_kv@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0003-1421-1765>

Тимофеева Нина Федоровна – научный сотрудник УНТЛ «Технологии полимерных наноконструкций» ФГАОУ ВО СВФУ им. М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия. E-mail: niakswan@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9895-5873>

Емцова Ксения Федоровна – стажер-исследователь отдела микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: k.emtsova@g.nsu.ru; <https://orcid.org/0009-0003-5165-5357>

Охлопкова Олеся Викторовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Таранов Олег Святославович – заведующий отделом микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: taranov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Протопопов Альберт Васильевич – д-р биол. наук, главный научный сотрудник ФГАОУ ВО СВФУ им. М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия. E-mail: a.protopopov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6543-4596>

Терновой Владимир Александрович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: tern@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1275-171x>

Локтев Валерий Борисович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0229-321x>

Святченко Виктор Александрович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2729-0592>

Агафонов Александр Петрович – д-р биол. наук, генеральный директор ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Участие авторов: Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А. – концепция и дизайн исследования; Степанюк М.А., Легостаев С.С. – проведение экспериментов; Святченко В.А. – координация и анализ вирусологического этапа работы; Степанюк М.А., Карелина К.В. – сборка нуклеотидных последовательностей и публикация в базе данных; Степанюк М.А., Терновой В.А. – филогенетический анализ и интерпретация данных; Степанюк М.А., Охлопкова О.В., Тимофеева Н.Ф., Протопопов А.В. – сбор биоматериала; Емцова К.Ф., Таранов О.С. – микроскопические исследования; Степанюк М.А., Охлопкова О.В., Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А. – подготовка рукописи, рецензирование текста и полученных результатов, оформление текста; Агафонов А.П. – администрирование, координация, финальное редактирование рукописи.

Поступила 17.11.2024
Принята в печать 10.01.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Marina A. Stepanyuk – junior researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: stepanyuk_ma@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>

Stanislav S. Legostaev – trainee researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6202-445x>

Kristina V. Karelina – trainee researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: karelina_kv@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0003-1421-1765>

Nina F. Timofeeva – Researcher at the Department of Polymer Nanocomposites Technologies at M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Sakha Republic, Russia. E-mail: niakswan@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9895-5873>

Ksenia F. Emtsova – trainee researcher of microscopic research department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: k.emtsova@g.nsu.ru; <https://orcid.org/0009-0003-5165-5357>

Olesia V. Ohlopkova✉ – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Biophysics and Environmental Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Oleg S. Taranov – head of microscopic research department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: taranov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Albert V. Protopopov – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. E-mail: a.protopopov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6543-4596>

Vladimir A. Ternovoi – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: tern@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1275-171x>

Valery B. Loktev – MD, PhD, DSc, Prof., academician RANS, Chief Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0229-321x>

Victor A. Svyatchenko – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2729-0592>

Alexander P. Agafonov – Doctor of Biological Sciences, Director General, Federal Biotechnology and Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Contribution: Ternovoy V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A. – concept and design of the study; Stepanyuk M.A., Legostaev S.S. – conducting experiments; Svyatchenko V.A. – coordination and analysis of the virological stage of work; Stepanyuk M.A., Karelina K.V. – assembly of nucleotide sequences and publication in the database; Stepanyuk M.A., Ternovoy V.A. – phylogenetic analysis and interpretation of data; Stepanyuk M.A., Ohlopkova O.V., Timofeeva N.F., Protopopov A.V. – collection of biomaterial; Emtsova K.F., Taranov O.S. – microscopic studies; Stepanyuk M.A., Ohlopkova O.V., Ternovoy V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A. – preparation of the manuscript, review of the text and obtained results, text design; Agafonov A.P. – administration, coordination, final editing of the manuscript. Received

Received 17 November 2024

Accepted 10 January 2025

Published 28 February 2025