



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

3

Том 68 • 2023

Volume 68 • Issue 3 • 2023

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Журнал «Вопросы вирусологии» знакомит читателей с достижениями российской и мировой вирусологии, помещает статьи, посвящённые изучению вирусов и вирусных болезней человека, животных и растений. Видное место в издании отводится публикации результатов экспериментальных работ по различным вопросам общей и частной вирусологии. В журнале печатаются материалы, способствующие внедрению в практику достижений вирусологической науки по ликвидации и снижению распространённости инфекционных заболеваний, а также их диагностике, профилактике и лечению.

В обзорных статьях обобщаются последние достижения в области вирусологии. Читатель найдет в журнале описание новых методов исследований, методических приёмов, новой аппаратуры и приспособлений.

Журнал рассчитан на вирусологов, эпидемиологов, паразитологов, фармакологов, биохимиков и других специалистов.

The Journal «Problems of virology» is focused on current advances in virology in Russia and the rest of the world. It covers research in virology and viral diseases of humans, animals, and plants. Emphasis is given to the original experimental studies on various aspects of general and special virology. The reviews of recent and historic developments in virology are regularly published.

The journal promotes the implementation of advances in virology aimed at treatment, reduction of the incidence and elimination of infectious diseases and enhancement of diagnostics, prevention, and treatment practices as well. The target audience of the journal are virologists (including medical and veterinary virologists, scientists and practitioners), epidemiologists, parasitologists, pharmacologists, biochemists and specialists in related medical disciplines.

Журнал входит в базу данных SCOPUS и рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» по специальностям:

1.5.10 Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2 Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22 Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские и биологические науки)

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), Журнал относится к категории K1, как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

The journal is indexed in the SCOPUS database and is included in the «List of peer-reviewed scientific journals in which the main scientific results of dissertations for the PhD degree and for the degree of Doctor of Science should be published» recommended by the Higher Attestation Commission for the following specialities:

1.5.10 Virology (medical and biological sciences)

3.2.2 Epidemiology (medical and biological sciences)

3.1.22 Infectious diseases (medical and biological sciences)

3.3.6 Pharmacology, clinical pharmacology (medical and biological sciences)

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a journal included in the SCOPUS and RSCI databases.

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, DOAJ, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science)

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Статьи иностранных авторов
и отдельные статьи, рекомендованные
Редакционной коллегией журнала,
публикуются на русском и английском
языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

<https://www.virusjour.crie.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
<https://www.ebsco.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: publisher@crie.ru

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя
E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна
Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.
К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.crie.ru>).

Направляя статью в редакцию,
авторы принимают условия договора
публичной оферты
(<https://www.virusjour.crie.ru>).

Подписано в печать 30.06.2023.
Формат 60×90^{1/8}.
Тираж 50 экз.
Отпечатано в типографии
«Буки Веди», www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

Учредители: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

3

Том 68 · 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор: **ЛЬВОВ Д.К.** (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф.,
член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н., член-корр. РАН)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Члены редколлегии:

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

Борисевич С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Сергиев Посад, Россия)

Брико Н.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Заседателев А.С. (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

Злобин В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

Кузин А.А. (д.м.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Кутырев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

Леонова Г.Н. (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

Локтев В.Б. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Лукашев А.Н. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Макаров В.В. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Мальшев Н.А. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Манапова Э.Р. (д.м.н.; Казань, Россия)

Михайлов М.И. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Негёсов С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

Никифоров В.В. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Панин А.Н. (д.в.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Покровский А.Г. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

Резник В.И. (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

Романенко В.В. (д.м.н.; Екатеринбург, Россия)

Савельев С.И. (д.м.н., проф.; Липецк, Россия)

Сметанина С.В. (к.м.н.; Москва, Россия)

Степанова Т.Ф. (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

Тутельян А.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

Чумаков П.М. (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Чучалин А.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Шестопалов А.М. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Щелканов М.Ю. (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

Яшкулов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Becker J. (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

Compans R.W. (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

Kawaoka Y. (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

Kuhn J.H. (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

Mackenzie J. (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

Nymadawa P. (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

Oxford J. (DSc; London, UK)

Sakoda Y. (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

Suarez D.L. (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

Tashiro M. (PhD, MD; Tokyo, Japan)

Titov L.P. (MD, PhD, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member Minsk, Republic of Belarus)

Turan K. (PhD, Prof.; Istanbul, Turkey)

Vaheri A. (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

Yuelong Shu (PhD; Beijing, P.R. China)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, DOAJ, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (on the Web of Science platform)

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.crie.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology,
111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79.
E-mail: publisher@crie.ru

Head of the Editorial and Publishing Department: *Olga V. Osokina*

EDITORIAL OFFICE:

111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79
E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Head of Editorial Office:
Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.crie.ru>) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement

(<https://www.virusjour.crie.ru>).

Signed to the press

on June 30, 2023.

Print format 60 × 90^{1/8}.

Circulation 50 copies.⁸

Produced at the Buki Vedi Printing House.

115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.

E-mail: info@bukivedi.com.

www.bukivedi.com

© Central Research Institute for Epidemiology, 2023

**Founders: Central Research Institute for Epidemiology,
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists**

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIROLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

3

Volume 68 · 2023

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,
Professor, Dr. Sci. (Medicine)**

Assistant editor in chief: **Grebennikova T.V.**, RAS Corr. Member,
Professor, Dr. Sci. (Biology)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.**, RAS Corr. Member, Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhny A.D.**, RAS Corr. Member, Professor,
Dr. Sci. (Biology)

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Aliper T.I. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Antonov V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. – Professor, Dr. Sci. (Chemistry) (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. – Dr. Sci. (Biology), (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. – Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Kuzin A.A. – Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. – Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Romanenko V.V. – Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Vladivostok, Russia)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista, Russia)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

Becker J. (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

Compans R.W. (PhD, Prof.; Atlanta, USA)

Fouchier R.A.M. (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Greifswald – Insel Riems, Germany)

Kawaoka Y. (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)

Kuhn J.H. (MD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

Liu W.J. (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

Mackenzie J. (PhD, Prof.; Brisbane, Australia)

Nymadawa P. (PhD, MD, DSc, Prof.; Ulan Bator, Mongolia)

Oxford J. (DSc; London, UK)

Sakoda Y. (PhD, Assoc. Prof.; Sapporo, Japan)

Suarez D.L. (D.V.M., PhD, A.C.V.M.; Athens, USA)

Tashiro M. (PhD, MD; Tokyo, Japan)

Titov L.P. (MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; Minsk, Republic of Belarus)

Turan K. (PhD, Prof.; Istanbul, Turkey)

Vaheri A. (PhD, MD, Prof.; Helsinki, Finland)

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

Yuelong Shu (PhD; Beijing, P.R. China)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Куц А.А., Иванов А.И.

Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций* 181

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Фефелова Е.В., Казанцева Л.С., Шаповалов Ю.К., Лукьянчук М.С., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г.

Предиктивная роль эритроцитов в оценке исходов COVID-19 198

Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С.

Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесённой SARS-CoV-2-инфекции или вакцинации против неё. 205

*Кудров Г.А., Зайнутдинов С.С., Гражданцева А.А., Шиповалов А.В., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Таранов О.С., Зайковская А.В., Шульгина И.С., Пьянков О.В., Кочнева Г.В.*Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) штамма Москва 215*Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Бумбали С., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Эсауленко Е.В., Тололян Арег А.*

Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости и ускользания от иммунного ответа в геноме вируса гепатита В, выявленного у беременных в Гвинейской Республике* 228

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г.

Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов. 242

*Асатрян М.Н., Тимофеев Б.И., Шмыр И.С., Хачатрян К.Р., Щербинин Д.Н., Тимофеева Т.А., Герасимук Э.Р., Агасарян В.Г., Ершов И.Ф., Шашкова Т.И., Иванисенко Н.В., Кардымон О.Л., Семенов Т.А., Народицкий Б.С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А.Л.*Математическая модель для оценки уровня перекрёстного иммунитета между штаммами вируса гриппа подтипа H₃N₂* 252

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Карташов М.Ю., Свирин К.А., Бекболотов А., Момушева К., Исканова Б., Солпуева А., Моторов У., Нарматова Е., Кривошеина Е.И., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Гашникова Н.М.

Анализ мутаций резистентности среди изолятов вируса гепатита С, циркулирующих в Кыргызстане 265

CONTENTS

REVIEWS

Kushch A.A., Ivanov A.V.

Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections* 181

ORIGINAL RESEARCHES

Smolyakov Yu.N., Kuznik B.I., Fefelova E.V., Kazantseva L.S., Shapovalov Yu.K., Lukyanchuk M.S., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G.

Predictive role of erythrocytes in assessment of COVID-19 outcomes. 198

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tuskaya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Bochkareva S. S.

Development and preservation of specific T-cell immunity after COVID-19 or vaccination against this infection 205

Kudrov G.A., Zainutdinov S.S., Grazhdantseva A.A., Shipovalov A.V., Sivolobova G.F., Semenova A.V., Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Taranov O.S., Zaykovskaya A.V., Shulgina I.S., Pyankov O.V., Kochneva G.V.Intranasal vaccine against COVID-19 based on a recombinant variant of the Sendai virus (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) strain Moscow 215**Balde T.A.L., Ostankova Yu.V., Boumbaly S., Naidenova E.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Davydenko V.S., Esaulenko E.V., Totolian Areg A.**

Frequency of drug resistance and immune escape mutations in the hepatitis B virus genome detected in pregnant women in the Republic of Guinea* 228

TO HELP THE VIROLOGIST

Ushkalenko N.D., Ersh A.V., Filatov P.V., Poltavchenko A.G.

The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses 242

Asatryan M.N., Timofeev B.I., Shmyr I.S., Khachatryan K.R., Shcherbinin D.N., Timofeeva T.A., Gerasimuk E.R., Agasaryan V.G., Ershov I.F., Shashkova T.I., Ivanisenko N.V., Kardymon O.L., Semenenko T.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.Mathematical model for assessing the level of cross-immunity between strains of influenza virus subtype H₃N₂* 252

SHORT COMMUNICATIONS

Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Bekbolotov A., Momusheva K., Iskanova B., Solpueva A., Motorov U., Narmatova E., Krivosheina E.I., Gladysheva A.V., Chub E.V., Gashnikova N.M.

Analysis of resistance-associated substitutions resistance analysis in hepatitis C virus sequences from Kyrgyzstan. 265

ОБЗОРЫ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173>

© КУЩ А.А., ИВАНОВ А.И., 2023

Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций

Кущ А.А.¹, Иванов А.И.²

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук», 119991, г. Москва, Россия

Экзосомы – внеклеточные везикулы эндосомального происхождения с двухслойной мембраной, диаметром 30–160 нм. Экзосомы высвобождаются из клеток разного происхождения и определяются в различных биологических жидкостях организма. Они содержат клеточные нуклеиновые кислоты, белки, липиды, метаболиты и могут передавать содержимое клеткам-реципиентам. В биогенезе экзосом участвуют клеточные белки семейства Rab ГТФазы и системы ESCRT, которые регулируют почкование, транспорт везикул, сортировку молекул, слияние мембран, образование мультивезикулярных телец и секрецию экзосом. Из клеток, инфицированных вирусами, высвобождаются экзосомы, которые содержат геномные вирусные ДНК и РНК, а также мРНК, микроРНК, другие виды РНК, белки и вирионы. Экзосомы способны переносить вирусные компоненты в неинфицированные клетки различных органов и тканей. В настоящем обзоре проанализировано влияние экзосом на жизненный цикл широко распространенных вирусов, вызывающих серьезные заболевания человека: вирус иммунодефицита человека 1-го типа, вирус гепатита В, вирус гепатита С, SARS-CoV-2. Вирусы способны проникать в клетки путём эндоцитоза, используют молекулярные и клеточные пути с участием белков Rab и ESCRT для высвобождения экзосом и распространения вирусных инфекций. Показано, что экзосомы могут оказывать разнонаправленные действия на патогенез вирусных инфекций, подавляя или способствуя развитию вызываемых ими заболеваний. Экзосомы потенциально могут использоваться в неинвазивной диагностике как биомаркеры стадии инфекции, а экзосомы, нагруженные биомолекулами и лекарственными препаратами, – как терапевтические средства. Генетически модифицированные экзосомы – перспективные кандидаты для новых противовирусных вакцин.

Ключевые слова: обзор; экзосомы; внеклеточные везикулы; эндоцитоз; Rab ГТФазы; система ESCRT; экзоцитоз; вирус иммунодефицита человека; вирус гепатита В; вирус гепатита С; SARS-CoV-2

Для цитирования: Кущ А.А., Иванов А.И. Экзосомы в жизненном цикле вирусов и патогенезе вирусных инфекций. Вопросы вирусологии. 2023; 68(3): 181-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173> EDN: <https://elibrary.ru/uablap>

Для корреспонденции: Кущ Алла Александровна, д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: vitaliku@mail.ru

Участие авторов: авторы заявляют о равном участии в написании и редактировании статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Благодарность. Авторы выражают благодарность О.В. Масаловой, Р.Р. Климовой и Н.Е. Федоровой за критический анализ и ценные замечания, а также К.И. Юрлову за помощь в оформлении рисунков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.05.2023
Принята в печать 22.06.2023
Опубликована 30.06.2023

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173>

Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections

Alla A. Kushch¹, Alexandr V. Ivanov²¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;²Institute of Molecular Biology named after V.A. Engelhardt of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

Exosomes are extracellular vesicles of endosomal origin, with a bilayer membrane, 30–160 nm in diameter. Exosomes are released from cells of different origins and are detected in various body fluids. They contain nucleic acids, proteins, lipids, metabolites and can transfer the contents to recipient cells. Exosome biogenesis involves cellular proteins of the Rab GTPase family and the ESCRT system, which regulate budding, vesicle transport, molecule sorting, membrane fusion, formation of multivesicular bodies and exosome secretion. Exosomes are released from cells infected with viruses and may contain viral DNA and RNA, as well as mRNA, microRNA, other types of RNA, proteins and virions. Exosomes are capable of transferring viral components into uninfected cells of various organs and tissues. This review analyzes the impact of exosomes on the life cycle of widespread viruses that cause serious human diseases: human immunodeficiency virus (HIV-1), hepatitis B virus, hepatitis C virus, SARS-CoV-2. Viruses are able to enter cells by endocytosis, use molecular and cellular pathways involving Rab and ESCRT proteins to release exosomes and spread viral infections. It has been shown that exosomes can have multidirectional effects on the pathogenesis of viral infections, suppressing or enhancing the course of diseases. Exosomes can potentially be used in noninvasive diagnostics as biomarkers of the stage of infection, and exosomes loaded with biomolecules and drugs - as therapeutic agents. Genetically modified exosomes are promising candidates for new antiviral vaccines.

Keywords: review; exosomes; extracellular vesicles; endocytosis; Rab GTPases; ESCRT system; exocytosis; human immunodeficiency virus; hepatitis B virus; hepatitis C virus; SARS-CoV-2

For citation: Kushch A.A., Ivanov A.V. Exosomes in the life cycle of viruses and the pathogenesis of viral infections. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 181-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-173> EDN: <https://elibrary.ru/uablap>

For correspondence: Alla A. Kushch, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Leading Researcher of the Cell Engineering Laboratory, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia. E-mail: vitalku@mail.ru

Information about the authors:Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>

Contribution: the authors declare equal participation in the writing and editing of the article

Funding. The research was funded by the state budget.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to O.V. Masalova, R.R. Klimova and N.E. Fedorova for critical analysis and valuable comments, as well as K.I. Yurlov for assistance in the design of the figures.

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

Received 10 May 2023
Accepted 22 June 2023
Published 30 June 2023

Введение

Экзосомы впервые были идентифицированы в культуральной жидкости ретикулоцитов. В 1983 г. две группы исследователей практически одновременно сообщили, что трансферриновые рецепторы ретикулоцитов ассоциируются с внутриклеточными везикулами небольших размеров (около 50 нм) и затем «буквально выбрасываются» (literally jettisoned) из созревающих ретикулоцитов во внеклеточное пространство [1, 2]. С.V. Harding и соавт. [1, 3] показали, что интернализированный трансферрин в клетках локализуется на большом количестве маленьких частиц внутри органелл, которые авторы назвали мультивезикуляр-

ными эндосомами (multivesicular endosomes). Мультивезикулярные эндосомы сливаются с плазматической мембраной с последующим высвобождением (экстернализацией) везикул, впоследствии названных экзосомами [4]. Было высказано предположение, что клетки могут использовать этот механизм в качестве общего способа высвобождения мембранных везикул. Это открытие вызвало огромный интерес исследователей, и с тех пор опубликованы сотни статей по экзосомам, создан специальный журнал – *Journal of Extracellular Vesicles*, сформированы специализированные общества: International Society for Extracellular Vesicles, The American Society for Exosomes and Microvesicles.

В обзоре кратко рассмотрены некоторые вопросы биогенеза и функций экзосом. Особое внимание уделено участию экзосом в вирусных инфекциях.

Характеристика экзосом

Экзосомы – внеклеточные везикулы (ВВ) с двуслойной мембраной диаметром 30–160 нм (в среднем около 100 нм), имеют эндосомное происхождение. К классическим маркерам экзосом относят CD63, CD81 и CD9, флотиллины, церамиды, TSG101 (tumor susceptibility gene 101) и Alix (apoptosis-linked gene 2 interacting protein X) [5, 6] (рис. 1). В экзосомах обнаружены липиды, белки, все известные виды РНК, метаболиты [7, 8]. После высвобождения с поверхности клетки экзосомы могут взаимодействовать с внеклеточным матриксом и (или) проникать в клетки-реципиенты [9]. Экзосомы высвобождаются из клеток различного происхождения, они обнаружены в различных биологических жидкостях: в плазме и сыворотке крови, моче, спинномозговой жидкости, грудном молоке, слюне, желудочном соке, семенной и фолликулярной жидкостях, в кале [7, 10, 11]. Эти везикулы характеризуются большой гетерогенностью по размерам и функциям [12]. Содержание (груз) экзосом различается и определяется клеточным происхождением, метаболическим статусом и окружающей средой клеток-доноров, поэтому различают многочисленные подгруппы экзосом [8]. Переноса различные биоактивные молекулы в клетки-реципиенты, экзосомы могут участвовать в регуляции транскрипции и трансляции; пролиферации, репродукции, развитии, клеточной дифференцировке, патологических процессах, в том числе в неоплазии [12, 13].

Одна из важнейших проблем изучения и применения экзосом состоит в необходимости усовершенствования методов разделения и очистки везикул. Вслед за ультрацентрифугированием, градиентным центрифугированием и ультрафильтрацией разработаны более совершенные методы и инструменты: чип ExoTIC [14], технология AF4 (asymmetric-flow field-flow fractionation) [15], метод двойной иммунофильтрации (dual-patterned immunofiltration – ExoDIF) [16]. Появились методы идентификации, оценки размеров и содержимого экзосом с использованием специальных методов микроскопии, проточной цитометрии [5]. Оценка частоты использования девяти различных методов выделения и очистки экзосом, выполненная в 2019 г., показала, что работы, в которых использовали иммуноаффинные методы, сортировку клеток по флуоресценции (FACS) и преципитацию на полимерах, составляли приблизительно 3–5%, центрифугирование в градиенте плотности – 25%, фильтрацию – 34%, ультрацентрифугирование – 58% и дифференциальное центрифугирование – 73% от общего количества всех проанализированных публикаций. Таким образом, дифференциальное центрифугирование остаётся наиболее используемым методом, однако отмечается, что в большинстве исследований использовалась комбинация этих методов [17]. Для надёжной классификации экзосом и стандартизации техноло-

гий их использования необходимо дальнейшее совершенствование методов идентификации и очистки экзосом. ВВ подразделяются на три основных типа в зависимости от места их происхождения, плотности, экспрессии маркеров и размера:

- а) экзосомы (30–150 нм);
- б) микровезикулы (100–1000 нм);
- в) апоптотические тельца (500–5000 нм) [18].

При этом следует учитывать большой разброс при определении размеров везикул [19]. В 2018 г. эксперты Международного общества внеклеточных везикул (The International Society for Extracellular Vesicles) опубликовали рекомендации, согласно которым в тех случаях, когда биогенез и отличительные свойства использованных везикул подробно не изучены, а их размеры значительно варьируют, более корректно использовать термин «экстраклеточные везикулы», в русскоязычной литературе принято обозначение ВВ. Термин «экзосомы» соответствует малым ВВ с размерами, не превышающими 200 нм [20]. Однако степень очистки везикул во многих исследованиях не определялась, и популяции везикул могли содержать как экзосомы, так и микровезикулы. В связи с этим при изложении результатов в дальнейшем мы будем использовать терминологию, приведенную в оригинальных исследованиях.

Биогенез экзосом

После проникновения в клетку компонентов внешней среды путём эндоцитоза интернализированный ма-

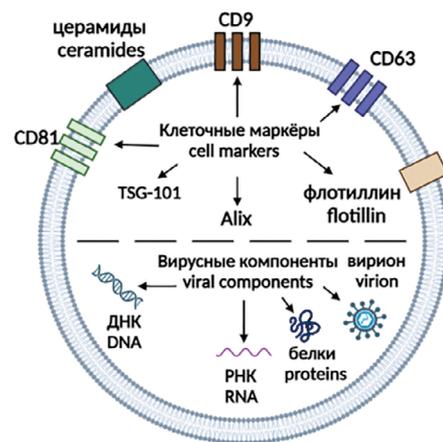


Рис. 1. Содержимое экзосом и биомаркеры.

В верхней половине – основные маркеры экзосом, представленные мембранными белками – тетраспанинами CD9, CD63, CD81 и флотиллинами; липидами – церамидами, а также компонентами клеточной системы ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport): Alix (apoptosis-linked gene 2 interacting protein X) и TSG-101 – продукт Tumor Susceptibility Gene 101 (*tsg101*). В нижней половине – вирусные компоненты, которые захватываются экзосомами в заражённых клетках, – геномные ДНК или РНК, вирусные структурные и неструктурные белки и вирионы.

Fig. 1. Exosome biomarkers and content.

In the upper half are the main markers of exosomes: membrane proteins – tetraspanins CD9, CD63, CD81 and flotillins; lipids – ceramides, components of the ESCRT system Alix and TSG-101. In the lower half – viral components that are captured by exosomes in infected cells – DNA or RNA, viral structural and non-structural proteins and virions.

териал доставляется в ранние эндосомы (РЭ) (рис. 2). Затем происходит созревание РЭ, что включает снижение рН внутри органеллы, накопление в мембране фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P), а также привлечение ряда ферментов семейства рабаптинов (Rab) и их активацию. Это приводит к образованию поздних эндосом (ПЭ). ПЭ, так же как и РЭ, выполняют

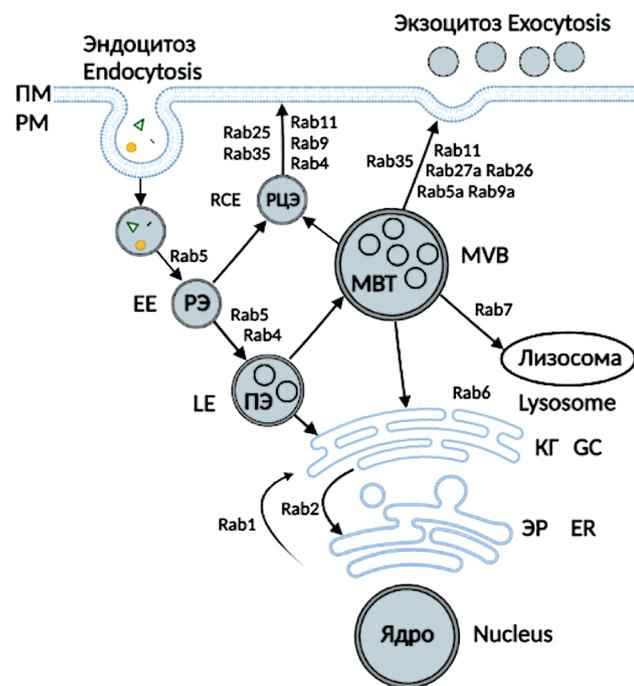


Рис. 2. Схема биогенеза экзосом и участие клеточных белков семейства Rab.

Молекулы и микрочастицы, проникающие в клетку путём эндоцитоза, условно обозначены как зелёный треугольник и жёлтый кружок. Rab5 участвует в слиянии эндоцитированных везикул с образованием ранней эндосомы (РЭ); Rab5 и Rab4 – транспорт к поздней эндосоме (ПЭ); Rab1 регулирует транспорт от эндоплазматического ретикулума (ЭР) к комплексу Гольджи (КГ). Rab2 участвует в рециркуляции и ретроградном транспорте от КГ обратно к ЭР. Rab6 регулирует перемещения внутри КГ. Rab7 регулирует эндосомальный транспорт от ПЭ и мультивезикулярных телец (МВТ) к лизосоме. Rab4 и Rab11, а также Rab 9 и Rab 25 регулируют переработку содержимого в рециклирующих эндосомах (РЦЭ) и транспортировку к плазматической мембране (ПМ). Rab27a и Rab35 участвуют в стыковке МВТ с плазматической мембраной; Rab 11 и Rab35 – в высвобождении везикул. В секреции везикул участвуют также Rab5a и Rab9a, усиливая выход экзосом.

Fig. 2. Scheme of exosome biogenesis and participation of cellular proteins of Rab family.

Molecules and microparticles that penetrate into the cell by endocytosis are conventionally designated as a green triangle and a yellow circle. Rab5 participates in the fusion of endocytized vesicles to form an early endosome (EE); Rab5 and Rab4 – to the late endosome (LE); Rab1 regulates transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi complex (GC). Rab2, on the contrary, participates in recycling and retrograde transport from GC back to ER. Rab6 regulates movements within GC. Rab7 regulates endosomal transport from LE and multivesicular bodies (MVB) to the lysosome. Rab4 and Rab11, as well as Rab 9 and Rab 25 regulate the processing of contents in recycling endosomes (RCE) and transport to the plasma membrane (PM). Rab27a and Rab35 are involved in the docking of MVB with the plasma membrane; Rab 11 and Rab35 are involved in the release of vesicles. Rab5a and Rab9a are also involved in the secretion of vesicles, enhancing the release of exosomes.

сортировку содержимого, а также сенсорную и сигнальную функции, реагируя на внутри- и внеклеточные ситуации [21]. Участки мембраны выгибаются внутрь эндосомы и отпочковываются, создавая множественные внутрипросветные (интралюминальные) везикулы (ИЛВ), которые образуют мультивезикулярные тельца (МВТ). Интернализированные материалы, инкорпорированные в ИЛВ, из МВТ направляются по одному из трёх возможных путей (рис. 2): первый – в рециклирующие эндосомы для переработки, затем к плазматической мембране или к комплексу Гольджи; второй – к лизосоме для слияния с лизосомой и деградации; третий – к плазматической мембране для слияния и высвобождения в окружающую среду в виде экзосом.

В биогенезе экзосом участвуют многочисленные клеточные белки [22]. Довольно подробно изучены белки Rab, принадлежащие семейству консервативных клеточных ГТФаз суперсемейства Ras, включающего более 60 членов, причём одна клетка может содержать более 40 различных белков Rab [23]. Участие отдельных белков Rab в разных стадиях биогенеза экзосом отражено на рис. 2. Важную роль в биогенезе экзосом также играют белки эндосомального сортировочного комплекса ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), включая ESCRT-0, -I, -II, -III и вспомогательные белки, в том числе Vps4 АТФазы. ESCRT-0, -I и -II участвуют в селективной сортировке убиквитинированных молекул; комплекс ESCRT-III и Vps4 – в инвагинации мембран и формировании ИЛВ, составляющих МВТ [24].

Роль экзосом в вирусных инфекциях

Исследования показали, что в экзосомах могут находиться и передаваться клеткам-реципиентам нуклеиновые кислоты, белки и даже вирионы оболочечных вирусов (рис. 1). Для создания условий, способствующих размножению и распространению, вирусы используют различные стратегии, влияя на регуляторные механизмы клетки и организма, в том числе на биогенез экзосом. В следующих разделах обзора будут рассмотрены основные результаты, отражающие участие экзосом в четырёх широко распространённых и социально значимых вирусных инфекциях, возбудителями которых являются вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), вирус гепатита В (ВГВ), вирус гепатита С (ВГС) и коронавирус SARS-CoV-2.

Экзосомы и инфекция ВИЧ-1

После заражения клеток ВИЧ-1 рекрутирует комплексы ESCRT-I, -II и -III, которые участвуют в процессах взаимодействия вируса с клеткой на разных стадиях жизненного цикла вируса [25]. Для сборки ВИЧ-1 привлекаются белки комплекса ESCRT-I – TSG101 и Alix. Эти же компоненты необходимы для высвобождения ВИЧ-1 из заражённой клетки [26, 27]. В процессе выхода из клетки участвует белок Gag ВИЧ-1, который накапливается и закоревается на плазматической мембране. Изучение ключевого компонента ESCRT – TSG101 с использованием системы

CRISPR/Cas9 в клетках человека, инфицированных ВИЧ-1, подтвердило колокализацию клеточного белка TSG101 с белком Gag ВИЧ-1 в местах сборки вируса. Подавление или повышение экспрессии гена TSG101 сильно влияет на выход новых вирионов из мембран заражённых клеток и на продукцию ВИЧ-1. Таким образом, взаимодействие TSG101 с Gag ВИЧ может служить потенциальной мишенью для противовирусной терапии [28–30]. Сборку вирусных частиц и секрецию экзосом также регулируют белки семейства Rab [31].

Роль экзосом в патогенезе ВИЧ-инфекции неоднозначна. Показано, что экзосомы из Т-клеток содержат большое количество молекул CD4⁺, которые конкурируют с клетками хозяина за связывание с белками ВИЧ-1, препятствуя таким образом распространению вируса. Противовирусное действие могут проявлять также экзосомы, выделяемые из семенной жидкости, грудного молока и других биологических жидкостей, подавляя репликацию ВИЧ-1 [32]. С другой стороны, экзосомы из клеток, инфицированных ВИЧ-1, способны индуцировать активацию CD4⁺-Т-лимфоцитов и репликацию вируса, в том числе в латентно инфицированных клетках, что может привести к мобилизации латентного резервуара ВИЧ в организме [33].

Экзосомы и вирус гепатита В

Несмотря на использование эффективной профилактической вакцины, гепатит В продолжает оставаться важной проблемой здравоохранения, поскольку современные методы терапии не могут вылечить хронические формы гепатита. Отчасти этому способствует отсутствие достаточно полного представления о путях сборки и высвобождения ВГВ. Считается, что входжение ВГВ в клетку происходит посредством эндоцитоза, в интернализации ВГВ и транспортировке из РЭ в ПЭ участвуют Rab5 и Rab7 [34]. Интересно, что на поздних стадиях репликации ВГВ тот же Rab7 способствует транспортировке вирусных частиц в лизосомы для их деградации [35]. Помимо белков Rab, которые действуют как молекулярные переключатели в транспорте везикул при ВГВ инфекции, вирус использует комплексы белков ESCRT [36, 37]. Важно, что интактные вирионы ВГВ могут высвобождаться в виде экзосом и передаваться не только в чувствительные, но и в нечувствительные к заражению клетки [38]. Таким образом, для обеспечения собственной репликации и распространения ВГВ использует эндоцитарный путь с участием клеточных систем Rab и ESCRT.

Исследования продемонстрировали, что экзосомы могут играть определённую роль в диагностике и лечении гепатита В. У пациентов с активной репликацией ВГВ (HBeAg-положительных) обнаружены более высокие уровни некоторых микроРНК (miR) в ВВ плазмы крови по сравнению с HBeAg-отрицательными, и уровни этих miR коррелировали с уровнями ДНК ВГВ и поверхностного антигена вируса (HBsAg) [39]. Сравнительное изучение экзосом в крови здоровых волонтеров, носителей ВГВ и больных

хроническим гепатитом В привело к выводу, что экзосомальные микроРНК могут служить биомаркерами для выявления разных стадий инфекции, вызванной ВГВ [40]. Отмечено, что тетраспанин CD63, ассоциированный с ИЛВ и экзосомами, колокализован со структурными белками ВГВ LHBs и core (Hbc). Подавление экспрессии CD63 РНК-интерференцией показало, что тетраспанин CD63 влияет на сборку ВГВ и его инфекционность [41]. Другие авторы выделяли экзосомы из культурального супернатанта гепатоцитов HepAD38, реплицирующих ВГВ (линия, аналогичная HepG2.2.15), и использовали их для обработки человеческих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) [42]. Экзосомы проникали в моноциты, но не в лимфоциты, и это приводило к повышению экспрессии PD-L1 на поверхности моноцитов и снижению экспрессии CD69 – маркера активированных иммунных клеток. Соответственно, экзосомы, секретлируемые клетками HepAD38, способны вызывать иммуносупрессию, истощение Т-клеток и потенциально могут способствовать прогрессированию ВГВ-инфекции. В то же время препараты, ингибирующие обратную транскриптазу ВГВ (энтекавир, ламивудин и тенофовир), изменяют содержимое экзосом таким образом, что это может ослаблять иммуностимулирующий потенциал вируса [42]. Для более детальной оценки влияния экзосом на патогенез гепатита В необходимы дальнейшие исследования.

Экзосомы и вирус гепатита С

ВГС вызывает острую инфекцию, которая в большинстве случаев переходит в хронический гепатит (ХГС) и прогрессирует в фиброз, цирроз и гепатоцелюлярную карциному. ХГС определяется более чем у 50 млн людей, однако вакцины против гепатита С пока нет, а препараты прямого противовирусного действия недоступны для многих пациентов из-за высокой стоимости, не препятствуют повторному инфицированию и рецидивам гепатоцелюлярной карциномы на фоне терапии препаратами прямого противовирусного действия. Это означает, что для разработки новых средств и, главное, для понимания патогенеза инфекции необходимы более детальные знания жизненного цикла вируса и взаимодействия его с клеточными процессами. Изучение жизненного цикла ВГС показало, что он может высвобождаться из клетки в составе экзосом, пройдя эндосомальный путь [43, 44]. В прохождении этого пути участвуют две клеточные системы – ESCRT и комплекс белков семейства Rab [45–48]. Активное участие белков семейства Rab наводит на мысль о возможном получении ингибиторов, которые могут подавить или блокировать ВГС-инфекцию. Пока такие ингибиторы не получены, но поиск путей воздействия на Rab ГТФазы продолжается [49]. Белки оболочки и белок core ВГС обнаружили в ИЛВ в составе MBV, это показало, что эти белки локализованы и в экзосомах, причём для высвобождения ВГС в экзосомах критичен компонент ESCRT-0 HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) [50, 51]. Интересно, что HRS

требуется также для секреции экзосом из дендритных клеток и представления антигена через экзосомы [52]. Авторы полагают, что более полное понимание взаимодействия ВГС с клеточными путями ESCRT поможет выбрать новые мишени для противовирусной терапии широкого спектра действия [53]. Обнаружение в экзосомах структурных и неструктурных белков и РНК ВГС позволяет рассматривать экзосомы как источник циркулирующих биомаркеров, связанных с патологическими процессами при гепатите С. Это особенно важно для диагностики хронических гепатитов, так как эффективность современных неинвазивных методов признаётся международными экспертами серьёзным препятствием для успешного лечения хронических заболеваний [54, 55].

Содержимое экзосом значительно варьирует в зависимости от природы клеток-доноров, физиологи-

ческого состояния, изменения внутриклеточной активности, микроокружения. В связи с этим особый интерес представляют циркулирующие экзосомы, полученные только из клеток печени. К преимуществам экзосом по сравнению с циркулирующими белками и комплексами РНК можно отнести высокую стабильность в биологических жидкостях, которую обеспечивают двухслойные липидные мембраны. Важно отметить, что изменения в экзосомах могут быть обнаружены на более ранних стадиях, чем явное повреждение тканей или другие клинические и гистологические признаки, как это было установлено на модели неалкогольного стеатогепатита у мышей [56]. Диагностика гепатита С проводится серологическими и молекулярными методами, которые позволяют оценить вирусную нагрузку и иммунный статус пациента. Развитие диагностических подходов на основе экзосом может дополнить и улучшить оценку повреждения печени и выявить ранние маркеры повышенного риска развития гепатокарциномы неинвазивными методами. Одна из проблем использования экзосом как биомаркеров ХГС состоит в том, что из большого пула циркулирующих экзосом технически сложно вычленили экзосомы, образовавшиеся в клетках печени [57]. Преодоление этих трудностей откроет новые возможности в диагностике ХГС, в том числе применение жидкой биопсии.

Эксперименты показали, что очищенные экзосомы из ВГС-инфицированных клеток гепатомы человека Huh7.5.1 содержали полноразмерную вирусную РНК, белки и вирусные частицы и были способны передавать продуктивную инфекцию ВГС незаражённым гепатоцитам [58]. Кроме того, определили, что антитела от больных гепатитом С лишь частично нейтрализовали ВГС-инфекцию, переданную через экзосомы, по сравнению со свободным вирусом. Это свидетельствует о том, что передача ВГС с экзосомами потенциально может быть одним из механизмов ускользания от иммунного ответа при гепатите С [58]. Для ответа на вопрос, возможно ли распространение ВГС через экзосомы, анализировали, может ли вирус использовать экзосомы для независимой от рецепторов передачи ВГС гепатоцитам [59]. Показали, что в сыворотках крови всех пациентов, инфицированных ВГС и не ответивших на лечение (интерферон α -2b (ИФН) + рибавирин), а также некоторых лиц, не получавших лечение, присутствовали экзосомы, содержащие минус-цепь РНК ВГС, образующуюся в процессе репликации вирусной РНК. Определили, что РНК ВГС в экзосомах находилась в комплексе с белком argonaute-2 (Ago2), белком теплового шока 90 (HSP90) и микроРНК miR-122 (рис. 3). Полученные данные, по мнению авторов, доказывают возможность передачи ВГС через циркулирующие экзосомы и указывают на потенциальные терапевтические стратегии, основанные на подавлении передачи ВГС через экзосомы. Однако следует отметить, что факт обнаружения антисмысловой цепи может и не говорить о передаче вируса при участии экзосом, так как её передача в клетки не обеспечит трансляцию генома вируса и образования белков ВГС

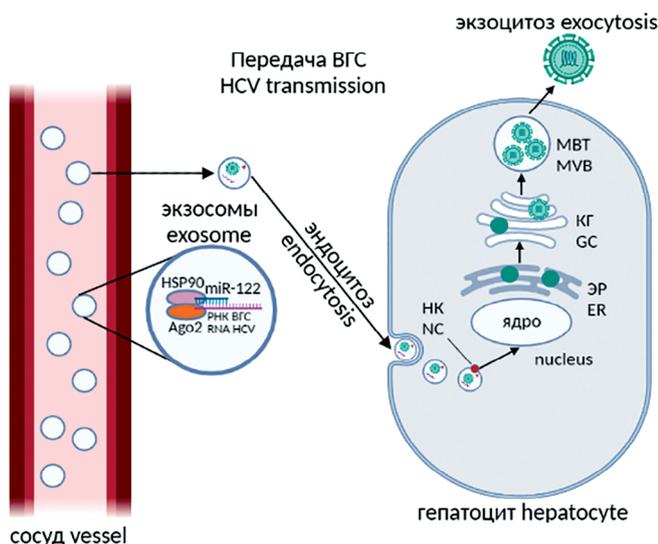


Рис. 3. Схематическое представление передачи вируса гепатита С через экзосомы.

В сыворотках крови пациентов с гепатитом С обнаружены экзосомы, содержащие РНК ВГС в комплексе с микроРНК (miR-122), белком теплового шока HSP90 и белком argonaute-2 (Ago2). Экзосомы способны проникать в незаражённые клетки, в том числе в гепатоциты, путём эндоцитоза. В гепатоцитах, захвативших экзосомы, содержащие вирусную РНК, наблюдается продуктивная ВГС-инфекция, которая может передаваться через вирусные частицы в высвобождающихся экзосомах. Таким образом, распространение вируса возможно через экзосомы, минуя клеточные рецепторы. НК – нуклеокапсид ВГС, ЭР – эндоплазматический ретикулум, КГ – комплекс Гольджи, МВТ – мультивезикулярные тельца (по T.N. Bukong и соавт. [59]).

Fig. 3. Schematic representation of hepatitis C virus transmission through exosomes.

Exosomes containing HCV RNA in combination with microRNA (miR-122), heat shock protein HSP90 and argonaute-2 protein (Ago2) were found in the blood sera of patients with hepatitis C. Exosomes are able to penetrate uninfected cells, including hepatocytes, by endocytosis. In hepatocytes that have captured exosomes containing viral RNA, a productive HCV infection is observed, which can be transmitted through viral particles in the released exosomes. Thus, the spread of the virus is possible through exosomes, bypassing cellular receptors. NC – HCV nucleocapsid, ER – endoplasmic reticulum, GC – Golgi complex, MVB – multivesicular bodies, сосуд – vessel, экзосомы – exosomes, гепатоцит – hepatocyte, ядро – nucleus, эндоцитоз – endocytosis, экзоцитоз – exocytosis (according to T.N. Bukong, et al. [59]).

– компонентов репликационного комплекса. Интересно, что экзосомы могут оказывать и противоположный эффект. Так, экзосомы, содержащие РНК ВГС, были способны транспортировать вирусную РНК к дендритным клеткам (pDC), РНК ВГС действовала на TLR7, активировала pDC, стимулировала синтез и секрецию ИФН- α , что вызывало подавление репликации ВГС и распространения вируса [60, 61].

Потенциал экзосом в терапии гепатита С

Протеомный анализ выявил около 250 белков в ВВ, полученных из первичных гепатоцитов крысы [62]. В циркулирующих ВВ здоровых людей идентифицировано около 70 белков, большинство из которых участвуют в транспорте везикул [63]. Помимо классических маркеров, обнаруженных в большинстве ВВ из других типов клеток, в экзосомах из гепатоцитов обнаружены и специфичные компоненты. Кроме того, практически все типы иммунных клеток, включая Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, макрофаги, клетки Купфера и нейтрофилы, продуцируют экзосомы. В связи с этим большой интерес представляют исследования, направленные на выяснение связи между патологическими изменениями в печени и содержимом экзосом из клеток печени больных гепатитом. Исследования показали, что ВВ/экзосомы, высвобождающиеся из гепатоцитов, в отличие от экзосом из других клеток печени, имеют повышенный уровень изоформы 2E1 цитохрома P450 (CYP 2E1) и асиалогликопротеинового рецептора 1 [24]. Предполагают, что печень высвобождает CYP-содержащие ВВ для стимулирования метаболизма лекарств в других клетках, которые поглощают эти везикулы. В работе также приводится перечень молекул, обнаруженных в ВВ, которые ассоциированы с развитием патологий печени [24]. Клетки печени могут быть как донорами, так и реципиентами экзосом, что определяет сложные связи между различными клетками печени, которые осуществляются белками, а также мРНК и микроРНК. Экзосомы потенциально могут использоваться как биомаркеры при различных заболеваниях печени [64]. Так, при гепатите С в экзосомах из сыворотки крови определили увеличение содержания четырёх miR; при алкогольном гепатите экзосомы, полученные из гепатоцитов, содержат miR, которые ассоциируются с гипертрофией; при гепатоцеллюлярной карциноме в экзосомах обнаруживали молекулы CEACAM1/6 (Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules), связанные с прогрессированием опухоли [64].

Отмечают, что использование ВВ имеет ряд преимуществ по сравнению со свободными белками и нуклеиновыми кислотами, в том числе:

- 1) нуклеиновые кислоты не реплицируются после введения;
- 2) содержащиеся в экзосомах вещества могут обладать более низкой иммуногенностью;
- 3) обладают высокой способностью преодолевать тканевые и клеточные барьеры;

4) устойчивы к деградации протеазами в циркуляции и к замораживанию/оттаиванию при длительном хранении [65].

Один из терапевтических подходов для подавления персистентной ВГС-инфекции предлагается в работе [66]. Показано, что соединения, нарушающие эндосомальный путь формирования экзосом и выход везикул из клетки, значительно подавляют репликацию вируса в клетках Huh7.5, заражённых химерным ВГС, содержащим зелёный флуоресцирующий белок (GFP), и при этом не влияют на жизнеспособность самих клеток. Другие подходы могут быть направлены на удаление циркулирующих экзосом, содержащих вирионы или РНК ВГС, а также на предотвращение их вхождения в клетки-мишени. «Вредные» экзосомы можно вывести из кровообращения, например, с использованием методов, аналогичных удалению циркулирующих антител с помощью экстракорпорального диализа. Описаны и другие стратегии снижения или отбора конкретных типов экзосом [67, 68]. Большинство работ по оценке роли экзосом в терапии гепатита С выполнены с использованием мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК). Клеточная терапия на основе МСК привлекает многих исследователей, экзогенные или активированные эндогенные МСК используются более чем в 1200 клинических испытаниях [69]. Клинические исследования показали, что терапия МСК уменьшает повреждение печени, улучшает её функцию и способствует регенерации тканей. При острой или хронической печёночной недостаточности применение МСК повышает выживаемость пациентов и обладает хорошей переносимостью и безопасностью [70]. X. Qian и соавт. в 2016 г. впервые показали способность экзосом, продуцируемых МСК, подавлять ВГС-инфекцию [71]. В этих экспериментах экзосомы, секретируемые из МСК пуповины (uMSC-Exo), были не токсичны и ингибировали репликацию ВГС *in vitro*. Этому способствовали определённые miR из экзосом. Кроме того, экзосомы из uMSC усиливали эффект ИФН- α и телупревира, используемых для лечения ХГС.

Серьёзную проблему для лечения всех заболеваний печени, в том числе гепатита С, представляет фиброз печени, возникающий при хроническом повреждении органа. Ключевую роль в этом процессе играют активированные stellate клетки печени (СКП), которые превращаются в миофибробласты, усиливающие отложение внеклеточного матрикса в печени и, как следствие, прогрессию фиброза [72]. ВВ и экзосомы могут играть разнонаправленные роли в фиброзе печени. Авторы [73] показали, что miR-19a из ВГС-инфицированных гепатоцитов активирует путь STAT3-TGF- β и в результате СКП. MiR-192 из клеток, инфицированных ВГС *in vitro*, также была способна активировать СКП путём повышения уровня TGF β в stellate клетках [74]. В других исследованиях получены противоположные эффекты. Экзосомы, полученные из стволовых клеток печени человека, подавляли профиброзную активность stellate клеток *in vivo* [75], и этот эффект связывали с достав-

кой антифиброзных miR-146a-5p через экзосомы [76]. Сообщалось, что экзосомы из МСК костного мозга могут ингибировать активацию СКП *in vivo* и *in vitro* через путь Wnt/ β -катенина [77]. Показано, что miR-486-5p, содержащаяся в экзосомах из МСК миндалин человека, связывается с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК SMO и ингибирует его экспрессию, и это приводит к инактивации СКП [78]. Определено, что при фиброзе печени miR-150-5p слабо экспрессирована, а хемокин CXCL1 экспрессирован сильно. Перенос miR-150-5p в СКП с помощью ВВ, выделяемых из МСК, ингибировало активацию СКП путём подавления экспрессии CXCL1 [79]. ВВ из сывороток здоровых мышей вводили мышам с экспериментально вызванным фиброзом печени и наблюдали снижение уровней гибели гепатоцитов, воспаления, ферментов аспартатаминотрансферазы/аланинаминотрансферазы и провоспалительных цитокинов в печени и периферической крови. ВВ из сывороток фиброзных мышей такого действия не оказывали [80]. Показано, что основными мишенями ВВ были активированные СКП. В ВВ нормальных мышей по сравнению с ВВ фиброзных мышей были более высокие уровни ряда miR. Каждая miR могла независимо подавлять экспрессию фиброгенных генов в активированных СКП. Сходные результаты получены с человеческими активированными СКП в культуре: ВВ из сывороток здоровых людей снижали уровень активации СКП и содержали более высокие уровни miR, чем ВВ от пациентов с фиброзом печени.

Оценка роли ВВ/экзосом в фиброзе печени позволяет заключить, что:

1) на СКП и развитие фиброза могут влиять ВВ и экзосомы из различных источников – МСК, гепатоцитов, плазмы крови, иммунных клеток;

2) действие ВВ и экзосом происходит путём переноса содержащихся в них биологически активных молекул, в том числе белков, мРНК, miR в активированные СКП;

3) ВВ и экзосомы, проникшие в активированные СКП, способны ингибировать молекулярные пути, в которых участвуют LPS/TLR, STAT3/Bcl-2/Beclin-1, TGFB/SMAD, Wnt/Beta-catenin и др.;

4) при фиброзе печени поглощение ВВ активированными СКП снижает их пролиферацию, созревание коллагена, уровень провоспалительных цитокинов и повышает аутофагию.

Таким образом, миофибробласты могут вернуться в состояние покоя [81]. Высказывается предположение, что сывороточные ВВ и экзосомы от здоровых людей по своей природе являются антифиброгенными и антифиброзными и содержат miR, которые оказывают терапевтическое действие на активированные стеллатные клетки или повреждённые гепатоциты [80]. Отмечается, что специфические изменения состава (профиля) miR в ВВ могут рассматриваться как возможные диагностические биомаркеры для дифференциации различных типов и стадий прогрессирования хронических гепатитов [82]. В то же время результаты исследования [83] показали, что ВВ/эк-

зосомы, содержащие определённые miR, могут рассматриваться и как потенциальные терапевтические агенты. Интересные данные получены при изучении натуральных киллеров (НК-клеток), которые участвуют в активации СКП [84] и могут влиять на функции клеток-мишеней через секрецию экзосом [85]. Определено, что НК-клетки (линия NK-92MI) секретируют экзосомы (НК-Ехо). После очистки НК-Ехо вносили в культуру активированных СКП человека линии LX-2 и мышам с CCl₄-индуцированным фиброзом (рис. 4). Обработка НК-Ехо значительно подавляла пролиферацию и активацию СКП *in vitro*. Кроме того, НК-Ехо снижали уровень фиброза у мышей [86]. Предположительно эффект связан с действием miR-223, которая экспрессируется в экзосомах НК-Ехо на высоком уровне. Действительно, подавление экспрессии miR-223 в НК-Ехо отменяло ингибирующее действие НК-Ехо на активацию СКП. С помощью программы Targetscan установлено, что предполагаемой мишенью miR-223 является ATG7 – один из маркеров аутофагии [87]. Экспериментальный анализ показал, что ATG7 является прямой мишенью miR-223. Так как аутофагия может участвовать в активации СКП, можно сделать вывод, что экзосомы из НК-клеток подавляют активацию СКП именно за счёт переноса miR-223, которая ингибировала аутофагию в результате взаимодействия с ATG7 [88]. Эти данные сходны с результатами, показавшими, что блокирование аутофагии ингибирует развитие фиброза печени [89, 90]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований по разработке системы доставки экзосом для лечения патологий печени, включая хронические вирусные гепатиты. В то же время вопрос о том, каким образом клетки-реципиенты распознают ВВ и как ВВ взаимодействуют с клетками-мишенями *in vivo*, пока не решён. Упоминаются разные молекулы на поверхности клеток-реципиентов, с которыми могут связываться ВВ [91]. Модель для изучения функции ВВ *in vivo* разработали на основе анализа экспрессии CD63-фторина у эмбрионов рыбок данио. Обнаружив экзосомы в циркуляции, авторы определили, что в эндцитозе везикул участвуют патрулирующие макрофаги и эндотелиальные клетки в хвостовой части эмбриона [92]. Роль макрофагов в распознавании экзосом отмечена также в работе на мышах [93], показавшей, что в распознавании макрофагами внутривенно введённых экзосом важен отрицательный заряд фосфатидилсерина в экзосомных мембранах.

Рассматривая экзосомы, ВВ, а также ВВ, выделяемые из МСК (МСК-ВВ), отмечают растущий интерес к роли МСК-ВВ в заболеваниях печени [94]. МСК-ВВ более удобны и менее иммуногенны, чем МСК, не приживляются, имеют высокий тропизм к печени, не вызывают aberrантной дифференцировки стволовых клеток, не проявляют иммуногенности и риска канцерогенеза. Бесклеточная терапия МСК-ВВ, а также ВВ, модифицированные противовирусными молекулами, открывают новые перспективы для лечения заболеваний печени.

Экзосомы для профилактики гепатита С

Свойства экзосом позволяют рассматривать их как потенциальные вакцины. Однако пока работ в этом направлении не много. Отмечается, что, благодаря способности циркулировать в организме и достигать периферические органы, экзосомы способны улучшить распределение антигенов [95]. Показано, что экзосомы из инфицированных ВГС клеток, содержащие РНК ВГС, могут индуцировать продукцию ИФН- α в неинфицированных плазмацитоподобных дендритных клетках [60]. Экспорт вирусной РНК с экзосомами может служить как стратегией вируса для уклонения от обнаружения патогена, так и стратегией хозяина для индукции иммунного ответа. Показана способность экзосом проникать в гепатоциты, инфицированные вирусом гепатита В, и передавать ИФН- α , активируя соответствующий противовирусный каскад [96]. Этот и другие результаты предполагают, что экзосомы могут быть не только переносчиками антигенов, но и индукторами иммунного ответа.

Экзосомы и коронавиральная инфекция

Коронавирусы могут входить в клетку путём либо прямого слияния вирусной мембраны с плазматической мембраной клетки, либо эндоцитоза. Получены данные о возможном участии экзосом во вхождении коронавируса в клетки-мишени. Установлено, что в состав белковых комплексов с клеточными рецепторами коронавируса и протеазой TMPRSS2 входят тетраспанины CD9, которые, наряду с CD81 и CD63, встроены в мембрану экзосом [97]. Образовавшиеся комплексы

обеспечивают быстрое и эффективное вхождение коронавируса. При отсутствии CD9 вирусы проникают с участием катепсинов, но гораздо позже и менее эффективно [98]. Экзосомы, высвободившиеся из клеток, инфицированных коронавирусом, могут способствовать проникновению вируса в неинфицированные клетки путём переноса молекул CD9.

Экзосомы в патогенезе COVID-19

Экзосомы у больных COVID-19 могут содержать вирусные РНК, белки и даже вирионы SARS-CoV-2 [99, 100]. В одной из работ, выполненных в этом направлении [101], выделяли экзосомы из плазмы крови 20 пациентов с COVID-19 и 8 здоровых волонтеров и провели протеомный анализ содержимого экзосом. Показано, что содержание 163 белков из 1637 идентифицированных значительно превышает таковое в экзосомах здоровых лиц. Содержание двух белков – тенасцина-С (TNC) и фибриногена- β (FGB) изменялось особенно сильно – более чем в 200 и 700 раз соответственно. Для выяснения возможности переноса содержимого экзосом в другие клетки использовали иммортализованные гепатоциты ИНН и Huh7. В клетках обеих линий наблюдали присутствие TNC и FGB, причём более высокое содержание этих белков обнаружили в гепатоцитах, обработанных экзосомами от пациентов с COVID-19. Так как TNC – иммуномодулятор, который может индуцировать хроническое воспаление [102], а повышенный уровень FGB в крови связан с сосудистыми нарушениями, наблюдаемыми при COVID-19, исследовали возможную

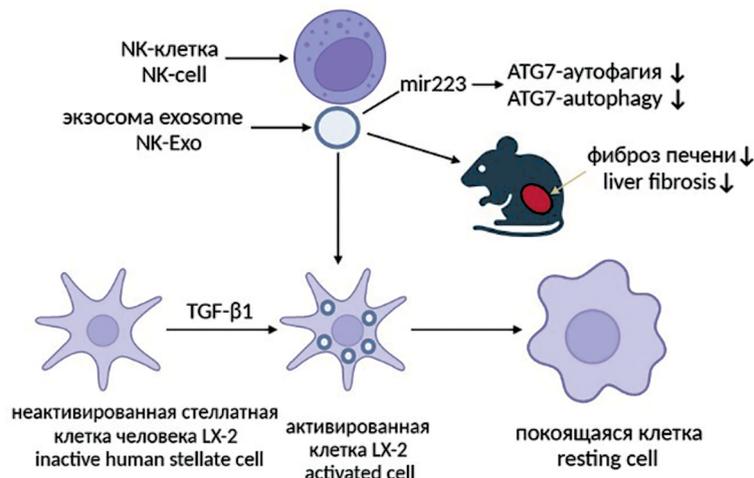


Рис. 4. Экзосомы из клеток натуральных киллеров (NK) снижают уровень экспериментального фиброза печени.

Неактивные stellatные клетки печени человека линии LX-2 активировали с помощью TGF- β 1 и затем обрабатывали экзосомами, выделенными из клеток NK – NK-Exo. В результате активность stellatных клеток была подавлена. Введение NK-Exo мышам с экспериментально вызванным фиброзом приводило к снижению уровня фиброза. Антифибротическое действие NK-Exo ассоциировалось с высоким уровнем экспрессии микроРНК miR-223, направленной на белок аутофагии ATG7 и подавление его функции. Блокада аутофагии вызывала снижение уровня фиброза печени (по L. Wang и соавт. [86, 88]).

Fig. 4. Exosomes from natural killer (NK) cells reduce the level of experimental liver fibrosis.

Inactive human hepatic stellate cells of the LX-2 line were activated with TGF- β 1 and then treated with exosomes isolated from NK cells – NK-Exo exosomes. As a result, human liver stellate cells activity was suppressed. The injection of NK-Exo into mice with experimentally induced fibrosis led to a decrease in the level of fibrosis. The antifibrotic effect of NK-Exo was associated with a high level of miR-223 expression directed at the autophagy protein ATG7 and suppression of its function. The blockade of autophagy caused a decrease in the level of liver fibrosis (according to L. Wang, et al. [86, 88]).

связь экзосом с воспалением. Для этого была изучена экспрессия фактора некроза опухоли α (TNF- α), интерлейкина 6 (IL-6) и хемокинового лиганда 5 (CCL5) в гепатоцитах, подвергшихся воздействию экзосом от пациентов с COVID-19 и от здоровых лиц. Оказалось, что экспрессия цитокинов и хемокина в гепатоцитах была значительно повышена только после обработки экзосомами от пациентов с COVID-19 и ассоциировалась с активацией NF- κ B в гепатоцитах (рис. 5 а). Это указывает на потенциальную возможность экзосом из плазмы крови больных COVID-19 индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов и вызывать клинические проявления заболевания, ассоциированного с SARS-CoV-2 не только в лёгких, но и в гепатоцитах – клетках удалённого органа. Этот вывод подтверждается наблюдениями о внелёгочных проявлениях COVID-19 [103].

Роль ВВ/экзосом в инфекции SARS-CoV-2 изучалась также в опытах с эпителиальными клетками лёгких A549 [104]. Показано, что после трансдукции лентивирусом, кодирующим два неструктурных (Nsp1 and Nsp12) и два структурных (envelope E и nucleocapsid N) белки SARS-CoV-2, ВВ, выделенные из клеток A549, содержат вирусную РНК (рис. 5 б). ВВ использовали для обработки кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (hiPSC-CMs). Методом qRT-PCR в кардиомиоцитах были обнаружены мРНК всех четырёх вирусных генов. Кроме того, в кардиомиоцитах, содержащих Nsp1, значительно увеличивалась экспрессия провоспалительных генов IL-1 β , IL-6 и MCP1. Полученные данные указывают на то, что клетки, которые не экспрессируют рецептор ACE2 SARS-CoV-2, могут получать вирусную генетическую информацию путём поглощения ВВ/экзосом, а экспрессия вирусных генов может способствовать усилению воспаления, что характерно для патогенеза COVID-19. В то же время ВВ/экзосомы могут доставлять ACE2 в клетки, которые не экспрессируют или слабо экспрессируют рецептор SARS-CoV-2, транспортируя белок от других клеток [105]. В плазме крови пациентов с COVID-19 идентифицировали экзосомы, содержащие ACE2 (ACE2+), и показали [106], что экзосомы ACE2+ конкурируют с клеточным ACE2 за нейтрализацию SARS-CoV-2, дозозависимо блокируя связывание вирусного S-белка с клетками ACE2+ (рис. 5 в). Экзосомы, содержащие ACE2, в 120–135 раз более эффективно блокировали связывание рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка по сравнению с рекомбинантным человеческим ACE2 (rhACE2), не связанным с везикулами [107]. Кроме того, экзосомы ACE2+ в 60–80 раз более эффективно защищали трансгенных мышей, экспрессирующих ген *ace2* человека, от повреждения лёгких и гибели после интраназального заражения SARS-CoV-2. Экзосомы ACE2+ ингибировали инфекцию вариантов α , β и δ SARS-CoV-2, содержащих мутации в RBD, с равной или более высокой эффективностью, чем штамм дикого типа. Этот результат показал, что экзосомы, содержащие ACE2, могут служить основой для разработки терапевтических средств широкого спектра действия

против существующих и будущих коронавирусов, которые используют рецептор ACE2 [108].

Интересные данные получены при обследовании пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания [109]. Представлены количественные данные изучения 1002 метаболитов в плазме крови, показавшие значительное увеличение содержания ганглиозидов GM3, которое коррелировало со снижением количества циркулирующих CD4⁺-Т-клеток у пациентов с COVID-19 и прогрессирующим увеличением показателей системного воспаления, включая С-реактивный белок, IL-6, скорость оседания эритроцитов, сывороточный ферритин и прокальцитонин по мере увеличения тяжести заболевания. Сравнительный анализ выявил сильную связь между тяжестью заболевания и обнаружением в сыворотках крови экзосом, несущих ганглиозиды (GM3) (рис. 5 г). Показано, что GD3, присутствующие на поверхности экзосом в микроокружении опухоли, подавляют функции Т-клеток, способствуя иммуносупрессии [110]. Ганглиозиды присутствуют во всех клетках позвоночных, экспрессируются на наружной поверхности плазматических мембран клеток [111], специфически связываются с регуляторными белками и другими молекулами, модулируют активность белков клеточной поверхности и действуют как рецепторы при межклеточных взаимодействиях, являются мишенями для патогенов, в том числе SARS-CoV-2 [112]. Таким образом, обнаруженные в циркуляции экзосомы, содержащие ганглиозиды, могут утяжелять течение COVID-19 через нарушение клеточных регуляторных путей и иммунного ответа [113].

Одним из проявлений COVID-19 является образование тромбов. Клиническое исследование показало, что у пациентов с COVID-19 в циркуляции присутствуют ВВ, содержащие активные молекулы CD142, тесно связанные с повышенной прокоагулянтной активностью (рис. 5 д). Высвобождение ВВ, содержащих CD142, из эндотелиальных клеток ассоциируется с провоспалительной активностью [114]. На состояние сосудистой системы при COVID-19 влияют также ВВ из тромбоцитов, нагруженные CD142. В циркуляции больных COVID-19 количество таких везикул значительно увеличивается. Определена прямая взаимосвязь между циркулирующими ВВ, происходящими из тромбоцитов, и тяжестью заболевания, что послужило основанием предложить эти везикулы в качестве биомаркеров для прогнозирования исходов у пациентов с COVID-19 [99, 115–117].

Суммируя, можно заключить, что участие экзосом, выделенных из клеток пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, в патогенезе COVID-19 определяется:

- а) содержанием вирусных РНК, белков и вирионов;
- б) переносом вирусных компонентов от мест проникновения (эпителий дыхательных путей) в другие органы;
- в) способностью изменять экспрессию клеточных генов, вовлечённых в патогенез COVID-19;
- г) усилением сосудистой дисфункции и цитокинового шторма.

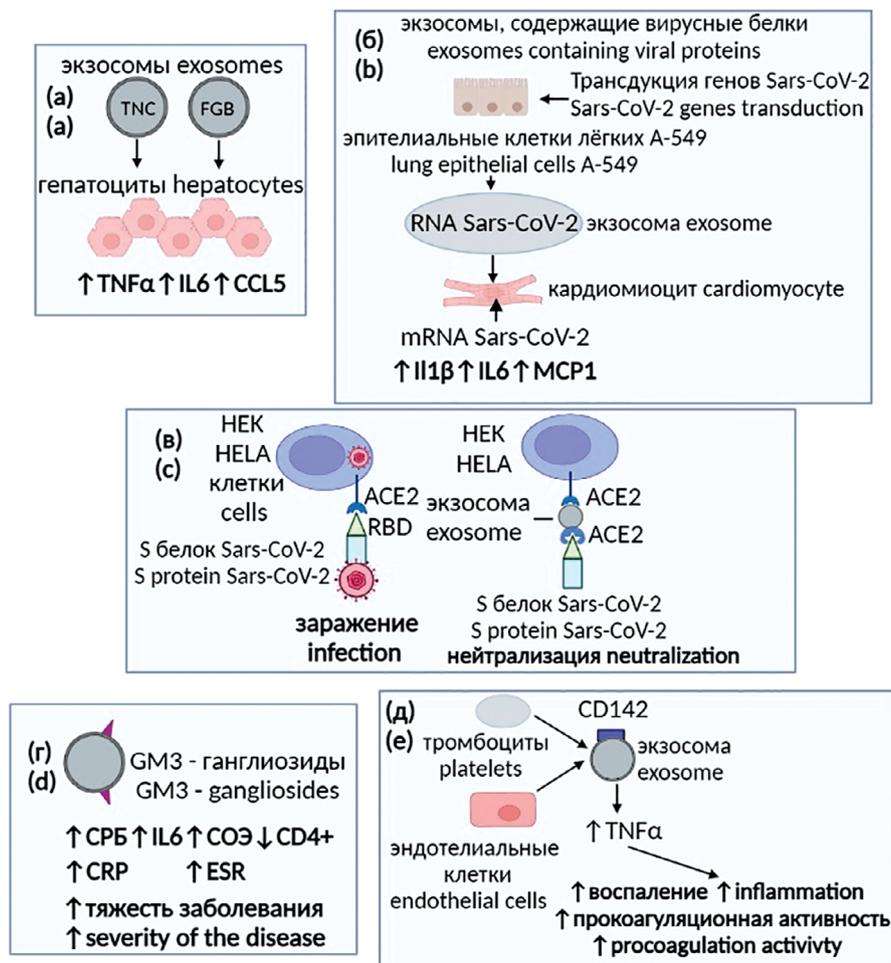


Рис. 5. Участие экзосом в патогенезе COVID-19:

- а – экзосомы, секретируемые клетками, инфицированными SARS-CoV-2, обогащены тенасцином-С (TNC) и фибриногеном-β (FGB) и, проникая в гепатоциты, инициируют продукцию TNF-α, IL-6 и CCL5 в гепатоцитах (по S. Sur и соавт. [101]);
- б – экзосомы, содержавшие гены SARS-CoV-2, вносили в культуру кардиомиоцитов и наблюдали в них экспрессию вирусных генов и значительное увеличение экспрессии генов провоспалительных цитокинов и хемокинов (по Y. Kwon и соавт. [104]);
- в – клеточный рецептор ACE2, взаимодействует с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка SARS-CoV-2, что вызывает заражение клеток (слева); в крови пациентов с COVID-19 обнаружили экзосомы, содержащие ACE2, и показали, что они конкурируют с клеточным рецептором ACE2, блокируя связывание S-белка с ACE2 клеток и нейтрализуя инфекционную активность вируса (справа) (по L. El-Shennawy и соавт. [107]);
- г – в сыворотках крови пациентов с COVID-19 обнаружили увеличение количества экзосом, несущих на поверхности ганглиозиды GM3, присутствие которых сопровождалось увеличением С-реактивного белка (СРБ), интерлейкина 6 (IL-6) и скорости оседания эритроцитов (СОЭ), снижением количества CD4⁺-клеток, а также коррелировало со степенью тяжести заболевания (по J.W. Song и соавт. [109]);
- д – экзосомы, высвобождающиеся из эндотелиальных клеток и тромбоцитов в циркуляцию у пациентов с COVID-19, содержат активные молекулы CD142 и обладают повышенной провоспалительной и прокоагулянтной активностью, прямо связаны с тяжестью заболевания (по W. Holnthoner и соавт. [114] и С. Balbi и соавт. [115]).

Fig. 5. Exosomes in the pathogenesis of COVID-19:

- a – exosomes secreted by cells infected with SARS-CoV-2 are enriched with tenascin-C (TNC) and fibrinogen-β (FGB) and, penetrating into hepatocytes, initiate the production of TNF-α, IL-6 and CCL5 in hepatocytes (according to S. Sur, et al. [101]);
- b – exosomes containing SARS-CoV-2 genes were introduced into the culture of cardiomyocytes and the expression of viral genes and a significant increase in the expression of proinflammatory cytokines and chemokines were observed in cardiomyocytes (according to Y. Kwon, et al. [104]);
- c – cell receptor ACE2 interacts with the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 S protein, causing cell infection (left); exosomes containing ACE2 were found in the blood of patients with COVID-19. They competed with the ACE2 cell receptor, blocking the binding of S protein to cells and neutralizing the infectious activity of the virus (right) (according to L. El-Shennawy, et al. [107]);
- d – in the blood sera of patients with COVID-19, an increase in the number of exosomes carrying GM3 gangliosides on the surface was found. The presence of GM3-exosomes was accompanied by an increase in C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) and ESR rate, a decrease in the number of CD4⁺ cells, and also correlated with the severity of the disease (according to J.W. Song et al. [109]);
- e – exosomes released from endothelial cells and platelets into circulation of patients with COVID-19 contain active CD142 molecules and have increased pro-inflammatory and procoagulant activity, directly related to the severity of the disease (according to W. Holnthoner, et al. [114] and C. Balbi, et al. [115]).

Экзосомы в терапии и профилактике COVID-19

Широкий спектр вакцин, используемых в настоящее время, снижает уровень инфицирования SARS-

CoV-2, однако остаётся необходимость в лечении значительного числа пациентов, у которых развиваются пневмония и другие серьезные заболевания. Среди

многочисленных средств, предлагаемых для терапии, десятки опубликованных работ, а также клинических испытаний посвящены изучению возможности использования МСК различного происхождения [69]. Показано, что МСК подавляют воспаление, улучшают состояние лёгких, не вызывают побочных эффектов и статистически значимо снижают смертность пациентов с COVID-19 [118]. Авторы заключили, что использование МСК является безопасным и эффективным методом лечения COVID-19. Исследования продолжаются, так как ни одно из тестируемых средств пока не получило разрешение на использование в терапии COVID-19.

В последнее время внимание исследователей привлекает бесклеточная терапия, которая имеет ряд преимуществ по сравнению с терапией МСК [119]. Она включает секретом МСК (набор факторов и биомолекул, секретируемых клетками) и ВВ/экзосомы, высвобождаемые из МСК. Анализ действия секретом МСК на повреждённые лёгкие крысы показал улучшение структуры лёгких, уменьшение α -SMA и снижение содержания коллагена. Это позволило предположить, что секретом МСК может представлять новый терапевтический подход к лечению такого серьёзного последствия COVID-19, как фиброз лёгких [120].

Предпосылками использования экзосом для лечения COVID-19 стали результаты работ, в которых анализировали действия экзосом при серьёзных повреждениях лёгких. Данные нескольких исследований показали, что ВВ/экзосомы, полученные из МСК костного мозга человека, оказывают положительное терапевтическое действие при остром повреждении лёгких и остром респираторном дистресс-синдроме у лабораторных животных [121]. Благодаря присутствию в экзосомах биологически активных молекул эти везикулы способны активировать регенерацию повреждённых тканей, подавлять выработку воспалительных цитокинов и модулировать функции иммунных клеток [122].

Одно из преимуществ экзосом состоит в их способности проникать в различные органы и ткани, что позволяет использовать их в качестве терапевтического средства при аэрозольной ингаляции (небулайзерная терапия) [123, 124]. Продemonстрировано, что ингаляция секретом и экзосом, полученных при культивировании клеток из лёгких мыши, содержащих эпителиальные, прогениторные клетки и МСК, способствует восстановлению лёгких при фиброзе. Наблюдается уменьшение накопления коллагена и пролиферации миофибробластов, восстанавливается типичная альвеолярная структура лёгких [125]. Ингаляционный способ введения менее болезненный, действует быстрее и при меньших дозах позволяет достичь такого же терапевтического эффекта, как при пероральной или инъекционной терапии [121].

Отмечают, что ВВ/экзосомы могут играть как положительную, так и отрицательную роль в коронавирусной инфекции. С одной стороны, ВВ могут подавлять инфекцию и предотвращать заражение, как это показано на примере ВВ, содержащих ACE2 или

ACE2 + TMPRSS2 [126, 127]. С другой стороны, ВВ могут способствовать вирусной инфекции, захватывая и распространяя вирус или вирусные компоненты и защищая их от иммунной системы. Кроме того, предполагают, что в периферической крови больных с SARS-CoV-2 присутствуют антагонистические экзосомы, которые могут снижать вирус-нейтрализующую способность плазмы крови реконвалесцентов и, вероятно, действуют как конкурентный ингибитор нейтрализующих антител [128].

Экзосомы используют в клинических исследованиях, направленных на лечение COVID-19 [129]. Оценивают потенциал экзосом в трех направлениях:

1) как везикул, секретируемых МСК из разных источников;

2) как везикул, содержащих специфические микроРНК и мРНК;

3) как везикул, доставляющих лекарства для лечения COVID-19.

С появлением коммерческих препаратов экзосом их также включают в исследования эффективности лечения. Так, проведено изучение безопасности и эффективности применения экзосом (ЕхоFlo), полученных из аллогенных МСК костного мозга, при лечении 24 пациентов с тяжёлым течением COVID-19, а также острым респираторным дистресс-синдромом средней и тяжёлой степени [130]. Внутривенное введение ЕхоFlo показало безопасность препарата, способность восстанавливать оксигенацию, подавлять цитокиновый шторм и восстанавливать иммунитет. Авторы заключили, что ЕхоFlo является многообещающим кандидатным лечебным средством при тяжёлой форме COVID-19. Суммируя данные о действии экзосом на различные клетки в лёгочной ткани, инфицированной SARS-CoV-2, авторы заключили [129], что экзосомы способны: а) взаимодействовать как с S-белком SARS-CoV-2, так и с клеточным рецептором ACE2, конкурентно подавляя проникновение вируса; б) снижать уровни провоспалительных цитокинов в сосудистых и альвеолярных клетках; повышать функции макрофагов, интерферонов, В-клеток, модулируя иммунные реакции. Эти результаты подтверждают вывод о том, что экзосомы – перспективные кандидаты для разработки вакцин.

При первых оценках возможности использования экзосом для разработки вакцин против коронавирусов за основу был принят S-белок SARS-CoV-1, вызвавший вспышку SARS в 2002–2003 гг. [131]. Препараты экзосом, содержавших S-белок, вводили мышам и показали, что двух инъекций экзосом без адьювантов было достаточно, чтобы индуцировать нейтрализующие антитела к коронавирусу. Наибольший эффект был достигнут при иммунизации вначале экзосомами, а затем аденовирусным вектором, экспрессирующим белок S. Сравнивали нейтрализующую активность антител в сыворотках крови иммунизированных мышей и сыворотках от выздоравливающих пациентов с пневмонией, вызванной SARS-CoV-1. Обнаружено, что после первой иммунизации экзосомальной вакциной и повторной стимуляции аденовирусным векто-

ром нейтрализующая активность антител превышала ту, которую наблюдали в сыворотке выздоравливающих пациентов. Высокая эффективность индукции гуморального ответа на введение экзосомальной вакцины, содержащей S-белок SARS-CoV-2, показала перспективность дальнейших исследований протективных свойств новых экзосомальных вакцин, способных предотвратить коронавирусные инфекции.

Большинство вакцин, используемых против SARS-CoV-2, предназначены для внутримышечного введения [132]. В 2022 г. сообщили о разработке и доклиническом испытании ингаляционной вакцины против COVID-19, которая после лиофилизации остаётся стабильной при комнатной температуре более трёх месяцев [133]. Вакцина содержит RBD SARS-CoV-2, конъюгированный с экзосомами из клеток лёгкого человека (рис. 6). Такая конструкция вакцины (экзосомы, содержащие на мембране RBD) увеличивает до 21 суток присутствие RBD как в слизистой оболочке дыхательных путей, так и в паренхиме лёгких. Ингаляционное введение вакцины вызывало у мышей специфические IgG-антитела к RBD в крови и IgA-антитела в слизистой оболочке. Наблюдалась индукция CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток, экспрессирующих провоспалительные цитокины в лёгких животных и очищение их от псевдовируса SARS-CoV-2 после заражения. У хомячков две дозы вакцины ослабили тяжёлую пневмонию и уменьшили воспалительные инфильтраты после заражения живым SARS-CoV-2. Экзосомы, содержащие на мембране рекомбинантный RBD SARS-CoV-2 (rRBD), заслуживают дальнейших испытаний как кандидатная ингаляционная вакцина против COVID-19. К преимуществам ингаляционной вакцины можно отнести натуральное происхождение наночастиц – экзосом, несущих вирусный антиген; быструю и непосредственную доставку экзосом в слизистую респираторного тракта; отсутствие температурных ограничений при хранении и доставке вакцины, а также неинвазивный способ введения.

Заключение

Оценивая действие экзосом в вирусных инфекциях, следует отметить их двойственную роль. Способность поглощать и перемещать вирусные РНК- и ДНК-геномы, белки и вирусные частицы в неинфицированные клетки может способствовать генетической кооперации между квазивидами вирусов и улучшать их приспособленность и длительность пребывания в организме. Эти свойства позволили назвать ВВ/экзосомы троянскими конями в вирусной инфекции [134, 135]. Действительно, вирусы могут использовать экзосомы для распространения, усиления инфекции, а также защиты от иммунного ответа хозяина. В то же время получены данные о способности экзосом противодействовать вирусным инфекциям. Так, показано, что экзосомы содержат множество противовирусных факторов, которые ингибируют репликацию ВИЧ-1 [136], в том числе воздействуя на вирусный ген *tat* и его комплексы с клеточными генами [137, 138]. Положительное действие экзосом, проду-

цируемых МСК, отмечено в клинических испытаниях при острых респираторных заболеваниях [139, 140]. Экзосомы, выделенные из культуры первичных трофобластов человека, обеспечивали резистентность клеток-реципиентов к ряду изученных вирусов, в том числе вирусу осповакцины, вирусу простого герпеса 1-го типа и цитомегаловирусу.

Таким образом, процессы, в которых участвуют экзосомы, могут играть как положительную, так и отрицательную роль в патогенезе вирусных инфекций, либо способствуя развитию инфекции, либо сдерживая её развитие [141]. Важное направление использования экзосом связано с содержанием в них маркеров вирусов и вирусных инфекций, что создаёт возможность применения экзосом в качестве жидкой биопсии и неинвазивной диагностики. Натуральное происхождение из клеток человека и высокая биосовместимость позволяют применять экзосомы для доставки лекарственных препаратов. Генетически модифицированные экзосомы могут служить основой для создания

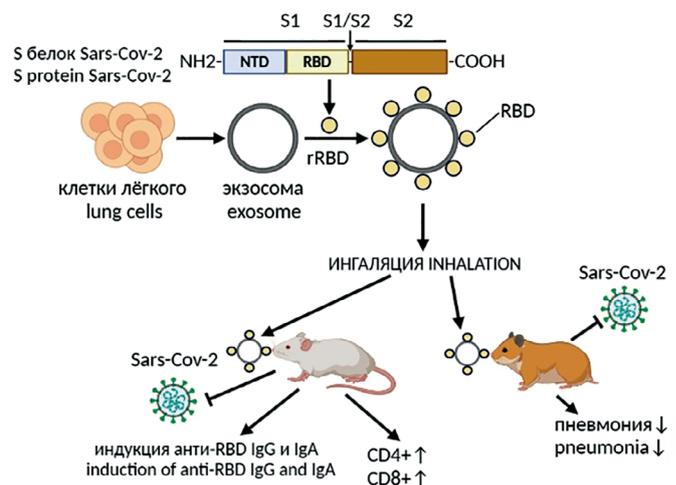


Рис. 6. Схематическое изображение получения и действия ингаляционной вакцины против SARS-CoV-2.

S-белок SARS-CoV-2 содержит домен, связывающий рецептор (RBD). Получен рекомбинантный белок RBD (rRBD). Методом малоинвазивной биопсии и трехмерного культивирования получали клетки лёгкого человека, из которых выделяли экзосомы. Экзосомы конъюгировали с rRBD SARS-CoV-2, который локализовался на мембране экзосомы. Путём ингаляции экзосомы вводили мышам и хомячкам. У мышей экзосомная вакцина вызвала индукцию анти-RBD антител классов IgG и мукозных – IgA, увеличение количества клеток CD4⁺ и CD8⁺ и клиренс вируса после заражения SARS-CoV-2. У хомячков вакцина ослабляла тяжёлую пневмонию, вызванную коронавирусом (по Z. Wang и соавт. [186], модифицировано).

Fig. 6. Schematic representation of the preparation and effects of the inhaled vaccine against SARS-CoV-2.

S protein SARS-CoV-2 contains a receptor binding domain (RBD). Recombinant protein RBD (rRBD) has been prepared. Human lung cells were obtained by minimal invasive biopsy and three-dimensional cultivation, from which exosomes were isolated. The exosomes were conjugated with rRBD, which was localized on the membrane of the exosome. Exosomes were injected into mice and hamsters by inhalation. In mice, the exosomal vaccine induced the induction of IgG and mucosal IgA anti-RBD antibodies, an increase in the number of CD4⁺ and CD8⁺ cells, and virus clearance after infection with SARS-CoV-2. In hamsters, the vaccine weakened severe pneumonia caused by coronavirus (Adapted with modification from Z. Wang, et al. [186]).

терапевтических средств и противовирусных вакцин. Очевидно, что позитивное и негативное участие экзосом в патогенезе вирусных инфекций в настоящее время недостаточно изучено и требует дальнейших расширенных исследований. Так, использование экзосом для лечебных и профилактических целей может быть опасным в связи с формированием аутоиммунных реакций из-за наличия в их структуре компонентов (в том числе и белков) человека. Усовершенствование методов выделения, очистки и стандартизации везикул, а также дальнейшие многосторонние исследования их свойств открывают перспективы для использования экзосом в борьбе с вирусными инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Harding C., Heuser J., Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* 1983; 97(2): 329–39. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>
- Pan B.T., Johnstone R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell.* 1983; 33(3): 967–78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)
- Harding C.V., Heuser J.E., Stahl P.D. Exosomes: looking back three decades and into the future. *J. Cell Biol.* 2013; 200(4): 367–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>
- Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 1987; 262(19): 9412–20.
- Xie S., Zhang Q., Jiang L. Current knowledge on exosome biogenesis, cargo-sorting mechanism and therapeutic implications. *Membranes (Basel)*. 2022; 12(5): 498. <https://doi.org/10.3390/membranes12050498>
- Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Primal-Bengtson B., et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016; 113(8): E968–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Wang S., Zhang K., Tan S., Xin J., Yuan Q., Xu H., et al. Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Mol. Cancer*. 2021; 20(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01298-z>
- Kalluri R., LeBleu V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367(6478): eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Zeng Y., Qiu Y., Jiang W., Shen J., Yao X., He X., et al. Biological features of extracellular vesicles and challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 816698. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.816698>
- Todd K.V., Tripp R.A. Exosome-mediated human norovirus infection. *PLoS One*. 2020; 15(8): e0237044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237044>
- Kowalczyk A., Wrzeczńska M., Czerniawska-Piątkowska E., Kupczyński R. Exosomes – spectacular role in reproduction. *Biomed. Pharmacother.* 2022; 148: 112752. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112752>
- Lee I., Choi Y., Shin D.U., Kwon M., Kim S., Jung H., et al. Small extracellular vesicles as a new class of medicines. *Pharmaceutics*. 2023; 15(2): 325. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020325>
- Picca A., Guerra F., Calvani R., Coelho-Junior H.J., Bucci C., Marzetti E. Circulating extracellular vesicles: friends and foes in neurodegeneration. *Neural. Regen. Res.* 2022; 17(3): 534–42. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320972>
- Liu F., Vermesh O., Mani V., Ge T.J., Madsen S.J., Sabour A., et al. The exosome total isolation chip. *ACS Nano*. 2017; 11(11): 10712–23. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04878>
- Zhang H., Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exomere and small extracellular vesicle separation and characterization. *Nat. Protoc.* 2019; 14(4): 1027–53. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0126-x>
- Kang Y.T., Kim Y.J., Bu J., Cho Y.H., Han S.W., Moon B.I. High-purity capture and release of circulating exosomes using an exosome-specific dual-patterned immunofiltration (ExoDIF) device. *Nanoscale*. 2017; 9(36): 13495–505. <https://doi.org/10.1039/c7nr04557c>
- Pathan M., Fonseka P., Chitti S.V., Kang T., Sanwlani R., Van Deun J., et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic. Acids. Res.* 2019; 47(D1): D516–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1029>
- Sidhom K., Obi P.O., Saleem A. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(18): 6466. <https://doi.org/10.3390/ijms21186466>
- van der Pol E., Sturk A., van Leeuwen T., Nieuwland R., Coumans F. Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J. Thromb. Haemost.* 2018; 16(6): 1236–45. <https://doi.org/10.1111/jth.14009>
- Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles*. 2018; 7(1): 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018>
- Mulligan R.J., Yap C.C., Winckler B. Endosomal transport to lysosomes and the trans-Golgi network in neurons and other cells: visualizing maturational flux. *Methods Mol. Biol.* 2023; 2557: 595–618. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2639-9_36
- Krylova S.V., Feng D. The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(2): 1337. <https://doi.org/10.3390/ijms24021337>
- Homma Y., Hiragi S., Fukuda M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J.* 2021; 288(1): 36–55. <https://doi.org/10.1111/febs.15453>
- Liu G., Yin X.M. The role of extracellular vesicles in liver pathogenesis. *Am. J. Pathol.* 2022; 192(10): 1358–67. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2022.06.007>
- Scourfield E.J., Martin-Serrano J. Growing functions of the ESCRT machinery in cell biology and viral replication. *Biochem. Soc. Trans.* 2017; 45(3): 613–34. <https://doi.org/10.1042/BST20160479>
- Lin C.Y., Urbina A.N., Wang W.H., Thitithanyanont A., Wang S.F. Virus hijacks host proteins and machinery for assembly and budding, with HIV-1 as an example. *Viruses*. 2022; 14(7): 1528. <https://doi.org/10.3390/v14071528>
- Johnson D.S., Bleck M., Simon S.M. Timing of ESCRT-III protein recruitment and membrane scission during HIV-1 assembly. *Elife*. 2018; 7: e36221. <https://doi.org/10.7554/eLife.36221>
- Hoffman H.K., Fernandez M.V., Groves N.S., Freed E.O., van Engelenburg S.B. Genomic tagging of endogenous human ESCRT-I complex preserves ESCRT-mediated membrane-remodeling functions. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(44): 16266–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009372>
- Meusser B., Purfuerst B., Luft F.C. HIV-1 Gag release from yeast reveals ESCRT interaction with the Gag N-terminal protein region. *J. Biol. Chem.* 2020; 295(52): 17950–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014710>
- Hadpech S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamat U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: a review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology*. 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>
- Gerber P.P., Cabrini M., Jancic C., Paoletti L., Banchio C., von Bilderling C., et al. Rab27a controls HIV-1 assembly by regulating plasma membrane levels of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 2015; 209(3): 435–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409082>
- Teow S.Y., Nordin A.C., Ali S.A., Khoo A.S. Exosomes in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: threat or opportunity? *Adv. Virol.* 2016; 2016: 9852494. <https://doi.org/10.1155/2016/9852494>
- Chiozzini C., Arenaccio C., Olivetta E., Anticoli S., Manfredi F., Ferrantelli F., et al. Trans-dissemination of exosomes from HIV-1-infected cells fosters both HIV-1 trans-infection in resting CD4+ T lymphocytes and reactivation of the HIV-1 reservoir. *Arch. Virol.* 2017; 162(9): 2565–77. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3391-4>
- Hayes C.N., Zhang Y., Makokha G.N., Hasan M.Z., Omokoko M.D., Chayama K. Early events in hepatitis B virus infection: From the cell surface to the nucleus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2016; 31(2): 302–9. <https://doi.org/10.1111/jgh.13175>
- Lin Y., Wu C., Wang X., Kemper T., Squire A., Gunzer M., et al. Hepatitis B virus is degraded by autophagosome-lysosome fusion

- mediated by Rab7 and related components. *Protein Cell*. 2019; 10(1): 60–6. <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0555-2>
36. Chou S.F., Tsai M.L., Huang J.Y., Chang Y.S., Shih C. The dual role of an ESCRT-0 component HGS in HBV transcription and naked capsid secretion. *PLoS Pathog*. 2015; 11(10): e1005123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005123>
 37. Prange R. Hepatitis B virus movement through the hepatocyte: An update. *Biol. Cell*. 2022; 114(12): 325–48. <https://doi.org/10.1111/boc.202200060>
 38. Wu Q., Glitscher M., Tonnemacher S., Schollmeier A., Raupach J., Zahn T., et al. Presence of intact hepatitis B virions in exosomes. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol*. 2023; 15(1): 237–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2022.09.012>
 39. van der Ree M.H., Jansen L., Kruize Z., van Nuenen A.C., van Dort K.A., Takkenberg R.B., et al. Plasma MicroRNA levels are associated with hepatitis B e antigen status and treatment response in chronic hepatitis B patients. *J. Infect. Dis*. 2017; 215(9): 1421–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix140>
 40. Wang D., Huang T., Ren T., Liu Q., Zhou Z., Ge L., et al. Identification of blood exosomal miRNA-1246, miRNA-150-5p, miRNA-5787 and miRNA-8069 as sensitive biomarkers for hepatitis B virus infection. *Clin. Lab*. 2022; 68(2). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2021.210415>
 41. Ninomiya M., Inoue J., Krueger E.W., Chen J., Cao H., Masamune A., et al. The exosome-associated tetraspanin CD63 contributes to the efficient assembly and infectivity of the hepatitis B virus. *Hepatol. Commun*. 2021; 5(7): 1238–51. <https://doi.org/10.1002/hep4.1709>
 42. Kakizaki M., Yamamoto Y., Yabuta S., Kurosaki N., Kagawa T., Kotani A. The immunological function of extracellular vesicles in hepatitis B virus-infected hepatocytes. *PLoS One*. 2018; 13(12): e0205886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205886>
 43. Wang C., Liu J., Yan Y., Tan Y. Role of exosomes in chronic liver disease development and their potential clinical applications. *J. Immunol. Res*. 2022; 2022: 1695802. <https://doi.org/10.1155/2022/1695802>
 44. Bunz M., Ritter M., Schindler M. HCV egress – unconventional secretion of assembled viral particles. *Trends Microbiol*. 2022; 30(4): 364–78. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.08.005>
 45. Kulhanek K.R., Roose J.P., Rubio I. Regulation of the small GTPase Ras and its relevance to human disease. *Methods. Mol. Biol*. 2021; 2262: 19–43. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1190-6_2
 46. Elgner F., Hildt E., Bender D. Relevance of Rab proteins for the life cycle of hepatitis C virus. *Front. Cell Dev. Biol*. 2018; 6: 166. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00166>
 47. Ahmed I., Akram Z., Iqbal H.M.N., Munn A.L. The regulation of Endosomal Sorting Complex Required for Transport and accessory proteins in multivesicular body sorting and enveloped viral budding – an overview. *Int. J. Biol. Macromol*. 2019; 127: 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.015>
 48. Corless L., Crump C.M., Griffin S.D., Harris M. Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles. *J. Gen. Virol*. 2010; 91(Pt. 2): 362–72. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017285-0>
 49. Li C., Gao Z., Cui Z., Liu Z., Bian Y., Sun H., et al. Deubiquitylation of Rab35 by USP32 promotes the transmission of imatinib resistance by enhancing exosome secretion in gastrointestinal stromal tumours. *Oncogene*. 2023; 42(12): 894–910. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02600-1>
 50. Kumar S., Barouch-Bentov R., Xiao F., Schor S., Pu S., Biquand E., et al. MARCH8 ubiquitinates the hepatitis C virus nonstructural 2 protein and mediates viral envelopment. *Cell Rep*. 2019; 26(7): 1800–14.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.075>
 51. Tamai K., Shiina M., Tanaka N., Nakano T., Yamamoto A., Kondo Y., et al. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. *Virology*. 2012; 422(2): 377–85. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.009>
 52. Tamai K., Tanaka N., Nakano T., Kakazu E., Kondo Y., Inoue J., et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010; 399(3): 384–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>
 53. Barouch-Bentov R., Neveu G., Xiao F., Beer M., Bekerman E., Schor S., et al. Hepatitis C virus proteins interact with the Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) machinery via ubiquitination to facilitate viral envelopment. *mBio*. 2016; 7(6): e01456-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01456-16>
 54. Younossi Z., Tacke F., Arrese M., Chander Sharma B., Mostafa I., Bugianesi E., et al. Global perspectives on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2019; 69(6): 2672–82. <https://doi.org/10.1002/hep.30251>
 55. Newman L.A., Muller K., Rowland A. Circulating cell-specific extracellular vesicles as biomarkers for the diagnosis and monitoring of chronic liver diseases. *Cell Mol. Life Sci*. 2022; 79(5): 232. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04256-8>
 56. Li J., Liu H., Mauer A.S., Lucien F., Raiter A., Bandla H., et al. Characterization of cellular sources and circulating levels of extracellular vesicles in a dietary murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol. Commun*. 2019; 3(9): 1235–49. <https://doi.org/10.1002/hep4.1404>
 57. Shah R., Patel T., Freedman J.E. Circulating extracellular vesicles in human disease. *N. Engl. J. Med*. 2018; 379(10): 958–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>
 58. Ramakrishnaiah V., Thumann C., Fofana I., Habersetzer F., Pan Q., de Ruiter P.E., et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(32): 13109–13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>
 59. Bukong T.N., Momen-Heravi F., Kodys K., Bala S., Szabo G. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog*. 2014; 10(10): e1004424. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004424>
 60. Dreux M., Garaigorta U., Boyd B., Décembre E., Chung J., Whitten-Bauer C., et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host. Microbe*. 2012; 12(4): 558–70. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.010>
 61. Zhang S., Kodys K., Babcock G.J., Szabo G. CD81/CD9 tetraspanins aid plasmacytoid dendritic cells in recognition of hepatitis C virus-infected cells and induction of interferon-alpha. *Hepatology*. 2013; 58(3): 940–9. <https://doi.org/10.1002/hep.25827>
 62. Conde-Vancells J., Rodriguez-Suarez E., Embade N., Gil D., Matthiesen R., Valle M., et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome. Res*. 2008; 7(12): 5157–66. <https://doi.org/10.1021/pr8004887>
 63. Properzi F., Logozzi M., Fais S. Exosomes: the future of biomarkers in medicine. *Biomark. Med*. 2013; 7(5): 769–78. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.63>
 64. Szabo G., Momen-Heravi F. Extracellular vesicles in liver disease and potential as biomarkers and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2017; 14(8): 455–66. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.71>
 65. Borrelli D.A., Yankson K., Shukla N., Vilanilam G., Ticer T., Wolfram J. Extracellular vesicle therapeutics for liver disease. *J. Control. Release*. 2018; 273: 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.022>
 66. Lin D., Reddy V., Osman H., Lopez A., Koksai A.R., Rhadhi S.M., et al. Additional inhibition of Wnt/β-catenin signaling by metformin in DAA treatments as a novel therapeutic strategy for HCV-infected patients. *Cells*. 2021; 10(4): 790. <https://doi.org/10.3390/cells10040790>
 67. McVey M.J., Kuebler W.M. Extracellular vesicles: biomarkers and regulators of vascular function during extracorporeal circulation. *Oncotarget*. 2018; 9(98): 37229–51. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26433>
 68. Fendl B., Weiss R., Eichhorn T., Linsberger I., Afonyushkin T., Puhm F., et al. Extracellular vesicles are associated with C-reactive protein in sepsis. *Sci. Rep*. 2021; 11(1): 6996. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86489-4>
 69. U.S. National Library of Medicine. Available at: <https://clinicaltrials.gov/>
 70. Feng Y., Wang A.T., Jia H.H., Zhao M., Yu H. A brief analysis of mesenchymal stem cells as biological drugs for the treatment of Acute-on-Chronic Liver Failure (ACLF): safety and potency. *Curr. Stem. Cell Res. Ther*. 2020; 15(3): 202–10. <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200101124317>
 71. Qian X., Xu C., Fang S., Zhao P., Wang Y., Liu H., et al. Exosomal microRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection. *Stem. Cells Transl. Med*. 2016; 5(9): 1190–203. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0348>
 72. Khatun M., Ray R.B. Mechanisms underlying hepatitis C virus-associated hepatic fibrosis. *Cells*. 2019; 8(10): 1249. <https://doi.org/10.3390/cells8101249>

73. Devhare P.B., Sasaki R., Shrivastava S., Di Bisceglie A.M., Ray R., Ray R.B. Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells. *J. Virol.* 2017; 91(6): e02225-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02225-16>
74. Kim J.H., Lee C.H., Lee S.W. Exosomal transmission of microRNA from HCV replicating cells stimulates transdifferentiation in hepatic stellate cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2019; 14: 483–97. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.006>
75. Bruno S., Pasquino C., Herrera Sanchez M.B., Tapparo M., Figliolini F., Grange C., et al. HLSC-derived extracellular vesicles attenuate liver fibrosis and inflammation in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. *Mol. Ther.* 2020; 28(2): 479–89. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.10.016>
76. Chiabotto G., Ceccotti E., Tapparo M., Camussi G., Bruno S. Human liver stem cell-derived extracellular vesicles target hepatic stellate cells and attenuate their pro-fibrotic phenotype. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 777462. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.777462>
77. Rong X., Liu J., Yao X., Jiang T., Wang Y., Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β -catenin pathway. *Stem. Cell Res. Ther.* 2019; 10(1): 98. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1204-2>
78. Kim J., Lee C., Shin Y., Wang S., Han J., Kim M., et al. sEVs from tonsil-derived mesenchymal stromal cells alleviate activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis through miR-486-5p. *Mol. Ther.* 2021; 29(4): 1471–86. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.025>
79. Du Z., Wu T., Liu L., Luo B., Wei C. Extracellular vesicles-derived miR-150-5p secreted by adipose-derived mesenchymal stem cells inhibits CXCL1 expression to attenuate hepatic fibrosis. *J. Cell Mol. Med.* 2021; 25(2): 701–15. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16119>
80. Chen L., Chen R., Kemper S., Cong M., You H., Brigstock D.R. Therapeutic effects of serum extracellular vesicles in liver fibrosis. *J. Extracell. Vesicles.* 2018; 7(1): 1461505. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1461505>
81. Bruno S., Chiabotto G., Camussi G. Extracellular vesicles: a therapeutic option for liver fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(12): 4255. <https://doi.org/10.3390/ijms21124255>
82. Hwang S., Yang Y.M. Exosomal microRNAs as diagnostic and therapeutic biomarkers in non-malignant liver diseases. *Arch. Pharm. Res.* 2021; 44(6): 574–87. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01338-2>
83. Zhou Y., Wang X., Sun L., Zhou L., Ma T.C., Song L., et al. Toll-like receptor 3-activated macrophages confer anti-HCV activity to hepatocytes through exosomes. *FASEB J.* 2016; 30(12): 4132–40. <https://doi.org/10.1096/fj.201600696R>
84. Fasbender F., Wiedera A., Hengstler J.G., Watzl C. Natural killer cells and liver fibrosis. *Front. Immunol.* 2016; 7: 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00019>
85. Neviani P., Wise P.M., Murtadha M., Liu C.W., Wu C.H., Jong A.Y., et al. Natural killer-derived exosomal miR-186 inhibits neuroblastoma growth and immune escape mechanisms. *Cancer Res.* 2019; 79(6): 1151–64. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0779>
86. Wang L., Wang Y., Quan J. Exosomes derived from natural killer cells inhibit hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Hum. Cell.* 2020; 33(3): 582–9. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00371-5>
87. Target Scan Human. Whitehead Institute for Biomedical Research. Available at: <http://www.targetscan.org>
88. Wang L., Wang Y., Quan J. Exosomal miR-223 derived from natural killer cells inhibits hepatic stellate cell activation by suppressing autophagy. *Mol. Med.* 2020; 26(1): 81. <https://doi.org/10.1186/s10020-020-00207-w>
89. Ye H.L., Zhang J.W., Chen X.Z., Wu P.B., Chen L., Zhang G. Ursodeoxycholic acid alleviates experimental liver fibrosis involving inhibition of autophagy. *Life Sci.* 2020; 242: 117175. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117175>
90. Zhang Y., Hua L., Lin C., Yuan M., Xu W., Raj D.A., et al. Pien-Tze-Huang alleviates CCl4-induced liver fibrosis through the inhibition of HSC autophagy and the TGF- β 1/Smad2 pathway. *Front. Pharmacol.* 2022; 13: 937484. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.937484>
91. Avalos P.N., Forsthoefel D.J. An emerging frontier in intercellular communication: extracellular vesicles in regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022; 10: 849905. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.849905>
92. Verweij F.J., Revenu C., Arras G., Dingli F., et al. Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes in vivo. *Dev. Cell.* 2019; 48(4): 573–89.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.004>
93. Matsumoto A., Takahashi Y., Nishikawa M., Sano K., Morishita M., Charoenviriyakul C., et al. Role of phosphatidylserine-derived negative surface charges in the recognition and uptake of intravenously injected B16BL6-derived exosomes by macrophages. *J. Pharm. Sci.* 2017; 106(1): 168–75. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.07.022>
94. Wu R., Fan X., Wang Y., Shen M., Zheng Y., Zhao S., et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in liver immunity and therapy. *Front. Immunol.* 2022; 13: 833878. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833878>
95. Schorey J.S., Harding C.V. Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1181–9. <https://doi.org/10.1172/JCI81132>
96. Yao Z., Qiao Y., Li X., Chen J., Ding J., Bai L., et al. Exosomes exploit the virus entry machinery and pathway to transmit alpha interferon-induced antiviral activity. *J. Virol.* 2018; 92(24): e01578-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01578-18>
97. Hassanpour M., Rezaie J., Nouri M., Panahi Y. The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104422. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104422>
98. Earnest J.T., Hantak M.P., Li K., McCray P.B. Jr., Perlman S., Gallagher T. The tetraspanin CD9 facilitates MERS-coronavirus entry by scaffolding host cell receptors and proteases. *PLoS Pathog.* 2017; 13(7): e1006546. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006546>
99. Barberis E., Vanella V.V., Falasca M., Caneperio V., Cappellano G., Raineri D., et al. Circulating exosomes are strongly involved in SARS-CoV-2 infection. *Front. Mol. Biosci.* 2021; 8: 632290. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.632290>
100. Bansal S., Perincheri S., Fleming T., Poulson C., Tiffany B., Bremner R.M., et al. Cutting edge: circulating exosomes with COVID spike protein are induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) vaccination prior to development of antibodies: a novel mechanism for immune activation by mRNA vaccines. *J. Immunol.* 2021; 207(10): 2405–10. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>
101. Sur S., Khatun M., Steele R., Isbell T.S., Ray R., Ray R.B. Exosomes from COVID-19 patients carry tenascin-C and fibrinogen- β in triggering inflammatory signals in cells of distant organ. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(6): 3184. <https://doi.org/10.3390/ijms22063184>
102. Mills J.T., Schwenzler A., Marsh E.K., Edwards M.R., Sabroe I., Midwood K.S., et al. Airway epithelial cells generate pro-inflammatory tenascin-C and small extracellular vesicles in response to TLR3 stimuli and rhinovirus infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1987. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01987>
103. Gupta A., Madhavan M.V., Sehgal K., Nair N., Mahajan S., Sehrawat T.S., et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(7): 1017–32. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0968-3>
104. Kwon Y., Nukala S.B., Srivastava S., Miyamoto H., Ismail N.I., Jousma J., et al. Detection of viral RNA fragments in human iPSC cardiomyocytes following treatment with extracellular vesicles from SARS-CoV-2 coding sequence overexpressing lung epithelial cells. *Stem. Cell Res. Ther.* 2020; 11(1): 514. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02033-7>
105. Wang J., Chen S., Bihl J. Exosome-mediated transfer of ACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2) from endothelial progenitor cells promotes survival and function of endothelial cell. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2020; 2020: 4213541. <https://doi.org/10.1155/2020/4213541>
106. Coccozza F., Névo N., Piovesana E., Lahaye X., Buchrieser J., Schwartz O., et al. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(2): e12050. <https://doi.org/10.1002/jev2.12050>
107. El-Shennawy L., Hoffmann A.D., Dashzeveg N.K., McAndrews K.M., Mehl P.J., Cornish D., et al. Circulating ACE2-expressing extracellular vesicles block broad strains of SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 405. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27893-2>
108. Ching K.L., de Vries M., Gago J., Dancel-Manning K., Sall J., Rice W.J., et al. ACE2-containing defensosomes serve as decoys to inhibit SARS-CoV-2 infection. *PLoS Biol.* 2022; 20(9): e3001754. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001754>
109. Song J.W., Lam S.M., Fan X., Cao W.J., Wang S.Y., Tian H., et al. Omics-driven systems interrogation of metabolic dysregulation in COVID-19 pathogenesis. *Cell Metab.* 2020; 32(2): 188–202.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.016>

110. Shenoy G.N., Loyall J., Berenson C.S., Kelleher R.J. Jr., Iyer V., Balu-Iyer S.V., et al. Sialic acid-dependent inhibition of T cells by exosomal ganglioside GD3 in ovarian tumor microenvironments. *J. Immunol.* 2018; 201(12): 3750–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801041>
111. Schnaar R.L. The biology of gangliosides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 2019; 76: 113–48. <https://doi.org/10.1016/bs.accb.2018.09.002>
112. Fantini J., Chahinian H., Yahi N. Leveraging coronavirus binding to gangliosides for innovative vaccine and therapeutic strategies against COVID-19. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021; 538: 132–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.015>
113. Hall M.W., Joshi L., Leal L., Ooi E.E. Immune immunomodulation in coronavirus disease 2019 (COVID-19): strategic considerations for personalized therapeutic intervention. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(1): 144–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa904>
114. Holthöner W., Bonstingl C., Hromada C., Muehleder S., Zipperle J., Stojkovic S., et al. Endothelial cell-derived extracellular vesicles size-dependently exert procoagulant activity detected by thromboelastometry. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 3707. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03159-0>
115. Balbi C., Burrello J., Bolis S., Lazzarini E., Biemmi V., Pianezzi E., et al. Circulating extracellular vesicles are endowed with enhanced procoagulant activity in SARS-CoV-2 infection. *EBioMedicine.* 2021; 67: 103369. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103369>
116. Cappellano G., Raineri D., Rolla R., Giordano M., Puricelli C., Vilaro B., et al. Circulating platelet-derived extracellular vesicles are a hallmark of SARS-Cov-2 infection. *Cells.* 2021; 10(1): 85. <https://doi.org/10.3390/cells10010085>
117. Tahyra A.S.C., Calado R.T., Almeida F. The role of extracellular vesicles in COVID-19 pathology. *Cells.* 2022; 11(16): 2496. <https://doi.org/10.3390/cells11162496>
118. Yang C.W., Chen R.D., Zhu Q.R., Han S.J., Kuang M.J. Efficacy of umbilical cord mesenchymal stromal cells for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Front. Immunol.* 2022; 13: 923286. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.923286>
119. Tan M.I., Alfarafiga N.M., Septiani P., Barlian A., Firmansyah M., Faizal A., et al. Potential cell-based and cell-free therapy for patients with COVID-19. *Cells.* 2022; 11(15): 2319. <https://doi.org/10.3390/cells11152319>
120. Bari E., Ferrarotti I., Saracino L., Perteghella S., Torre M.L., Richeldi L., et al. Mesenchymal stromal cells secretome for post-COVID-19 pulmonary fibrosis: a new therapy to treat the long-term lung sequelae? *Cells.* 2021; 10(5): 1203. <https://doi.org/10.3390/cells10051203>
121. Gardin C., Ferroni L., Chachques J.C., Zavan B. Could mesenchymal stem cell-derived exosomes be a therapeutic option for critically ill COVID-19 patients? *J. Clin. Med.* 2020; 9(9): 2762. <https://doi.org/10.3390/jcm9092762>
122. Perets N., Hertz S., London M., Offen D. Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. *Mol. Autism.* 2018; 9: 57. <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0240-6>
123. Elahi F.M., Farwell D.G., Nolte J.A., Anderson J.D. Preclinical translation of exosomes derived from mesenchymal stem/stromal cells. *Stem. Cells.* 2020; 38(1): 15–21. <https://doi.org/10.1002/stem.3061>
124. Allan D., Tieu A., Lalu M., Burger D. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for regenerative therapy and immune modulation: Progress and challenges toward clinical application. *Stem. Cells Transl. Med.* 2020; 9(1): 39–46. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0114>
125. Dinh P.C., Paudel D., Brochu H., Popowski K.D., Gracieux M.C., Cores J., et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 1064. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14344-7>
126. Coccozza F., Névo N., Piovesana E., Lahaye X., Buchrieser J., Schwartz O., et al. Extracellular vesicles containing ACE2 efficiently prevent infection by SARS-CoV-2 Spike protein-containing virus. *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(2): e12050. <https://doi.org/10.1002/jev2.12050>
127. Inal J.M. Decoy ACE2-expressing extracellular vesicles that competitively bind SARS-CoV-2 as a possible COVID-19 therapy. *Clin. Sci. (Lond).* 2020; 134(12): 1301–4. <https://doi.org/10.1042/CS20200623>
128. Askenase P.W. COVID-19 therapy with mesenchymal stromal cells (MSC) and convalescent plasma must consider exosome involvement: Do the exosomes in convalescent plasma antagonize the weak immune antibodies? *J. Extracell. Vesicles.* 2020; 10(1): e12004. <https://doi.org/10.1002/jev2.12004>
129. Rezaabakhsh A., Mahdipour M., Nourazarian A., Habibollahi P., Sokullu E., Avci Ç.B., et al. Application of exosomes for the alleviation of COVID-19-related pathologies. *Cell Biochem. Funct.* 2022; 40(5): 430–8. <https://doi.org/10.1002/cbf.3720>
130. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A., Woods P., Nolan A., Bremer N. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem. Cells Dev.* 2020; 29(12): 747–54. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0080>
131. Kuate S., Cinatl J., Doerr H.W., Ueberl K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology.* 2007; 362(1): 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.12.011>
132. Sharma K., Koirala A., Nicolopoulos K., Chiu C., Wood N., Britton P.N. Vaccines for COVID-19: Where do we stand in 2021? *Paediatr. Respir. Rev.* 2021; 39: 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.pr-rv.2021.07.001>
133. Wang Z., Popowski K.D., Zhu D., de Juan Abad B.L., Wang X., Liu M., et al. Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine. *Nat. Biomed. Eng.* 2022; 6(7): 791–805. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00902-5>
134. Altan-Bonnet N. Extracellular vesicles are the Trojan horses of viral infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 2016; 32: 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.004>
135. Badierah R.A., Uversky V.N., Redwan E.M. Dancing with Trojan horses: an interplay between the extracellular vesicles and viruses. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021; 39(8): 3034–60. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1756409>
136. Sun L., Wang X., Zhou Y., Zhou R.H., Ho W.Z., Li J.L. Exosomes contribute to the transmission of anti-HIV activity from TLR3-activated brain microvascular endothelial cells to macrophages. *Antiviral. Res.* 2016; 134: 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.07.013>
137. Welch J.L., Kaddour H., Schlievert P.M., Stapleton J.T., Okeoma C.M. Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF-κB/Sp1/Tat circuitry. *J. Virol.* 2018; 92(21): e00731-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00731-18>
138. Chen J., Li C., Li R., Chen H., Chen D., Li W. Exosomes in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2021; 16(5): 262–70. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000694>
139. Abraham A., Krasnodembkaya A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of acute respiratory distress syndrome. *Stem. Cells. Transl. Med.* 2020; 9(1): 28–38. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0205>
140. Popowski K.D., Dinh P.C., George A., Lutz H., Cheng K. Exosome therapeutics for COVID-19 and respiratory viruses. *View (Beijing).* 2021; 2(3): 20200186. <https://doi.org/10.1002/VIW.20200186>
141. Rangel-Ramírez V.V., González-Sánchez H.M., Lucio-García C. Exosomes: from biology to immunotherapy in infectious diseases. *Infect. Dis. (Lond).* 2023; 55(2): 79–107. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2149852>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕDOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-166>

© СМОЛЯКОВ Ю.Н., КУЗНИК Б.И., ФЕФЕЛОВА Е.В., КАЗАНЦЕВА Л.С., ШАПОВАЛОВ Ю.К., ЛУКЬЯНЧУК М.С., ЛУКЬЯНОВ С.А., ШАПОВАЛОВ К.Г., 2023



Предиктивная роль эритроцитов в оценке исходов COVID-19

Смоляков Ю.Н.¹, Кузник Б.И.¹, Фефелова Е.В.¹, Казанцева Л.С.², Шаповалов Ю.К.¹, Лукьянчук М.С.¹, Лукьянов С.А.¹, Шаповалов К.Г.¹¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, г. Чита, Россия;²ГУЗ «Краевая клиническая инфекционная больница», 672042, г. Чита, Россия

Введение. Поиск доступных и точных предикторов исхода COVID-19 имеет крайне важное значение, так как позволяет эффективно корректировать тактику лечения пациента.

Цель работы – на основе динамики показателей красной крови разработать простые и точные критерии, предсказывающие исход COVID-19.

Материалы и методы. Наблюдения проведены у 125 пациентов с тяжёлым и крайне тяжёлым течением COVID-19, у которых на 1, 5, 7, 10, 14 и 21-й день пребывания в стационаре в динамике определялись показатели, характеризующие состояние красной крови. Для расчёта пороговых значений выживаемости и летальности, имеющих предиктивную ценность, проводился ROC-анализ.

Результаты. Общее число эритроцитов и уровень гемоглобина у тяжелобольных и крайне тяжелобольных не выходили за пределы допустимых норм, хотя в группе умерших на всём протяжении исследования проявляли тенденцию к уменьшению. В 1-й и 21-й день количество MacroR у умерших по сравнению с выжившими было сниженным. Установлено, что по показателю RDW-CV с большой долей вероятности на относительно ранних сроках можно судить об исходе заболевания COVID-19. Дополнительным критерием исхода COVID-19 может служить показатель RDW-SD.

Заключение. Показатели RDW-CV и RDW-SD при тяжёлом течении COVID-19 могут быть использованы как эффективные предикторы исхода заболевания.

Ключевые слова: COVID-19; эритроциты; анизоцитоз; RDW-CV; RDW-SD

Для цитирования: Смоляков Ю.Н., Кузник Б.И., Фефелова Е.В., Казанцева Л.С., Шаповалов Ю.К., Лукьянчук М.С., Лукьянов С.А., Шаповалов К.Г. Предиктивная роль эритроцитов в оценке исходов COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 198-204. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-166> EDN: <https://elibrary.ru/ukdgqa>

Для корреспонденции: Смоляков Юрий Николаевич, канд. мед. наук, доцент, заведующий кафедрой медицинской физики и информатики ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России, 672000, г. Чита, Россия. E-mail: smolyakov@ Rambler.ru

Участие авторов: Смоляков Ю.Н. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных; Кузник Б.И. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Фефелова Е.В. – анализ и интерпретация данных; Казанцева Л.С. – сбор и интерпретация данных; Шаповалов Ю.К. – сбор и интерпретация данных; Лукьянчук М.С. – сбор и интерпретация данных; Лукьянов С.А. – сбор и интерпретация данных; Шаповалов К.Г. – редактирование статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 49 от 20.07.2021).

Поступила 28.02.2023

Принята в печать 26.04.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-166>

Predictive role of erythrocytes in assessment of COVID-19 outcomes

Yuri N. Smolyakov¹, Boris I. Kuznik¹, Elena V. Fefelova¹, Lyudmila S. Kazantseva², Yuri K. Shapovalov¹, Mariya S. Lukyanchuk¹, Sergey A. Lukyanov¹, Konstantin G. Shapovalov¹

¹Chita State Medical Academy, 672000, Chita, Russia;

²Regional Clinical Infectious Diseases Hospital, 672042, Chita, Russia

Introduction. The search for affordable and accurate predictors of the outcome of COVID-19 is extremely important, as it provides the possibility to effectively correct the patient treatment tactics.

Aim of the study. To develop simple and accurate criteria based on the dynamics of red blood counts that predict the outcome of COVID-19.

Materials and methods. Observations were carried out in 125 patients with severe and extremely severe COVID-19, in whom indicators characterizing the state of red blood were determined in dynamics on days 1, 5, 7, 10, 14 and 21 after the hospitalization. ROC analysis was performed to calculate the threshold predictive values for survival and mortality.

Results. The total number of erythrocytes and the level of hemoglobin in severe and extremely severe patients did not go beyond the acceptable limits, although showed a tendency to decrease in the group of fatal cases. On the 1st and 21st days, the number of MacroR in the deceased patients was reduced compared to those in group of survivors. It has been established that the RDW-CV test can predict the outcome of the COVID-19 with a high degree of probability at a relatively early stage of disease. RDW-SD test can be an additional predictive criterion of COVID-19 outcome.

Conclusion. The RDW-CV test can be used as an effective predictor of disease outcome in patients with severe COVID-19.

Keywords: COVID-19; erythrocytes; anisocytosis; RDW-CV; RDW-SD

For citation: Smolyakov Yu.N., Kuznik B.I., Fefelova E.V., Kazantseva L.S., Shapovalov Yu.K., Lukyanchuk M.S., Lukyanov S.A., Shapovalov K.G. Predictive role of erythrocytes in assessment of COVID-19 outcomes. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 198-204. (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-166> EDN: <https://elibrary.ru/ukdgqa>

For correspondence: Yury N. Smolyakov, PhD (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Medical Physics and Informatics, Chita State Medical Academy, 672000, Chita, Russia. E-mail: smolyakov@rambler.ru

Information about the authors:

Smolyakov Yu.N., <https://orcid.org/0000-0001-7920-7642>

Kuznik B.I., <https://orcid.org/0000-0002-2502-9411>

Fefelova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0724-0352>

Kazantseva L.S., <https://orcid.org/0000-0002-9816-9714>

Shapovalov Yu.K., <https://orcid.org/0000-0001-6408-239X>

Lukyanchuk M.S., <https://orcid.org/0000-0001-9095-8252>

Lukyanov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7997-9116>

Shapovalov K.G., <https://orcid.org/0000-0002-3485-5176>

Contribution: Smolyakov Yu.N. – the study concept and design, data analysis and interpretation; Kuznik B.I. – the study concept and design, preparation of the text, final approval of the article for publication; Fefelova E.V. – data analysis and interpretation; Kazantseva L.S. – data collection and interpretation; Shapovalov Yu.K. – data collection and interpretation; Lukyanchuk M.S. – data collection and interpretation; Lukyanov S.A. – data collection and interpretation; Shapovalov K.G. – editing the article.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Chita State Medical Academy (protocol No. 49 dated 20.07.2021).

Received 28 February 2023

Accepted 26 April 2023

Published 30 June 2023

Введение

В настоящее время считается общепризнанным, что основной причиной тяжёлого течения и высокой летальности больных COVID-19 является неконтролируемое воспаление [1, 2]. В то же время не последнюю роль в развитии тяжелейших осложнений при COVID-19, вплоть до полиорганной недостаточности, приводящей к летальному исходу, играет тромбообразование в мелких и крупных кровеносных сосудах [3–5]. Кроме того, на течение и исход COVID-19 может оказывать влияние изменение механических свойств клеток крови, нередко способствующее окклюзии сосудов [6].

Вместе с тем если проблемам воспаления, состояния врождённого и адаптивного иммунитета и системы гемостаза при COVID-19 посвящено значительное число работ, то вопрос о механических свойствах клеток крови при этом заболевании не привлекал существенного внимания учёных. Сказанное в значительной степени относится к самому большому отряду форменных элементов крови – эритроцитам. Между тем Х. Yuan и соавт. [7] установили, что у тяжелобольных COVID-19, в том числе находящихся в критическом состоянии, наблюдается снижение уровня эритроцитов и гемоглобина. Недавние исследования М. Kubánková и соавт. [6] показали, что у тяжелобольных COVID-19, по сравнению с пациентами, переносящими заболевание в более лёгкой форме, наблюдается значительное снижение жёсткости лимфоцитов, повышение размеров моноцитов, появление более мелких и менее деформируемых эритроцитов и наличие крупных деформируемых активированных нейтрофилов. Многие из перечисленных сдвигов так и не вернулись к показателям контрольной группы даже через несколько месяцев после выписки из больницы, что, по мнению авторов, свидетельствует о долгосрочном воздействии COVID-19 на систему кроветворения.

Учитывая представленные работы, мы поставили **цель** выяснить, насколько показатели, характеризующие физические особенности эритроцитов, могут отражать состояние тяжести больных COVID-19. Более того, мы поставили перед собой **задачу** выяснить, можно ли по показателям эритроцитов, входящим в общий анализ крови, предсказать у тяжелобольных возможность положительного или летального исхода.

Материалы и методы

Выполнено ретроспективное исследование у 125 пациентов с тяжёлым и крайне тяжёлым течением COVID-19. Средний возраст пациентов составлял $64,5 \pm 11,2$ года. Пациенты находились на лечении в моностационаре на базе ГУЗ «Городская клиническая больница № 1» г. Читы. Госпитализация всех включённых в исследование лиц проводилась с 6-го по 10-й день с момента появления симптомов заболевания. Диагностика степени тяжести течения COVID-19 и схема лечения соответствовали актуальной версии Временных методических рекомендаций Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)».

Назначалась противовирусная, антибактериальная, антикоагулянтная, респираторная, инфузионная, нутритивно-метаболическая терапия. Показатели гемограммы оценивались на 1, 5, 7, 10, 14 и 21-й день с момента госпитализации. Критериями исключения из исследования являлись онкопатология, иммунодефицит любого генеза, беременность, наличие на момент госпитализации декомпенсированной хронической патологии, заболевания крови, кровотечения, гематомы.

Все проводимые мероприятия соответствовали этическим стандартам, разработанным на основе Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2008 г, и «Правил клинической практики в Российской Федерации», утверждённым приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266. Исследование проводилось при информированном добровольном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России (протокол № 49 от 20.07.2021).

Общий анализ крови производился на гемоанализаторе PENTRA-80 (Horiba ABX Diagnostics, США). Число эритроцитов обозначалось в степени $10^{12}/л$, уровень гемоглобина рассчитывался в г/л.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием специализированного языка программирования R версии 4.1.0. Количественные характеристики признаков были представлены медианой (Me , Q_2 – второй квартиль), первым и третьим квартилем (Q_1 и Q_3 соответственно). Для расчёта пороговых значений летальности, имеющих предиктивную ценность, проводился ROC-анализ [8, 9]. При построении ROC-кривой происходит изменение величины (порога) исследуемого фактора при принятии решения о возможной летальности и на заданном пороге по экспериментальным данным рассчитываются чувствительность и специфичность предсказания. Цикл испытания начинается с 0% чувствительности и 100% специфичности, заканчивается при 100% чувствительности, 0% специфичности. В ходе этой процедуры строится ROC-кривая и определяется точка баланса чувствительности/специфичности, в которой эти показатели максимальны. Полученная в этой точке величина исследуемого признака может считаться оптимальным порогом принятия прогностического решения, выше (ниже) которого можно говорить о возможном летальном исходе. Оценку предсказательной точности проводили по экспертной шкале показателей площади под ROC-кривой (Area Under Curve – AUC). Экспертную шкалу оценки можно принять в следующем виде:

- 90–100% – отличная;
- 80–90% – хорошая;
- 70–80% – приемлемая;
- 60–70% – слабая;
- 50–60% – неудовлетворительная [10, 11].

Для оценки значимости роста AUC в динамике дней заболевания сопоставление ROC-кривых производи-

лась попарно (1–5, 5–7, 7–10, 10–14, 14–21) с использованием непараметрического алгоритма E.R. DeLong и соавт. [12], при этом тестировалась нулевая гипотеза об отсутствии различий в AUC двух кривых.

Результаты

Общее число эритроцитов в обеих группах не выходило за пределы допустимых норм, хотя в группе умерших на всём протяжении исследования проявляло тенденцию к уменьшению. Однако в большинстве случаев эти изменения не носили значимый характер. Исключение составляет 5-й день пребывания пациентов в стационаре: выжившие – 4,49 [4,17–4,92], умершие – 4,31 [3,78–4,6]; $p = 0,030$.

Уровень гемоглобина (HGB, г/л) у выживших и умерших также не претерпевал существенных изменений и лишь на 10-й день (у умерших – 108 [100–134], выживших – 125 [113–137]; $p = 0,025$) значительно снижался, не достигая общепринятой нормы. Особенно низким уровень гемоглобина в группе умерших отмечался на 21-й день пребывания пациентов в стационаре – 3,89 [3,26–4,14], хотя значимо не отличался от показателей выживших – 4,24 [3,70–4,62]; $p = 0,24$. Разумеется, отсутствие значимости в содержании гемоглобина связано с большим разбросом данных в обеих группах.

Гематокрит (HCT, %) в группе умерших всегда был ниже, чем у выживших, однако значимые сдвиги отмечались лишь на 5-й день: выжившие – 38,4 [35,7–41,5], умершие – 37 [32,6–39,6]; $p = 0,019$.

Средний объём эритроцитов (MCE, фл) на всём протяжении исследования в обеих группах не выходил за пределы нормы и значимо не отличался у выживших и умерших.

Содержание гемоглобина в одном эритроците (MCH, пг) и средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах и в эритроцитарной массе (MCHC, г/л) в обеих группах мало отличались друг от друга и находились на нижних границах нормы или близко к ним.

Прямое измерение ширины эритроцитарной гистограммы на 20% её высоты (RDW-SD, фл) и нормированное стандартное отклонение объёма эритроцита, выраженное в процентах (RDW-CV, %), на всём протяжении исследования в группе умерших оказались повышенными. В то же время содержание MicroR и MacroR в обеих группах существенно не отличалось друг от друга. Исключение составляет лишь день поступления пациентов в стационар, когда содержание MacroR в группе умерших (3,4 [3,2–3,4]) по сравнению с выжившими (3,8 [3,5–4,2]) было понижено ($p = 0,041$), и на 21-й день, когда число MacroR в группе умерших (3,4 [3,2–3,4]) оказалось сниженным (у выживших – 3,8 [3,5–4,2]; $p = 0,040$).

Как видно из приведённых данных, большинство исследуемых показателей, характеризующих состояние красной крови у выживших и умерших больных COVID-19, статистически значимо не имеет отличий. Исключением можно считать RDW-SD и RDW-CV, величины которых у умерших на протяжении всего срока исследования оказались повышенными.

Следующей задачей являлся вопрос: можно ли по эритроцитарным показателям прогнозировать исход заболевания у тяжелобольных COVID-19?

Как и следовало ожидать, такими тестами являются лишь RDW-SD и RDW-CV. Так, по данным RDW-SD на 1, 5, 7, 10 и 14-й день пребывания пациентов в стационаре по показателю RDW-SD прогноз оказался приемлемым, а на 21-й день – хорошим (рис. 1).

По тесту RDW-CV на 1, 5, 7 и 10-й день прогнозирование являлось приемлемым, на 14-й – хорошим и на 21-й день – отличным (рис. 2).

Таким образом, только показатель RDW-CV на 14-й и 21-й день может быть с большой долей вероятности использован для прогнозирования исхода COVID-19. К сожалению, изменение тактики терапии к этому сроку далеко не всегда может быть эффективным.

Обсуждение

Приведённые нами данные говорят о том, что существенной разницы у выживших и умерших больных COVID-19 в большинстве показателей, взятых из общего анализа и характеризующих в основном состояние красной крови, выявить не удалось. Исключение составляет лишь снижение числа эритроцитов и уровня гемоглобина в группе умерших по сравнению с выжившими, а также увеличение показателей эритроцитарной гистограммы (RDW-SD и RDW-CV) у умерших. Кроме того, в отдельные сроки (1-й и 21-й день) количество MacroR у умерших по сравнению с выжившими было сниженным. Нами также установлено, что по тесту RDW-CV с большой долей вероятности можно судить об исходе заболевания COVID-19. Тест RDW-CV оказался приемлемым на 14-й день, а на 21-й – хорошим.

В то же время в литературе имеется немало указаний на роль эритроцитов в развитии тяжёлой симптоматики при COVID-19. Так, согласно данным M. Kubánková и соавт. [6], COVID-19 характеризуется появлением небольших эритроцитов с низкой деформацией. Значительное уширение распространения деформации при COVID-19 является результатом появления эритроцитов с низкой деформацией, что соответствует полученным нами данным.

Установлено, что по сравнению со среднетяжёлой формой у тяжелобольных и находящихся в критическом состоянии пациентов отмечалось снижение числа эритроцитов и уровня гемоглобина [7], что совпадает с нашими данными и объясняется нарушением процесса кроветворения.

Известно, что у тяжелобольных COVID-19 развивается гиперкоагуляция, сопровождаемая макро- и микроангиопатией с отложением фибрина. При этом повреждение мембран эритроцитов воспалительными молекулами, и в частности фибрином, при COVID-19 может привести к критическим биофизическим событиям, таким как зарождение пузырьков или пенообразование [13]. Помимо прямого связывания с эритроцитами, фибрин влияет на функциональность эритроцитов, увеличивая циркулирующие воспалительные биомаркеры за счёт свя-

звания с эндотелиальными клетками. Присутствие воспалительных биомаркеров в кровообращении связано с образованием активных форм кислорода, которые вызывают эриптоз эритроцитов и патологическую деформируемость [14–16].

Наряду с воспалением это приводит к переходу на наружную сторону мембраны отрицательно заряженного фосфатидилсерина, что усиливает процесс

свёртывания крови, в том числе образование тромбина. При патологических состояниях, таких как хроническое воспаление, переход фосфатидилсерина на поверхность эритроцита способствует увеличению агрегации эритроцитов, фосфатидилсерин также опосредует адгезию эритроцитов к эндотелию, способствуя окклюзии мелких сосудов. Во время инфекции COVID-19 патологические уровни тромбина, фибри-

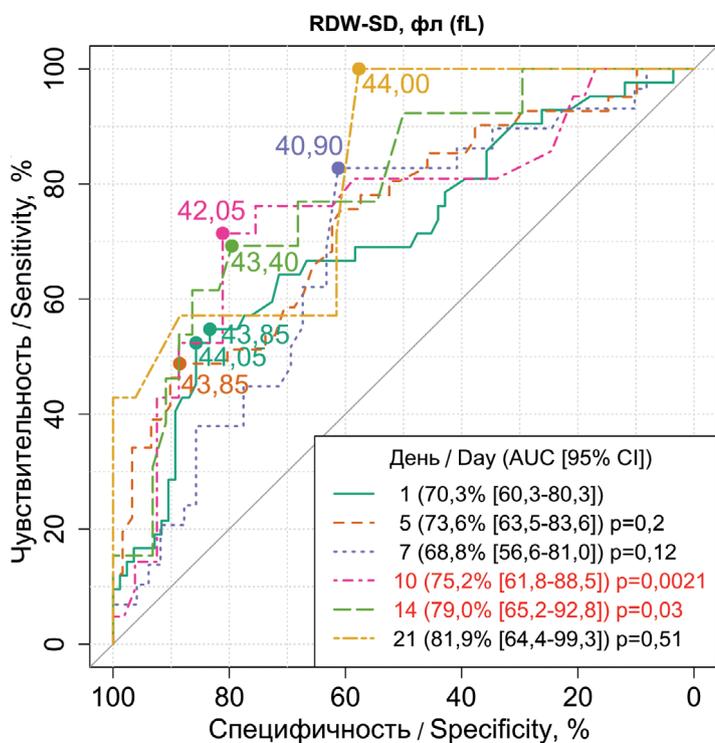


Рис. 1. Кривые ROC-анализа прогностической точности показателя RDW-SD по дням заболевания (достоверность *p* демонстрирует отличия AUC от предшествующего дня контроля по методу E.R. DeLong и соавт. [12]).

Fig. 1. ROC curves for the analysis of the predictive accuracy of the RDW-SD test by days of illness (significance *p* shows differences in AUC compared to the previous day of control according to the method by E.R. DeLong, et al. [12]).

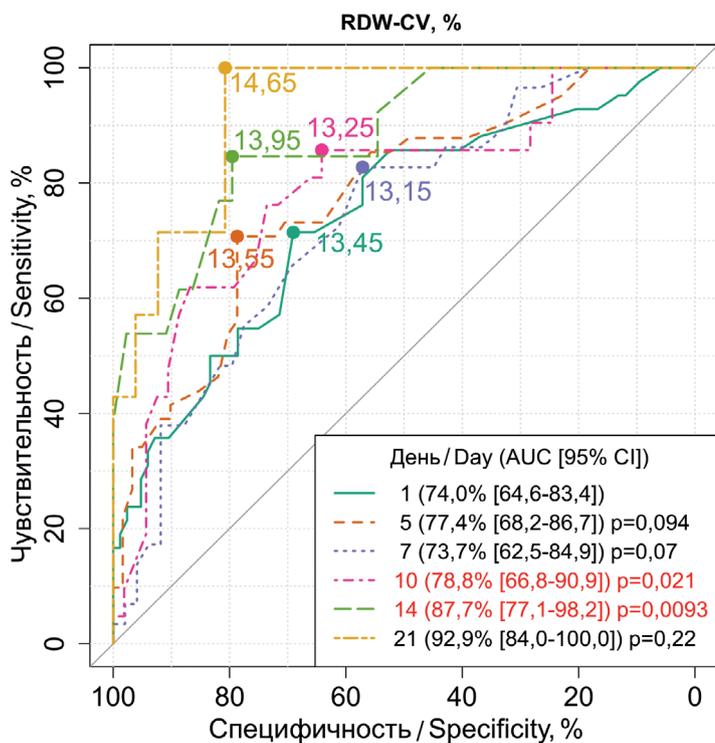


Рис. 2. Кривые ROC-анализа прогностической точности показателя RDW-CV по дням заболевания (достоверность *p* демонстрирует отличия AUC от предшествующего дня контроля по методу E.R. DeLong и соавт. [12]).

Fig. 2. ROC curves for the analysis of the predictive accuracy of the RDW-CV test by disease days (significance *p* shows differences in AUC compared to the previous day of control according to the method by E.R. DeLong, et al. [12]).

на, D-димера и повышенное количество циркулирующих воспалительных молекул могут взаимодействовать с эритроцитами [17], что приводит к образованию хрупких мембран эритроцитов с патологической эластичностью. При этом некоторые из клеток были не только меньше обычных, но и имели асимметричную форму, что говорит о наличии фрагментированных эритроцитов [6]. Следует заметить, что наличие шистоцитов является маркером тяжёлой формы COVID-19 [18]. Но изменения эритроцитов при COVID-19 касаются не только их формы. Согласно данным T. Thomas и соавт. [19], при COVID-19 в мембране эритроцитов выявляется структурное повреждение белков с одновременным ремоделированием липидов, в результате чего нарушается доставка кислорода в ткани. По всей видимости, эти сдвиги отчасти объясняют, почему RDW-SD и RDW-CV при COVID-19 являются относительно надёжными предикторами исхода заболевания.

A. Savezzi и соавт. [20], обобщив источники литературы, пришли к мнению, что в патогенезе COVID-19 существенную роль играют патологические метаболические пути, происходящие из денатурации гемоглобина и нарушения регуляции метаболизма железа:

- 1) снижение уровня функционирующего гемоглобина;
- 2) перегрузка железом клеток/тканей (гиперферритинемия);
- 3) высвобождение токсичного циркулирующего гема;
- 4) гипоксемия и системная гипоксия;
- 5) восстановление оксида азота;
- 6) активация коагуляции;
- 7) ферроптоз с окислительным стрессом и липопероксидацией;
- 8) митохондриальная дегенерация и апоптоз.

Следует отметить, что для критических состояний, индуцированных различной инфекцией, характерно развитие анемии и склонности к разрушению эритроцитов. Ю.П. Орлов и соавт. объясняют это конкуренцией макро- и микроорганизма за ресурсы эндогенного железа как важного для многих бактерий микроэлемента. Не исключается защитная роль анемии в предупреждении распространения инфекции. Одновременно рассматривается концепция пермисивной (допустимой) анемии при сепсисе и тяжёлых инфекционных процессах [21].

При этом появление эритроцитов с изменёнными размерами может свидетельствовать о стимуляции эритропоэза в результате их избыточного разрушения на фоне чрезмерной системной воспалительной реакции, а также при прохождении патологически изменённого альвеолярного кровотока [22].

Следует отметить, что при тяжёлом течении COVID-19 основной причиной летальности является пневмония, нередко сопровождаемая острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). При этом на микроскопическом уровне в лёгких часто повреждаются структуры, которые отвечают за газообмен – передачу кислорода в кровь и углекислого газа в выдыхаемый воздух. Из-за этого способность лёгких

пропускать кислород в кровь может снижаться [23–25]. Разумеется, нарушение транспортной функции газов эритроцитами усугубляет течение пневмонии и ОРДС.

Заключение

Анализ анизоцитоза эритроцитов в общем анализе крови (показатели RDW-CV и RDW-SD) показал высокие возможности предсказания летального исхода при тяжёлом течении COVID-19-пневмонии. Их прогностическая ценность значимо нарастает, начиная с 10-го дня от начала активной терапии и мониторинга клеточного состава крови в стационарных условиях. Все представленные данные говорят о том, что нарушение эритроцитарных функций при COVID-19 играет далеко не последнюю роль в исходе этой коварной и пока ещё недостаточно изученной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: 377 consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1033–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
2. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassel B.W., et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21(5): 319–29. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9>
3. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with 379 poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(4): 844–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>
4. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020; 395(10223): 507–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
5. Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A., Kuznik B., Umnov R. Peptides: Prospects for Use in the Treatment of COVID-19. *Molecules*. 2020; 25(19): 4389. <https://doi.org/10.3390/molecules25194389>
6. Kubánková M., Hohberger B., Hoffmanns J., Fürst J., Herrmann M., Guck J., et al. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys. J.* 2021; 120(14): 2838–47. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.025>
7. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., et al. Changes of hematological and immunological parameters in COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 112(4): 553–9. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02930-w>
8. Григорьев С.Г., Лобзин Ю.В., Скрипченко Н.В. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач. *Журнал инфектологии*. 2016; 8(4): 36–45. EDN: <https://www.elibrary.ru/xfwbjt> <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45>
9. Hughes G., Kopetzky J., McRoberts N. Mutual information as a performance measure for binary predictors characterized by both ROC curve and PROC curve analysis. *Entropy (Basel)*. 2020; 22(9): 938. <https://doi.org/10.3390/e22090938>
10. Hosmer S., Lemeshow S.L. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons; 2013.
11. Файнзильберг Л.С., Жук Т.Н. Гарантированная оценка эффективности диагностических тестов на основе усиленного ROC-анализа. *Управляющие системы и машины*. 2009; (5): 3–13.
12. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics*. 1988; 44(3): 837–45. <https://doi.org/10.2307/2531595>
13. Denis P.A. COVID-19-related complications and decompression illness share main features. Could the SARS-CoV2-related complications rely on blood foaming? *Med. Hypotheses*. 2020; 144: 109918. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109918>

14. Кузник Б.И. *Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии*. Чита: Экспресс-издательство; 2010.
15. Кузник Б.И., Стуров В.Г., Левшин Н.Ю., Максимова О.Г., Кудлай Д.А. *Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей и подростков*. Новосибирск: Наука; 2018.
16. Weisel J.W., Litvinov R.I. Red blood cells: The forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2019; 17(2): 271–82. <https://doi.org/10.1111/jth.14360>
17. Grobler C., Maphumulo S.C., Grobbelaar L.M., Bredenkamp J.C., Laubscher G.J., Lourens P.J., et al. Covid-19: The rollercoaster of fibrin(ogen), D-dimer, von Willebrand Factor, P-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(14): 5168. <https://doi.org/10.3390/ijms21145168>
18. Della Rocca D.G., Magnocavallo M., Lavalle C., Romero J., Forleo G.B., Tarantino N., et al. Evidence of systemic endothelial injury and microthrombosis in hospitalized COVID-19 patients at different stages of the disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2020; 51(3): 571–6. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02330-1>
19. Thomas T., Stefanoni D., Dzieciatkowska M., Issaian A., Nemkov T., Hill R.C., et al. Evidence of structural protein damage and membrane lipid remodeling in red blood cells journal pre-proof Kub from COVID-19 patients. *J. Proteome Res.* 2020; 19(11): 4455–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00606>
20. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin. Pract.* 2020; 10(2): 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
21. Орлов Ю.П., Говорова Н.В., Лукач В.Н., Байтугаева Г.А., Клементьев А.В., Какуля Е.Н. Метаболизм железа в условиях инфекции. Обзор литературы. *Вестник интенсивной терапии им. А.И. Салтанова*. 2020; (1): 90–9. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2020-1-90-99> EDN: <https://www.elibrary.ru/ivbhpx>
22. Gattinoni L., Chiumello D., Caironi P., Busana M., Romitti F., Brazzi L., et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med.* 2020; 46(6): 1099–102. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06033-2>
23. Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hölzer B., et al. COVID-19-induced ARDS is associated with decreased frequency of activated memory/effector T Cells expressing CD11a⁺⁺. *Mol. Ther.* 2020; 28(12): 2691–702. <https://doi.org/10.1016/j.yjth.2020.10.001>
24. Zhang X., Li S., Niu S. ACE2 and COVID-19 and the resulting ARDS. *Postgrad. Med. J.* 2020; 96(1137): 403–7. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-137935>
25. Navas-Blanco J.R., Dudaryk R. Management of respiratory distress syndrome due to COVID-19 infection. *BMC Anesthesiol.* 2020; 20(1): 177. <https://doi.org/10.1186/s12871-020-01095-7>
- COVID-19 patients. *Int. J. Hematol.* 2020; 112(4): 553–9. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-02930-w>
8. Grigor'ev S.G., Lobzin Yu.V., Skripchenko N.V. The role and place of logistic regression and ROC-analysis in solving medical diagnostic task. *Zhurnal infektologii.* 2016; 8(4): 36–45. EDN: <https://www.elibrary.ru/xfwbjt> <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45> (in Russian)
9. Hughes G., Kopetzky J., McRoberts N. Mutual information as a performance measure for binary predictors characterized by both ROC curve and PROC curve analysis. *Entropy (Basel).* 2020; 22(9): 938. <https://doi.org/10.3390/e22090938>
10. Hosmer S., Lemeshow S.L. *Applied Logistic Regression*. John Wiley & Sons; 2013.
11. Faynzil'berg L.S., Zhuk T.N. Guaranteed assessment of the effectiveness of diagnostic tests based on enhanced ROC analysis. *Upravlyayushchie sistemy i mashiny.* 2009; (5): 3–13. (in Russian)
12. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988; 44(3): 837–45. <https://doi.org/10.2307/2531595>
13. Denis P.A. COVID-19-related complications and decompression illness share main features. Could the SARS-CoV2-related complications rely on blood foaming? *Med. Hypotheses.* 2020; 144: 109918. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109918>
14. Kuznik B.I. *Cellular and Molecular Mechanisms of Regulation of the Hemostasis System in Norm and Pathology [Kletochnye i molekulyarnye mekhanizmy regulatsii sistemy gemostaza v norma i patologii]*. Chita: Ekspress-izdatelstvo; 2010. (in Russian)
15. Kuznik B.I., Sturov V.G., Levshin N.Yu., Maksimova O.G., Kudlay D.A. *Hemorrhagic and Thrombotic Diseases and Syndromes in Children and Adolescents [Gemorrahicheskie i tromboticheskie zabolevaniya i sindromy u detey i podrostkov]*. Novosibirsk: Nauka; 2018. (in Russian)
16. Weisel J.W., Litvinov R.I. Red blood cells: The forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2019; 17(2): 271–82. <https://doi.org/10.1111/jth.14360>
17. Grobler C., Maphumulo S.C., Grobbelaar L.M., Bredenkamp J.C., Laubscher G.J., Lourens P.J., et al. Covid-19: The rollercoaster of fibrin(ogen), D-dimer, von Willebrand Factor, P-selectin and their interactions with endothelial cells, platelets and erythrocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(14): 5168. <https://doi.org/10.3390/ijms21145168>
18. Della Rocca D.G., Magnocavallo M., Lavalle C., Romero J., Forleo G.B., Tarantino N., et al. Evidence of systemic endothelial injury and microthrombosis in hospitalized COVID-19 patients at different stages of the disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* 2020; 51(3): 571–6. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02330-1>
19. Thomas T., Stefanoni D., Dzieciatkowska M., Issaian A., Nemkov T., Hill R.C., et al. Evidence of structural protein damage and membrane lipid remodeling in red blood cells journal pre-proof Kub from COVID-19 patients. *J. Proteome Res.* 2020; 19(11): 4455–69. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00606>
20. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin. Pract.* 2020; 10(2): 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
21. Орлов Ю.П., Говорова Н.В., Лукач В.Н., Байтугаева Г.А., Клементьев А.В., Какуля Е.Н. Iron metabolism in conditions of infection. Review. *Vestnik intensivnoy terapii im. A.I. Saltanova.* 2020; (1): 90–9. <https://doi.org/10.21320/1818-474X-2020-1-90-99> EDN: <https://www.elibrary.ru/ivbhpx> (in Russian)
22. Gattinoni L., Chiumello D., Caironi P., Busana M., Romitti F., Brazzi L., et al. COVID-19 pneumonia: different respiratory treatments for different phenotypes? *Intensive Care Med.* 2020; 46(6): 1099–102. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-06033-2>
23. Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hölzer B., et al. COVID-19-induced ARDS is associated with decreased frequency of activated memory/effector T Cells expressing CD11a⁺⁺. *Mol. Ther.* 2020; 28(12): 2691–702. <https://doi.org/10.1016/j.yjth.2020.10.001>
24. Zhang X., Li S., Niu S. ACE2 and COVID-19 and the resulting ARDS. *Postgrad. Med. J.* 2020; 96(1137): 403–7. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-137935>
25. Navas-Blanco J.R., Dudaryk R. Management of respiratory distress syndrome due to COVID-19 infection. *BMC Anesthesiol.* 2020; 20(1): 177. <https://doi.org/10.1186/s12871-020-01095-7>

REFERENCES

1. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. COVID-19: 377 consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1033–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
2. Bonaventura A., Vecchié A., Dagna L., Martinod K., Dixon D.L., Van Tassel B.W., et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21(5): 319–29. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00536-9>
3. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. Abnormal coagulation parameters are associated with 379 poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(4): 844–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14768>
4. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel 382 coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet.* 2020; 395(10223): 507–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
5. Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A., Kuznik B., Umnov R. Peptides: Prospects for Use in the Treatment of COVID-19. *Molecules.* 2020; 25(19): 4389. <https://doi.org/10.3390/molecules25194389>
6. Kubánková M., Hohberger B., Hoffmanns J., Fürst J., Herrmann M., Guck J., et al. Physical phenotype of blood cells is altered in COVID-19. *Biophys. J.* 2021; 120(14): 2838–47. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.05.025>
7. Yuan X., Huang W., Ye B., Chen C., Huang R., Wu F., et al. Changes of hematological and immunological parameters in

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-171>

© БЛЯХЕР М.С., ФЕДОРОВА И.М., ТУЛЬСКАЯ Е.А., КАПУСТИН И.В., КОТЕЛЕВА С.И., РАМАЗАНОВА З.К., ОДИНЦОВ Е.Е., САНДАЛОВА С.В., НОВИКОВА Л.И., АЛЕШКИН А.В., БОЧКАРЕВА С.С., 2023



Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесённой COVID-19-инфекции или вакцинации против неё

Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С.

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия

Цель работы – оценка показателей специфического Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 при первичном и вторичном ответе на антигены вируса скрининговым методом.

Материалы и методы. Пациенты, перенёвшие COVID-19 в лёгкой и среднетяжёлой форме, были обследованы через 1–1,5 месяца после заболевания и через 6–10 месяцев (перед вакцинацией и после неё). Здоровые добровольцы обследованы перед вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак», 2–6 раз в ходе неё, а также через 6–8 месяцев (перед ревакцинацией и после неё). Уровень антител класса IgG и IgM к SARS-CoV-2 оценивали методом ИФА на тест-системах фирмы «Вектор-Бест» (Россия). Антигенную (АГ) активацию Т-клеток во фракции мононуклеаров, выделенных из крови обследуемых, оценивали по повышению продукции IFN- γ после АГ-стимуляции этих клеток в лунках готовых планшетов из ИФА-наборов, предназначенных для обнаружения антител против SARS-CoV-2. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

Результаты. После вакцинации здоровых людей у 88,5% выявлены АГ-специфические Т-клетки, причём у половины появление в крови Т-клеток, распознающих антиген, опережало появление антител к нему. Через 6–8 месяцев снижается как уровень АГ-активации, так и число проб, в которых она регистрируется. При ревакцинации уровень АГ-активации Т-клеток памяти *in vitro* повышается, и они до полугода выявляются у 76,9–100,0% привитых. Напротив, после COVID-19 у 86,7% людей на момент вакцинации в крови сохранялись АГ-специфические Т-клетки с высокой активностью. После вакцинации переболевших значительно увеличились показатели активности Т-клеток, распознающих RBD-домен S-белка SARS-CoV-2, и доля людей, в крови которых эти клетки выявлялись.

Заключение. Показано, что Т-клеточный иммунитет против антигенов вируса SARS-CoV-2 сохраняется не менее 6 месяцев после заболевания. У привитых ранее не болевших COVID-19 людей такая длительность сохранения АГ-специфических Т-клеток в циркулирующей крови достигается только после ревакцинации.

Ключевые слова: Т-клеточный иммунитет; антигены SARS-CoV-2; продукция интерферона γ ; вакцинация; COVID-19

Для цитирования: Бляхер М.С., Федорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И., Алешкин А.В., Бочкарева С.С. Формирование и сохранение специфического Т-клеточного иммунитета после перенесённой COVID-19-инфекции или вакцинации против неё. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(3): 205–214. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-171> EDN: <https://elibrary.ru/ттqnhо>

Для корреспонденции: Бляхер Мария Сергеевна, д-р мед. наук, профессор, ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия. E-mail: maria.s.b@bk.ru

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической, экспериментальной работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

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

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г).

Поступила 24.04.2023

Принята в печать 19.06.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-171>

Development and preservation of specific T-cell immunity after COVID-19 or vaccination against this infection

Mariya S. Blyakher, Irina M. Fedorova, Elena A. Tulskeya, Ivan V. Kapustin, Svetlana I. Koteleva, Zarema K. Ramazanova, Evgeny E. Odintsov, Svetlana V. Sandalova, Lidia I. Novikova, Andrej V. Aleshkin, Svetlana S. Bochkareva

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

Aim – evaluation of specific T-cell immunity against SARS-CoV-2 in primary and secondary response to virus antigens by screening method.

Materials and methods. Patients were tested 1–1.5 months after COVID-19 and 6–10 months before and after vaccination. Healthy volunteers were screened before, 2–6 times during the vaccination course, and 6–8 months after revaccination with the Sputnik V vaccine. IgG and IgM antibodies to SARS-CoV-2 were detected by ELISA using commercially available kits (Vector-Best, Russia). Antigenic (AG) activation of T cells in the fraction of blood's mononuclear cells was assessed by IFN- γ production after AG stimulation in the wells of plates from ELISA kits intended for detection of antibodies against SARS-CoV-2. Data were processed by MS Excel and Statistica 10.0 software.

Results. AG-specific T cells were detected in 88.5% of vaccinated healthy volunteers, half of whom were found to have T cells appearing earlier than antibodies to AG. After 6-8 months, the level of AG activation decreases. Following the revaccination, the level of AG activation of memory T cells in vitro increases within six months in 76.9–100.0% of vaccinated subjects. On the contrary, after COVID-19, 86.7% of individuals had in their blood the AG-specific T cells with high activity at the time of vaccination. The activity of T cells recognizing the RBD domain of the SARS-CoV-2 S protein and the proportion of individuals who had these cells in their blood increased after the vaccination of convalescents.

Conclusion. T-cell immunity against SARS-CoV-2 antigens has been shown to persist for 6 months after illness. In vaccinated individuals without history of COVID-19, such duration of the preservation of AG-specific T cells in blood was only achieved after the revaccination.

Keywords: *T-cell immunity; SARS-COV-2 antigens; IFN- γ production; vaccination; COVID-19*

For citation: Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskeya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I., Aleshkin A.V., Bochkareva S.S. Development and preservation of specific T-cell immunity after COVID-19 or vaccination against this infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 205-214 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-171> EDN: <https://elibrary.ru/ttqnh0>

For correspondence: Maria S. Blyakher, Dr. Sci. (Med.), G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia. E-mail: maria.s.b@bk.ru

Information about the authors:

Blyakher M.S., <https://orcid.org/0000-0003-3480-6873>

Fedorova I.M., <https://orcid.org/0000-0002-0335-2752>

Tulskeya E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1969-4009>

Kapustin I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6191-260X>

Koteleva S.I., <https://orcid.org/0000-0003-1878-2234>

Ramazanova Z.K., <https://orcid.org/0000-0002-9314-3312>

Odintsov E.E., <https://orcid.org/0000-0001-5895-2520>

Sandalova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4548-9888>

Novikova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-0307-4561>

Aleshkin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0532-1378>

Bochkareva S.S., <https://orcid.org/0000-0002-1204-7645>

Contribution: All authors made a significant contribution to the search and analytical, experimental work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 41 dated Dec. 10, 2020).

Received 24 April 2023

Accepted 19 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

Волнообразное изменение заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), чаще всего связанное с появлением новых штаммов вируса SARS-CoV-2¹, продолжается по настоящее время. Изучение формирования гуморального и клеточного иммунного ответа у людей, переболевших COVID-19, является необходимым для разработки вакцин, интерпретации патогенеза COVID-19 и корректировки мер борьбы с пандемией.

В большинстве опубликованных исследований Т-клеточный иммунитет к SARS-CoV-2 оценивают с помощью синтезированных авторами пептидов, соответствующих эпитопам Т-клеток, с помощью перекрывающихся пулов пептидов вирусных белков. Наиболее часто используются методы проточной цитометрии и ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) [1–3].

В то же время для исследования динамики развития клеточного иммунитета, длительности его сохранения, изменения при ревакцинации человека или его повторном заболевании, помимо использования унифицированных методов [4], крайне желательно обследование как можно большего количества людей, а также вовлеченность в исследования как можно большего числа лабораторий. Для этой цели ранее нами был предложен способ определения специфического клеточного иммунного ответа на антигены (АГ) коронавируса SARS-CoV-2, предполагающий активацию мононуклеаров крови человека в лунках планшетов с сорбированными АГ вируса, причём используются планшеты с АГ из наборов, предназначенных для обнаружения антител (АТ) против SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа (ИФА) [5]. Присутствие в пробах крови АГ-специфических Т-клеток регистрируется по повышению продукции ими интерферона (IFN) γ по сравнению с нестимулированной пробой. Чувствительность и специфичность метода, контроль участия НК-клеток в результирующей реакции подробно описаны в статье [6].

Цель работы – оценка показателей специфического Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2 при первичном и вторичном ответе на АГ вируса скрининговым методом. В настоящей работе представлены результаты мониторинга Т-клеточного иммунитета у лиц, впервые привитых вакциной против SARS-CoV-2, и у людей, переболевших COVID-19 в 2020–2021 гг.

Материалы и методы

Образцы цельной венозной крови и сыворотки были получены от 93 человек обоего пола в возрасте 18–70 лет, постоянно проживающих в Московском регионе. В число обследованных включены: 49 человек, перенёвших COVID-19 в лёгкой или среднетяжёлой форме в период с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. (диагностика и лечение проведены в поликлиниках и клиниках Москвы); 44 здоровых

добровольца, не имевших в анамнезе данного заболевания и планирующих вакцинацию против инфекции, обусловленной SARS-CoV-2 (они же приняли участие в исследовании по формированию Т-клеточного ответа после вакцинации). Работы с клиническим материалом проводились в соответствии с международными этическими нормами при информированном добровольном согласии обследуемых. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г.).

Переболевшие COVID-19 обследовались через 1–1,5 месяца после перенесённого заболевания. Из них 14 человек позднее (через 6–10 месяцев) обследовались перед вакцинацией «Гам-КОВИД-Вак» и после её завершения. Здоровый контроль – непосредственно перед вакцинацией (в день введения первого компонента вакцины), в этой группе брали кровь 4–6 раз в ходе вакцинации, а также через 3 и 6 месяцев после неё.

Кровь собирали в пробирки с гепарином (4 мл крови для исследования лимфоцитов) и с активатором образования сгустка (2 мл крови на сыворотку).

АТ к SARS-CoV-2 класса IgG (АТ IgM) и IgM (АТ IgM) определяли методом ИФА с помощью тест-систем «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020) и «SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10389 от 18.05.2020) соответственно согласно инструкциям разработчика. Трактовка результатов ИФА-тестирования проводилась в зависимости от коэффициента позитивности (КП). Реакция считалась отрицательной при $KP < 0,8$, положительной – при $KP \geq 1,1$, сомнительной – при $0,8 \leq KP < 1,1$.

Мононуклеары выделяли из цельной венозной крови в градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США), разводили до концентрации 5×10^6 /мл в полной среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FCS) (Biosera, Франция). Доля лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров колебалась от 85 до 92%.

Стимуляция лимфоцитов антигенами SARS-CoV-2

Активацию лимфоцитов проводили в 96-луночных планшетах с АГ SARS-CoV-2, сорбированными в лунках планшетов:

- антиген 1 (АГ1) – цельновиральный инактивированный АГ SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления АТ IgG к SARS-CoV-2 производства ФБУН ГНЦ «Вектор», № РЗН 2020/10017 от 10.04.2020);
- антиген 2 (АГ2) – рекомбинантный полноразмерный поверхностный тримеризованный S-гликопротеин SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления АТ IgG к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020);
- антиген 3 (АГ3) – рекомбинантный рецептор-связывающий домен поверхностного S-гликопротеина SARS-CoV-2 (ИФА-набор для выявления

¹<https://stopкоронавирус.рф/news/20220301-1300.htm>

Таблица 1. Средние показатели стимуляции Т-клеток различными вариантами антигенов SARS-CoV-2 у людей ($n = 49$), перенёвших COVID-19 1–1,5 месяца назад, Me [Q_1 – Q_3]**Table 1. Mean rates of T-cell stimulation by different variants of SARS-CoV-2 antigens in individuals ($n = 49$) who had COVID-19 1–1.5 months ago, Me [Q_1 – Q_3]**

Длительность стимуляции, ч Stimulation duration, h	Концентрация IFN- γ после стимуляции мононуклеаров крови антигенами SARS-CoV-2 (пг/мл) IFN- γ concentration after stimulation of blood mononuclear cells with SARS-CoV-2 antigens (pg/ml)			
	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3	Контрольный антиген Control antigen
20	84,2 [#] [43,1–296,6]	14,0 [4,8–48,4]	0,0 [0,0–12,6]	16,8 [2,1–24,2]
72	310,0 [#] [139,3–600,3]	228,8 ^{#*} [156,1–882,8]	27,7 [2,9–59,9]	0,0 [0,0–3,0]

Примечание. *Значимое отличие от величины при 20-часовой стимуляции ($p < 0,05$). [#]Значимое отличие от стимуляции контрольным антигеном ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference from the value at 20-hours stimulation ($p < 0.05$). [#]Significant difference from control antigen stimulation ($p < 0,05$).

АТ IgG к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», № РЗН 2020/10393 от 18.05.2020).

В качестве контрольного АГ использовали полистироловые планшеты, предназначенные для выявления АТ IgG к вирусу денге (Vircell, S.L., Испания, REF-G1018), с сорбированным вирусом денге (тип 1 – штамм Гавайи, тип 2 – Новая Гвинея, тип 3 – штамм H87 и тип 4 – штамм H241) – возбудителем, с которым подавляющее большинство жителей Московского региона не контактировало. Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Спонтанную продукцию IFN- γ оценивали в пробах, инкубированных в аналогичных условиях без АГ.

Супернатанты, собранные через 20 и 72 ч культивирования, хранили до исследования при температуре –40 °С. Концентрацию IFN- γ определяли методом ИФА с помощью тест-системы «Гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ» (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2017/16008 от 24.07.2017). Результаты учитывали как разницу (Δ) между АГ-стимулированной и спонтанной продукцией IFN- γ и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q_1 – Q_3]. В качестве порогового значения концентрации IFN- γ использовали 50 пг/мл (среднее значение различий между концентрациями IFN- γ , измеренными в триплетах, при определении уровня АГ-стимулированной продукции IFN- γ выделенными лимфоцитами).

Статистический анализ данных проведён с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel и Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Справедливость проверяемой гипотезы исследования оценивали по величине p , критическим значением которой считали $p < 0,05$.

Результаты

Обследование переболевших людей

С помощью разработанного нами метода было проведено определение АГ-специфических Т-клеток в образцах крови 49 людей через 1–1,5 месяца после COVID-19, перенесённого ими в 2020–2021 гг. Заболевание у всех протекало в лёгкой и среднетяжёлой

форме, инфицирование вирусом SARS-CoV-2 было подтверждено методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), лечение было амбулаторным.

АГ-стимуляция Т-лимфоцитов каждым из трёх применённых АГ регистрировалась по повышению продукции IFN- γ по сравнению с нестимулированной пробой. Для оценки неспецифической активации NK-клеток АГ SARS-CoV-2, фиксированными на пластике, использовали контрольный АГ, также фиксированный на пластике. В **табл. 1** показаны различия в величине стимулирующего эффекта при длительности стимуляции 20 и 72 ч.

На стимуляцию АГ вируса денге, также фиксированными в лунках полистиролового планшета, реакция мононуклеаров в обеих группах была низкой как при 20-часовой, так и при 72-часовой стимуляции.

Для АГ2 преимущество увеличения времени стимуляции мононуклеаров в планшетах очевидно. Величина эффекта при стимуляции АГ1 и АГ3 также увеличивается при 72-часовой АГ-стимуляции. При этом реакция на АГ3 появлялась только через 72 ч и была обнаружена у 24,5% переболевших.

Разработанный метод оказался удобен и при обследовании здоровых лиц, привитых против инфекции, обусловленной SARS-CoV-2. В **табл. 2** показана величина стимулирующего эффекта каждого из трёх АГ у 44 привитых людей через 3 недели после завершения вакцинации двухкомпонентной вакциной «Гам-КОВИД-Вак». В этой группе Т-клетки, специфичные в отношении АГ2 и АГ3, надёжно выявляются только при АГ-стимуляции в течение 72 ч.

Сохранение антиген-специфических Т-клеток у переболевших людей и изменение показателей Т-клеточной памяти в ходе вакцинации

В соответствии с Временными методическими рекомендациями по вакцинации против SARS-CoV-2² Минздрава России, в 2021 г. после перенесённого заболевания пациентам рекомендовалось прививаться через 6 месяцев. В связи с этим 14 человек из 49, ранее перенёвших COVID-19, были вакцинированы вакциной

²<https://minzdrav.gov.ru/news/2021/08/24/17217>

Таблица 2. Средние показатели стимуляции Т-клеток различными вариантами антигенов SARS-CoV-2 у здоровых людей ($n = 44$) после вакцинации, Ме [Q₁–Q₃]**Table 2. Mean rates of T-cell stimulation by different variants of SARS-CoV-2 antigens for healthy individuals ($n = 44$) after vaccination, Me [Q₁–Q₃]**

Длительность стимуляции, ч Stimulation duration, h	Концентрация IFN- γ после стимуляции мононуклеаров крови антигенами SARS-CoV-2 (пг/мл) IFN- γ concentration after stimulation of blood mononuclear cells with SARS-CoV-2 antigens (pg/ml)			
	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3	Контрольный антиген Control antigen
20	74,0 [#] [11,6–125,1]	0,0	5,8 [0,0–67,4]	5,4 [2,5–53,2]
72	139,6 [#] [70,9–349,5]	70,9 ^{#*} [0,0–263,6]	60,6 ^{#*} [23,6–109,9]	33,5 [9,7–46,5]

Примечание. *Значимое отличие от величины при 20-часовой стимуляции ($p < 0,05$). [#]Значимое отличие от стимуляции контрольным антигеном ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference from the value at 20-hours stimulation ($p < 0.05$). [#]Significant difference from control antigen stimulation ($p < 0.05$).

Таблица 3. Реакция Т-лимфоцитов на антигенную стимуляцию мононуклеаров крови людей, перенёвших COVID-19 ($n = 14$) 6–10 месяцев назад, перед вакцинацией и после неё, Ме [Q₁–Q₃]**Table 3. The response of T-lymphocytes to antigenic stimulation of blood mononuclear cells from individuals who had COVID-19 ($n = 14$) 6–10 months ago, before and after vaccination, Me [Q₁–Q₃]**

Срок после перенесенного заболевания Period after illness	Концентрация IFN- γ после стимуляции мононуклеаров крови (пг/мл) IFN- γ concentration after stimulation of blood mononuclear cells (pg/ml)			
	20 ч 20 h		72 ч 72 h	
	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3
1–1,5 месяца 1–1,5 month	90,5 [15,7–198,0]	134,6 [35,8–464,4]	86,4 [4,9–293,7]	1,6 [0,0–45,5]
6–10 месяцев (перед вакцинацией) 6–10 month (before vaccination)	49,5 [17,3–89,0]	144,1 [47,6–738,2]	145,8 [40,3–576,4]	13,5 [1,5–29,9]
Через 1–2 недели после вакцинации 1–2 weeks after vaccination	90,4 [56,8–180,1]	266,5 [94,2–830,6]	381,6* [73,5–915,5]	52,0* [0,0–103,4]

Примечание. *Значимое отличие от величины через 1–1,5 месяца после перенесённого заболевания ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference from the value 1–1.5 month after disease ($p < 0.05$).

«Гам-КОВИД-Вак». Перед вакцинацией у всех 14 пациентов в сыворотке крови присутствовали АГ IgG, однако показатели КП были ниже, чем у этих же людей при первом обследовании (Ме 7,6 и 13,3 соответственно). У троих сохранились АГ IgM.

Изменение активности АГ-специфических Т-клеток в течение полугода у этой группы людей показано в табл. 3. Результаты 72-часовой стимуляции приведены для всех антигенов, 20-часовой стимуляции – только для АГ1.

Через 1–1,5 месяца после перенесённого заболевания мононуклеары, выделенные из крови переболевших, при 20-часовой стимуляции реагировали на АГ1 у 87,5% людей, а при 72-часовой на АГ1 – у 71,4%, на АГ2 – у 50%, на АГ3 – у 28,6%. Средняя концентрация IFN- γ была максимальной при 72-часовой стимуляции АГ1.

Через полгода после первого обследования на 20-часовую стимуляцию АГ1 реагировали Т-клетки 57,1% доноров, на 72-часовую АГ1 – 78,6%, на АГ2 – 71,4%, АГ3 – 14,3% доноров. Уже через 1–2 недели после вакцинации эти частоты сменялись на 71,4; 100,0; 92,9; и 57,1% соответственно.

Ранее (при обследовании через 1 месяц после перенесённого заболевания) удлинение инкубации мо-

нонуклеаров с АГ1 приводило не к увеличению доли положительных проб, а только к усилению АГ-стимулированной продукции IFN- γ у некоторых людей. По прошествии 6 месяцев после заболевания у 14,3% обследованных 72-часовой период инкубации приводил к значительной активации Т-клеток, что подтверждается высокой продукцией IFN- γ . После вакцинации этой группы то же наблюдалось уже у 57,1% людей.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что на момент вакцинации в обследованной нами группе больше чем у половины людей, переболевших COVID-19, в крови сохранялись АГ-специфические Т-клетки и активность этих клеток была высока. После вакцинации значительно увеличились показатели активности Т-клеток, распознающих АГ2 и АГ3, и доля обследованных, в крови которых эти клетки выявлялись.

Обследование здоровых людей в ходе вакцинации

Динамика формирования и длительность сохранения Т-клеточного иммунитета были исследованы также у 44 здоровых лиц, не имевших в анамнезе COVID-19 и привитых в первой половине 2021 г. двухкомпонентной вакциной «Гам-КОВИД-Вак». На первых этапах проведённой работы не было ясно, какой срок после вакцинации оптимален для оценки пока-

Таблица 4. Реакция Т-лимфоцитов на антигенную стимуляцию мононуклеаров крови здоровых людей ($n = 44$) в ходе вакцинации, Me [Q₁–Q₃]**Table 4. The response of T-lymphocytes to antigenic stimulation of blood mononuclear cells from healthy individuals ($n = 44$) during vaccination, Me [Q₁–Q₃]**

Срок обследования Observations period	Концентрация IFN- γ после стимуляции мононуклеаров крови (пг/мл) IFN- γ concentration after stimulation of blood mononuclear cells (pg/ml)			
	20 ч 20 h		72 ч 72 h	
	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3
1 неделя после введения первого компонента ($n = 22$) 1 week after injection of the 1 st vaccine component ($n = 22$)	4,9 [0,0–16,5]	2,5 [0,0–29,6]	0,0 [0,0–0,6]	0,0 [0,0–0,0]
3 недели после введения первого компонента ($n = 40$) 3 weeks after injection of the 1 st vaccine component ($n = 40$)	78,9* [18,3–204,9]	110,5* [42,0–159,5]	0,0 [0,0–14,1]	14,4 [7,2–21,7]
3 недели после введения второго компонента ($n = 34$) 3 weeks after injection of the 2 nd vaccine component ($n = 34$)	41,9 [11,1–87,4]	112,5* [15,7–411,3]	51,0* [21,1–383,6]	53,2* [40,0–81,1]

Примечание. *Значимое отличие от величины через 1 неделю после введения первого компонента вакцины ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference from the value 1 week after injection of the 1st component of the vaccine ($p < 0.05$).

зателей Т-клеточного иммунитета в периферической крови привитых людей, поэтому первые 22 человека из 44 привитых сдавали кровь еженедельно. Из них у 10 человек Т-клеточная реакция и АТ появились после введения первого компонента вакцины – на 2–3-й неделе. Среднее увеличение IFN- γ (Me [Q₁–Q₃]) после 72-часовой стимуляции мононуклеаров АГ1 составляло 144,1 [96,8–222,9] пг/мл, сывороточная концентрация АТ IgG против S-гликопротеина SARS-CoV-2 была в диапазоне 10,1 < КП < 16,3. Особенностью подгруппы было появление Т-клеточной реакции на АГ на одну неделю раньше появления АТ (с 8-х по 15-е сутки после вакцинации). Возраст привитых людей в этой подгруппе был от 31 года до 57 лет.

У других 12 человек АТ IgG против S-гликопротеина SARS-CoV-2 появились через 3–4 недели после введения второго компонента вакцины. Средний возраст участников исследования в этой группе был выше, чем в первой: 2/3 группы составляли лица старше 60 лет. Опережение гуморального ответа Т-клеточным было отмечено в этой группе у небольшого количества участников исследования: у 4 из 12 человек (у 2 до 60 лет и у 2 – старше 60 лет). Из остального состава группы у троих были выявлены только АТ, а Т-клеточный ответ за указанный период наблюдения не был выявлен.

В табл. 4 представлено изменение Т-клеточного ответа на АГ1, АГ2 и АГ3 во всей группе из 44 здоровых привитых людей без разделения по возрасту и соотношению гуморального и клеточного ответа.

Через 7–12 дней после введения первого компонента вакцины 20-часовая стимуляция в присутствии АГ1 приводит к активации Т-клеток только у 13,6% привитых, а через 3 недели – у 45,0%. Увеличение длительности стимуляции мононуклеаров с 20 до 72 ч на этом этапе вакцинации приводило к увеличению разницы между концентрацией в АГ-стимулированной и интактной пробах, но доля положительных реакций не возрастала. Через 3 недели после полного курса вакцинации при 72-часовой стимуляции мононукле-

аров Т-клетки привитых людей активируются всеми исследованными АГ: АГ1 – у 88,2%, АГ2 – у 76,5%, АГ3 – у 82,3%. При этом у 8 привитых (23,5%) АГ-активация Т-лимфоцитов обнаружена только при 72-часовой инкубации, но не при 20-часовой.

Следовательно, при обследовании здоровых вакцинированных людей оптимальным сроком активации мононуклеаров также является 72-часовая стимуляция.

Примечательно, что после завершения вакцинации Т-клетки большинства обследованных активировались как АГ1, так и АГ2 практически одинаково – в 30 и 28 пробах соответственно. На этом сроке в группе обследованных были 3 человека, у которых Т-клетки отвечали на стимуляцию АГ3, но не давали реакцию на крупный цельновирионный АГ.

Уровень АТ к гликопротеину S вируса SARS-CoV-2 за описанный период изменялся следующим образом. Перед вакцинацией у людей, вошедших в группу здоровых, в крови отсутствовали АТ против SARS-CoV-2. Через 7–12 дней после первого компонента вакцины АТ IgM отсутствовали, а сывороточная концентрация АТ IgG определялась в диапазоне КП 0,0–7,1 (Me 0). Перед введением второго компонента АТ IgM обнаруживались у двоих (КП 2,8 и 3,5), медиана КП для АТ IgG равна 6,0. После полного курса вакцинации через 3 недели у большинства привитых уровень IgG против SARS-CoV-2 находился выше предела обнаружения (КП > 13,5); только у двоих из 44 доноров КП был 4,6 и 9,5 соответственно.

Также была проведена оценка длительности сохранения Т-клеточного иммунитета после вакцинации здоровых людей. Для этой цели было обследовано 17 из 44 участников описанной группы. Снижение уровня АТ IgG по сравнению с достигнутым в ходе вакцинации к этому моменту произошло у всех обследуемых (в среднем с КП 16,1 до 3,4; $p < 0,001$).

За период, прошедший между окончанием вакцинации и планируемой ревакцинацией (6–7 месяцев), никто из обследованных не перенёс заболевания, связанного с ПЦП-подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2,

Таблица 5. Изменение реакции Т-лимфоцитов на антигенную стимуляцию мононуклеаров крови здоровых людей ($n = 17$) после ревакцинации вакциной «Гам-КОВИД-Вак», Me [Q₁–Q₃]**Table 5.** Changes in the response of T-lymphocytes on the antigenic stimulation of blood mononuclear cells from healthy individuals ($n = 17$) after revaccination with «Gam-COVID-Vac» vaccine, Me [Q₁–Q₃]

Срок обследования Observation period	Концентрация IFN- γ после стимуляции мононуклеаров крови (пг/мл) IFN- γ concentration after stimulation of blood mononuclear cells (pg/ml)			
	20 ч 20 h		72 ч 72 h	
	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3
Перед ревакцинацией Before revaccination	20,5 [11,8–57,0]	85,8 [45,7–272,2]	74,8 [39,6–231,5]	28,1 [7,0–76,2]
1–3 недели после ревакцинации 1–3 weeks after revaccination	43,5 [13,0–126,1]	162,3 [127,6–359,1]	139,6 [92,6–324,4]	67,9* [24,0–125,0]
6 месяцев после ревакцинации 6 months after revaccination	56,8* [36,0–144,7]	549,4* [108,5–1234,3]	300,9* [117,9–863,4]	300,5* [25,2–628,2]

Примечание. *Значимое отличие от величины перед ревакцинацией ($p < 0,05$).

Note. *Significant difference from the value before revaccination ($p < 0.05$).

хотя бессимптомную инфекцию исключить было нельзя. Обследование проводилось перед ревакцинацией, через 1–2 недели после ревакцинации вакцинами «Гам-КОВИД-Вак» и через 6 месяцев после этого (табл. 5). Участники исследования ревакцинировались в разное время с июля по ноябрь 2021 г., в период до появления на территории России штамма омикрон.

К моменту ревакцинации у людей, привитых вакциной «Гам-КОВИД-Вак» 6 месяцев назад, эффективность стимуляции мононуклеаров АГ1 снижается и в 20-часовых, и в 72-часовых культурах. Только у 17,6% доноров через 20 ч стимуляции в планшете с АГ1 активируются Т-клетки. Через 72 ч стимуляции АГ1 активирует Т-клетки у 70,6% обследованных, АГ2 – у 52,9%, АГ3 – у 41,9%. У данной группы людей также выполняется закономерность, описанная ранее на материале переболевших: оптимальные условия для стимуляции создавались не при 20-часовой, а при 72-часовой инкубации мононуклеаров в лунках с АГ.

Через 1–2 недели после ревакцинации показатели Т-клеточного иммунитета в отношении всех АГ значимо возрастают. Активация Т-лимфоцитов АГ1, АГ2 и АГ3 через 72 ч регистрируется в 100,0; 94,1 и 58,8% проб. Формирование вторичного иммунитета, по-видимому, не завершается за 2 недели, и через 6 месяцев АГ3 распознается Т-клетками уже 88,2% доноров, а АГ1 и АГ2 – 100,0% доноров.

Уровень АТ IgG против S-гликопротеина SARS-CoV-2 значимо ($p < 0,001$) увеличился после ревакцинации и через 3–4 недели характеризовался средним КП 15,3 [14,8–15,3]. Через 6 месяцев концентрация АТ оставалась высокой более чем у половины ревакцинированных: КП 10,9 [6,6–14,2].

Как для научных, так и для практических целей необходимо понимание широты распознавания Т-клетками, циркулирующими на периферии, иммунодоминантных эпитопов вируса SARS-CoV-2. В табл. 6 представлены сводные результаты по частоте проявления положительных реакций мононуклеаров на 72-часовую АГ-стимуляцию.

Как видно из табл. 6, максимальная частота положительных реакций на АГ-стимуляцию наблюдается при использовании АГ1. Повторная встреча клеток иммунной системы с вирусом SARS-CoV-2 в результате ревакцинации или вакцинации переболевших приводит к увеличению числа людей, Т-клетки которых активируются более мелкими фрагментами вируса – АГ2 и АГ3. Наибольшее количество проб, в которых АГ-специфические Т-клетки активировались стимуляцией АГ2 и АГ3, выявлялось через 6 месяцев после первого обследования и позднее.

Обсуждение

Проведённое исследование показало, что разработанный нами метод пригоден для мониторинга постинфекционного и поствакцинального иммунитета. АГ SARS-CoV-2, фиксированные в лунках планшетов из ИФА-наборов для обнаружения АТ IgG, доступны для поглощения, процессинга, презентации и распознавания клетками мононуклеарной фракции, выделенной из крови пациента. Данное обстоятельство упрощает и удешевляет исследования Т-клеточного иммунитета. Его главным преимуществом является тот факт, что, возможно, уступая другим вариантам IGRA-тестов в чувствительности и аспектам узкой специфичности, данный метод может позволить решить важные задачи в исследовании клеточного иммунитета.

Очень важно, чтобы исследования проводились на стандартно произведённых наборах реагентов, тогда результаты, полученные в разных лабораториях, будут сравнимыми. В статье Д.А. Потеряева и соавт. [4] справедливо указывается, что «количественное значение защитного уровня Т-клеток, определяемое одним набором ELISPOT, нельзя прямо экстраполировать на другой набор». Разнообразие пептидов вирусных белков, синтезированных разными авторами, способствует пониманию взаимодействия между вирусом и организмом хозяина, однако может создавать и сложности. Существует мнение, что исследования Т-клеток памяти с использованием только коротких синтетических

Таблица 6. Частота положительных реакций на антигенную стимуляцию мононуклеаров крови, которые способны активироваться после заболевания и (или) вакцинации

Table 6. The frequency of positive reactions to antigenic stimulation of blood mononuclear cells that are able to be activated after disease and/or vaccination

Группа Group	Срок обследования Observations period	Доля лиц с положительной реакцией при стимуляции мононуклеаров крови (%) Proportion of individuals with a positive reaction after blood mononuclear cells stimulation mononuclear cells (%)				
		Реакция на 1 антиген Reaction to 1 antigen			Реакция на 2 антигена Reaction to 2 antigens	
		Антиген 1 Antigen 1	Антиген 2 Antigen 2	Антиген 3 Antigen 3	Антигены 1 и 2 Antigens 1 and 2	Антигены 2 и 3 Antigens 2 and 3
Переболевшие (n = 14) People who had COVID-19 (n = 14)	1–1,5 месяца после заболевания 1–1,5 month after disease	74,1	50,0	28,6	50,0	28,6
	Перед вакцинацией Before vaccination	78,6	71,4	14,3	71,4	14,3
	1–2 недели после вакцинации 1–2 weeks after vaccination	100,0	92,9	57,1	92,9	57,1
	6 месяцев после вакцинации 6 months after vaccination	100,0	100,0	64,2	100,0	57,1
Здоровые (n = 17) Healthy people (n = 17)	После полного курса вакцинации After full vaccination schedule	88,2	76,5	82,3	76,5	70,6
	Перед ревакцинацией Before revaccination	70,6	52,9	41,9	52,9	23,5
	1–3 недели после ревакцинации 1–3 weeks after revaccination	100,0	94,1	58,8	94,1	47,1
	6 месяцев после ревакцинации 6 months after revaccination	100,0	100,0	88,2	100,0	74,6

пептидов может выявлять в числе прочих низкоаффинные Т-клетки, не играющие роли в уничтожении инфицированных вирусом мишеней, но приводящие к завышенной оценке числа клеток памяти [7].

Переход от текущего состояния, когда Т-клеточный иммунитет квалифицированно может исследоваться только в ограниченном круге хорошо оборудованных лабораторий, к тому, чтобы его оценка стала действительно широкодоступной, потребует значительного времени. Тем не менее если бы уже на настоящем этапе можно было создать условия для получения материалов исследования из лабораторий разного уровня обеспеченности, то это значительно приблизило бы создание стандартного дизайна исследований для сравнения показателей у разных пациентов или у одного и того же человека на разных стадиях постинфекционного/поствакцинального периода.

Полученные данные показывают, что предлагаемый нами метод может успешно применяться как скрининговый. Наши результаты соответствуют данным научных статей, сообщающих о длительном (6 и более месяцев) сохранении у переболевших Т-клеток памяти, специфичных к спайк-белку, если такие клетки обнаруживались у них сразу после перенесённого заболевания [8–10], в том числе при лёгких формах заболевания [11]. Некоторые авторы указывают, что и уровень АТ к спайк-белку у переболевших за полгода и даже за год не претерпевает существенного снижения [12–14]. Мы же, напротив, отмечали снижение концентрации АТ. Возможно, эти различия зависят от размера выборки и доли пациентов разных

возрастов. W.N. Chia и соавт. [15], проанализировав данные более 500 пациентов, пришли к выводу, что прогноз продолжительности иммунитета может быть точно определён только на индивидуальном уровне.

После вакцинации переболевших у обследованных нами пациентов через 1–2 недели появились Т-клетки, специфичные не только в отношении спайк-белка (у 100,0% группы), но и его RBD-домена (у 57,1% группы). Вероятно, несмотря на то что переболевшие при введении вакцины развивали вторичный иммунный ответ на АГ вируса, срок в 1–2 недели после вакцинации был неоптимальным для выявления АГ-специфических Т-клеток (позднее у тех же лиц показатели активации Т-клеток АГ1, АГ2 и АГ3 были выше), однако в процессе работы нас интересовало, в частности, как быстро в крови человека появляются такие клетки.

При мониторинге поствакцинального иммунного ответа у здоровых людей, не имевших АТ к SARS-CoV-2, мы в соответствии с информированным согласием доноров также начинали забор крови для исследования через 1 неделю после введения первого компонента вакцины. В этот момент, ещё до появления АТ против спайк-белка, у 13,6% привитых (3 человека из 22) Т-клетки активировались в присутствии АГ1, а через 3 недели – у 45,0%. Реакция на АГ2 и АГ3 на этом сроке не была обнаружена ни при 24-часовой, ни при 72-часовой стимуляции, тогда как после введения второго компонента вакцины через 3 недели АГ3 активирует Т-клетки у 82,3% участников исследования.

Нам представляется интересным наблюдение, что у людей, в крови которых удалось выявить АГ-специфи-

ческие Т-клетки уже после введения первого компонента вакцины «Гам-КОВИД-Вак», Т-клеточная реакция на АГ на одну неделю опережала появление АГ. Возраст привитых людей в этой группе был от 31 до 57 лет. В научной литературе имеются единичные сообщения на этот счёт [16]. Однако показано, что при COVID-19 Т-клетки появляются раньше, чем АГ [17].

Появление и динамика количества АГ-специфических Т-клеток в большинстве статей анализируются начиная с 1 месяца после завершения вакцинации. При этом имеются противоречивые сведения о доле привитых людей, у которых образовались Т-клетки памяти [18–22]. Наличие реакции Т-клеток на тот или иной АГ SARS-CoV-2, вероятно, зависит от биологической доступности АГ, сорбированных на пластике, особенно небольших пептидов. В этом смысле технология Quantiferon, где АГ SARS-CoV-2 или их Т-клеточные эпитопы напылены на пластик [8, 9], имеет преимущество перед обычными ИФА-тест-системами, где использование полистирола с высокой сорбционной способностью может ограничивать захват и процессинг АГ мононуклеарами крови. В то же время цельновирионный АГ (АГ1) и S-белок (АГ2) содержат RBD, эпитопы которого могут вызывать активацию АГ-специфических Т-клеток, сформировавшихся в организме вакцинированных людей, а биодоступность RBD из планшетов с АГ1 и АГ2, вероятно, выше, чем из планшетов с АГ3.

С этими же особенностями связан, по-видимому, и наблюдавшийся нами переход от состояния, когда после первого введения вакцины или сразу после болезни АГ-специфические Т-клетки эффективно выявлялись через 20 ч инкубации, а по прошествии нескольких месяцев у значительной части обследованных их можно было обнаружить только при 72-часовой стимуляции.

По-видимому, для того чтобы после активации АГ, фиксированными на пластике, в культуре мононуклеаров накопилось количество IFN- γ , надёжно показывающее факт активации, требуется именно 72 ч инкубации. Однако на этапе первичного иммунного ответа (после введения первого компонента вакцины) количество Т-клеток, взаимодействующих с АГ, ещё слишком мало, и биодоступность АГ на пластике имеет решающее значение: Т-лимфоциты привитых первым компонентом вакцины активируются в присутствии крупного вирусного фрагмента (АГ1).

Заключение

Проведённое исследование показало, что разработанный нами метод может быть успешно применён для мониторинга Т-клеточного ответа на АГ SARS-CoV-2 у людей в постинфекционном и поствакцинальном периоде. Он достаточно чувствителен и специфичен, относительно несложен, осуществим на отечественных реагентах, недорог. Для указанной задачи целесообразно применять готовые полистироловые планшеты с фиксированным полноразмерным S-гликопротеином SARS-CoV-2 (АГ2).

Увеличение продолжительности АГ-стимуляции до 72 ч позволяет обнаруживать предложенным на-

ми методом АГ-специфические Т-клетки не только к цельновирионному АГ SARS-CoV-2, но и к его S-гликопротеину, а также к его фрагменту – RBD.

В настоящее время, через 3 года после начала пандемии COVID-19, обусловленной новым коронавирусом SARS-CoV-2, когда выявлено уже так много новых штаммов этого вируса, возникает вопрос о том, имеет ли значение выявление Т-клеток памяти, специфичных к S-гликопротеину первоначального возбудителя COVID-19 [21], однако использованный нами метод осуществим и на планшетах с АГ других, более актуальных штаммов SARS-CoV-2, если соответствующие ИФА-тест-системы будут выпускаться.

Проведённый нами мониторинг постинфекционного иммунитета у лиц, перенёсших COVID-19 в 2020–2021 гг., показал, что Т-клеточный иммунитет против АГ вируса SARS-CoV-2 сохраняется не менее 6 месяцев после заболевания. У привитых, если они ранее не болели COVID-19, такая длительность сохранения АГ-специфических Т-клеток в циркулирующей крови достигается только после ревакцинации, что подтверждается и другими авторами [9, 22, 23].

ЛИТЕРАТУРА

1. Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol. Rev.* 2022; 310(1): 27–46. <https://doi.org/10.1111/imr.13089>
2. Quadeer A.A., Ahmed S.F., McKay M.R. Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform. *Cell Rep. Med.* 2021; 2(6): 1003–12. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100312>
3. Kedzierska K., Thomas P.G. Count on us: T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Rep. Med.* 2022; 3(3): 100562. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100562>
4. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнатъева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192> <https://www.elibrary.ru/uouyprx>
5. Бляхер М.С., Капустин И.В., Одинцов Е.Е., Рамазанова З.К., Сандалова С.В., Тульская Е.А. и др. Способ определения специфического клеточного иммунного ответа на антигены коронавируса (SARS-COV-2). Патент РФ № 2780369 С1; 2021.
6. Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К. и др. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(6): 527–37. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>
7. Bacher P., Rosati E., Esser D., Martini G.R., Saggau C., Schiminsky E., et al. Low-avidity CD4+ T cell responses to SARS-CoV-2 in unexposed individuals and humans with severe COVID-19. *Immunity.* 2020; 53(6): 1258–71.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.016>
8. Лобов А.В., Иванова П.И., Погодина Е.А., Казей В.И., Максимова Е.Д., Шубина И.Ж. Оценка клеточного звена иммунитета при новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Российский биотерапевтический журнал.* 2021; 20(4): 10–7. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17> <https://www.elibrary.ru/hdnbwe>
9. Jaganathan S., Stieber F., Rao S.N., Nikolayevskyy V., Manisero D., Allen N., et al. Preliminary evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIArearch anti-SARS-CoV-2 total test in recently vaccinated individuals. *Infect. Dis. Ther.* 2021; 10(4): 2765–76. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00521-8>
10. Yao L., Wang G.L., Shen Y., Wang Z.Y., Zhan B.D., Duan L.J., et al. Persistence of antibody and cellular immune responses in coronavirus disease 2019 patients over nine months after infection. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(4): 586–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab255>
11. Rank A., Tzortzini A., Kling E., Schmid C., Claus R., Löll E., et al. One year after mild COVID-19: The majority of patients maintain

- specific immunity, but one in four still suffer from long-term symptoms. *J. Clin. Med.* 2021; 10(15): 3305. <https://doi.org/10.3390/jcm10153305>
12. Mak W.A., Koeleman J.G.M., van der Vliet M., Keuren F., Ong D.S.Y. SARS-CoV-2 antibody and T cell responses one year after COVID-19 and the booster effect of vaccination: A prospective cohort study. *J. Infect.* 2022; 84(2): 171–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.003>
 13. Martynova E., Hamza S., Garanina E.E., Kabwe E., Markelova M., Shakirova V., et al. Long term immune response produced by the SputnikV vaccine. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(20): 11211. <https://doi.org/10.3390/ijms222011211>
 14. Комбарова С.Ю., Алешкин А.В., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Затевалов А.М., Мехтиев Э.Р. и др. Особенности гуморального ответа на инфекцию, вакцинацию и ревакцинацию при COVID-19. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2022; 173(6): 719–25. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-6-719-725> <https://www.elibrary.ru/jghnpl>
 15. Chia W.N., Zhu F., Ong S.W.X., Young B.E., Fong S.W., Le Bert N., et al. Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study. *Lancet Microbe.* 2021; 2(6): e240–9. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(21\)00025-2](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00025-2)
 16. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Qui M., de Alwis R., Sim J.X.Y., Lim J.M.E., et al. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med.* 2021; 2(6): 682–8.e4. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.04.003>
 17. Goletti D., Petrone L., Manissero D., Bertoletti A., Rao S., Ndunda N., et al. The potential clinical utility of measuring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific T-cell responses. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021; 27(12): 1784–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.005>
 18. Anderson E.J., Rouphael N.G., Widge A.T., Jackson L.A., Roberts P.C., Makhene M., et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(25): 2427–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>
 19. Sahin U., Muik A., Vogler I., Derhovanessian E., Kranz L., Vormehr M., et al. BNT162b2 induces SARS-CoV-2-neutralising antibodies and T cells in humans. *medRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.20245175>
 20. Ewer K.J., Barrett J.R., Belij-Rammerstorfer S., Sharpe H., Makinson R., Morter R., et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat. Med.* 2021; 27(2): 270–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>
 21. Sadoff J., Le Gars M., Shukarev G., Heerwegh D., Truyers C., de Groot A.M., et al. Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(19): 1824–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034201>
 22. Parry H.M., Bruton R., Tut G., Ali M., Stephens C., Faustini S., et al. Single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 in older people induces equivalent antibody generation but enhanced cellular responses after ChAdOx1. *Lancet.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3825573>
 23. Tomalka J.A., Suthar M.S., Deeks S.G., Sekaly R.P. Fighting the SARS-CoV-2 pandemic requires a global approach to understanding the heterogeneity of vaccine responses. *Nat. Immunol.* 2022; 23(3): 360–70. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01130-4>
- REFERENCES**
1. Sette A., Crotty S. Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunol. Rev.* 2022; 310(1): 27–46. <https://doi.org/10.1111/immr.13089>
 2. Quadeer A.A., Ahmed S.F., McKay M.R. Landscape of epitopes targeted by T cells in 852 individuals recovered from COVID-19: Meta-analysis, immunoprevalence, and web platform. *Cell Rep. Med.* 2021; 2(6): 1003–12. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100312>
 3. Kedzierska K., Thomas P.G. Count on us: T cells in SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell Rep. Med.* 2022; 3(3): 100562. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100562>
 4. Poteryaev D.A., Abbasova S.A., Ignat'eva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigrTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2021; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192> <https://www.elibrary.ru/uoyypx> (in Russian)
 5. Blyakher M.S., Kapustin I.V., Odintsov E.E., Ramazanova Z.K., Sandalova S.V., Tul'skaya E.A., et al. Method for determining the specific cellular immune response to coronavirus antigens (SARS-CoV-2). Patent RF № 2280590; 2022. (in Russian)
 6. Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tul'skaya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., et al. Assessment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 convalescents. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(6): 527–37. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151> (in Russian)
 7. Bacher P., Rosati E., Esser D., Martini G.R., Saggau C., Schiminsky E., et al. Low-avidity CD4+ T cell responses to SARS-CoV-2 in unexposed individuals and humans with severe COVID-19. *Immunity.* 2020; 53(6): 1258–71.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.11.016>
 8. Lobov A.V., Ivanova P.I., Pogodina E.A., Kazey V.I., Maksimova E.D., Shubina I.Zh. Assessment of the cellular immunity response to the new coronavirus infection COVID-19. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal.* 2021; 20(4): 10–7. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-10-17> <https://www.elibrary.ru/hdnbwe> (in Russian)
 9. Jaganathan S., Stieber F., Rao S.N., Nikolayevskyy V., Manissero D., Allen N., et al. Preliminary evaluation of QuantiFERON SARS-CoV-2 and QIAreac anti-SARS-CoV-2 total test in recently vaccinated individuals. *Infect. Dis. Ther.* 2021; 10(4): 2765–76. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00521-8>
 10. Yao L., Wang G.L., Shen Y., Wang Z.Y., Zhan B.D., Duan L.J., et al. Persistence of antibody and cellular immune responses in coronavirus disease 2019 patients over nine months after infection. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(4): 586–94. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab255>
 11. Rank A., Tzortzini A., Kling E., Schmid C., Claus R., Löll E., et al. One year after mild COVID-19: The majority of patients maintain specific immunity, but one in four still suffer from long-term symptoms. *J. Clin. Med.* 2021; 10(15): 3305. <https://doi.org/10.3390/jcm10153305>
 12. Mak W.A., Koeleman J.G.M., van der Vliet M., Keuren F., Ong D.S.Y. SARS-CoV-2 antibody and T cell responses one year after COVID-19 and the booster effect of vaccination: A prospective cohort study. *J. Infect.* 2022; 84(2): 171–8. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.003>
 13. Martynova E., Hamza S., Garanina E.E., Kabwe E., Markelova M., Shakirova V., et al. Long term immune response produced by the SputnikV vaccine. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(20): 11211. <https://doi.org/10.3390/ijms222011211>
 14. Kombarova S.Yu., Aleshkin A.V., Novikova L.I., Bochkareva S.S., Zatevalov A.M., Mekhtiev E.R., et al. Features of the humoral response to infection, vaccination, and revaccination during COVID-19. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2022; 173(6): 719–25. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2022-173-6-719-725> <https://www.elibrary.ru/jghnpl> (in Russian)
 15. Chia W.N., Zhu F., Ong S.W.X., Young B.E., Fong S.W., Le Bert N., et al. Dynamics of SARS-CoV-2 neutralising antibody responses and duration of immunity: a longitudinal study. *Lancet Microbe.* 2021; 2(6): e240–9. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(21\)00025-2](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(21)00025-2)
 16. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Qui M., de Alwis R., Sim J.X.Y., Lim J.M.E., et al. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med.* 2021; 2(6): 682–8.e4. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2021.04.003>
 17. Goletti D., Petrone L., Manissero D., Bertoletti A., Rao S., Ndunda N., et al. The potential clinical utility of measuring severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-specific T-cell responses. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021; 27(12): 1784–9. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.07.005>
 18. Anderson E.J., Rouphael N.G., Widge A.T., Jackson L.A., Roberts P.C., Makhene M., et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(25): 2427–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028436>
 19. Sahin U., Muik A., Vogler I., Derhovanessian E., Kranz L., Vormehr M., et al. BNT162b2 induces SARS-CoV-2-neutralising antibodies and T cells in humans. *medRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.20245175>
 20. Ewer K.J., Barrett J.R., Belij-Rammerstorfer S., Sharpe H., Makinson R., Morter R., et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nat. Med.* 2021; 27(2): 270–8. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01194-5>
 21. Sadoff J., Le Gars M., Shukarev G., Heerwegh D., Truyers C., de Groot A.M., et al. Interim results of a phase 1-2a trial of Ad26.COV2.S COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(19): 1824–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034201>
 22. Parry H.M., Bruton R., Tut G., Ali M., Stephens C., Faustini S., et al. Single vaccination with BNT162b2 or ChAdOx1 in older people induces equivalent antibody generation but enhanced cellular responses after ChAdOx1. *Lancet.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3825573>
 23. Tomalka J.A., Suthar M.S., Deeks S.G., Sekaly R.P. Fighting the SARS-CoV-2 pandemic requires a global approach to understanding the heterogeneity of vaccine responses. *Nat. Immunol.* 2022; 23(3): 360–70. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01130-4>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-172>

© КУДРОВ Г.А., ЗАЙНУТДИНОВ С.С., ГРАЖДАНЦЕВА А.А., ШИПОВАЛОВ А.В., СИВОЛОБОВА Г.Ф., СЕМЕНОВА А.В., МЕРКУЛЬЕВА Ю.А., ЩЕРБАКОВ Д.Н., ТАРАНОВ О.С., ЗАЙКОВСКАЯ А.В., ШУЛЬГИНА И.С., ПЬЯНКОВ О.В., КОЧНЕВА Г.В., 2023



Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) штамма Москва

Кудров Г.А., Зайнутдинов С.С., Гражданцева А.А., Шиповалов А.В., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Таранов О.С., Зайковская А.В., Шульгина И.С., Пьянков О.В., Кочнева Г.В.

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

Введение. Одним из наиболее удобных, безопасных и эффективных способов профилактики респираторных инфекций, включая COVID-19, является интраназальная вакцинация с использованием живых векторных вакцин на основе непатогенных или слабопатогенных для человека вирусов. Вирус Сендай как нельзя лучше подходит для этих целей, поскольку он является респираторным вирусом и способен, не вызывая заболевания, ограниченно реплицироваться в клетках бронхиального эпителия человека.

Цель работы – конструирование и изучение вакцинных свойств рекомбинантного варианта вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего секретрируемый рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2 штамма дельта (RBDdelta), при однократной интраназальной иммунизации.

Материалы и методы. Рекомбинантный вариант вируса Сендай штамма Москва, несущий вставку трансгена RBDdelta между генами *P* и *M*, сконструирован методами обратной генетики и синтетической биологии. Экспрессию трансгена RBDdelta оценивали методом вестерн-блоттинга. Иммуногенность вакцины исследовали на двух моделях: сирийских хомяках и мышах линии BALB/c. Иммуногенность оценивали методами ИФА и в реакции вируснейтрализации. Протективность оценивали по уровню снижения репликации вируса SARS-CoV-2 в тканях носовой полости и лёгких методом количественной ОТ-ПЦР-РВ у вакцинированных животных, а также гистологическим анализом лёгких.

Результаты. На основе штамма Москва вируса Сендай сконструирован рекомбинантный вариант Sen-RBDdelta(M), экспрессирующий секретрируемую форму RBDdelta, которая иммунологически идентична природному RBD S-белка SARS-CoV-2. Однократное интраназальное введение Sen-RBDdelta(M) сирийским хомякам и мышам линии BALB/c значительно – в 15 и 107 раз соответственно – снижает репликативную активность SARS-CoV-2 в лёгких животных, предотвращая развитие пневмонии. На мышинной модели также показана эффективная индукция вируснейтрализующих антител против дельта-штамма SARS-CoV-2.

Заключение. Рекомбинантный вариант вируса Сендай штамма Москва Sen-RBDdelta(M) является перспективным вакцинным конструктором в отношении инфекции SARS-CoV-2 и обладает протективными свойствами уже при однократном интраназальном введении.

Ключевые слова: вирус Сендай; рекомбинантный вариант вируса; SARS-CoV-2; RBD; иммуногенность; протективность

Для цитирования: Кудров Г.А., Зайнутдинов С.С., Гражданцева А.А., Шиповалов А.В., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Таранов О.С., Зайковская А.В., Шульгина И.С., Пьянков О.В., Кочнева Г.В. Интраназальная вакцина против COVID-19 на основе рекомбинантного варианта вируса Сендай (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) штамма Москва. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 215-227. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-172> EDN: <https://elibrary.ru/tyngdx>

Для корреспонденции: Кочнева Галина Вадимовна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru, g.v.kochneva@yandex.ru

Участие авторов: Кудров Г.А., Зайнутдинов С.С., Шиповалов А.В., Щербаков Д.Н., Таранов О.С., Зайковская А.В. – проведение экспериментов, интерпретация данных, подготовка текста; Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Семенова А.В., Меркульева Ю.А., Шульгина И.С. – проведение экспериментов; Пьянков О.В. – одобрение окончательного варианта статьи; Кочнева Г.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) ГЗ-37/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных, национальных и международных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен биоэтической комиссией организации (протокол № 3 от 28.12.2022).

Поступила 25.04.2023
Принята в печать 19.06.2023
Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-172>

Intranasal vaccine against COVID-19 based on a recombinant variant of the Sendai virus (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) strain Moscow

Gleb A. Kudrov, Sergei S. Zainutdinov, Antonina A. Grazhdantseva, Andrey V. Shipovalov, Galina F. Sivolobova, Anastasiya V. Semenova, Iuliia A. Merkuleva, Dmitry N. Shcherbakov, Oleg S. Taranov, Anna V. Zaykovskaya, Irina S. Shulgina, Oleg V. Pyankov, Galina V. Kochneva

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Introduction. Intranasal vaccination using live vector vaccines based on non-pathogenic or slightly pathogenic viruses is the one of the most convenient, safe and effective ways to prevent respiratory infections, including COVID-19. Sendai virus is the best suited for this purpose, since it is respiratory virus and is capable of limited replication in human bronchial epithelial cells without causing disease.

The aim of the work is to design and study the vaccine properties of recombinant Sendai virus, Moscow strain, expressing secreted receptor-binding domain of SARS-CoV-2 Delta strain S protein (RBDdelta) during a single intranasal immunization.

Materials and methods. Recombinant Sendai virus carrying insertion of RBDdelta transgene between P and M genes was constructed using reverse genetics and synthetic biology methods. Expression of RBDdelta was analyzed by Western blot. Vaccine properties were studied in two models: Syrian hamsters and BALB/c mice. Immunogenicity was evaluated by ELISA and virus-neutralization assays. Protectiveness was assessed by quantitation of SARS-CoV-2 RNA in RT-PCR and histological analysis of the lungs.

Results. Based on Sendai virus Moscow strain, a recombinant Sen-RBDdelta(M) was constructed that expressed a secreted RBDdelta immunologically identical to natural SARS-CoV-2 protein. A single intranasal administration of Sen-RBDdelta(M) to hamsters and mice significantly, by 15 and 107 times, respectively, reduced replicative activity of SARS-CoV-2 in lungs of animals, preventing the development of pneumonia. An effective induction of virus-neutralizing antibodies has also been demonstrated in mice.

Conclusion. Sen-RBDdelta(M) is a promising vaccine construct against SARS-CoV-2 infection and has a protective properties even after a single intranasal introduction.

Keywords: *Sendai virus; recombinant variant of the virus; SARS-CoV-2; RBD; immunogenicity; protectiveness*

For citation: Kudrov G.A., Zainutdinov S.S., Grazhdantseva A.A., Shipovalov A.V., Sivolobova G.F., Semenova A.V., Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Taranov O.S., Zaykovskaya A.V., Shulgina I.S., Pyankov O.V., Kochneva G.V. Intranasal vaccine against COVID-19 based on a recombinant variant of the Sendai virus (Paramyxoviridae: *Respirovirus*) strain Moscow. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 215-227. (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-172> EDN: <https://elibrary.ru/tyngdx>

For correspondence: Galina V. Kochneva, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Viral Hepatitis Laboratory, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru, g.v.kochneva@yandex.ru

Information about the authors:

Kudrov G.A., <https://orcid.org/0000-0002-8251-7040>
Zainutdinov S.S., <https://orcid.org/0000-0001-5818-4402>
Grazhdantseva A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7712-3699>
Shipovalov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>
Sivolobova G.F., <https://orcid.org/0000-0002-8362-0314>
Semenova A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7767-0537>
Merkuleva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-6974-0686>
Shcherbakov D.N., <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>
Taranov O.S., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Zaykovskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

Shulgina I.S., <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Kochneva G.V., <https://orcid.org/0000-0002-2420-0483>

Contribution: Kudrov G.A., Zainutdinov S.S., Shipovalov A.V., Shcherbakov D.N., Taranov O.S., Zaykovskaya A.V. – conducting of the experiments, interpretation of the data, preparing of the text; Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Semenova A.V., Merkuleva I.A., Shulgina I.S. – conducting of the experiments; Pyankov O.V. – final approval of the article for publication; Kochneva G.V. – the study concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the article.

Funding. This study was a part of state assignment of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor GZ-37/21.

Conflict of interests. The authors declare that there is not conflict of interests.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional, national and international standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Bioethical Commission of the institution (protocol No 3 dated December 28, 2022).

Received 25 April 2023

Accepted 19 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

Пандемия COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, сделала разработку вакцин главным биомедицинским приоритетом современного здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на конец 2022 г. 199 вакцинных препаратов находились на стадии доклинических испытаний и 175 вакцин – на стадии клинических испытаний [1]. Различные платформы использовались для создания вакцин на основе шиповидного S-белка SARS-CoV-2 и его рецептор-связывающего домена (RBD), включая ДНК и РНК, векторные и белковые субъединичные вакцины [2]. Векторные вакцины на основе непатогенных или слабopatогенных для человека респираторных вирусов обладают рядом преимуществ и могут имитировать природную инфекцию соответствующего патогена.

Поскольку входными воротами для SARS-CoV-2 являются слизистые оболочки, для остановки этой инфекции огромное значение приобретает именно мукозальная иммунизация. По сравнению с инъекционными вакцинами, на производстве которых сосредоточены огромные усилия фармацевтических компаний, интраназальные вакцины обеспечивают дополнительные уровни защиты, такие как секреторные димерные IgA (sIgA) и резидентные В- и Т-клетки памяти в слизистой оболочке дыхательных путей [3].

При создании мукозальных вакцин принципиальным является наличие в них живых вирусов, которые способны преодолевать многочисленные барьеры слизистой оболочки и достигать лимфатических фолликулов, где происходит формирование полноценного иммунного ответа [4]. Живые вирусные частицы плотно упакованы и содержат на своей поверхности гликопротеины, полисахаридные цепочки которых защищают белки от ферментативной деградаци. Вирус Сендай (парагрипп мышей I типа, род *Respirovirus*, семейство *Paramyxoviridae*) как нельзя лучше подходит для этих целей, поскольку является респираторным вирусом и способен, не вызывая заболевания, ограниченно реплицироваться в клетках бронхиального эпителия человека, а также в некоторых категориях дендритных клеток. В процессе ограниченной ре-

пликации рекомбинантные варианты вируса Сендай способны индуцировать в организме человека специфический иммунный ответ на экспрессируемые ими протективно значимые чужеродные вирусные антигены [5]. Использование вируса Сендай в качестве вакцинного вектора также обеспечивает неспецифическую противовирусную защиту организма, поскольку он является одним из лучших природных индукторов интерферонов и применялся для производства человеческого лейкоцитарного интерферона до начала эпохи рекомбинантных белков [6, 7].

Важным преимуществом вируса Сендай как вакцинного вектора является высокая стабильность его генома. Стабильность связана с необычным свойством генома вируса Сендай, так же как и других парамиксовирусов, которое называется правилом шести и обозначает строгую полигенксерность длины генома ($6n + 0$, где n – один нуклеотид). Это свойство способствует особенно низкой частоте гомологичной рекомбинации геномных РНК парамиксовирусов [8]. Кроме того, репликация вируса Сендай происходит исключительно в цитоплазме, а не в ядре клетки, и риск генетической интеграции вирусного генома в геном хозяина минимален [9].

Вакцинные свойства вируса Сендай активно исследуются в мировой практике. Так, интраназальные вакцины на его основе успешно прошли клинические испытания против парагриппа человека I типа и респираторно-синцитиального вируса [10]. Целый ряд рекомбинантных вирусов Сендай проходят доклинические исследования в качестве вакцин против респираторных инфекций человека [11], включая COVID-19 [9].

Ранее нами была разработана векторная система для получения рекомбинантных вариантов вируса Сендай российского штамма Москва [12]. Векторная система включает четыре плазмидные конструкции, содержащие:

- 1) полноразмерную ДНК-копию генома вируса с сайтом для встройки трансгенов между генами *P* и *M*;
- 2) ген *N*;
- 3) ген *P*;
- 4) ген *L* [13].

Экспрессия генов *N*, *P* и *L* является необходимым элементом оживления рекомбинантных вариантов вируса, они кодируют белки репликативного комплекса, который синтезирует геномную РНК.

Целью настоящей работы являлось конструирование и изучение вакцинных свойств рекомбинантного варианта вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующего секреторируемый рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2 штамма дельта, при однократной интраназальной иммунизации.

Материалы и методы

Культуры клеток

В работе использовали 293-T7 – дериват культуры клеток почки эмбриона человека 293, конститутивно продуцирующий полимеразу фага T7; LLC-MK₂ – культуру клеток почки макаки-резуса; Vero E6 – клетки почки африканской зелёной маргитышки. Культуры клеток 293, LLC-MK₂ и Vero E6 получены из ATCC (American Type Culture Collection). Культура клеток 293-T7 получена нами ранее путём встройки в хромосомную ДНК клеток 293 оптимизированного трансгена полимеразы T7 (*T7opt*). Кратко: последовательность гена *T7opt* была выделена с использованием рестриктаз EcoRI – BglIII из коммерческой плазмиды pCAGGS [14] и клонирована по сайтам EcoRI – BglIII/BamHI в плазмиду pCDH-EF1a-MCS-IRES-zeo [15]. Получившаяся плаزمиды pCDH-T7opt была использована для трансформации клеток 293, в результате чего получен клон клеток 293-T7 со встроенным в хромосомную ДНК трансгеном *T7opt*.

Плазмиды

Плазмиду pVL3-RBDdelta получали на основе плазмиды pVEAL2-RBD, кодирующей рецептор-связывающий домен (RBD) (308V–541F) S-белка SARS-CoV-2 варианта Wuhan [16]. Для этого в нуклеотидную последовательность, кодирующую RBD, вводили мутации, приводящие к аминокислотным заменам T479K и L452R. Мутацию T479K вводили по методу перекрывающейся полимеразной цепной реакции (ПЦР). На матрице pVEAL2-RBD с использованием пар праймеров T479K_F – IRES-RBD-R и URBD-F – T479K-R (таблица) получали фрагменты RBD, от-

жигали и затем проводили ПЦР с фланкирующими праймерами URBD-F и IRES-RBD-R и последующий гидролиз фрагмента рестриктазами Bsp13I и AspA2I. Для введения мутации L452R проводили ПЦР на матрице pVEAL2-RBD с использованием пары праймеров URBD-F – L452R-R (таблица) и последующий гидролиз рестриктазами AsuNHI и Bsp13I. Вектор pVL3 гидролизовали AsuNHI и AspA2I и встраивали одновременно обе вставки, содержащие соответствующие мутации.

Вирусы

Рекомбинантные варианты вируса Сендай получали на основе штамма Москва [12] с использованием набора плазмидных конструкций, описанных в [13]. Рекомбинантный вирус Сендай Sen2-EGFP(M), несущий встройку зелёного флуоресцентного белка перед геном *M*, получен ранее [13]. Рекомбинантные вирусы нарабатывали в аллантаической жидкости 11-дневных куриных эмбрионов в течение 72 ч при 37 °С. Позитивные в реакции гемагглютинации с эритроцитами петуха пробы объединяли, осветляли центрифугированием при 1150 × g 10 мин и однократно замораживали при –40 °С. После разморозки пробирки с аллантаической жидкостью центрифугировали при 12 000 × g 30 мин при 6 °С (осветление). Вирус из надосадочной жидкости концентрировали центрифугированием при 100 000 × g 45 мин при 6 °С. Полученный осадок суспендировали в фосфатно-солевом буфере (1/10 от исходного объёма) с добавлением MgCl₂ до конечной концентрации 1 мМ. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком при частоте колебаний наконечника 22 кГц, амплитуде 14–16 мкм и мощности 300 Вт. Обработку ультразвуком проводили 3 раза по 1 мин с охлаждением после каждой обработки в течение 30 сек во льду. Препарат расфасовывали и хранили при –40 °С.

Титрование вируса Сендай проводили методом бляшек на культуре клеток LLC-MK₂ с использованием для визуализации вируса эритроцитов морской свинки, как описано в [17]. Титр вируса выражали в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ) на 1 мл суспензии. Титр очищенного концентрированного препарата вируса Сендай обычно составляет 1,0–1,5 × 10⁹ БОЕ/мл.

Для оценки иммуногенности и протективности вакцины использовали дельта- и гамма-штаммы SARS-CoV-2:

Таблица. Последовательности нуклеотидов, использованные в работе
Table. Oligonucleotide sequences used in the study

Название Name	Последовательность 3'–5' Sequence 3'–5'	Сайты рестриктаз Restriction sites
T479K-F	atcagccgagcaAGcctgtaac	–
IRES-RBD-R	ggttgggccatattatcatcgtg	AspA2I
URBD-F	ctataggagaccaagctgg	AsuNHI
T479K_R	ggtacaaggCTtgctgccgctgat	–
L452R-R	tggacttccggaacagccggtacCggttaattgtagtg	Bsp13I
Delta-F	cggaaattcgtacgccaccatgtttgtttctgtttattgccacta	BsiWI
Delta-R	tttatgcatgcgcgctatgtgtaattgactccttgtagc	BssHII

hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (Delta VOC) и hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (Gamma VOC).

Куриные эмбрионы и эритроциты животных

Куриные эмбрионы 11-дневного возраста получали в ЗАО «Птицефабрика Ново-Барышевская» (с. Барышево, Новосибирская обл., Россия).

Кровь петуха и морской свинки была получена из вивария ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»). Промывание эритроцитов и подготовку рабочей 0,1–1% суспензии осуществляли 0,9% раствором хлорида натрия (физиологический раствор).

Работа с лабораторными животными

Все работы с животными проводили в помещениях виварного блока лаборатории биологической защиты 2-го (BSL-2) и 3-го уровня (BSL-3). В работе использовали 16 сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* (самки, возраст 6 недель, масса 80–110 г) и 26 мышей линии BALB/c *Mus musculus strain BALB/c* (самки, возраст 8 недель, масса 18–22 г), свободных от посторонней микрофлоры, которые были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животных содержали на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде. Манипуляции с животными, включая иммунизацию, отбор смывов и крови, осуществляли после премедикации раствором золетила (Valdepharm, Франция). Иммунизацию проводили интраназально, объём каждого инокулята составлял 100 мкл для хомяков (по 50 мкл в каждую ноздрю) и 10 мкл для мышей. Контрольным группам вводили аналогичное количество фосфатно-солевого буфера, на котором проводили разведение вируса. Забор крови у животных осуществляли через 28 дней после вакцинации для выявления общих и вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2.

Определение общих антител класса IgG к коронавирусу проводили с использованием тест-системы «Вектор ИФА SARS-CoV-2-AT» («Вектор-Бест», Россия). Для детекции IgG использовали пероксидазный конъюгат Goat Anti-Mouse IgG (Biomedicals, США). Нейтрализующую активность сывороток крови определяли на культуре клеток Vero E6 против вируса hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (Delta VOC), как описано в [16].

На 30-й день после однократной иммунизации проводили интраназальную инокуляцию опытных и контрольных групп вирусом SARS-CoV-2 в дозе 50 ИД₅₀ на одно животное в соответствии с ранее полученными данными о восприимчивости сирийских хомяков [18] и мышей BALB/c [19]. Контроль клинического состояния после заражения проводили ежедневно, у всех животных фиксировали массу и брали смывы из носовой полости. Животных выводили из эксперимента по достижении максимума вирусной нагрузки в тканях лёгких: на 6-е сутки после заражения хомяков и на 5-е сутки – мышей, извлекали лёгкие

и ткани носовой полости, готовили 10% гомогенаты. Фрагменты лёгких фиксировали в формалиново-фосфатном буфере для микроскопического исследования. Репликацию вируса SARS-CoV-2 в смывах из носовой полости и гомогенатах тканей оценивали методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «Вектор-ПЦРрв-пCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия). Амплификацию проводили на приборе Rotor-Gene 6000 (BioRad, США) с детекцией количества ПЦР-продукта по каналу FAM. Вирусная нагрузка была определена в миллилитре (копий/мл) для смывов и в миллиграмме (копий/мг) для тканей органов по значениям порога цикла (ct). В качестве стандарта использованы серийные разведения стандартизированного положительного контроля, поставляемого с набором реагентов для ПЦР.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных, национальных и международных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен биоэтической комиссией организации (протокол № 3 от 28.12.2022).

Микроскопические исследования

Для светооптического исследования фиксированные в 4% растворе параформальдегида на растворе Хенкса фрагменты лёгких хомяков обезжировали стандартным методом в серии растворов этанола нарастающей концентрации, изопропанол и ксилоле с использованием гистологического автомата Sakura Tissue-Tek II (Sakura, Япония) и заключали в среду для заливки «Гистомикс» («БиоВитрум», Россия), формируя блоки. Из блоков готовили срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Leica RM 2255 (Leica, Германия), которые монтировали на обезжиренные предметные стекла и высушивали на воздухе. Для окраски срезы депарафинировали в ксилоле и проводили по растворам этилового спирта нисходящей концентрации, промывали в дистиллированной воде. Окраска гематоксилином и эозином: срезы окрашивали гематоксилином Эрлиха в течение 30 сек, промывали в проточной воде, затем окрашивали эозином (1%) в течение 2 мин.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Достоверность различий между группами оценивали при помощи непараметрических методов сравнения. Для двух групп использован U-критерий Манна–Уитни, при большем количестве – тест множественного сравнения Данна. Различия считались значимыми при двустороннем $p < 0,05$.

Результаты

Рекомбинантный вариант Sen-RBDdelta(M) вируса Сендай штамма Москва

Создание рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) вируса Сендай штамма Москва осуществляли

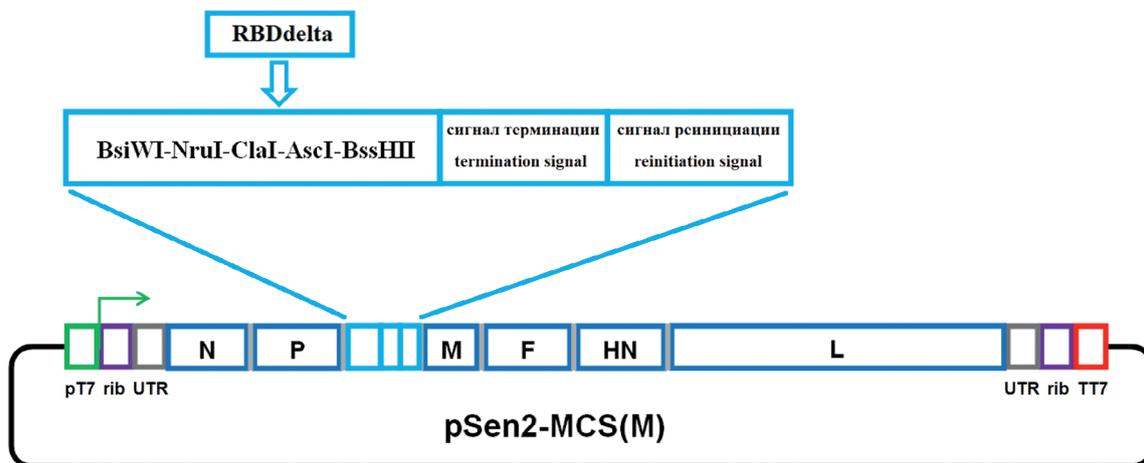


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) вируса Сендай штамма Москва с введением трансгена RBDdelta между генами *P* и *M*. Синтез геномной РНК рекомбинантных штаммов вируса Сендай осуществляется с плазмидной ДНК под контролем полимеразы фага T7 (указано стрелкой). pT7 – промотор; TT7 – терминатор полимеразы T7; rib – рибозим.

Fig. 1. Scheme for constructing the recombinant Sen-RBDdelta(M) variant of the Sendai virus strain Moscow with the introduction of the RBDdelta transgene between the *P* and *M* genes. Synthesis of genomic RNA of recombinant Sendai virus strains is carried out from plasmid DNA under the control of T7 phage polymerase (indicated by the arrow). pT7 – promoter; TT7 – T7 polymerase terminator; rib – ribozyme.

с использованием ранее сконструированного набора из четырёх плазмидных ДНК, три из которых экспрессируют гены *N*, *P* и *L* вируса Сендай штамма Москва (вспомогательные плазмиды), а четвёртая содержит полноразмерную копию ДНК геномной РНК вируса Сендай штамма Москва (GenBank Acc. KP717417.1), в состав которой введён структурный элемент для встройки и экспрессии трансгенов между генами *P* и *M* (pSen2-MCS(M)) (рис. 1) [13]. Структурный элемент включает полилинкер из пяти уникальных сайтов для крупнощеплящих эндонуклеаз рестрикции BsiWI, NruI, ClaI, AscI, BssHIII, за которым следует сигнал терминации транскрипции трансгена и сигнал реинициации транскрипции последующего гена (*M*) для РНК-полимеразы вируса Сендай. Экспрессия генов *N*, *P* и *L* вируса Сендай штамма Москва, так же как и синтез геномных РНК рекомбинантных штаммов вируса Сендай, осуществляется с соответствующими плазмидными ДНК под контролем полимеразы фага T7 в клетках 293-T7. Точность размера геномных РНК контролируется рибозимами, расположенными по её 3'- и 5'-концам.

В качестве трансгена для получения вакцинного конструктора использовали последовательность рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 штамма дельта (RBDdelta, участок S-белка 308V–541F), слитую вместе с сигнальным пептидом (участок S-белка 1M–15C), которую получали методом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pVL3-RBDdelta и пары праймеров Delta-F – Delta-R (таблица). Этот ампликон (трансген RBDdelta и сигнальный пептид S-белка в его N-концевой части) был встроен рестриктазно-лигазным методом по сайтам BsiWI – BssHIII в полилинкер геномной плазмиды pSen2-MCS(M) с последующим получением инфекционного рекомбинантного вируса Sen-RBDdelta(M)

со встройкой трансгена RBDdelta между генами *P* и *M* (рис. 1). Полногеномное секвенирование подтвердило ожидаемую первичную структуру рекомбинантного варианта.

Экспрессию RBDdelta в составе рекомбинантного варианта Sen-RBDdelta(M) оценивали методом вестерн-блоттинга. В рекомбинантном варианте RBDdelta сконструирован в виде секретируемого белка (содержит лидерный домен в N-концевой части), поэтому для вестерн-блоттинга мы использовали аллантоисную жидкость 11-дневных куриных эмбрионов (рис. 2 а, в) или культуральную среду клеток LLC-MK₂ (рис. 2 б) после их инфицирования штаммом Sen-RBDdelta(M).

Как следует из рис. 2 а, в, RBDdelta выявляется в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов в виде белка с молекулярной массой 39 кДа и взаимодействует как с антителами иммунной мыши, так и с сывороткой крови человека, прошедшего двукратную вакцинацию «Спутником-V», а через полгода переболевшего в лёгкой форме COVID-19. В культуральной среде LLC-MK₂ клеток, инфицированных рекомбинантным штаммом Sen-RBDdelta(M), также выявляется RBDdelta (рис. 2 б) с использованием в качестве первичных антител иммунной сыворотки мыши.

Оценка протективности и иммуногенности Sen-RBDdelta(M) на модели хомяков

Экспериментальной группе золотистых китайских хомяков ($n = 8$) однократно проводили интраназальную иммунизацию вирусом Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^7 БОЕ/животное. Контрольной группе ($n = 8$) интраназально вводили фосфатный буферный раствор, на котором проводили разведение вируса. Вирус Сендай является природным патогеном мышей, но он также патогенен и для других грызунов,

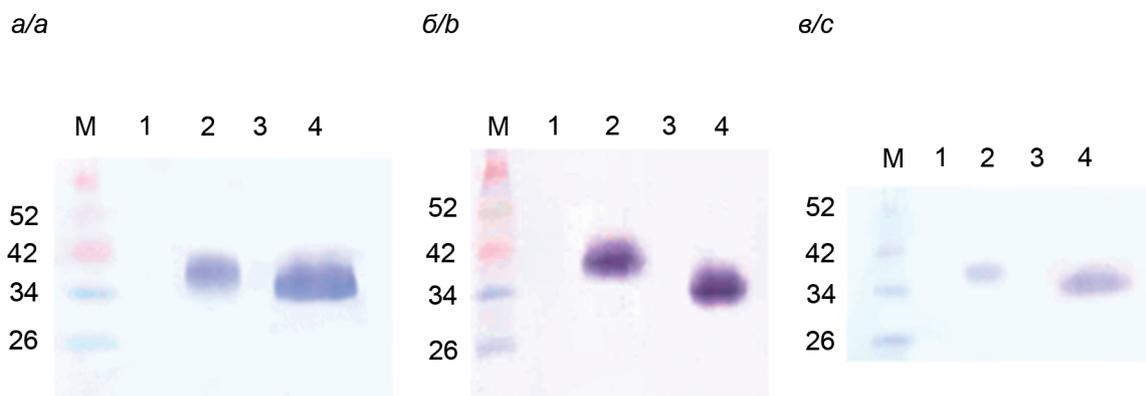


Рис. 2. Вестерн-блоттинг экспрессии RBDdelta рекомбинантным вирусом Sen-RBDdelta(M): *a, в* – в аллантоисной жидкости 11-дневных куриных эмбрионов; *б* – в культуральной среде клеток LLC-MK₂. В качестве первичных антител использована поликлональная сыворотка крови мыши, иммунизированной RBDdelta, разведение 1 : 500 (*a, б*), или сыворотка крови вакцинированного реконвалесцента COVID-19, разведение 1 : 200 (*в*). М – контроль молекулярной массы; 1 – отрицательный контроль аллантоисной жидкости неинфицированных куриных эмбрионов (*a, в*) или культуральной среды неинфицированных клеток (*б*); 2 – положительный контроль RBD (200 нг, 35 кДа), экспрессированного в клетках CHO-K1; 3 – пустая дорожка; 4 – аллантоисная жидкость куриных эмбрионов, инфицированных Sen-RBDdelta(M), 15 мкл (*a, в*), или культуральная среда клеток, инфицированных Sen-RBDdelta(M) (*б*).

Fig. 2. Western blot analysis of RBDdelta expression by recombinant Sen-RBDdelta(M) virus: *a, c* – in allantoic fluid of 11-day-old chicken embryos; *b* – in culture medium of LLC-MK₂ cells. Polyclonal blood serum of a mouse immunized by RBDdelta, dilution 1 : 500 (*a, b*) or blood serum of vaccinated convalescent COVID-19, dilution 1 : 200 (*c*) was used as primary antibodies. M – molecular weight control; 1 – negative control of the allantoic fluid of uninfected chicken embryos (*a, c*) or the culture medium of uninfected LLC-MK₂ cells (*b*); 2 – positive control of RBD (200 ng, 35 kDa) expressed in CHO-K1 cells; 3 – empty track; 4 – allantoic fluid of chicken embryos infected with Sen-RBDdelta(M), 15 μ l (*a, c*), or culture medium of cells infected with Sen-RBDdelta(M) (*b*).

включая хомяков [20]. В связи с этим всех животных ежедневно наблюдали на предмет побочных клинических реакций после введения рекомбинантного вируса. Иммунизированные животные в 1-ю неделю демонстрировали клинические ухудшения в виде потускнения и локальной потери шерстяного покрова. К 7-м суткам зафиксирована смерть одного вакцинированного животного. В последующие дни клиника системного ответа регрессировала.

Через 28 дней после иммунизации у всех животных измеряли уровень общих и вируснейтрализующих антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 штамма hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (Delta VOC). У 100% вакцинированных индукции иммунного ответа не выявлено. Показатель титра общих антикоронавирусных антител составил менее 1 : 50 (ниже порога определения), показатель титра вируснейтрализующих антител – менее 1 : 7 (ниже порога определения).

На 30-й день после иммунизации группам вакцинированных хомяков и контроля проводили интраназальную инокуляцию вирусом SARS-CoV-2 штаммом hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (Delta VOC). Контроль клинического состояния после заражения проводили ежедневно, у всех животных фиксировали массу (рис. 3 *a*). Репликацию коронавируса оценивали методом ОТ-ПЦР-РВ в смывах из полости носа ежедневно со 2-х по 5-е сутки после заражения (рис. 3 *б*) и на 6-е сутки после окончания эксперимента в тканях лёгких и носовой полости (рис. 3 *в*).

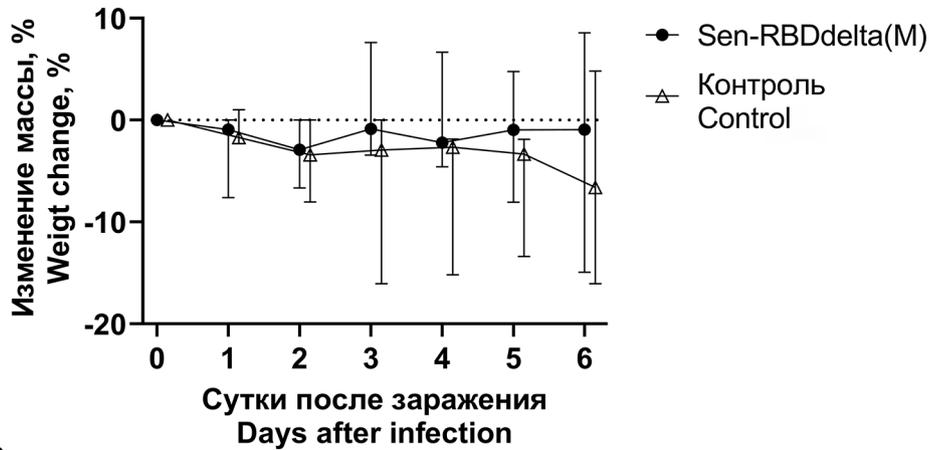
Как показано на рис. 3 *a*, у всех животных, инфицированных SARS-CoV-2, после заражения наблюдалась

прогрессирующая потеря массы тела, у неиммунизированного контроля достигающая к 6-м суткам после заражения 6%, у вакцинированных – 4,2% без значимых различий между группами. Исследование методом ОТ-ПЦР-РВ образцов смывов носовой полости со 2-х по 5-е сутки (рис. 3 *б*) и образцов тканей полости носа на 6-е сутки (рис. 3 *в*) показало присутствие генетического материала вируса SARS-CoV-2 у всех животных без достоверных межгрупповых различий. В тканях лёгких на 6-е сутки в группе иммунизированных выявлено достоверное снижение количества копий вирусной РНК относительно контроля ($p = 0,0093$, тест Манна–Уитни), разница медиан составила 1,18 lg копий/мг (рис. 3 *в*).

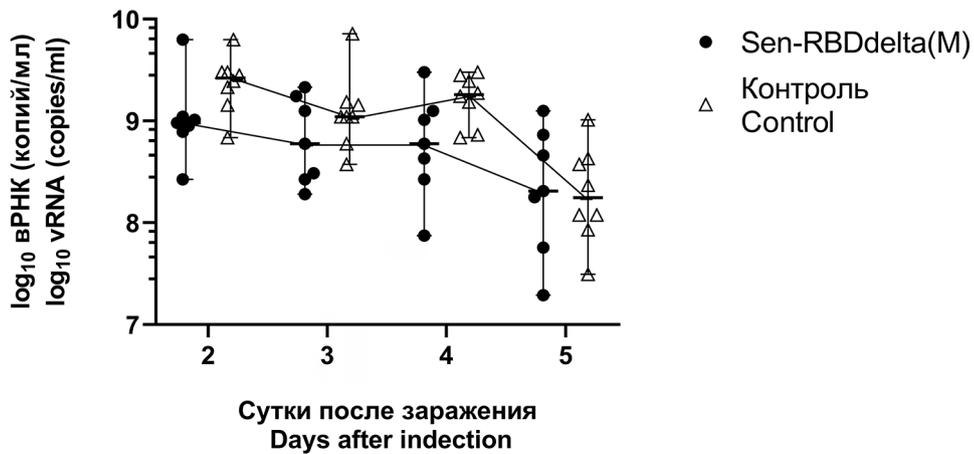
Патоморфологический анализ показал, что основное различие в состоянии лёгких животных вакцинированной и контрольной групп состояло в преобладании в контрольной группе выраженного нарушения сосудистой проницаемости в форме плазморрагии, достигающей 43–67% от общей площади срезов (рис. 4 *a*). В лёгких вакцинированных хомяков обширных локусов плазморрагии и геморрагии не обнаруживалось (рис. 4 *б*).

В группе вакцинированных животных отмечалась наименьшая степень выраженности воспалительно-клеточной инфильтрации. С более слабой воспалительно-клеточной реакцией у вакцинированных хомяков связано и заметное сохранение воздушности лёгочной ткани (рис. 4 *б*). В контрольной группе наблюдалась потеря воздушности лёгких, которая сопровождалась максимальными проявлениями плазморрагии (рис. 4 *a*).

a/a



b/b



в/с

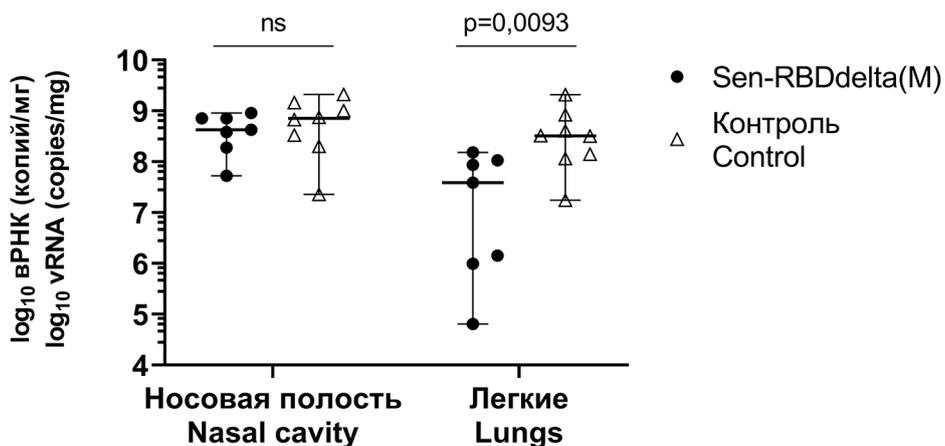


Рис. 3. Клиническое заболевание у хомячков после интраназального заражения штаммом дельта SARS-CoV-2: *a* – динамика изменения массы тела в процентах, точки – медианные значения, вертикальные линии – 95% доверительные интервалы; *b* – вирусная нагрузка (копий/мл) в смывах носовой полости; *в* – вирусная нагрузка (копий/мг) в гомогенатах тканей носовой полости и лёгких, точки – индивидуальные значения, горизонтальные линии – медианы, вертикальные линии – 95% доверительные интервалы. Значения *p* указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) в U-тесте Манна–Уитни.

Fig. 3. Clinical disease in hamsters after intranasal infection with SARS-CoV-2 delta strain: *a* – dynamics of weight change, points are median values, vertical lines are 95% confidence intervals; *b* – viral load (copies/ml) in nasal cavity flushes; *c* – viral load (copies/mg) in homogenates of nasal cavity and lung tissues, dots are individual values, horizontal lines are medians, vertical lines are 95% confidence intervals. *p*-values are indicated for statistically significant differences ($p < 0.05$) in the Mann–Whitney U-test.

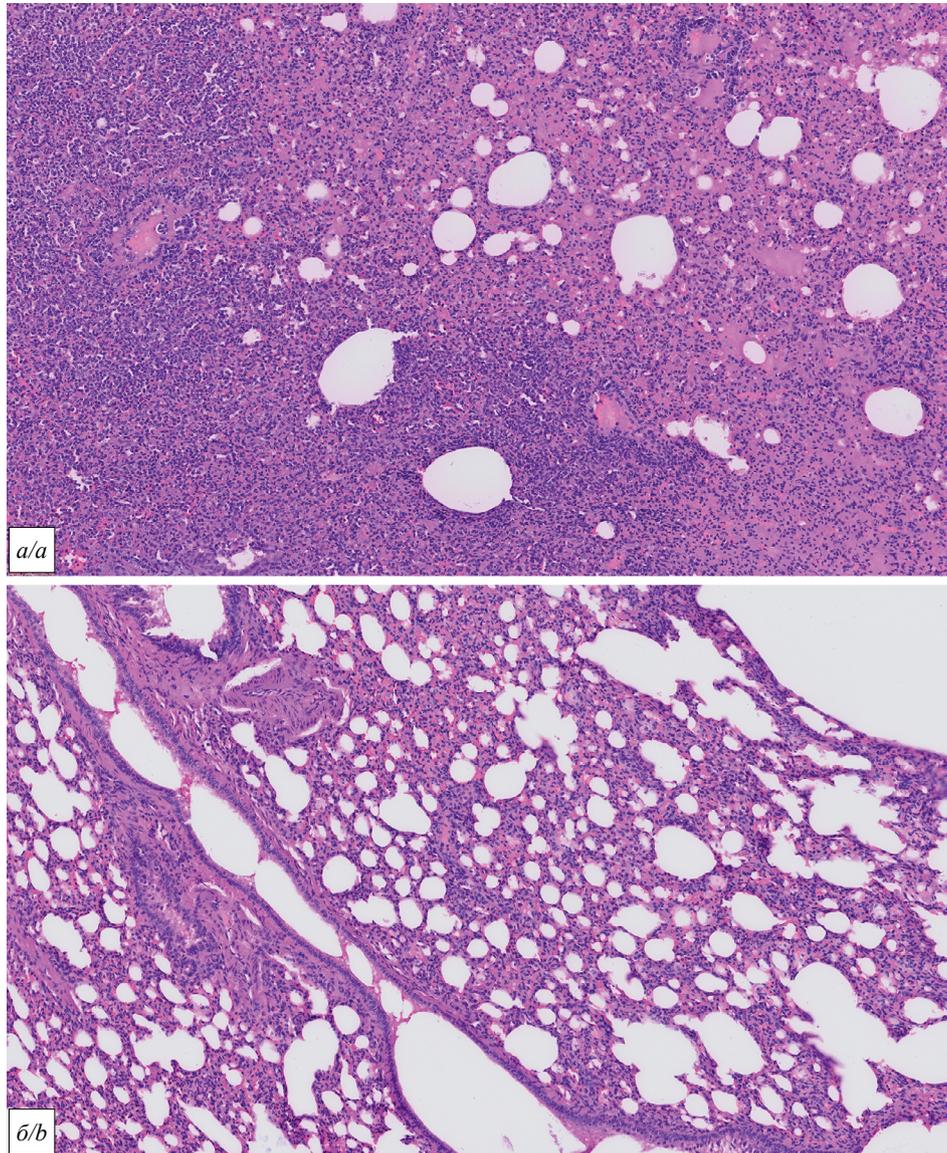


Рис. 4. Гистологический срез лёгкого сирийского хомяка из контрольной (а) и вакцинированной группы (б).

Fig. 4. Histological section of a Syrian hamster lung from the control (a) and the vaccinated group (b).

Оценка протективности и иммуногенности Sen-RBDdelta(M) на модели мышей линии BALB/c

В эксперименте использовали 26 мышей линии BALB/c, разделённых на 3 группы: 1-ю группу ($n = 9$) интраназально иммунизировали рекомбинантом Sen-RBDdelta(M) в дозе 10^5 БОЕ/мышь; мышам 2-й группы ($n = 8$) аналогично вводили рекомбинант Sen2-EGFP(M) (контроль вакцинного вектора); 3-й группе ($n = 9$, отрицательный контроль) интраназально вводили фосфатно-солевой буфер, использованный для получения вирусных суспензий.

Основываясь на ранее полученных данных о патогенности высокой дозы вируса Сендай для хомяков, доза иммунизации мышей была снижена до 10^5 БОЕ/мышь. При такой дозе иммунизации видимых признаков заболевания и летальность мышей не наблюдали на протяжении всего исследуемого периода.

Через 28 дней после иммунизации у всех животных измеряли уровень общих (рис. 5 а) и вируснейтрализующих (рис. 5 б) антител класса IgG против вируса SARS-CoV-2 штамма hCoV-19/Russia/MOS-2406/2021 (Delta VOC).

IgG к коронавирусу были выявлены у всех вакцинированных животных при отрицательных результатах в группах вектора и контроля (рис. 5 а). Вируснейтрализующие антитела (рис. 5 б) выявлены у всех вакцинированных животных, средний геометрический титр составил $127 \pm 1,41$.

Протективность вакцины Sen-RBDdelta(M) оценивали в отношении гамма-штамма SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 (Gamma VOC). Выбор гамма-штамма обусловлен восприимчивостью к нему мышей линии BALB/c. Предшествующие эксперименты по заражению вариантом дельта SARS-CoV-2

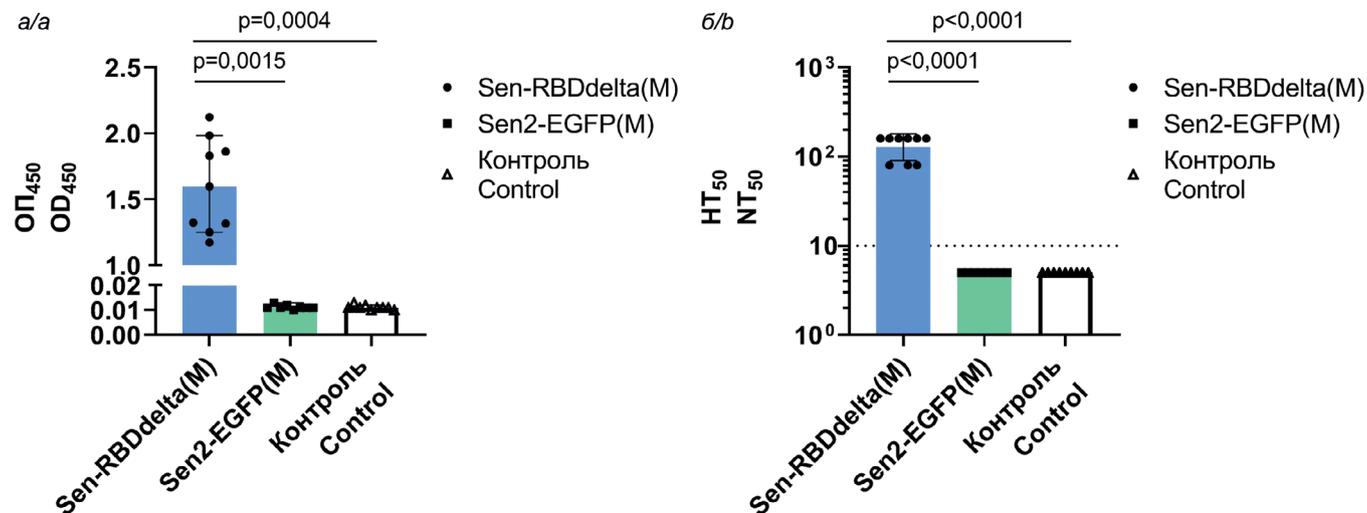


Рис. 5. Общие и нейтрализующие антитела класса IgG против дельта-штамма SARS-CoV-2 в сыворотках иммунизированных мышей линии BALB/c: *a* – значение оптической плотности (ОП₄₅₀), определенное методом ИФА; точки – индивидуальные значения, вершины гистограммы – медианы, вертикальные линии – 95% доверительные интервалы; *b* – титры нейтрализации (НТ₅₀), точки – индивидуальные значения, вершины гистограмм – средние геометрические значения, вертикальные линии – стандартные отклонения, горизонтальная пунктирная линия – пороговое значение титра (НТ₅₀ < 1 : 10). Значения *p* указаны для статистически значимых различий (*p* < 0,05) в тесте множественного сравнения Данна.

Fig. 5. Total and neutralizing IgG antibodies against the SARS-CoV-2 delta strain in the sera of immunized BALB/c mice: *a* – optical density value (OD₄₅₀) determined by ELISA; dots – individual values, histogram tops – medians, vertical lines – 95% confidence intervals; *b* – neutralization titers (NT₅₀), points – individual values, histogram tops – geometric means, vertical lines – standard deviations; horizontal dotted line – threshold value (NT₅₀ < 1 : 10). *p*-values are indicated for statistically significant differences (*p* < 0.05) in Dunn's Multiple Comparison Test.

показали отсутствие развития инфекционного процесса у мышей линии BALB/c [19]. Результаты представлены на **рис. 6**, из которого следует, что в группе вакцинированных (Sen-RBDdelta(M)) происходит достоверное снижение вирусной нагрузки в обоих органах-мишенях относительно интактного контроля, разница медиан в тканях полости носа составила 3,17 Ig копий/мг (*p* = 0,0012), в тканях лёгких – 2,03 Ig копий/мг (*p* = 0,0377). Группа контроля вектора, иммунизированная рекомбинантом Sen2-EGFP(M), имела больший уровень вирусной нагрузки по сравнению с группой Sen-RBDdelta(M) и меньший в сравнении с интактным контролем без статистически значимых различий между группами.

Обсуждение

В качестве антигена для создания интраназальной вакцины конструкции против COVID-19 на основе вируса Сендай мы использовали секретируемую форму рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 высокопатогенного штамма дельта (RBDdelta). Секретируемая форма RBDdelta содержит на N-конце сигнальный пептид S-белка MFVFLVLLPLVSSQC, который обеспечивает выход белка во внеклеточное пространство [21]. Ранее было показано, что секретируемая форма рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, полученного в клетках яичников китайского хомяка CHO-K1, специфически взаимодействует с человеческим рецептором – ангиотензинпревращающим ферментом 2 и сывороточными IgG реконвалесцентов COVID-19, а также обеспечивает индукцию специфического гуморального

иммунного ответа у мышей при двукратной внутрибрюшинной иммунизации с использованием в качестве адъюванта гидроокиси алюминия [16].

Полученный нами рекомбинантный вариант вируса Сендай штамма Москва Sen-RBDdelta(M) эффективно продуцирует RBDdelta в культуральную среду и аллантоисную жидкость при заражении клеток LLC-MK₂ и куриных эмбрионов соответственно. Это свидетельствует о стабильности экспрессии трансгена RBDdelta в составе рекомбинантного вируса Сендай в разных клеточных системах. Продуцируемый RBDdelta взаимодействует как с антителами иммунной мыши, так и с сывороткой крови человека, прошедшего двукратную вакцинацию «Спутником-V», а через полгода переболевшего COVID-19 в лёгкой форме. Это свидетельствует об иммуноидентичности секретируемого рекомбинантным вариантом Sen-RBDdelta(M) белка RBDdelta и RBD домена вирионного S-гликопротеина SARS-CoV-2.

Для оценки иммуногенности и протективности рекомбинантного штамма Sen-RBDdelta(M) в отношении вируса SARS-CoV-2 мы использовали два вида лабораторных животных: высокочувствительных к коронавирусной инфекции хомяков и избирательно чувствительных к некоторым штаммам SARS-CoV-2 мышей линии BALB/c. В обоих случаях мы использовали однократное интраназальное введение препарата Sen-RBDdelta(M), поскольку такой путь вакцинации является наилучшим в плане простоты использования, а также наименее травматичным и безопасным в сравнении с парентеральным введением.

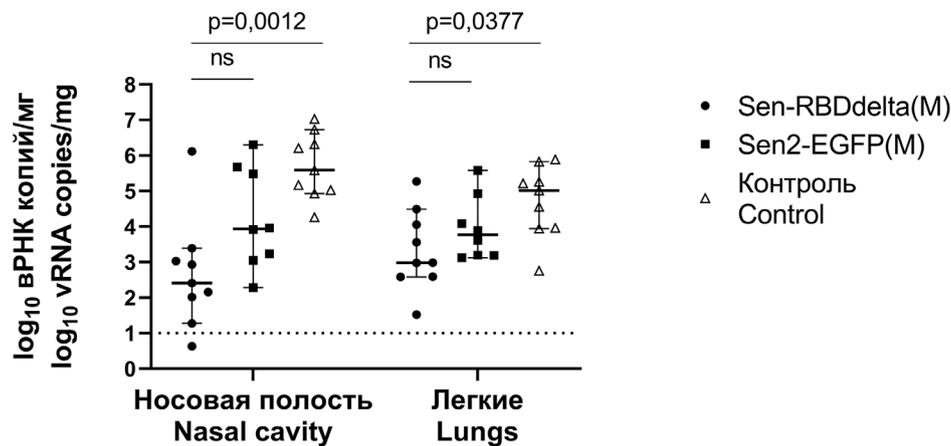


Рис. 6. Вирусная нагрузка (копий/мг) в гомогенатах тканей носовой полости и лёгких мышей BALB/c на 5-е сутки после заражения штаммом гамма SARS-CoV-2. На диаграмме точки – индивидуальные значения, горизонтальные линии – медианы, вертикальные линии – 95% доверительные интервалы. Значения p указаны для статистически значимых различий ($p < 0,05$) в тесте множественного сравнения Данна.

Fig. 6. Viral load (copies/mg) in nasal cavity and lung tissue homogenates of BALB/c mice on day 5 after infection with Gamma strain SARS-CoV-2. In the diagram, the points are individual values, the horizontal lines are medians, and the vertical lines are 95% confidence intervals. P -values are indicated for statistically significant differences ($p < 0.05$) in Dunn's Multiple Comparison Test.

При вакцинации сирийских хомяков препаратом Sen-RBDdelta(M) не выявлено достоверных признаков индукции гуморального ответа в отношении вируса SARS-CoV-2 через 4 недели после вакцинации. Однако последующее заражение вакцинированных хомяков дельта-вариантом SARS-CoV-2 показало наличие протективного эффекта исследуемой вакцины в тканях лёгких, в 15 раз (на 1,18 lg) снизив репликационную активность вируса SARS-CoV-2 относительно неиммунизированного контроля на 6-е сутки после заражения. Выявленное нарушение сосудистой проницаемости (плазморрагии) тканей лёгких, выявленное у животных контрольной группы, являлось основным патоморфологическим признаком тяжести инфекционного процесса.

Полученные данные согласуются с данными литературы о слабой восприимчивости хомяков к иммунизации RBD шиповидного белка SARS-CoV-2 как в виде субъединичных вакцин [22], так и в составе векторной конструкции [23]. Выявленный протективный эффект может быть связан с индуцированным вакциной специфическим клеточным иммунным ответом, как было показано в работе [24].

На модели мышей линии BALB/c показано, что однократная интраназальная иммунизация рекомбинантным вирусом Sen-RBDdelta(M) индуцирует гуморальный ответ с формированием нейтрализующих антител класса IgG к дельта-варианту SARS-CoV-2 через 4 недели после иммунизации. Заражение вакцинированных мышей патогенным для них гамма-штаммом SARS-CoV-2 продемонстрировало высокую протективность вакцины Sen-RBDdelta(M). В результате анализа вирусной нагрузки на 5-е сутки после заражения в сравнении с контролем определено достоверное снижение количества РНК вируса SARS-CoV-2 в 107 раз (на 2,09 lg) в тканях лёгких

и в 1497 раз (на 3,27 lg) в тканях носовой полости. Важно отметить, что интраназальное введение вектора Sen2-EGFP(M) также обладало хорошим защитным эффектом, обеспеченным, как мы полагаем, известными иммуностимулирующими свойствами самого вируса Сендай [5, 9].

Заключение

Проведённое нами исследование подтвердило имеющиеся в литературе данные, что хомяки не являются адекватной моделью для оценки иммуногенности вакцин, основным антигеном которых является RBD шиповидного белка SARS-CoV-2. Несмотря на отсутствие гуморального иммунитета, однократная интраназальная вакцинация хомяков рекомбинантным вариантом Sen-RBDdelta(M) обеспечивает защиту лёгких от развития пневмонии, останавливая инфекцию коронавируса в верхних дыхательных путях. На модели мышей линии BALB/c показана эффективная индукция вируснейтрализующих антител после однократной интраназальной иммунизации вирусом Sen-RBDdelta(M), а также его высокая протективность в отношении коронавирусной инфекции, существенный вклад в которую вносит векторный компонент рекомбинантного конструкта.

Таким образом, полученный нами рекомбинантный вариант вируса Сендай штамма Москва Sen-RBDdelta(M) является перспективным вакцинным конструктом в отношении вируса SARS-CoV-2 и обладает протективными свойствами уже при однократном интраназальном введении. Дальнейшие доклинические исследования, включающие расширение круга модельных животных, оптимизацию дозы вакцинации, оценку параметров мукозального и клеточного иммунного ответа, позволят однозначно оценить вакцинный потенциал рекомбинантного

варианта Sen-RBDdelta(M) вируса Сендай штамма Москва.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
2. Wang N., Shang J., Jiang S., Du L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00298>
3. Lund F.E., Randall T.D. Scent of a vaccine. *Science.* 2021; 373(6553): 397–9. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>
4. Зайнутдинов С.С., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Кочнева Г.В. Мукозальный иммунитет и вакцины против вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(6): 399–408. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-82> <https://www.elibrary.ru/qfwwnn>
5. Зайчук Т.А., Нечипуренко Ю.Д., Аджубей А.А., Оникиенко С.Б., Черешнев В.А., Зайнутдинов С.С. и др. Проблемы создания вакцин против бетакоронавирусов: антителозависимое усиление инфекции и вирус Сендай как возможный вакцинный вектор. *Молекулярная биология.* 2020; 54(6): 922–38. <https://doi.org/10.31857/S0026898420060154> <https://www.elibrary.ru/cfddrc>
6. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.L., Myllylä G. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. *Methods Enzymol.* 1981; 78(Pt. A): 29–38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)78094-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)78094-7)
7. Nyman T.A., Tölö H., Parkkinen J., Kalkkinen N. Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes. *Biochem. J.* 1998; 329(Pt. 2): 295–302. <https://doi.org/10.1042/bj3290295>
8. Matsumoto Y., Ohta K., Kolakofsky D., Nishio M. The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing. *RNA.* 2018; 24(4): 461–7. <https://doi.org/10.1261/rna.065243.117>
9. Morimoto S., Saeki K., Takeshita M., Hirano K., Shirakawa M., Yamada Y., et al. Intranasal Sendai virus-based SARS-CoV-2 vaccine using a mouse model. *Genes Cells.* 2023; 28(1): 29–41. <https://doi.org/10.1111/gtc.12992>
10. Scaggs Huang F., Bernstein D.I., Slobod K.S., Portner A., Takimoto T., Russell C.J., et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(2): 554–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
11. Russell C.J., Hurwitz J.L. Sendai virus-vectored vaccines that express envelope glycoproteins of respiratory viruses. *Viruses.* 2021; 13(6): 1023. <https://doi.org/10.3390/v13061023>
12. Zainutdinov S.S., Tikunov A.Y., Matveeva O.V., Netesov S.V., Kochneva G.V. Complete genome sequence of the oncolytic Sendai virus strain Moscow. *Genome Announc.* 2016; 4(4): e00818–16. <https://doi.org/10.1128/genomea.00818-16>
13. Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Зайнутдинов С.С. Набор рекомбинантных плазмидных ДНК для получения рекомбинантных вирусов Сендай штамм Москва (варианты). Патент РФ № 2787724; 2023.
14. Addgene. T7opt in pCAGGS. Available at: <https://www.addgene.org/65974>
15. NovoPro. pCDH-EF1a-MCS-IRES-zeo vector map and sequence. Available at: <https://www.novoprolabs.com/vector/Vgm4tkma>
16. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Shanshin D.V., Rudometov A.P., Karpenko L.I., et al. Comparative immunogenicity of the recombinant receptor-binding domain of protein S SARS-CoV-2 obtained in prokaryotic and mammalian expression systems. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(1): 96. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010096>
17. Tatsumoto N., Miyauchi T., Arditi M., Yamashita M. Quantification of infectious Sendai virus using plaque assay. *Bio Protoc.* 2018; 8(21): e3068. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3068>
18. Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др. Патогенность вызывающих обеспокоенность вариантов вируса SARS-CoV-2 для сирийского хомячка. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; (3): 164–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-3-164-169> <https://www.elibrary.ru/mirlbr>

19. Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др. Изучение восприимчивости линий мышей к вызывающим обеспокоенность вариантам вируса SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; (1): 148–55. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-148-155> <https://www.elibrary.ru/vgamvf>
20. Matveeva O.V., Kochneva G.V., Netesov S.V., Onikienko S.B., Chumakov P.M. Mechanisms of oncolysis by paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae.* 2015; 7(2): 6–16.
21. Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Беленькая С.В., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаншин Д.В. и др. Интегративный плазмидный вектор pVEAL2-S-RBD, обеспечивающий экспрессию и секрецию рекомбинантного рецепторсвязывающего домена (RBD) коронавируса SARS-CoV-2 в клетках млекопитающих, рекомбинантный штамм клеточной линии CHO-R1-RBD и рекомбинантный белок RBD SARS-CoV-2, продуцируемый указанным штаммом клеточной линии CHO-K1-RBD. Патент РФ № 2752858; 2021.
22. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Volkova N.V., et al. Are hamsters a suitable model for evaluating the immunogenicity of RBD-based anti-COVID-19 subunit vaccines? *Viruses.* 2022; 14(5): 1060. <https://doi.org/10.3390/v14051060>
23. Ilinykh P.A., Periasamy S., Huang K., Kuzmina N.A., Ramathan P., Meyer M.N., et al. A single intranasal dose of human parainfluenza virus type 3-vectored vaccine induces effective antibody and memory T cell response in the lungs and protects hamsters against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines.* 2022; 7(1): 47. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00471-3>
24. Castro J.T., Fumagalli M.J., Hojo-Souza N.S., Azevedo P., Salazar N., Rattis B., et al. Neutralizing antibody – independent immunity to SARS-CoV-2 in hamsters and hACE-2 transgenic mice immunized with a RBD/nucleocapsid fusion protein. *BioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.09.16.460663>

REFERENCES

1. WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
2. Wang N., Shang J., Jiang S., Du L. Subunit vaccines against emerging pathogenic human coronaviruses. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 298. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00298>
3. Lund F.E., Randall T.D. Scent of a vaccine. *Science.* 2021; 373(6553): 397–9. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>
4. Zaynutdinov S.S., Sivolobova G.F., Loktev V.B., Kochneva G.V. Mucosal immunity and vaccines against viral infections. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(6): 399–408. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-82> (in Russian)
5. Zaychuk T.A., Nechipurenko Yu.D., Adzhubey A.A., Onikienko S.B., Chereshev V.A., Zaynutdinov S.S., et al. The challenges of vaccine development against betacoronaviruses: antibody dependent enhancement and sendai virus as a possible vaccine vector. *Molekulyarnaya biologiya.* 2020; 54(6): 922–38. <https://doi.org/10.31857/S0026898420060154> <https://www.elibrary.ru/cfddrc> (in Russian)
6. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.L., Myllylä G. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendai virus. *Methods Enzymol.* 1981; 78(Pt. A): 29–38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)78094-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)78094-7)
7. Nyman T.A., Tölö H., Parkkinen J., Kalkkinen N. Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes. *Biochem. J.* 1998; 329(Pt. 2): 295–302. <https://doi.org/10.1042/bj3290295>
8. Matsumoto Y., Ohta K., Kolakofsky D., Nishio M. The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing. *RNA.* 2018; 24(4): 461–7. <https://doi.org/10.1261/rna.065243.117>
9. Morimoto S., Saeki K., Takeshita M., Hirano K., Shirakawa M., Yamada Y., et al. Intranasal Sendai virus-based SARS-CoV-2 vaccine using a mouse model. *Genes Cells.* 2023; 28(1): 29–41. <https://doi.org/10.1111/gtc.12992>
10. Scaggs Huang F., Bernstein D.I., Slobod K.S., Portner A., Takimoto T., Russell C.J., et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Hum. Vaccin.*

- Immunother.* 2021; 17(2): 554–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
11. Russell C.J., Hurwitz J.L. Sendai virus-vectored vaccines that express envelope glycoproteins of respiratory viruses. *Viruses.* 2021; 13(6): 1023. <https://doi.org/10.3390/v13061023>
 12. Zainutdinov S.S., Tikunov A.Y., Matveeva O.V., Netesov S.V., Kochneva G.V. Complete genome sequence of the oncolytic Sendai virus strain Moscow. *Genome Announc.* 2016; 4(4): e00818–16. <https://doi.org/10.1128/genomea.00818-16>
 13. Kochneva G.V., Grazhdantseva A.A., Sivolobova G.F., Zaynutdinov S.S. A set of recombinant plasmid DNA for obtaining recombinant Sendai viruses strain Moscow (variants). Patent RF № 2787724; 2023. (in Russian)
 14. Addgene. T7opt in pCAGGS. Available at: <https://www.addgene.org/65974>
 15. NovoPro. pCDH-EF1a-MCS-IRES-zeo vector map and sequence. Available at: <https://www.novoprolabs.com/vector/Vgm4tkma>
 16. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Shanshin D.V., Rudometov A.P., Karpenko L.I., et al. Comparative immunogenicity of the recombinant receptor-binding domain of protein S SARS-CoV-2 obtained in prokaryotic and mammalian expression systems. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(1): 96. <https://doi.org/10.3390/vaccines10010096>
 17. Tatsumoto N., Miyauchi T., Arditi M., Yamashita M. Quantification of infectious Sendai virus using plaque assay. *Bio Protoc.* 2018; 8(21): e3068. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3068>
 18. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., et al. Pathogenicity of the SARS-COV-2 virus variants of concern for the Syrian golden hamster. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2022; (3): 164–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-3-164-169> <https://www.elibrary.ru/mirlbr> (in Russian)
 19. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2022; (1): 148–55. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-148-155> <https://www.elibrary.ru/vgamvf> (in Russian)
 20. Matveeva O.V., Kochneva G.V., Netesov S.V., Onikienko S.B., Chumakov P.M. Mechanisms of oncolysis by paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae.* 2015; 7(2): 6–16.
 21. Merkul'eva Yu.A., Shcherbakov D.N., Belen'kaya S.V., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shan'shin D.V., et al. Integrative plasmid vector pVEAL2-S-RBD providing expression and secretion of the recombinant receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 coronavirus in mammalian cells, recombinant strain of the CHO-R1-RBD cell line and recombinant SARS-CoV-2 RBD protein produced by the specified strain of the cell line CHO-K1-RBD. Patent RF № 2752858; 2021.
 22. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Volkova N.V., et al. Are hamsters a suitable model for evaluating the immunogenicity of RBD-based anti-COVID-19 subunit vaccines? *Viruses.* 2022; 14(5): 1060. <https://doi.org/10.3390/v14051060>
 23. Ilinykh P.A., Periasamy S., Huang K., Kuzmina N.A., Ramanaathan P., Meyer M.N., et al. A single intranasal dose of human parainfluenza virus type 3-vectored vaccine induces effective antibody and memory T cell response in the lungs and protects hamsters against SARS-CoV-2. *NPJ Vaccines.* 2022; 7(1): 47. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00471-3>
 24. Castro J.T., Fumagalli M.J., Hojo-Souza N.S., Azevedo P., Salazar N., Rattis B., et al. Neutralizing antibody – independent immunity to SARS-CoV-2 in hamsters and hACE-2 transgenic mice immunized with a RBD/nucleocapsid fusion protein. *BioRxiv.* 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.09.16.460663>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-175>

© БАЛДЕ Т.А.Л., ОСТАНКОВА Ю.В., БУМБАЛИ С., НАЙДЕНОВА Е.В., ЗУЕВА Е.Б., СЕРИКОВА Е.Н., ВАЛУТИТЕ Д.Э., ЩЕМЕЛЕВ А.Н., ДАВЫДЕНКО В.С., ЭСАУЛЕНКО Е.В., ТОТОЛЯН АРЕГ А., 2023



Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости и ускользания от иммунного ответа в геноме вируса гепатита В, выявленного у беременных в Гвинейской Республике

Балде Т.А.Л.¹, Останкова Ю.В.², Бумбали С.^{1,3}, Найденова Е.В.⁴, Зуева Е.Б.², Серикова Е.Н.², Валутите Д.Э.², Щемелев А.Н.², Давыденко В.С.², Эсауленко Е.В.², Тотолян Арег А.²

¹Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинейская Республика;

²ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;

³Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинеи, Нзерекоре, Гвинейская Республика;

⁴ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, Саратов, Россия

Введение. Несмотря на все усилия по ограничению передачи вируса гепатита В (ВГВ) от матери ребёнку, понимание течения хронического гепатита В (ХГВ) у беременных женщин всё ещё ограничено. Одним из регионов с крайне высокой распространённостью ХГВ является Африка: здесь суммарное количество больных составляет приблизительно 75 млн человек. Кроме того, серьёзным фактором, способным повлиять как на лечение, так и на вакцинацию профилактики, могут являться мутации вируса. Таким образом, изучение генетической гетерогенности ВГВ является значимым.

Цель работы – оценить распространённость мутаций лекарственной устойчивости и мутаций ускользания от иммунного ответа ВГВ у беременных женщин в Гвинейской Республике.

Материалы и методы. Исследованы образцы плазмы крови, полученные от 480 беременных женщин из разных регионов Гвинейской Республики с лабораторно подтверждённым ВГВ. Нуклеотидные последовательности для определения генотипов и выявления мутаций получали с использованием nested-ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру на базе перекрывающихся пар праймеров, совместно фланкирующих полный геном вируса.

Результаты и обсуждение. В обследованной группе чаще всего обнаруживали вирус генотипа Е (92,92%) по сравнению с субгенотипами А1 (1,67%), А3 (1,46%), D1 (0,63%), D2 (1,04%) и D3 (2,29%). Среди обследованных ВГВ-инфицированных беременных было выявлено 188 человек (39,17%) с неопределяемым HBsAg. Мутации лекарственной устойчивости вируса были выявлены у 33 человек, что составило 6,88%. Обнаружены следующие мутации: S78T (27,27%), L80I (24,24%), S202I (15,15%), M204I/V (42,42%). Показано также наличие полиморфных вариантов, не описанных как фармакорезистентные, в положениях, связанных с развитием лекарственной устойчивости к тенофовиру, ламивудину, телбивудину и энтекавиру (L80F, S202I, M204R). При анализе MHR и региона детерминанты α мутации выявлены у 318 (66,25%) беременных. Из них у 172 человек, что составило 54,09%, обнаружены множественные мутации. Определено наличие замен в 13 позициях, ассоциированных с HBsAg-негативным ХГВ и (или) потенциально влияющих на антигенность HBsAg.

Заключение. Выявленная среди терапевтически наивных беременных женщин широкая распространённость мутаций иммунного бегства и лекарственной устойчивости, способных приводить к ложноотрицательным результатам скрининга на HBsAg, безуспешной профилактики и вирусологической неэффективности терапии ВГВ-инфекции, представляет собой серьёзную проблему.

Ключевые слова: вирусный гепатит В; скрытый гепатит В; вирус гепатита В; мутации лекарственной устойчивости; мутации вакцинного избегания; клинически значимые мутации; лабораторная диагностика; беременные; Гвинейская Республика

Для цитирования: Балде Т.А.Л., Останкова Ю.В., Бумбали С., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Давыденко В.С., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А. Частота встречаемости мутаций лекарственной устойчивости и ускользания от иммунного ответа в геноме вируса гепатита В, выявленного у беременных в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 228-241. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-175> EDN: <https://elibrary.ru/scvbmy>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: shenna1@yandex.ru

Участие авторов: Балде Т.А.Л. – организация исследований, доставка образцов; Останкова Ю.В. – планирование и проведение исследований, подбор литературы, написание статьи, статистическая обработка данных, подготовка иллюстраций; Бумбали С. – планирование и организация исследований, доставка образцов; Найденова Е.В. – проведение исследований, написание статьи; Зуева Е.Б. – проведение исследований; Серикова Е.Н. – проведение исследований; Валутите Д.Э. – проведение исследований; Щемелев А.Н. – проведение исследований; Давыденко В.С. – проведение исследований; Эсауленко Е.В. – руководство данным этапом исследований; Тотолян Арег А. – общее руководство, написание статьи.

Финансирование. Исследования проводились в рамках распоряжений Правительства Российской Федерации № 1448-р от 25 июля 2015 г., № 2904-р от 22 декабря 2017 г. и № 2985-р от 14 ноября 2020 г. о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Благодарность. Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе образцов биологического материала руководству и сотрудникам регионального госпиталя города Сонакру (Гвинейская Республика).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением этического комитета Гвинеи (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.).

Поступила 03.05.2023

Принята в печать 19.06.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-175>

Frequency of drug resistance and immune escape mutations in the hepatitis B virus genome detected in pregnant women in the Republic of Guinea

Thierno Amadou Labé Balde¹, Yulia V. Ostankova², Sanaba Boumbaly^{1,3}, Ekaterina V. Naidenova⁴, Elena B. Zueva², Elena N. Serikova², Diana E. Valutite², Alexander N. Shchemelev², Vladimir S. Davydenko², Elena V. Esaulenko², Areg A. Totolian²

¹Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

²Saint-Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia;

³Centre International de Recherche sur les Infections Tropicales en Guinée, N'Zérékoré, Republic of Guinea;

⁴Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The aim of the work is to assess the prevalence of hepatitis B virus drug resistance mutations and immune escape mutations in pregnant women in the Republic of Guinea.

Materials and methods. Blood plasma samples obtained from 480 pregnant women from different regions of the Republic of Guinea with laboratory-confirmed viral hepatitis B were studied. Nucleotide sequences for genotype identification and mutation detection were obtained using nested-PCR followed by Sanger sequencing, based on overlapping pairs of primers spanning the complete genome of the virus.

Results and discussion. In the examined group, the viral genotype E was the most prevalent (92.92%) compared with subgenotypes A1 (1.67%), A3 (1.46%), D1 (0.63%), D2 (1.04%) and D3 (2.29%). Among the examined HBV-infected pregnant women, 188 (39.17%) had undetectable HBsAg. Drug resistance mutations were detected in 33 individuals, which amounted to 6.88%. The following mutations were found: S78T (27.27%), L80I (24.24%), S202I (15.15%), M204I/V (42.42%). The presence of polymorphic variants not described as drug resistant has also been shown in positions associated with the development of drug resistance to tenofovir, lamivudine, telbivudine and entecavir (L80F, S202I, M204R). When analyzing the MHR and the region of a determinant, mutations were detected in 318 (66.25%) of pregnant women. In 172 of them, which amounted to 54.09%, multiple mutations were found. The amino acid substitutions in 13 positions associated with HBsAg-negative hepatitis B and/or potentially affecting HBsAg antigenicity were identified.

Conclusion. The high prevalence of immune escape and drug resistance mutations potentially associated with false-negative result of HBsAg screening, prophylaxis failure, and virological failure of therapy that has been identified among treatment naive pregnant women imposes a serious problem.

Keywords: *viral hepatitis B; occult hepatitis B infection; hepatitis B virus; drug resistance mutations; escape mutations; clinically significant mutations; laboratory diagnostics; pregnant women; Republic of Guinea*

For citation: Balde T.A.L., Ostankova Yu.V., Boumbaly S., Naidenova E.V., Zueva E.B., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Davydenko V.S., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Frequency of drug resistance and immune escape mutations in the hepatitis B virus genome detected in pregnant women in the Republic of Guinea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 228-241. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088--175> EDN: <https://elibrary.ru/scvbmy>

For correspondence: Yulia V. Ostankova, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of Immunology and Virology of HIV Infection, Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, St. Petersburg, Russia. E-mail: shenna1@yandex.ru

Information about the authors:

Balde T.A.L., <https://orcid.org/0000-0002-3808-4380>
Ostankova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>
Boumbaly S., <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>
Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>
Zueva E.B., <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>
Serikova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>
Valutite D.E., <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>
Shchemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>
Davydenko V.S., <https://orcid.org/0000-0003-0078-9681>
Esaulenko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-3669-1993>
Totolian Areg A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Contribution: Balde T.A.L. – organization of research, delivery of samples; Ostankova Yu.V. – conducting research, selection of literature, writing an article, statistical data processing, preparation of illustrations; Boumbaly S. – planning and organization of research, delivery of samples; Naidenova E.V. – conducting research, writing an article; Zueva E.B. – conducting research; Serikova E.N. – conducting research; Valutite D.E. – conducting research; Shchemelev A.N. – conducting research; Davydenko V.S. – conducting research; Esaulenko E.V. – managing this stage of research; Totolyan Areg A. – general guidance, writing an article.

Funding. The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation No. 1448-r of July 25, 2015, No. 2904-r of December 22, 2017, and No. 2985-r of November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

Acknowledgement. The authors' team is grateful for the help in collecting samples of biological material to the management and employees of the regional hospitals of the cities of Conakry (Republic of Guinea).

Conflict of interest. The authors declare no potential conflicts of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the National Ethics Committee of the Ministry of Health of the Republic of Guinea (Approval No. 129/CNERS/16 dated August 31, 2015).

Received 03 May 2023
Accepted 19 June 2023
Published 30 June 2023

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее распространённых гепатотропных вирусов и может вызывать как острое, так и хроническое заболевание печени. В настоящее время более чем 360 млн человек поставлен диагноз «хронический вирусный гепатит В» (ХГВ) [1]. При этом ежегодно регистрируется 1,5 млн новых случаев инфицирования и 887 тыс. случаев смерти от этой хронической инфекции [2]. Основным лабораторным диагностическим маркером заболевания является поверхностный антиген ВГВ (HBsAg), встречаемость которого в популяции зависит от географического региона [3].

Одним из регионов с крайне высокой распространённостью ХГВ является Африка: здесь встречаемость HBsAg превышает 8% и может достигать 25%, а суммарное количество больных составляет приблизительно 75 млн человек, 25% из которых, согласно расчётам, умрут от заболеваний печени [4]. В странах Африки к югу от Сахары, в том числе в её западной части, основными путями передачи являются верти-

кальный – от матери к ребёнку во время родов и горизонтальный – в раннем детстве при тесном бытовом контакте с инфицированными родителями, сиблингами или иными родственниками [2].

Перинатальное и раннее детское инфицирование ВГВ не только приводит к повышенному риску хронизации заболевания, но и является сильным предиктором неблагоприятных долгосрочных исходов цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы [5]. Критическое значение имеет скрининг на ВГВ всех беременных женщин. Около 75 млн женщин детородного возраста во всём мире больны ХГВ, что составляет около 25,3%. При отсутствии мер профилактики ВГВ частота передачи вируса от матери к ребёнку составляет 31,3% [6]. Сосредоточение внимания на инфицированных женщинах и предоставлении профилактического лечения женщинам с высокой вирусной нагрузкой может быть эффективным подходом к снижению передачи инфекции ребёнку [7]. Учитывая цель Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по ликвидации к 2030 г. вирусного гепатита как серьёзной угрозы общественному здравоохранению, сокращение передачи вируса от матери ребёнку по-

средством всеобщей вакцинации младенцев и введения иммуноглобулина против ВГВ новорожденным от инфицированных женщин, является приоритетным для профилактики гепатита В (ГВ) [8]. Современные методы терапии редко позволяют излечить ХГВ из-за рефрактерной природы внутриклеточной вирусной репликации кольцевой ковалентно замкнутой ДНК ВГВ, которая находится в ядре инфицированных клеток в виде эписомальной плазмиды и даёт возможность постоянного обновления вирусного пула в организме [9]. Однако уменьшение вирусной нагрузки при лечении беременных женщин значительно снижает риск пренатального инфицирования ребёнка [10]. Несмотря на все усилия по ограничению передачи ВГВ от матери ребёнку, понимание течения ХГВ у беременных женщин всё ещё ограничено. Кроме того, серьёзным фактором, способным повлиять как на лечение, так и на вакцинную профилактику, могут являться мутации вируса. Таким образом, изучение генетической гетерогенности ВГВ является значимой задачей научных исследований.

ВГВ характеризуется высокой степенью генетической гетерогенности и в настоящее время подразделяется на десять генотипов (A–I), которые отличаются друг от друга по составу нуклеотидных последовательностей более чем на 8%. Кроме того, генотипы A, B, C, D, F и H подразделяют на субгенотипы, демонстрирующие дивергенцию нуклеотидных последовательностей в диапазоне от 4 до 7,5% [11]. В большинстве географических регионов за редким исключением преобладают 1–2 основных генотипа и несколько второстепенных, в том числе завезённых из других регионов [12]. Генотипы A, D и E являются наиболее распространёнными, обнаруженными в Африке. При этом ВГВ типа A широко распространён во всем мире и преобладает в странах Южной, Центральной и Восточной Африки, в то время как генотип E доминирует в Западной и Центральной части континента. Однако распространённость этих генотипов может значительно различаться даже в пределах одной страны. Высокая степень генетической изменчивости ВГВ позволяет ему реагировать на эндогенное и экзогенное селективное давление путём дальнейшей модуляции структуры своего генома. Во время длительной инфекции и при различных селективных воздействиях некоторые варианты, особенно в гене *S*, могут эволюционировать и тем самым помочь вирусу избежать терапевтических, профилактических и диагностических мер [13].

Ген оболочки ВГВ имеет три открытые рамки считывания (open reading frames) – PreS1, PreS2 и S, которые кодируют три белка – малый, средний и большой HBsAg, транслируемые с разных матричных РНК. Большой ген *S* ВГВ кодирует белок preS1 (108 а.о.), белок preS2 (55 а.о.) и малый S-белок HBsAg (226 а.о.). Как до, так и после противовирусной терапии мутации в S-области (область малого поверхностного антигена ГВ) в основном происходят в N-концевом регионе (1–99 а.о.) и в большом гидрофильном реги-

оне (major hydrophilic region – MHR) (100–169 а.о.), а не в C-концевой области (170–226 а.о.). При этом MHR, для которого показано относительно большое количество аминокислотных замен, включает детерминанту α (124–147 а.о.), третичная структура которой определяет антигенную специфичность. Таким образом, эффективность вакцинации и терапии может быть снижена из-за появления клинически значимых мутаций: мутаций ускользания от иммунного ответа (escape mutations – EM), мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ) и мутаций, влияющих на прогрессирование заболевания [14]. Причём из-за перекрытия генов *S* и обратной транскриптазы (RT) ЛУ в гене *RT* могут приводить к возникновению EM в MHR, и наоборот [15].

Гвинейская Республика, расположенная в Западной Африке, является регионом с высокой распространённостью многих вирусных инфекционных заболеваний, в том числе вызываемых гепатотропными вирусами, что подчёркивает важность эпидемиологической оценки данной территории для определения ситуации по ВГВ [16]. При этом в Гвинее вакцинация против ГВ с 2006 г. включена в национальный календарь иммунизации, но не проводится при рождении. Рекомендованный график включает двукратное введение вакцины в возрасте 2 и 4 месяцев с последующей ревакцинацией в 11 месяцев. В возрасте 11–15 лет ранее невакцинированным подросткам показана вакцинация либо по схеме трёх доз, либо в соответствии с режимом введения двух доз с интервалом не менее 6 месяцев. Тем не менее, согласно отчетам Министерства здравоохранения Гвинеи, охват вакцинацией в стране не превышает 47% населения [17].

В 2021 г. в Гвинее были разработаны новые программные стандарты и процедуры расширенной вакцинации, согласно целям которой в будущем планируется внедрение вакцинации против ГВ при рождении, однако в представленном календаре описано несколько схем вакцинаций – как при рождении, так и, например, трёхкратное введение в 6, 10 и 14 недель. Следует также отметить, что поставки медицинских препаратов, включая вакцины, в Гвинейской Республике крайне ограничены не только из-за высокой для страны стоимости препаратов, но и из-за отсутствия налаженной системы хранения и транспортировки веществ, требующих соблюдения холодовой цепи. Ещё одной проблемой является недоверие населения к врачам, проявляющееся в том числе отказом матерей от вакцинации детей. Обязательного скрининга населения, включая беременных женщин, на HBsAg в Гвинее не проводится. Исследования ГВ ограничены как по количеству, так и по качеству используемых методов диагностики. Так, крайне невелико количество публикаций, посвящённых молекулярно-генетическим особенностям вируса в стране [18]. Ранее мы сообщали о случаях выявления у беременных женщин в Конакри эскаре-мутаций, способных приводить к ускользанию вируса от диагностики при скринировании на HBsAg [19]. Однако подробного анализа именно у беременных женщин в Гвинее не проводили.

Цель нашей работы – оценить распространённость мутаций ЛУ и ускользания от иммунного ответа ВГВ у беременных женщин в Гвинейской Республике.

Материалы и методы

В работе использованы образцы плазмы крови, полученные от 1810 беременных женщин из разных регионов Гвинейской Республики. Возраст обследованных варьировал от 13 до 55 лет и составил в среднем 25,8 года. При этом 402 женщины (22,21%) проживают в сельской местности, а 1408 (77,79%) – в городской. Ни одной из женщин ранее не был поставлен диагноз «вирусный ГВ», для всех обследованных скринирование на маркеры ГВ впервые осуществлялось в рамках настоящего исследования.

Лабораторные исследования проводили на базе Российско-гвинейского научного исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, расположенного на территории Института прикладной биологии Гвинеи (IRBAG) в префектуре Киндия. На проведение данного этапа работы было получено согласие этического комитета Гвинеи (протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.). Все обследованные дали письменное информированное согласие на участие в эксперименте.

Методом иммуоферментного анализа определяли серологические маркеры ГВ (HBsAg, антител анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG) с использованием ряда диагностических наборов производства НПО «Диагностические системы» и АО «Вектор-Бест», как было описано ранее [19]. Чувствительность тест-систем, предназначенных для выявления HBsAg, применённых в настоящем исследовании, составила 0,01 МЕ/мл.

Выявление ДНК ВГВ проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием разработанной в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методики, позволяющей выявлять ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке, в том числе при HBsAg-негативном ГВ, чувствительность метода составляет 10 МЕ/мл при экстракции из 100 мкл плазмы [16]. Нуклеотидные последовательности для определения генотипов и выявления мутаций получали путём использования nested-ПЦР с последующим секвенированием по Сэнгеру на базе перекрывающихся пар праймеров, совместно фланкирующих

полный геном вируса, как было показано ранее [20]. Серотипы выявленных изолятов, характеризующие их антигенную специфичность, определяли на основании анализа нуклеотидной последовательности консервативной области детерминанты α HBsAg.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ Microsoft Excel, Prism 5.0. При оценке статистической погрешности использовали точный интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представлены с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йейтса. В качестве порога достоверности отличий было определено значение вероятности $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Суммарная встречаемость серологических маркеров ГВ в общей группе составила 56,63% (95% ДИ 54,31–58,93%). Результат анализа распространённости исследованных маркеров ГВ в группе представлен в **табл. 1**.

Следует отметить, что, хотя у 37,13% беременных выявляли антитела анти-HBs IgG, только одна женщина сообщила о получении вакцинации против ГВ, во всех остальных случаях, по всей видимости, антитела имеют естественное происхождение за счёт контакта с вирусом.

При оценке распространённости молекулярно-биологического маркера ГВ ДНК вируса выявили у 480 женщин, что составило 26,52% случаев (95% ДИ 24,5–28,62%).

Распространённость ДНК ВГВ в городской и сельской местности составила 26,92% (95% ДИ 24,62–29,32%) и 25,12% (95% ДИ 20,96–29,66%) соответственно. Таким образом, достоверных различий не выявлено.

Хотя число подростковых беременностей в мире постепенно снижается, количество фактических случаев среди девушек-подростков в странах Африки не сокращается. Несмотря на определённый законодательством Гвинейской Республики возраст совершеннолетия (18 лет), всё ещё велико влияние местных культурных традиций, согласно которым девочку считают готовой для бракосочетания и деторождения с возраста появления менархе. Распределение по воз-

Таблица 1. Распространённость серологических маркеров ГВ (HBsAg, анти-HBcore IgG, анти-HBs IgG) в обследованной группе (n = 1810)
Table 1. Prevalence of HBV serological markers (HBsAg, anti-HBcore IgG, anti-HBs IgG) in the examined group (n = 1810)

Выявленные серологические маркеры Detected serological markers	Беременные женщины, n (%) Pregnant women, n (%)	95% доверительный интервал, % 95% Confidence Intervals, %
HBsAg+	292 (16,13)	14,47–17,91
HBs IgG+	672 (37,13)	34,90–39,40
HBcore IgG+	885 (48,90)	46,57–51,23
Серонегативные / Seronegative	785 (43,37)	41,07–45,69

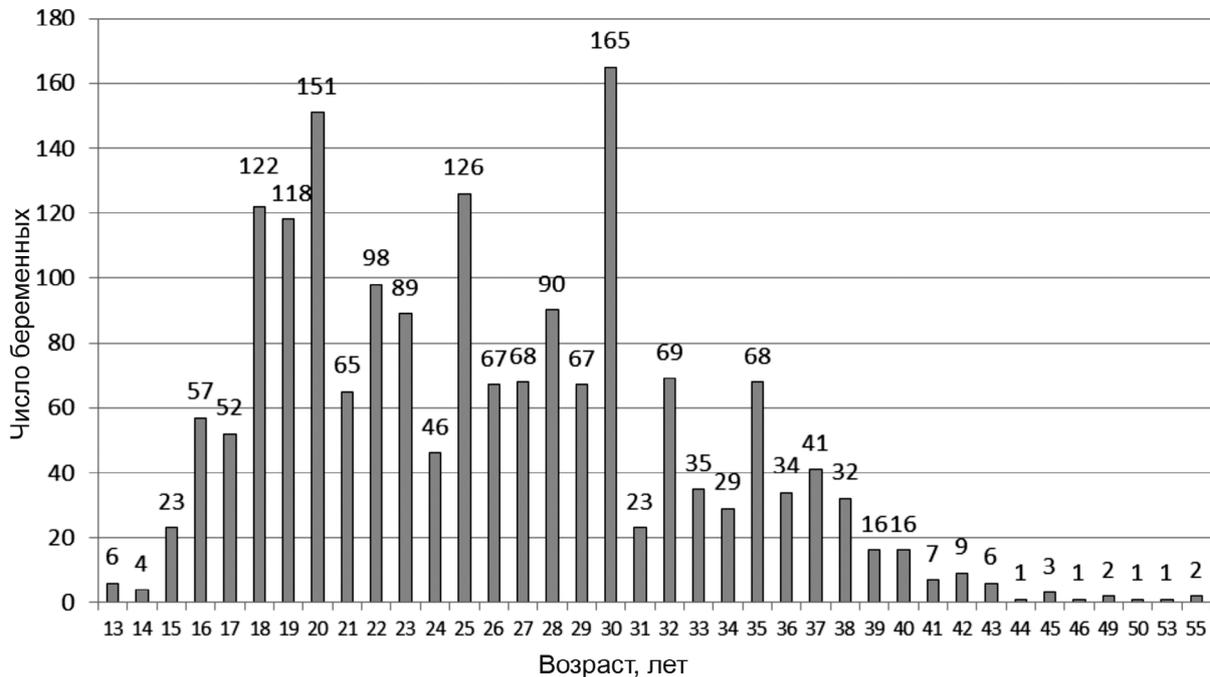


Рис. 1. Распределение по возрастам беременных женщин в обследуемой группе.

Fig. 1. Age distribution of pregnant women in the study group.

Таблица 2. Распространённость ДНК ВГВ в разных возрастных группах

Table 2. Prevalence of HBV DNA in different age groups

Возрастные группы Age groups	Беременные женщины, n (%) Pregnant women, n (%)	95% доверительный интервал, % 95% Confidence Intervals, %
13–17 лет / years	45 (31,69)	24,14–40,02
13–19 лет / years	126 (32,98)	28,29–37,95
18–35 лет / years	381 (25,47)	23,28–27,76
>35 лет / years	54 (31,4)	24,55–38,9

растам беременных в обследованной группе представлено на рис. 1.

С учётом того, что ВОЗ рассматривает беременность в возрасте до 19 лет включительно как подростковую, приводящую к повышенному риску системных инфекций и развития таких гинекологических заболеваний, как послеродовой эндометрит и эклампсия, для выявления закономерности встречаемости ДНК ВГВ относительно возрастного варьирования было проведено ранжирование группы по возрастам и отдельно рассмотрены группы от 13 до 17 лет (142 человека, 7,85% от общей группы), от 13 до 19 лет (382 человека, 21,1% от общей группы), от 18 до 35 лет (1496 человек, 82,65% от общей группы) и старше 35 лет (172 человека, 9,5% от общей группы). Результаты представлены в табл. 2.

Показаны достоверные различия в распространённости ДНК ВГВ между возрастными группами 13–19 и 18–35 лет: $\chi^2 = 8,346$ при $p = 0,0039$, $df = 1$, $RR = 1,295$ при 95% ДИ 1,096–1,531%. Однако различия между группами 13–17 и 18–35 лет не обнаружено: $p = 0,1297$.

На основании филогенетического анализа 480 изолятов показано, что в обследованной группе наиболее часто обнаруживали вирус генотипа E (92,92%; 95% ДИ 90,24–95,05%), в значительно меньшей степени представлены генотипы A (3,13%; 95% ДИ 1,76–5,1%) и D (3,96%; 95% ДИ 2,4–6,11%). При более глубоком типировании преобладал ВГВ генотипа E (92,92%; 95% ДИ 90,24–95,05%) по сравнению с субгенотипами A1 (1,67%; 95% ДИ 0,72–3,26%), A3 (1,46%; 95% ДИ 0,59–2,98%), D1 (0,63%; 95% ДИ 0,13–1,82%), D2 (1,04%; 95% ДИ 0,34–2,41%) и D3 (2,29%; 95% ДИ 1,15–4,06%) (рис. 2).

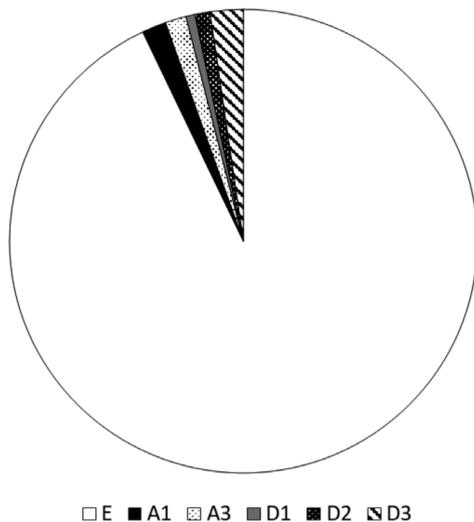


Рис. 2. Распределение субгенотипов вируса гепатита В в обследованной группе.

Fig. 2. Distribution of HBV subgenotypes in the examined group.

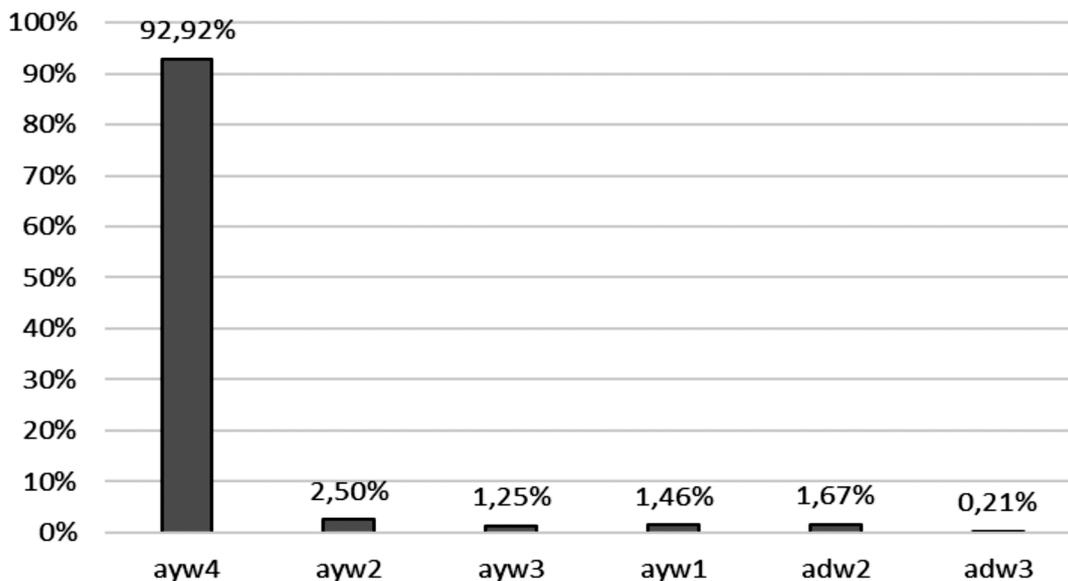


Рис. 3. Распределение серотипов вируса гепатита В в обследованной группе.

Fig. 3. Distribution of HBV serotypes in the examined group.

При определении серологического подтипа обнаруженных изолятов чаще всего удалось выявить серотип ayw4 (92,92%; 95% ДИ 90,24–95,05%), к которому принадлежали все изоляты генотипа Е. Соответственно, в значительно меньшей степени представлены серотипы ayw2 (2,5%; 95% ДИ 1,3–4,33%), ayw3 (1,25%; 95% ДИ 0,46–2,7%), ayw1 (1,46%; 95% ДИ 0,59–2,98%), adw2 (1,67%; 95% ДИ 0,72–3,26%) и adw3 (0,21%; 95% ДИ 0,01–1,16%) (рис. 3). При этом для генотипа А определены два серотипа – ayw1 и adw2, в то время как для генотипа D показаны три – ayw2, ayw3 и adw3.

Распределение генотипов ВГВ в группе сопоставимо с данными о циркулирующих в регионе вариантах вируса. Так, ранее мы сообщали о преобладании в Гвинейской Республике ВГВ генотипа Е среди доноров крови (85,53%) [21]. В странах-соседях также показано доминирование генотипа Е. Например, в Мали встречаемость указанного генотипа составляет 91,1%, в Кот-д’Ивуаре – 87,4%, а в Сенегале и Буркина-Фасо – 75 и 72% соответственно [22]. Хотя ВГВ генотипа Е широко распространен в странах Африки к югу от Сахары, этот вариант возбудителя характеризуется низкой вариабельностью генома, что, предположительно, может говорить о его сравнительно коротком эволюционном пути. В то же время для генотипа Е показана эпидемиологическая связь с HBsAg-негативным вариантом, а также развитием мутаций ЛУ и вакцинного ускользания [22]. Среди обследованных нами ВГВ-инфицированных беременных было выявлено 188 человек (39,17%; 95% ДИ 34,77–43,69%) с неопределяемым HBsAg. Из них 113 женщин были в возрасте до 30 лет, что составило 60,11% (95% ДИ 52,73–67,6%) от всех беременных со скрытым ГВ (скГВ). При этом распределение генотипов

вируса при HBsAg-негативных и позитивных случаях не отличалось: $p = 0,9914$. Так, встречаемость ВГВ генотипа Е составила 92,55% (95% ДИ 87,82–95,87%) среди лиц с скГВ и 93,15% (95% ДИ 89,62–95,77%) – среди HBsAg-позитивных беременных, что сопоставимо с общей представленностью указанного генотипа в обследованной группе – 92,92%. При этом ни нуклеотидные, ни аминокислотные последовательности Pre-S1/Pre-S2/S области ВГВ от лиц с скГВ не показали каких-либо признаков кластеризации, а были распределены среди последовательностей, полученных от HBsAg-позитивных лиц. Филогенетическое дерево, включающее исследованные изоляты ВГВ генотипов А и D, представлено на рис. 4.

Фрагмент филогенетического дерева ВГВ генотипа Е представлен на рис. 5.

Можно предположить, что встречаемость HBsAg-негативного ГВ у молодых женщин связана с особенностями передачи инфекции в странах Африки, в частности, с преимущественным инфицированием в раннем детстве, в том числе вертикальным путём.

Значительное количество мутаций было обнаружено в MHR и RT-регионе. Генетические изменения, связанные с аминокислотными заменами в домене RT, классифицируют как первичные мутации ЛУ и вторичные компенсаторные мутации, восстанавливающие репликационную способность вируса. В настоящей работе при анализе региона RT генома ВГВ мутации ЛУ вируса были выявлены у 33 человек, что составило 6,88% (95% ДИ 4,78–9,52%) случаев. При анализе 33 изолятов, полученных от лиц с фармакорезистентными вариантами вируса, мутации ЛУ были обнаружены в следующих соотношениях: S78T (27,27%; 95% ДИ 13,3–45,52%), L80I (24,24%; 95% ДИ 11,09–42,26%), S202I (15,15%; 95% ДИ 5,11–31,9%), M204I/V (42,42%; 95% ДИ 25,48–

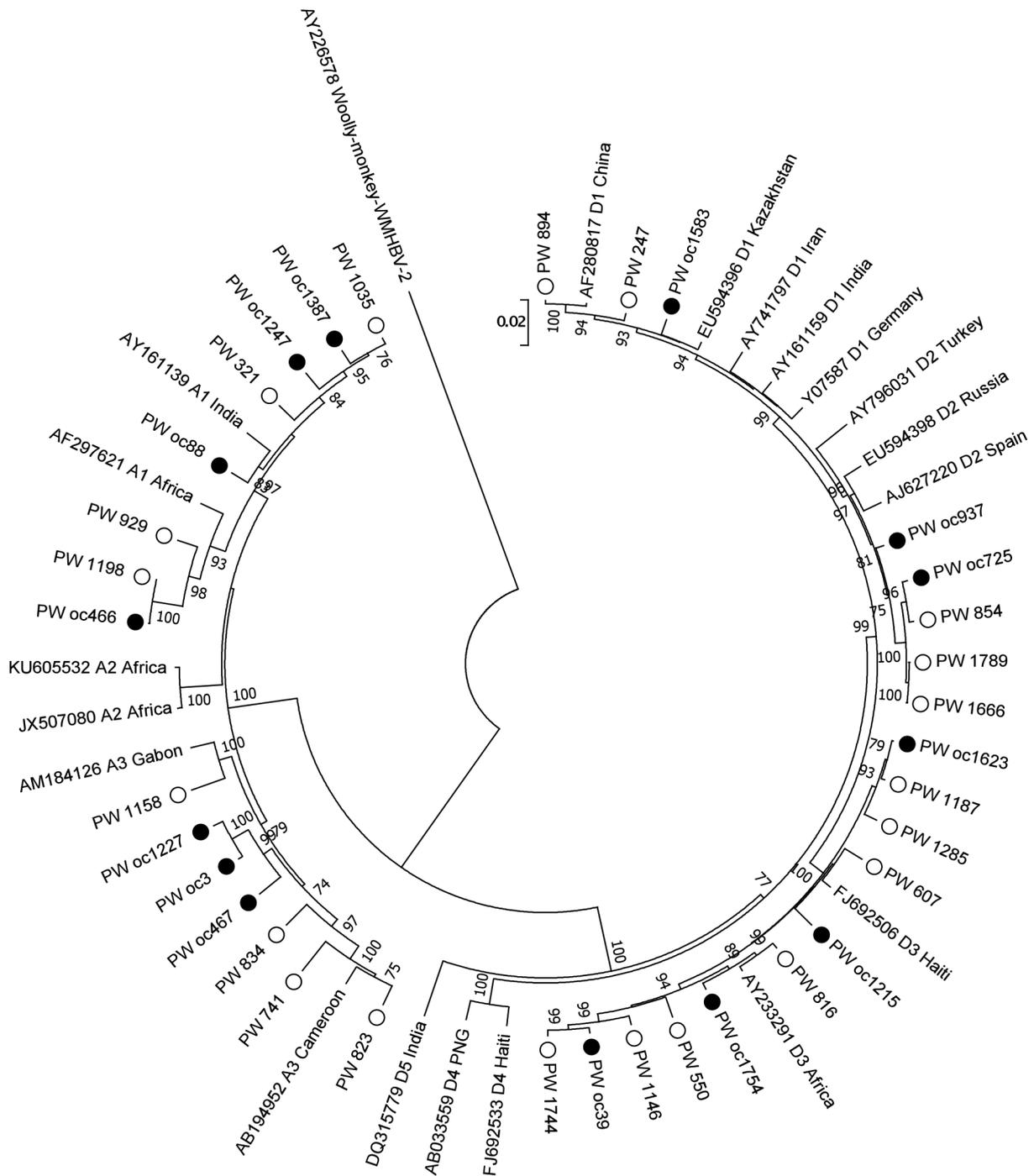


Рис. 4. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов вируса гепатита В генотипов А и D, выделенных от беременных, проживающих в Гвинейской Республике, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Как внешняя группа использована нуклеотидная последовательность вируса гепатита В шерстистой обезьяны AY226578. Исследованные в настоящей работе образцы обозначены белыми (HBsAg+) и чёрными кружками (HBsAg-). Даны значения bootstrap ≥ 70 .

Fig. 4. Phylogenetic tree for HBV complete genome nucleotide sequences of genotypes A and D isolated from pregnant women living in the Republic of Guinea in comparison with the reference sequences presented in the GenBank database. Reference sequences are designated with GenBank accession numbers and indicated genotype and the region of the sample origin. The Woolly Monkey HBV nucleotide sequence AY226578 was used as the outgroup. The sequences from this study are indicated by white circles (HBsAg+) and black circles (HBsAg-). Bootstrap values ≥ 70 .

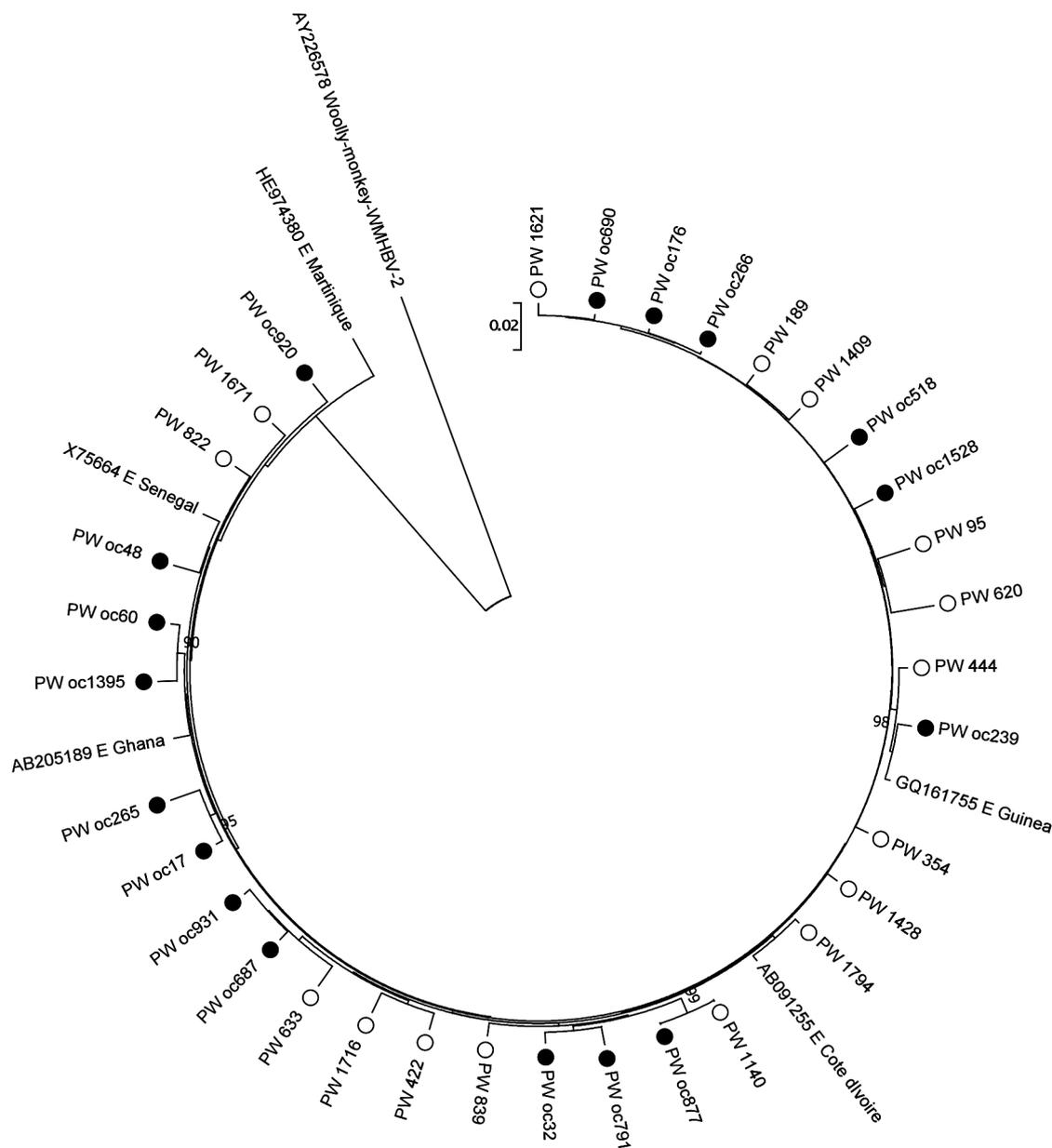


Рис. 5. Филогенетический анализ некоторых нуклеотидных последовательностей полных геномов вируса гепатита В генотипа Е, выделенных от беременных, проживающих в Гвинейской Республике, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Как внешняя группа использована нуклеотидная последовательность вируса гепатита В шерстистой обезьяны AY226578. Исследованные в настоящей работе образцы обозначены белыми (HBsAg+) и чёрными кружками (HBsAg-). Даны значения bootstrap ≥ 70 .

Fig. 5. Phylogenetic tree for some HBV complete genome nucleotide sequences of genotype E isolated from pregnant women living in the Republic of Guinea in comparison with the reference sequences presented in the GenBank database. Reference sequences are designated with GenBank accession numbers and indicated genotype and the region of the sample origin. The Woolly Monkey HBV nucleotide sequence AY226578 was used as the outgroup. The samples studied in this work are indicated by white circles (HBsAg+) and black circles (HBsAg-). Bootstrap values ≥ 70 .

60,78%). При этом у одного человека выявлено сочетание S78T + L204I, у трёх – L80I + M204I/V.

В Гвинейской Республике наиболее распространённым терапевтическим препаратом по отношению к ВГВ является Атрипла (Atripla), включающий эфавиренз, эмтрицитабин и тенофовир, используется также ламивудин. В связи с этим выявление мутаций

ЛУ к тенофовиру и ламивудину не вызывает удивления. Однако тенофовир имеет высокий генетический барьер устойчивости и поддерживает эффективное подавление ВГВ как у моноинфицированных, так и у лиц с коинфекцией вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ)/ВГВ [13]. Кроме того, все обследованные нами беременные отрицали получение препарата

или какое-либо иное лечение. Можно предположить, что источником обнаружения мутаций у терапевтически наивных женщин являлось заражение несущим мутацию вирусом от получавших терапию партнеров с низкой или средней приверженностью к лечению. Ещё одной причиной возникновения таких генетических изменений может оказаться естественный полиморфизм вируса. Косвенно подтверждает это предположение обнаружение мутаций только у пациенток с ВГВ генотипа E, а также наличие полиморфных вариантов, не описанных как фармакорезистентные, в положениях, связанных с развитием ЛУ к тенофовиру, ламивудину, телбивудину и энтекавиру (L80F, S202I, M204R). В некоторых регионах Африки обнаруженные нами мутации ЛУ встречались у терапевтически наивных лиц гораздо чаще, чем в странах Европы или Америки [13]. Отдельного внимания заслуживает мутация S78T, так как, наряду с повышенной продукцией транскриптов вируса и устойчивой секрецией вирусных частиц при отсутствии антигенных доменов белка S, эта аминокислотная замена может предрасполагать к канцерогенным эффектам [23]. Отметим, что в наших исследованиях вирусного ГВ в Гвинейской Республике таких мутаций не выявлено ранее ни среди ВИЧ-инфицированных лиц, ни среди условно здоровых людей и доноров крови, хотя аминокислотные замены в связанных с ЛУ позициях обнаруживали. Необходимо также сказать, что в то время как для ВИЧ-инфекции определён уровень (> 5%) распространённости первичных мутаций ЛУ у не получавших лечения лиц, выше которого мутации ЛУ ВИЧ представляют собой серьёзное препятствие для успешного лечения на популяционном уровне, требующее введения на территории анализа первичной резистентности у всех инфицированных лиц с последующим выбором схемы терапии, для ВГВ нет рекомендаций по установлению какого-либо конкретного порога распространённости таких мутаций. Представляется очевидным, что определение сходных пороговых значений и рекомендаций для ВГВ могло бы способствовать усовершенствованию анализа эпидемиологической ситуации в том или ином регионе, а также унификации подходов к лечению.

Из-за перекрывания генов, кодирующих RT и HBsAg, мутации ЛУ могут вызывать генетические изменения и в MHR. На сегодняшний день идентифицировано более 30 мутаций HBsAg, приводящих к ускользанию вируса от иммунитета: они позволяют вирусу уклоняться от нейтрализующих антител, способствуют персистентной инфекции ВГВ и приспособляемости вируса. Иммуноассоциированные EM также могут мешать распознаванию HBsAg антителами, индуцированными вакциной, что представляет собой потенциальную угрозу для глобальной программы вакцинации [24].

При анализе MHR и региона детерминанты α , являющейся кластером основных эпитопов В-клеток, расположенных между 124 и 147 (или 149) а.о., мутации выявлены у 318 из 480 беременных (66,25%; 95% ДИ 61,83–70,47%). В 172 случаях из 318 человек определяемыми

мутациями в детерминанте α обнаружены множественные генетические изменения, что составило 54,09% (95% ДИ 48,44–59,66%). Показано наличие замен в 15 позициях, ассоциированных с скГВ и (или) потенциально влияющих на антигенность HBsAg. Наиболее распространённые в обследуемой группе ВГВ-инфицированных беременных клинически значимые мутации представлены в **табл. 3**.

Среди мутаций ЛУ в регионе RT, выявленных в настоящей работе, только две приводят к значимым аминокислотным заменам в S-регионе генома вируса. Так, мутация tS78T соответствует мутации sC69*, представляющей собой преждевременный стоп-кодон, приводящий к удалению почти всего малого поверхностного белка вируса [23]. В свою очередь, полиморфизм tM204I/V приводит к двум мутациям в S-гене: sI195M, связанной со снижением реактивности антител к эпитопам в первой или второй петле или в обеих петлях белка [25], и sW196*, приводящей к укорочению С-конца белка, способствующей трансформации клеток и ассоциированной с высоким онкогенным потенциалом за счёт изменённой экспрессии генов хозяина [26, 27].

Ранее было показано, что средняя частота мутаций в гене, кодирующем HBsAg, составляет 11% в популяциях Северной Америки и увеличивается до 47% у больных ХГВ в Южной Корее, а частота мутаций в MHR колеблется от 57,5% для ВГВ генотипа А до 100% для генотипа D, составляя 59,9% для генотипа E [28], что не противоречит высокому уровню замен, выявленному нами в обследованной группе.

Среди выявленных нами мутаций две (Y100C, M103I) ассоциированы с развитием HBsAg-негативного ХГВ [29]. Мутация I110L связана с резистентностью к иммуноглобулину. Десять мутаций (T127P, Q129H/R, M133I, Y134H, C137Y, S140L, K141E, D144E, G145R, Y147C) определены в детерминантной области. Отметим, что наиболее распространёнными полиморфными вариантами, связанными с иммунологическим ускользанием и обнаруживаемыми в изолятах ВГВ в генотипе E, являются T116N, P120L/S, Q129H/R, M133I, D144E и G145I [30], однако в обследованной нами группе последние две мутации встречались сравнительно редко. Поскольку MHR состоит из двух петель между cys124 и cys137, а также cys139 и cys147, мутации в этой области разрушают дисульфидные мостики. Исследования предсказания их структуры *in silico* показали, что трёхмерная конформация экстравирионной петли изолятов с заменами аминокислот между остатками 133 и 144 отличается от конформации генотипа E дикого типа [31]. Такие замены могут приводить к продукции поверхностного антигена, отличного от обычного и, соответственно, не обнаруживаемого при скринировании [32, 33]. Мутация G145R также может нарушать секрецию HBsAg и приводить к реинфекции в тканях печени, несмотря на защитные титры анти-HBs [34]. Мутация Y147C способствует репликации на стадии синтеза вирусной ДНК и, учитывая необходимость

Таблица 3. Наиболее распространённые клинически значимые мутации, выявленные в регионе Pre-S1/Pre-S2/S в обследуемой группе ($n = 480$)Table 3. The most prevalent clinically significant mutations identified in the Pre-S1/Pre-S2/S-region sequences from the examined group ($n = 480$)

Область генома ВГВ HBV genome region	Мутация Mutation	Частота встречаемости в группе Frequency of occurrence in the group	Генотип Genotype
RT	S78T	9 (1,88%; 95% ДИ 0,86–3,53%)	E
RT	L80I	8 (1,67%; 95% ДИ 0,72–3,26%)	E
RT	S202I	5 (1,04%; 95% ДИ 0,34–2,41%)	E
RT	M204I/V	14 (2,92%; 95% ДИ 1,60–4,85%)	E
RT	L80F	17 (3,54%; 95% ДИ 2,08–5,61%)	E
RT	S202R	19 (3,96%; 95% ДИ 2,40–6,11%)	E
RT	M204R	53 (11,04%; 95% ДИ 8,38–14,19%)	E
MHR	Y100C	21 (4,38%; 95% ДИ 2,73–6,61%)	A, E
MHR	M103I	13 (2,71%; 95% ДИ 1,45–4,59%)	E
MHR	I110L	65 (13,54%; 95% ДИ 10,61–16,93%)	A, D, E
MHR	T116N	58 (12,08%; 95% ДИ 9,30–15,34%)	E
MHR	P120L/S	94 (19,58%; 95% ДИ 16,13–23,42%)	E
MHR	T127P	27 (5,63%; 95% ДИ 3,74–8,08%)	D, E
MHR	Q129H/R	34 (7,08%; 95% ДИ 4,95–9,76%)	D, E
MHR	M133I	110 (22,92%; 95% ДИ 19,23–26,94%)	A, D, E
MHR	Y134H	31 (6,46%; 95% ДИ 4,43–9,04%)	E
MHR	C137Y	46 (9,58%; 95% ДИ 7,10–12,58%)	E
MHR	S140L	19 (3,96%; 95% ДИ 2,40–6,11%)	E
MHR	K141E	39 (8,13%; 95% ДИ 5,84–10,94%)	E
MHR	D144E	15 (3,13%; 95% ДИ 1,76–5,1%)	E
MHR	G145R	28 (5,83%; 95% ДИ 3,91–8,32%)	E
MHR	Y147C	23 (4,79%; 95% ДИ 3,06–7,1%)	E

дисульфидной связи Cys-Cys в поддержании конформации для антигенности HBsAg, приводит к прорыву инфекции у вакцинированных больных [35]. Ряд мутаций, потенциально способных влиять на обнаружение HBsAg, были выявлены вне детерминантной области – G159A, E164G, A166V, S167L, A168V [29].

Последовательность генотипа ВГВ, используемого для вакцин, потенциально может влиять на иммуногенность против невакцинных генотипов, но данные, подтверждающие это, ограничены [36]. Более вероятно, что возникновение ВГВ-инфекции, даже несмотря на иммунопрофилактику, связано либо с вертикальной передачей вируса с ЕМ, либо в результате отбора мутаций *de novo*, особенно в условиях отсроченной вакцинации. Для предотвращения вертикальной передачи вируса ВОЗ рекомендует, чтобы все новорождённые, независимо от статуса инфицирования матери, получали первую дозу вакцины против ГВ как можно скорее после рождения, предпочтительно в течение 24 ч, а затем 2 или 3 дозы вакцины с интервалом не менее 4 недель, чтобы завершить серию вакцинации [1]. Однако доступ к вакцине при рождении по-прежнему ограничен во многих странах с низ-

ким уровнем дохода. Среди 47 стран Африканского региона только 13 внедрили к 2020 г. моновалентную вакцинацию против ГВ, запланированную при рождении [37]. В большинстве же африканских стран, где иммунизация против ГВ только внедряется на государственном уровне, как в Гвинейской Республике, вакцинация откладывается до 6-недельного возраста [38]. Кроме того, трудности проведения своевременной профилактики возникли из-за высокой частоты родов в домашних условиях, отказом матерей приносить новорождённых на осмотр и (или) вакцинацию [39, 40]. Можно предположить, что эта задержка не только создаёт окно для инфекции, но также увеличивает вероятность передачи ЕМ и (или) появления новых мутаций ускользания.

Появление в популяции ЕМ с высокой частотой встречаемости является серьёзной проблемой для лиц с ослабленным иммунитетом, о чём свидетельствует исследование R. Salpini и соавт., продемонстрировавших, что у 75% больных с иммуносупрессией и реактивацией ВГВ несёт по крайней мере одну мутацию в области Pre-S1/Pre-S2/S, преимущественно локализованную в MHR [41].

Отметим при этом, что мутации ускользания от иммунного ответа часто встречаются не сами по себе, а в сочетании со значимыми аминокислотными заменами в генах *Pol* и *Core*, связанными с ЛУ вируса или повышенным риском развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Поэтому важно понимать функциональные последствия ЕМ для репликации ВГВ, так как их наличие приводит к увеличению распространённости необнаруживаемых вариантов вируса, несущих значимые для лечения и прогрессирования заболевания мутации. Обнаружение сосуществования сложных мутантов ВГВ, например, иммунного ускользания и ЛУ, представляет собой серьёзную проблему, требующую корректировки противовирусной терапии и профилактики инфицирования, так как могут приводить к заболеванию вакцинированных лиц.

Заключение

Хотя информация о генетическом разнообразии ВГВ и клинически значимых мутациях имеет решающее значение для ведения пациентов, эти данные в Гвинейской Республике ограничены. Учитывая глобальное значение болезни, вызванной данным возбудителем, и многогранное влияние вариаций белка HBsAg на результаты диагностики, клиническое течение и эффективность лечения, всестороннее знание разнообразия и частоты мутаций имеет важное значение. Выявленная среди терапевтически наивных беременных женщин широкая распространённость мутаций иммунного бегства и ЛУ, способных приводить к ложноотрицательным результатам скрининга на HBsAg, безуспешной профилактике и вирусологической неэффективности терапии ВГВ-инфекции, является серьёзной проблемой. Своевременное обнаружение патогена, генотипирование, определение клинически значимых мутаций необходимы для профилактики вертикального инфицирования, лечения заболевания, а также выявления путей распространения вируса и планирования программы иммунизации в Гвинейской Республике.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Hepatitis B. Key facts. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
2. WHO. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: Actions for impact. Web Annex 2: Data Methods. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240027077>
3. GBD 2019 Hepatitis B Collaborators. Global, regional, and national burden of hepatitis B, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 7(9): 796–829. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00124-8)
4. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015; 386(10003): 1546–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
5. Kao J.H. Hepatitis B vaccination and prevention of hepatocellular carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2015; 29(6): 907–17. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.09.011>
6. Yao N., Fu S., Wu Y., Tian Z., Feng Y., Li J., et al. Incidence of mother-to-child transmission of hepatitis b in relation to maternal peripartum antiviral prophylaxis: A systematic review and me-

ta-analysis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2022; 101(11): 1197–206. <https://doi.org/10.1111/aogs.14448>

7. Pan C.Q., Duan Z., Dai E., Zhang S., Han G., Wang Y., et al. Tenofovir to prevent hepatitis B transmission in mothers with high viral load. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(24): 2324–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508660>
8. Terrault N.A., Lok A.S.F., McMahon B.J., Chang K.M., Hwang J.P., Jonas M.M., et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: aASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018; 67(4): 1560–99. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>
9. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015; 64(12): 1972–84. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
10. Akinbodewa A.A., Gbadegesin B.A., Adejumo O.A., Ahmed S.D., Uwameiye O., Dada S.A., et al. A multicentre study of awareness and practice of vaccination against infectious diseases among haemodialysis subjects in Nigeria. *West Afr. J. Med.* 2019; 36(3): 239–45.
11. Kramvis A. Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. *S. Afr. Med. J.* 2018; 108(8b): 17–21. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2018.v108i8b.13495>
12. Stasi C., Silvestri C., Voller F. Emerging trends in epidemiology of hepatitis B virus infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2017; 5(3): 272–6. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00010>
13. Mokaya J., McNaughton A.L., Hadley M.J., Beloukas A., Gerretti A.M., Geodhals D. A systematic review of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine escape mutations in Africa: A call for urgent action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(8): e0006629. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006629>
14. Phan N.M.H., Faddy H.M., Flower R.L., Dimech W.J., Spann K.M., Roulis E.V. Low genetic diversity of hepatitis B virus surface gene amongst Australian blood donors. *Viruses.* 2021; 13(7): 1275. <https://doi.org/10.3390/v13071275>
15. Hossain M.G., Ueda K. Investigation of a novel hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) escape mutant affecting immunogenicity. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0167871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167871>
16. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Метод выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе гнездовой ПЦР с детекцией по трем вирусным мишеням в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022; 67(9): 530–7. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537> <https://elibrary.ru/qndbzr>
17. Попова А.Ю., Кутырева В.В., Тотолян Арег А., ред. *Генатум В в странах Западной Африки: эпидемиология, диагностика, профилактика.* СПб.; 2021.
18. Garmiri P., Loua A., Naba N., Candotti D., Allain J.P. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 10): 2442–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012013-0>
19. Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Останкова Ю.В. и др. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; (1): 87–94. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-87-94> <https://elibrary.ru/upnyfx>
20. Boumbaly S., Serikova E.N., Balde T.A.L., Ostantkova Yu.V., Schemelev A.N., Valutite D.E., et al. Amino acid substitutions in core and HBsAg regions of hepatitis B virus in patients with mono-infection and HBV/HIV-coinfection in the Republic of Guinea. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders.* 2021; 13(3): 122–33. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2021-13-3-122-133>
21. Бумбали С., Балде Т.А.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В. и др. Распространённость маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 59–68. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92> <https://elibrary.ru/zybhjz>
22. Ingasia L.A.O., Kostaki E.G., Paraskevis D., Kramvis A. Global and regional dispersal patterns of hepatitis B virus genotype E from and in Africa: A full-genome molecular analysis. *PLoS One.* 2020; 15(10): e0240375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240375>

23. Shirvani-Dastgerdi E., Winer B.Y., Celià-Terrassa T., Kang Y., Tabernero D., Yagmur E., et al. Selection of the highly replicative and partially multidrug resistant rtS78T HBV polymerase mutation during TDF-ETV combination therapy. *J. Hepatol.* 2017; 67(2): 246–54. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.027>
24. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., et al. HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3161-2>
25. Sloan R.D., Ijaz S., Moore P.L., Harrison T.J., Teo C.G., Tedder R.S. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant. *Antivir. Ther.* 2008; 13(3): 439–47.
26. Wang M.L., Tang H. Nucleos(t)ide analogues causes HBV S gene mutations and carcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2016; 15(6): 579–86. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(16\)60064-4](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(16)60064-4)
27. Lai M.W., Liang K.H., Yeh C.T. Hepatitis B virus preS/S truncation mutant rtM204I/sW196* increases carcinogenesis through deregulated HIF1A, MGST2, and TGFβ. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(17): 6366. <https://doi.org/10.3390/ijms21176366>
28. Gencay M., Hübner K., Gohl P., Seffner A., Weizenegger M., Neofytos D., et al. Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0172101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172101>
29. Lazarevic I., Banko A., Miljanovic D., Cupic M. Immune-escape hepatitis B virus mutations associated with viral reactivation upon immunosuppression. *Viruses.* 2019; 11(9): 778. <https://doi.org/10.3390/v11090778>
30. Adesina O.A., Akanbi O.A., Opaleye O.O., Japhet M.O., Wang B., Oluyeye A.O., et al. Detection of Q129H immune escape mutation in apparently healthy hepatitis B virus carriers in southwestern Nigeria. *Viruses.* 2021; 13(7): 1273. <https://doi.org/10.3390/v13071273>
31. Faleye T.O., Adewumi O.M., Ifeorah I.M., Akere A., Bakarey A.S., Omoruyi E.C., et al. Detection and circulation of hepatitis B virus immune escape mutants among asymptomatic community dwellers in Ibadan, southwestern Nigeria. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 39: 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.008>
32. Powell E.A., Gededzha M.P., Rentz M., Rakgole N.J., Selabe S.G., Seleise T.A., et al. Mutations associated with occult hepatitis B in HIV-positive South Africans. *J. Med. Virol.* 2015; 87(3): 388–400. <https://doi.org/10.1002/jmv.24057>
33. Olagbenro M., Anderson M., Gaseitsiwe S., Powell E.A., Gededzha M.P., Selabe S.G., et al. In silico analysis of mutations associated with occult hepatitis B virus (HBV) infection in South Africa. *Arch. Virol.* 2021; 166(11): 3075–84. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05196-7>
34. Urabe A., Imamura M., Tsuge M., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., et al. The relationship between HBcAg and HBV reinfection in HBV related post-liver transplantation patients. *J. Gastroenterol.* 2017; 52(3): 366–75. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1240-y>
35. Rajput M.K. Mutations and methods of analysis of mutations in Hepatitis B virus. *AIMS Microbiol.* 2020; 6(4): 401–21. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020024>
36. Hamada-Tsutsumi S., Iio E., Watanabe T., Murakami S., Isogawa M., Iijima S., et al. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One.* 2015; 10(2): e0118062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118062>
37. World Health Organization (WHO). Hepatitis B vaccination coverage [Internet]. Available online: <https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/hepb.html> access date: 23.06.23
38. Wilson P., Parr J.B., Jhaveri R., Meshnick S.R. Call to action: prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B in Africa. *J. Infect. Dis.* 2018; 217(8): 1180–3. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy028>
39. Bassoum O., Kimura M., Dia A.T., Lemoine M., Shimakawa Y. Coverage and timeliness of birth dose vaccination in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *Vaccines.* 2020; 8(2): 301. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020301>
40. Moturi E., Tevi-Benissan C., Hagan J., Shendale S., Mayenga D., Murokora D., et al. Implementing a birth dose of hepatitis B vaccine in Africa: Findings from assessments in 5 countries. *J. Immunol. Sci.* 2018; (Suppl. 5): 31–40. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/si.1104>
41. Salpini R., Colagrossi L., Bellocchi M.C., Surdo M., Becker C., Alteri C., et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology.* 2015; 61(3): 823–33. <https://doi.org/10.1002/hep.27604>

REFERENCES

1. WHO. Hepatitis B. Key facts. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
2. WHO. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021: Accountability for the global health sector strategies 2016–2021: Actions for impact. Web Annex 2: Data Methods. Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789240027077>
3. GBD 2019 Hepatitis B Collaborators. Global, regional, and national burden of hepatitis B, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 7(9): 796–829. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00124-8)
4. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015; 386(10003): 1546–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
5. Kao J.H. Hepatitis B vaccination and prevention of hepatocellular carcinoma. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2015; 29(6): 907–17. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.09.011>
6. Yao N., Fu S., Wu Y., Tian Z., Feng Y., Li J., et al. Incidence of mother-to-child transmission of hepatitis b in relation to maternal peripartum antiviral prophylaxis: A systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2022; 101(11): 1197–206. <https://doi.org/10.1111/aogs.14448>
7. Pan C.Q., Duan Z., Dai E., Zhang S., Han G., Wang Y., et al. Tenofovir to prevent hepatitis B transmission in mothers with high viral load. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(24): 2324–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508660>
8. Terrault N.A., Lok A.S.F., McMahon B.J., Chang K.M., Hwang J.P., Jonas M.M., et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: aASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018; 67(4): 1560–99. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>
9. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015; 64(12): 1972–84. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
10. Akinbodewa A.A., Gbadegesin B.A., Adejumo O.A., Ahmed S.D., Uwameiye O., Dada S.A., et al. A multicentre study of awareness and practice of vaccination against infectious diseases among haemodialysis subjects in Nigeria. *West Afr. J. Med.* 2019; 36(3): 239–45.
11. Kramvis A. Molecular characteristics and clinical relevance of African genotypes and subgenotypes of hepatitis B virus. *S. Afr. Med. J.* 2018; 108(8b): 17–21. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2018.v108i8b.13495>
12. Stasi C., Silvestri C., Voller F. Emerging trends in epidemiology of hepatitis B virus infection. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2017; 5(3): 272–6. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2017.00010>
13. Mokaya J., McNaughton A.L., Hadley M.J., Beloukas A., Gerretti A.M., Geodhals D. A systematic review of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine escape mutations in Africa: A call for urgent action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(8): e0006629. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006629>
14. Phan N.M.H., Faddy H.M., Flower R.L., Dimech W.J., Spann K.M., Roulis E.V. Low genetic diversity of hepatitis B virus surface gene amongst Australian blood donors. *Viruses.* 2021; 13(7): 1275. <https://doi.org/10.3390/v13071275>
15. Hossain M.G., Ueda K. Investigation of a novel hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) escape mutant affecting immunogenicity. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0167871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167871>
16. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Semenov A.V., Totolyan Areg A. Method for hepatitis B virus DNA detecting in biological material

- at low viral load based on nested PCR with detection on three viral targets in real-time mode. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2022; 67(9): 530–7. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-530-537> <https://elibrary.ru/qndbzzr> (in Russian)
17. Popova A.Yu., Kuttyreva V.V., Totolyan Areg A., eds. *Hepatitis B in West Africa: Epidemiology, Diagnosis, Prevention [Gepatit B v stranakh Zapadnoy Afriki: epidemiologiya, diagnostika, profilaktika]*. St. Petersburg; 2021. (in Russian)
 18. Garmiri P., Loua A., Haba N., Candotti D., Allain J.P. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 10): 2442–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012013-0>
 19. Balde T.A.L., Bumbali S., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., et al. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the Republic of Guinea. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (1): 87–94. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-87-94> <https://elibrary.ru/upnyfx> (in Russian)
 20. Boubaly S., Serikova E.N., Balde T.A.L., Ostankova Yu.V., Schemelev A.N., Valutite D.E., et al. Amino acid substitutions in core and HBsAg regions of hepatitis B virus in patients with monoinfection and HBV/HIV-coinfection in the Republic of Guinea. *HIV Infection and Immunosuppressive Disorders*. 2021; 13(3): 122–33. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2021-13-3-122-133>
 21. Bumbali S., Balde T.L., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Naydenova E.V., et al. Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(1): 59–68. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92> <https://elibrary.ru/zybhjz> (in Russian)
 22. Ingasia L.A.O., Kostaki E.G., Paraskevis D., Kramvis A. Global and regional dispersal patterns of hepatitis B virus genotype E from and in Africa: A full-genome molecular analysis. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0240375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240375>
 23. Shirvani-Dastgerdi E., Winer B.Y., Celià-Terrassa T., Kang Y., Taberner D., Yagmur E., et al. Selection of the highly replicative and partially multidrug resistant rtS78T HBV polymerase mutation during TDF-ETV combination therapy. *J. Hepatol.* 2017; 67(2): 246–54. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.027>
 24. Colagrossi L., Hermans L.E., Salpini R., Di Carlo D., Pas S.D., Alvarez M., et al. HEPVIR working group of the European Society for translational antiviral research (ESAR). Immune-escape mutations and stop-codons in HBsAg develop in a large proportion of patients with chronic HBV infection exposed to anti-HBV drugs in Europe. *BMC Infect. Dis.* 2018; 18(1): 251. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3161-2>
 25. Sloan R.D., Ijaz S., Moore P.L., Harrison T.J., Teo C.G., Tedder R.S. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant. *Antivir. Ther.* 2008; 13(3): 439–47.
 26. Wang M.L., Tang H. Nucleos(t)ide analogues causes HBV S gene mutations and carcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2016; 15(6): 579–86. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(16\)60064-4](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(16)60064-4)
 27. Lai M.W., Liang K.H., Yeh C.T. Hepatitis B virus preS/S truncation mutant rtM204I/sW196* increases carcinogenesis through deregulated HIF1A, MGST2, and TGFβ1. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(17): 6366. <https://doi.org/10.3390/ijms21176366>
 28. Gencay M., Hübner K., Gohl P., Seffner A., Weizenegger M., Neofytos D., et al. Ultra-deep sequencing reveals high prevalence and broad structural diversity of hepatitis B surface antigen mutations in a global population. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0172101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172101>
 29. Lazarevic I., Banko A., Miljanovic D., Cupic M. Immune-escape hepatitis B virus mutations associated with viral reactivation upon immunosuppression. *Viruses*. 2019; 11(9): 778. <https://doi.org/10.3390/v11090778>
 30. Adesina O.A., Akanbi O.A., Opaleye O.O., Japhet M.O., Wang B., Oluyeye A.O., et al. Detection of Q129H immune escape mutation in apparently healthy hepatitis B virus carriers in southwestern Nigeria. *Viruses*. 2021; 13(7): 1273. <https://doi.org/10.3390/v13071273>
 31. Faleye T.O., Adewumi O.M., Ifeora I.M., Akere A., Bakarey A.S., Omoruyi E.C., et al. Detection and circulation of hepatitis B virus immune escape mutants among asymptomatic community dwellers in Ibadan, southwestern Nigeria. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 39: 102–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.08.008>
 32. Powell E.A., Gededzha M.P., Rentz M., Rakgole N.J., Selabe S.G., Seleise T.A., et al. Mutations associated with occult hepatitis B in HIV-positive South Africans. *J. Med. Virol.* 2015; 87(3): 388–400. <https://doi.org/10.1002/jmv.24057>
 33. Olagbenro M., Anderson M., Gaseitsiwe S., Powell E.A., Gededzha M.P., Selabe S.G., et al. In silico analysis of mutations associated with occult hepatitis B virus (HBV) infection in South Africa. *Arch. Virol.* 2021; 166(11): 3075–84. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05196-7>
 34. Urabe A., Imamura M., Tsuge M., Kan H., Fujino H., Fukuhara T., et al. The relationship between HBcrAg and HBV reinfection in HBV related post-liver transplantation patients. *J. Gastroenterol.* 2017; 52(3): 366–75. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1240-y>
 35. Rajput M.K. Mutations and methods of analysis of mutations in Hepatitis B virus. *AIMS Microbiol.* 2020; 6(4): 401–21. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020024>
 36. Hamada-Tsutsumi S., Iio E., Watanabe T., Murakami S., Isogawa M., Iijima S., et al. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0118062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118062>
 37. World Health Organization (WHO). Hepatitis B vaccination coverage [Internet]. Available online: <https://immunizationdata.who.int/pages/coverage/hepb.html> access date: 23.06.23
 38. Wilson P., Parr J.B., Jhaveri R., Meshnick S.R. Call to action: prevention of mother-to-child transmission of hepatitis B in Africa. *J. Infect. Dis.* 2018; 217(8): 1180–3. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy028>
 39. Bassoum O., Kimura M., Dia A.T., Lemoine M., Shimakawa Y. Coverage and timeliness of birth dose vaccination in sub-Saharan Africa: A systematic review and meta-analysis. *Vaccines*. 2020; 8(2): 301. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020301>
 40. Moturi E., Tevi-Benissan C., Hagan J., Shendale S., Mayenga D., Murokora D., et al. Implementing a birth dose of hepatitis B vaccine in Africa: Findings from assessments in 5 countries. *J. Immunol. Sci.* 2018; (Suppl. 5): 31–40. <https://doi.org/10.29245/2578-3009/2018/si.1104>
 41. Salpini R., Colagrossi L., Bellocchi M.C., Surdo M., Becker C., Alteri C., et al. Hepatitis B surface antigen genetic elements critical for immune escape correlate with hepatitis B virus reactivation upon immunosuppression. *Hepatology*. 2015; 61(3): 823–33. <https://doi.org/10.1002/hep.276>

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178>

© УШКАЛЕНКО Н.Д., ЕРШ А.В., ФИЛАТОВ П.В., ПОЛТАВЧЕНКО А.Г., 2023



Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов

Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Массовая вакцинация против натуральной оспы была прекращена в 1980 г. вследствие успешной ликвидации заболевания. В то же время возможность применения вируса натуральной оспы в военных или террористических целях, а также заболевания, вызываемые вирусом оспы обезьян в африканском регионе, а в последнее время и в эндемичных районах других континентов, остаются угрозой для невакцинированного населения. В случаях возникновения этих заболеваний большое значение имеет быстрая диагностика, поскольку от неё зависит скорость и в конечном счёте эффективность лечебных и карантинных мероприятий.

Цель – создание набора реагентов для иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющего быстро и с высокой чувствительностью выявлять ортопоксвирусы (ОПВ) в клинических образцах.

Материалы и методы. Методом одностадийного ИФА оценивали эффективность выявления вирусов в криолизатах образцов культуры клеток CV-1, инфицированных вирусами осповакцины, оспы коров, оспы кроликов и экстремелии, а также в клинических образцах инфицированных кроликов и мышей.

Результаты. Показано, что ускоренный вариант ИФА позволяет обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах в диапазоне $5,0 \times 10^2$ – $5,0 \times 10^3$ БОЕ/мл, а в клинических пробах – при вирусной нагрузке, превышающей 5×10^3 БОЕ/мл.

Заключение. Анализ включает минимальное число операций и может быть выполнен в течение 45 мин, что позволяет использовать его в условиях повышенного уровня биобезопасности. Ускоренный ИФА изготовлен с использованием поликлональных антител, что значительно упрощает производство диагностической системы и снижает его стоимость.

Ключевые слова: ортопоксвирусы; вирус оспы коров; вирус осповакцины; вирус экстремелии; вирус оспы кроликов; клинические образцы; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Ушкаленко Н.Д., Ерш А.В., Филатов П.В., Полтавченко А.Г. Ускоренный метод иммуноферментного анализа для выявления ортопоксвирусов. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(3): 242-251. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178> EDN: <https://elibrary.ru/qjivtp>

Для корреспонденции: Филатов Павел Владимирович, канд. биол. наук, научный сотрудник ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru

Участие авторов: Ушкаленко Н.Д. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ерш А.В. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных; Филатов П.В. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Полтавченко А.Г. – концепция и дизайн исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол 08-09.2020 от 25.09.2020).

Поступила 11.05.2023

Принята в печать 22.06.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178>

The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses

Nikita D. Ushkalenko, Anna V. Ersh, Pavel V. Filatov, Alexander G. Poltavchenko

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Introduction. Following the successful eradication of smallpox, mass vaccination against this disease was discontinued in 1980. The unvaccinated population continues to be at risk of infection due to military use of variola virus or exposure to monkeypox virus in Africa and non-endemic areas. In cases of these diseases, rapid diagnosis is of great importance, since the promptness and effectiveness of therapeutic and quarantine measures depend on it.

The aim of work is to develop a kit of reagents for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for fast and highly sensitive detection of orthopoxviruses (OPV) in clinical samples.

Materials and methods. The efficiency of virus detection was evaluated by single-stage ELISA in the cryolysate of CV-1 cell culture samples infected with vaccinia, cowpox, rabbitpox, and ectromelia viruses, as well as in clinical samples of infected rabbits and mice.

Results. The method of rapid ELISA was shown to allow the detection of OPV in crude viral samples in the range of 5.0×10^2 – 5.0×10^3 PFU/ml, and in clinical samples with a viral load exceeding 5×10^3 PFU/ml.

Conclusions. The assay involves a minimum number of operations and can be performed within 45 minutes, which makes it possible to use it in conditions of a high level of biosecurity. Rapid ELISA method was developed using polyclonal antibodies, which significantly simplifies and reduces the cost of manufacturing a diagnostic system.

Keywords: *orthopoxviruses; cowpox virus; vaccinia virus; ectromelia virus; rabbitpox virus; clinical samples; ELISA*

For citation: Ushkalenko N.D., Ersh A.V., Filatov P.V., Poltavchenko A.G. The rapid ELISA method for detection of orthopoxviruses. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 242-251 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-178> EDN: <https://elibrary.ru/qjivvt>

For correspondence: Pavel V. Filatov, PhD (Biol.), Research Officer, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru

Information about the authors:Ushkalenko N.D., <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>Ersh A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>Filatov P.V., <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>Poltavchenko A.G., <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Contribution: Ushkalenko N.D. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Ersh A.V. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data; Filatov P.V. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Poltavchenko A.G. – the study concept and design, final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution (protocol code 08-09.2020 dated 25.09.2020).

Received 11 May 2023

Accepted 22 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

По современной классификации род *Orthopoxvirus* подсемейства Chordoroxvirinae семейства Poxviridae включает 9 видов вирусов, из которых четыре – вирусы натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО), оспы коров (ВОК) и осповакцины (ВОВ) – патогенны для человека [1]. ВОК и ВОВ у человека вызывают локализованные инфекции, купирующиеся самостоятельно в течение 3–4 недель и редко переходящие в генерализованную форму [2]. Инфицирование ВНО

или ВОО приводит к системным заболеваниям, характеризующимся общей интоксикацией, лихорадкой, своеобразными высыпаниями на коже и (или) слизистых оболочках и нередко заканчивающимся летально [2–4]. Эти вирусы высококонтагиозны, устойчивы к факторам внешней среды и могут передаваться различными путями, что позволяет специалистам рассматривать ВНО и ВОО как потенциальные агенты биологического оружия или биотеррористических актов [5, 6]. Если ВНО к 1980 г. ликвидирован в результате массовой вакцинации, то ВОО продолжает

угрожать жизни людей в эндемичных регионах Африки [7]. Кроме того, участвовавшие эпизоды вывоза ВОО за пределы Африки свидетельствуют о его глобальном значении [4, 8]. Последние случаи распространения ВОО за пределами Африки с мая 2022 г. приобрели массовый характер и были зарегистрированы во многих государствах по всему миру. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC)¹, с начала 2022 г. и по 12 февраля 2023 г. в 110 странах зарегистрировано 85 802 лабораторно подтвержденных случаев этого заболевания, 97 из которых закончились летально. По данным ВОЗ², в России зарегистрировано два случая ВОО.

В системе мероприятий по борьбе с ВОО (MP 3.1.0290-22)³ большое значение имеет ранняя диагностика заболевания, так как от этого зависит эффективность профилактических, лечебных и карантинных мероприятий [9]. Диагноз не может быть поставлен только по анамнестическим данным и клиническим признакам, поскольку симптоматика ВОО сходна с проявлениями многих других инфекционных заболеваний. Дифференциальная диагностика может быть проведена лабораторными методами для выявления вирусных частиц, вирусной ДНК или вирусных белков. Выявление морфологически характерных ортопоксвирусов (ОПВ) методом электронной микроскопии (ЭМ) с негативным контрастированием может быть выполнено быстро, но только при концентрации вирусных частиц, превышающей 10^6 – 10^8 вир/мл. Различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяют не только выявлять сотни и даже десятки копий вирусной ДНК, но и дифференцировать виды ОПВ, однако такой анализ может быть выполнен в строго контролируемых лабораторных условиях в течение нескольких часов [10–12]. И ЭМ, и ПЦР требуют дорогостоящего оборудования и обученного персонала, что мало подходит для эндемичных африканских регионов с ограниченной лабораторной инфраструктурой [13, 14].

Иммунохимические методы не могут дифференцировать виды ОПВ вследствие выраженной перекрестной реактивности вирусных белков, однако они менее прихотливы к условиям анализа и могут выполняться быстрее ПЦР. Так, известен иммунохроматографический (lateral flow immunoassay) тест Orthopox BioThreat Alert, позволяющий выявить ОПВ в концентрациях 10^6 – 10^7 БОЕ/мл в течение 20–25 мин [9]. Другим примером может служить немецкая иммуно-

фильтрационная система AVICAP (Antibody Immuno Column for Analytical Processes), допускающая достоверное выявление ОПВ при их содержании в образце, превышающем 10^4 БОЕ/мл, в течение 45 мин [15]. Оба теста могут выполняться во внелабораторных условиях. Иммуноферментный анализ (ИФА) с захватом антигена хоть и требует регистрирующей аппаратуры, но уже стал рутинным методом, который может быть использован в минимально оснащенной лаборатории. Известен вариант ИФА с использованием сочетания моно- и поликлональных антител, позволяющий регистрировать ОПВ в концентрации, превышающей 10^4 БОЕ/мл [16], а также ИФА на основе пары тщательно подобранных моноклональных антител, допускающий детекцию ОПВ при вирусной нагрузке выше 1×10^3 БОЕ/мл [15]. Оба метода достигают высокой чувствительности за счёт длительных инкубаций, увеличивающих время анализа примерно до 3 ч.

Ранее мы сообщали о разработке автономного теста, основанного на дот-иммуноанализе с использованием кроличьих поликлональных антител к ВОВ, допускающего выявление ОПВ в концентрации 10^3 – 10^4 БОЕ/мл за 36 мин во внелабораторных условиях [17]. В настоящей статье описан вариант ИФА на основе поликлональных антител, позволяющий провести быструю и чувствительную детекцию ОПВ.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовали казеин, бычий сывороточный альбумин (БСА), tween-20, сахарозу, готовый к использованию раствор тетраметилбензидина (ТМБ), пероксидазу хрена RZ = 3, Proclin 300, фосфатно-солевой буфер (ФСБ) фирмы Sigma-Aldrich (Германия), а также химические реактивы отечественного производства с квалификацией не ниже ЧДА (чистый для анализа).

Вирусы

Вирус вакцины штамм LIVP (ВОВ), штамм GRI-90 (ВОК), штамм К-1 (вирус экстремелии – ВЭ) и штамм Утрехт (вирус оспы кроликов – ВОКр). Культивирование и титрование вирусов в монослое клеточной культуры CV-1 выполняли согласно ранее описанной методике [17]. В работе использовали криолизаты инфицированных клеток (два цикла замораживания – оттаивания).

Клинические образцы

В качестве клинических образцов использовали образцы крови и органов 6-месячного кролика породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг, интраназально инфицированного вирусом ВОКр в дозе 10^4 БОЕ, и образцы органов мышей линии BALB/c с массой тела 13–16 г, интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах 10^6 и 10^8 БОЕ/животное.

Корочка с пустулы на месте вакцинации человека, отпавшая на 29-е сутки после введения осповакцины, получена из Медсанчасти № 163 в виде обезличенного образца.

¹CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Monkeypox in the U.S., 2022a. Available at: <https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/index.html> (дата обращения: 11 мая 2023).

²2022-23 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends World Health Organization Produced on 09 May 2023. Available at: https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/ (дата обращения: 11 мая 2023).

³MP 3.1.0290-22 Методические рекомендации «Противоэпидемические мероприятия, направленные на предупреждение возникновения и распространения оспы обезьян». М., 2022. 27 с.

Контроли

Для контроля специфичности анализа применяли неинфицированную культуру клеток CV-1, обработанную так же, как вирусные препараты.

В качестве гетерогенных контролей использовали антигены вирусов, вызывающих экзантематозные заболевания: вирус кори (штамм НовО/96), выращенный на монослое клеток Vero, очищенный центрифугированием в градиенте плотности сахарозы и инактивированный прогреванием в течение 1 ч при 56 °С; антиген вируса краснухи и антиген вируса ветряной оспы закупали у фирмы Faron Inc. (Китай). Все гетерогенные контроли использовали в концентрации 1 мкг/мл.

Антитела

Поликлональные антитела к ВОВ получали из гипериммунной сыворотки кролика путём двукратного осаждения 4М-сульфатом аммония. Иммунизацию кроликов проводили по ранее описанной методике [17].

Набор для ИФА

Сорбцию антител в 96-луночные высокосорбционные полистироловые планшеты NEST (Nest Biotechnology, Китай) выполняли из ФСБ в объёме 200 мкл/яч в течение 20 ч при 4 °С. Блокировку ячеек в объёме 250 мкл проводили ФСБ, содержащим 0,2% казеина и 1% сахарозы, в течение 1 ч при 37 °С. Планшеты высушивали 12 ч при 30 °С, запаивали в фольгированную упаковку под вакуумом и хранили до использования при 4 °С. Конъюгат поликлональных антител с пероксидазой хрена получали по ранее описанному методу [18]. Полученный конъюгат диализовали против ФСБ, добавляли 50% глицерина и хранили с при –20 °С.

Выполнение анализа

Анализ образцов выполняли в одну стадию, совмещая инкубации образца и конъюгата. Разведение образцов и конъюгата выполняли в растворе, содержащем ФСБ pH 7,2; 0,1% казеина; 0,5% БСА; 0,2% tween-20; 0,05% фенола и 0,05% Proclin 300. В ячейки сенсibilизированного планшета вносили по 100 мкл рабочего разведения конъюгата, а затем по 100 мкл подготовленных образцов вирусных суспензий или по 30 мкл тканевых гомогенатов. Планшет инкубировали 30 мин в термошейкере («Биосан», Латвия) при 37 °С и 600 об/мин. Отмывали 7 раз раствором ФСБ, содержащим 0,1% tween-20 в объёме 350 мкл/яч, вносили по 200 мкл/яч раствора ТМБ и инкубировали 10 мин в термошейкере при 37 °С и 600 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 75 мкл/яч 0,5 М раствора серной кислоты. Регистрацию оптической плотности (ОП) проводили с использованием спектрофотометра Thermo Scientific Varioskan LUX (Thermoscientific, США) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка

Все эксперименты выполняли в трёх повторах, по данным которых рассчитывали среднее значение ОП (M), доверительный интервал (Δx) для довери-

тельной вероятности 95% ($p = 0,95$) и коэффициент вариации (K). На втором этапе, используя данные ИФА серий разведений вирусного препарата (табл. 1), в полулогарифмических координатах строили график зависимости ОП₄₅₀ препарата от Ig его титра (T). Строили аппроксимирующую прямую, получали её уравнение и величину достоверности аппроксимации. Расчёты выполняли с использованием статистических функций программы Microsoft Excel. На основании этих данных оценивали ориентировочный титр вирусов в клинических образцах.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол 08-09.2020 от 25.09.2020).

Результаты

Результаты оценки чувствительности ИФА при определении культуральных препаратов ОПВ приведены в табл. 1.

Калибровочные графики для ВОВ и ВОКр, построенные на основе данных табл. 1, приведены на рис. 1 и 2 соответственно.

Результаты исследования клинических образцов кролика, инфицированного ВОКр, и расчётные данные о содержании вируса в образцах, полученные по калибровочному графику для ВОКр (рис. 2), приведены в табл. 2.

Характеристики клинических образцов мышей, инфицированных ВОВ, результаты их ИФА и расчётные данные о содержании вируса в образцах, полученные по калибровочному графику для ВОВ (рис. 1), приведены в табл. 3.

Обсуждение

В предыдущих публикациях мы описывали разработку автономного набора для выявления ОПВ методом дот-иммуноанализа на белковых матрицах с использованием поликлональных антител против ВОВ, как иммобилизованных на подложке антител захвата, так и в качестве антител детекции, связанных с частицами коллоидного золота. При этом мы сравнивали два варианта реализации анализа: двухстадийный, в котором этапы инкубации с образцом и в конъюгате выполняются отдельно, и одностадийный, где эти этапы совмещены. Установлено, что одностадийный вариант позволяет не только сократить время анализа, но и увеличить чувствительность выявления ОПВ в неочищенных вирусных препаратах, по сравнению с двухстадийной постановкой анализа. При этом лимит определения разных видов ОПВ укладывался в диапазон от $6,2 \times 10^2$ для ВОКр до $8,0 \times 10^3$ БОЕ/мл для ВОК [19]. Показано, что прирост чувствительности может быть объяснён агрегацией частиц золотого конъюгата на вирионах и субвирусных структурах [20]. В настоящей работе мы попытались реализовать одностадийный (ускоренный) формат ИФА для вы-

Таблица 1. Результаты иммуноферментного анализа культуральных препаратов ортопоксвирусов

Table 1. ELISA results of OPV culture preparations

Образец (штамм) Sample (strain)	Разведения Dilution	Титр, БОЕ/мл Titer, PFU/ml	Результаты ИФА (ОП ₄₅₀), ELISA results (OD ₄₅₀), M ± Δx
Вирус осповакцины (ЛИВП) Vaccinia virus (LIVP)	0	1,1 × 10 ⁷	–
	1 : 10	1,1 × 10 ⁶	4,302 ± 0,352
	1 : 100	1,1 × 10 ⁵	4,211 ± 0,368
	1 : 200	5,5 × 10 ⁴	3,965 ± 0,277
	1 : 400	2,7 × 10 ⁴	3,256 ± 0,202
	1 : 800	1,3 × 10 ⁴	1,901 ± 0,154
	1 : 1600	6,8 × 10 ³	1,221 ± 0,135
	1 : 3200	3,4 × 10 ³	0,826 ± 0,082
	1 : 6400	1,7 × 10 ³	0,374 ± 0,039
	1 : 12 800	8,6 × 10 ²	0,318 ± 0,025
Вирус оспы коров (GRI-90) Cowpox virus (GRI-90)	0	9,8 × 10 ⁶	–
	1 : 100	9,8 × 10 ⁴	1,875 ± 0,154
	1 : 200	4,9 × 10 ⁴	1,174 ± 0,130
	1 : 400	2,4 × 10 ⁴	0,746 ± 0,101
	1 : 800	1,2 × 10 ⁴	0,501 ± 0,071
	1 : 1600	6,1 × 10 ³	0,417 ± 0,044
	1 : 3200	3,0 × 10 ³	0,292 ± 0,021
	1 : 6400	1,5 × 10 ³	0,252 ± 0,025
	1 : 12 800	7,6 × 10 ²	0,240 ± 0,019
	Вирус оспы кроликов (Утрехт) Rabbit poxvirus (Utrecht)	0	1,0 × 10 ⁶
1 : 10		1,0 × 10 ⁵	1,625 ± 0,172
1 : 100		1,0 × 10 ⁴	0,907 ± 0,108
1 : 200		5,0 × 10 ³	0,654 ± 0,083
1 : 400		2,5 × 10 ³	0,508 ± 0,054
1 : 800		1,2 × 10 ³	0,471 ± 0,063
1 : 1600		6,2 × 10 ²	0,356 ± 0,046
1 : 3200		3,1 × 10 ²	0,311 ± 0,036
1 : 6400		1,6 × 10 ²	0,239 ± 0,020
Вирус экстремелии (К-1) Ectromelia virus (K-1)		0	2,3 × 10 ⁶
	1 : 100	2,3 × 10 ⁴	0,931 ± 0,106
	1 : 200	1,1 × 10 ⁴	0,705 ± 0,061
	1 : 400	5,7 × 10 ³	0,515 ± 0,052
	1 : 800	2,8 × 10 ³	0,346 ± 0,043
	1 : 1600	1,4 × 10 ³	0,238 ± 0,037
Контроль клеточной культуры Cell culture control	0	0	0,085 ± 0,031
Гетерогенные контроли Heterologous controls	Антиген вируса ветряной оспы Chickenpox virus antigen	0	0,102 ± 0,037
	Антиген вируса кори Measles virus antigen	0	0,093 ± 0,032
	Антиген вируса краснухи Rubella virus antigen	0	0,097 ± 0,028
Оптическая плотность критическая Optical density critical The cut-off optical density value			0,250

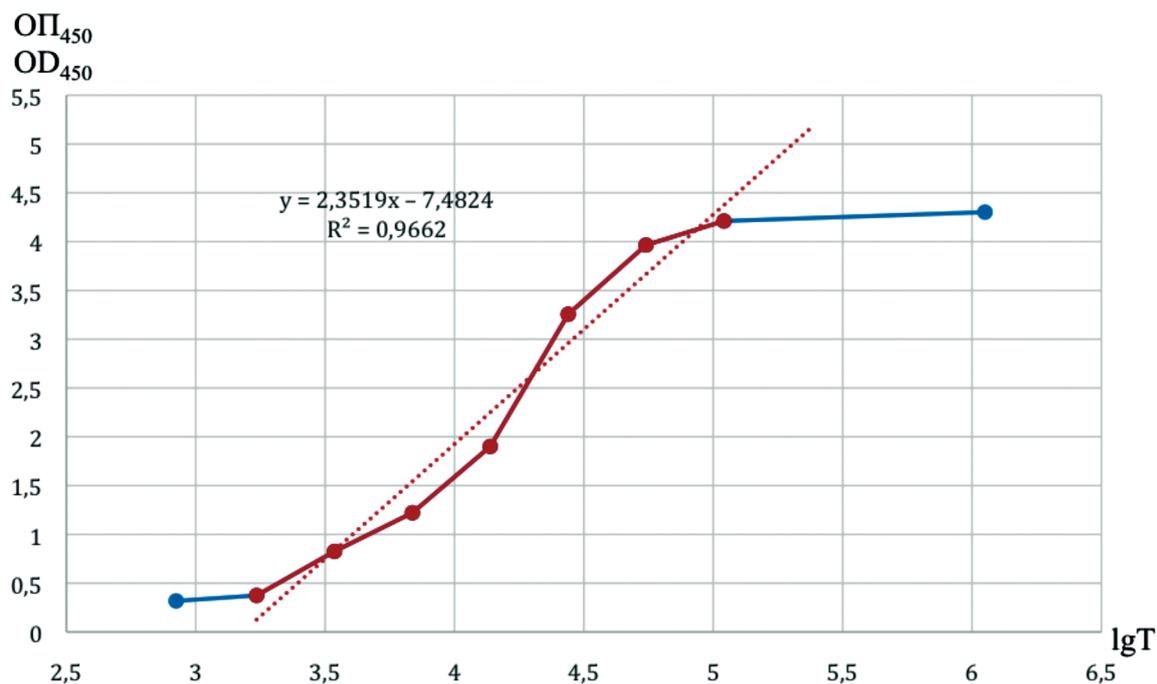


Рис. 1. Калибровочный график для вируса осповакцины

Fig. 1. Calibration plot for vaccinia virus

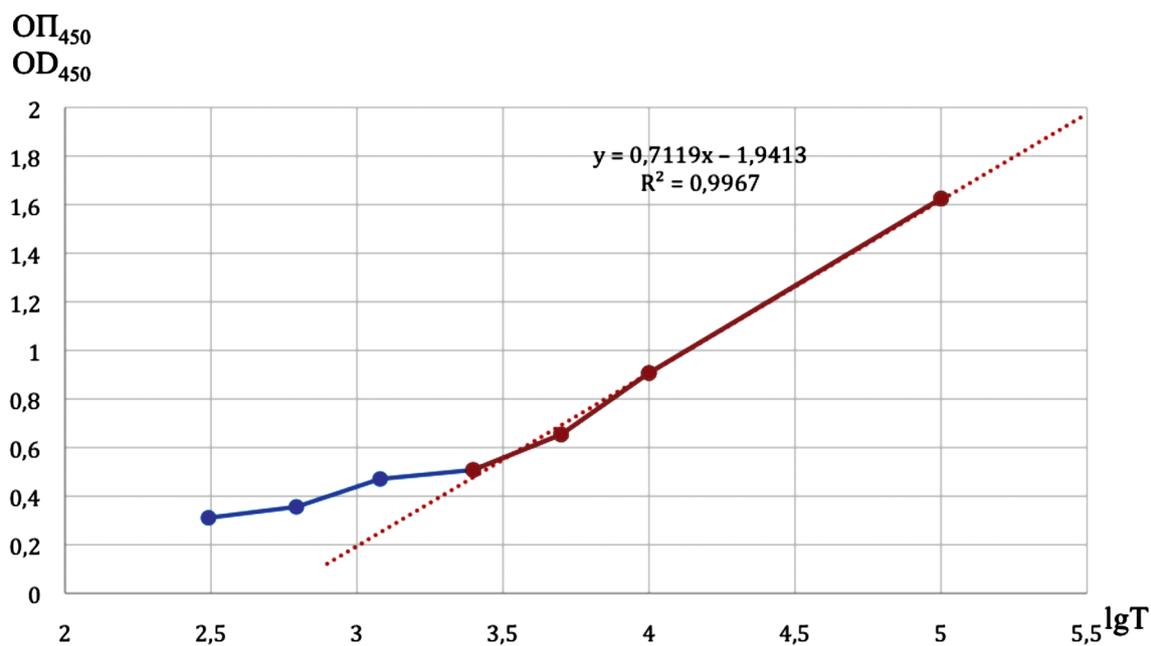


Рис. 2. Калибровочный график для вируса оспы кроликов

Fig. 2. Calibration plot for rabbitpox virus

явления ОПВ в культуральных вирусных препаратах и клинических образцах. Результаты исследования серий двукратных разведений культуральных препаратов ОПВ приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что ускоренный ИФА со всеми препаратами вирусов обеспечивает более высокую чувствительность, чем дот-иммуно-

анализ на основе тех же антител. Лимит определения всех использованных ОПВ укладывается в диапазон от $3,1 \times 10^2$ БОЕ/мл для ВОКр до $3,0 \times 10^3$ БОЕ/мл для ВОК. С учётом возможных погрешностей в титровании вируса и постановке ИФА чувствительность ускоренного варианта выявления ОПВ в неочищенных препаратах можно обозначить диапазоном

Таблица 2. Ориентировочная оценка титра вируса оспы кролика в клинических образцах инфицированного кролика методом ускоренного иммуноферментного анализа

Table 2. Approximate calculation of the titer of rabbitpox virus in a clinical samples from infected rabbit by rapid ELISA method

Клинический образец Clinical sample	День после заражения Day after infection	Результаты ИФА (ОП ₄₅₀) ELISA results (OD ₄₅₀) <i>M ± Δx</i>	Титр вируса*, БОЕ/мл Titer*, PFU/ml
Сыворотка крови Serum	1	0,094 ± 0,023	Н.д. N.d.
	2	0,084 ± 0,028	Н.д. N.d.
	3	0,092 ± 0,019	Н.д. N.d.
	4	0,604 ± 0,072	3,7 × 10 ³
	5	0,904 ± 0,103	1,0 × 10 ⁴
	6	1,212 ± 0,115	2,7 × 10 ⁴
Форменные элементы крови Formed elements of blood	1	0,088 ± 0,039	Н.д. N.d.
	2	0,086 ± 0,035	Н.д. N.d.
	3	0,089 ± 0,035	Н.д. N.d.
	4	0,094 ± 0,015	Н.д. N.d.
	5	0,648 ± 0,081	4,3 × 10 ³
	6	1,302 ± 0,172	3,6 × 10 ⁴
Почка Kidney		0,636 ± 0,076	4,2 × 10 ³
Селезёнка Spleen		1,583 ± 0,151	9,0 × 10 ⁴
Печень Liver		2,194 ± 0,190	6,4 × 10 ⁵
Лёгкое Lung		4,483 ± 0,301	1,0 × 10 ⁹
Участки кожи с высыпаниями Areas of skin with rashes		2,721 ± 0,188	3,5 × 10 ⁶
Оптическая плотность критическая The cut-off optical density value			0,250

Примечание. *Расчётные результаты. Н.д. – нет данных.

Note. *Calculated results. N.d. – no data.

5,0 × 10²–5,0 × 10³ БОЕ/мл. ИФА специфичен и не выявляет взаимодействий с препаратами неинфицированной клеточной культуры и с гетерогенными контролями возбудителей экзантематозных инфекций (корь, краснуха, ветряная оспа). По результатам, приведённым в табл. 1, построены калибровочные графики для ВОВ и ВОКр, использованные далее при оценке титров вирусов в клинических образцах. Графики приведены на рис. 1 и 2.

Для оценки выявления ОПВ в клинических образцах кролика в течение 7 суток с момента заражения до гибели животного из ушной вены отбирали кровь и разделяли каждую пробу на сыворотку и форменные элементы. Форменные элементы суспендировали в физиологическом растворе в соотношении 1 : 10. После гибели кролика отбирали образцы

из разных участков почек, печени, лёгких и селезёнки массой 0,1–0,2 г, а также кусочков кожи из зоны с видимыми высыпаниями (0,5 см²) и готовили из них 10% гомогенаты в ФСБ. Отбор и подготовку образцов проводили в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2970–11⁴. Полученные образцы сыворотки и суспензий из форменных элементов (в объёме 100 мкл) или гомогенатов из тканей органов (в объёме 30 мкл) вносили в ячейки иммуносорбента и выполняли одностадийный ИФА. Результаты исследований приведены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что вирус обнаруживается в сыворотке крови инфицированного животного с 4-го дня после заражения, что совпадает с повышением температуры тела, и его содержание резко возрастает в последующие дни. В форменных элементах

Таблица 3. Характеристики и результаты иммуноферментного анализа клинических образцов мышей, инфицированных вирусом осповакцины

Table 3. Characteristics and results of ELISA of clinical specimens from mice infected with VACV

Характеристики образцов Sample characteristics			Результаты ИФА (ОП ₄₅₀), ELISA results (OD ₄₅₀), $M \pm \Delta x$	Титр вируса*, БОЕ/мл Titer*, PFU/ml
инфицирующая доза Infectious dose	орган organ	титр вируса, БОЕ/мл virus titer, PFU/ml		
10 ⁸ БОЕ/животное PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой Nasal septum with mucosa	1,8 × 10 ⁷	2,486 ± 0,178	1,7 × 10 ⁴
	Лёгкие Lungs	1,8 × 10 ⁶	1,925 ± 0,142	1,0 × 10 ⁴
	Головной мозг Brain	9,1 × 10 ⁴	0,788 ± 0,091	3,3 × 10 ³
10 ⁶ БОЕ/животное PFU/animal	Носовая перегородка со слизистой Nasal septum with mucosa	4,0 × 10 ³	0,338 ± 0,029	2,1 × 10 ³
	Печень Liver	10	0,089 ± 0,038	Н.д. N.d.
	Селезёнка Spleen	80	0,095 ± 0,031	Н.д. N.d.
	Селезёнка Spleen	0	0,085 ± 0,034	Н.д. N.d.
0	Головной мозг Brain	0	0,085 ± 0,055	Н.д. N.d.
	Лёгкие Lungs	0	0,091 ± 0,04	Н.д. N.d.
Оптическая плотность критическая The cut-off optical density value			0,250	

Примечание. *Расчётные результаты. Н.д. – нет данных.

Note. *Calculated results. N.d. – no data.

крови антигены вируса выявляются на сутки позднее. Вирус выявляется во всех исследованных органах погибшего животного. По ориентировочной оценке титра вируса, определённого по калибровочному графику (рис. 2), распределение концентрации ВОКр в органах кролика по убыванию выглядит так: лёгкие, кожа, печень, селезёнка, почка, что согласуется с ранее опубликованными данными титрования вирусов [21] и дот-иммуноанализа [17].

В другой серии экспериментов исследовали органы мышей линии BALB/c (13–16 г), интраназально инфицированных ВОВ (ЛИВП)-4 в дозах 10⁶ и 10⁸ БОЕ/животное. Для контроля использовали органы здоровых мышей. На 7-е сутки после инфицирования выполняли процедуру эвтаназии с помощью цервикальной дислокации и проводили забор проб органов, из которых готовили 10% гомогенаты на питательной среде DMEM. Титры вирусов методом бляшек на культуре клеток CV-1 определяли после нескольких актов замораживания – оттаивания гомогенатов. Характеристики представленных образцов, результаты их ускоренного ИФА, а также сравнительные данные титров вируса в образцах, полученные путём титрования и оценки по калибровочной кривой (см. рис. 1), приведены в табл. 3.

Данные табл. 3 показывают, что вирусы надёжно определяются в органах мыши, заражённой дозой ВОВ 10⁸ БОЕ/животное. При дозе инфицирова-

ния 10⁶ БОЕ/животное вирус на пределе чувствительности выявляется только в образце слизистой носа. Таким образом, надёжная детекция методом ИФА ОПВ в гомогенатах органов возможна при вирусной нагрузке, превышающей 5 × 10³ БОЕ/мл.

Результаты определения содержания вирусов в образцах, полученные методами титрования и расчётом по результатам ИФА, в ряде случаев значительно различаются. Причинами этого могут служить методические различия при приготовлении гомогенатов тканей, а также погрешности аппроксимации данных при построении калибровочных графиков. Кроме того, занижение данных ИФА предположительно может быть связано со стерическими помехами, создаваемыми клеточным дебрисом, при выделении вирусных антигенов на иммуносорбенте. Ранее мы отмечали такие эффекты при обработке криолизатов инфицированных клеток ультразвуком. После такой обработки титры, выявляемые в дот-анализе, снижались, но возвращались к прежним значениям после осаждения дебриса центрифугированием [22]. В любом случае полученные результаты свидетельствуют о том, что оценка титра вирусов по расчётным данным требует критического отношения, особенно в области выходящего за диапазон экспериментальных значений экстраполяционного участка аппроксимирующей кривой.

Сухую корочку массой 0,2 г с места вакцинации человека растирали в фарфоровой ступке, суспендировали в 1 мл ФСБ и выполняли ИФА. Полученный результат ИФА (ОП = $3,587 \pm 0,11$ оптических единиц) соответствовал титру ВОВ на калибровочном графике (рис. 1), равному 5×10^5 БОЕ/мл. Данные согласуются с ранее полученными результатами параллельного титрования гомогената образца и суспензии ВОВ [19].

Таким образом, ускоренный вариант ИФА позволяет в течение 45 мин обнаруживать ОПВ в неочищенных вирусных образцах в диапазоне $5,0 \times 10^2$ – $5,0 \times 10^3$ БОЕ/мл, а в клинических пробах – при вирусной нагрузке, превышающей 5×10^3 БОЕ/мл. Такая чувствительность превышает чувствительность известных систем для внелабораторной (point of care) детекции ОПВ [9, 13] и лишь немного уступает лимиту обнаружения в ИФА с использованием тщательно подобранных пар моноклональных антител [15], но существенно превосходит его по оперативности и простоте выполнения. Кроме того, достоинством описанного выше ИФА является то, что он изготовлен с использованием поликлональных антител, что значительно упрощает производство диагностической системы и снижает её стоимость [16].

Хотя в настоящем исследовании по техническим причинам не были протестированы высокопатогенные для человека ВНО и ВОО, известно, что ОПВ обладают широкой перекрёстной антигенной реактивностью [1–3, 23], и результаты должны быть сходными и для них. ИФА позволяет идентифицировать ОПВ только на уровне рода. Однако в сочетании с анамнестическими данными и характерными симптомами этот метод позволяет предварительно установить заражение патогенными видами поксвирусов, чего достаточно для срочного принятия мер по изоляции и лечению заражённых. Подтверждение инфекции ВОО лучше всего проводить ПЦР, так как это единственный относительно быстрый метод, позволяющий дифференцировать виды ОПВ [11].

Заключение

Описанный в статье одностадийный вариант ИФА обладает чувствительностью, достаточной для выявления ОПВ в пробах клинических материалов. Анализ включает минимальное число операций и может быть выполнен в течение 45 мин, что позволяет использовать его для идентификации ОПВ на уровне рода в условиях повышенного уровня биобезопасности.

ЛИТЕРАТУРА

- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. In: *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Springer Science & Business Media; 2005. <https://doi.org/10.1007/b107126> <https://elibrary.ru/ueqvtt>
- Richter J. Poxviruses. In: *Tropical Dermatology*. Elsevier; 2017: 152–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29634-2.00013-4>
- Buller R.M.L. 170 – Poxviruses. In: Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M., eds. *Infectious Diseases*. Elsevier; 2017: 1452–7.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00170-2>

- Sklenovská N. Monkeypox virus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dharma K., eds. *Animal-Origin Viral Zoonoses*. Singapore: Springer; 2020: 39–68. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_2
- Супотницкий М.В. Натуральная оспа, оспа обезьян. В кн.: Супотницкий М.В. *Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений*. М.: Кафедра, Русская панорама; 2013: 83–86.
- Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00195-X)
- Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
- Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
- Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox Bio-Threat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Methods.* 2013; 187(1): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.023>
- Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.003> <https://elibrary.ru/mxekaf>
- Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2): 163–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
- Максютов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; (4): 60–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> <https://elibrary.ru/xgsxtz>
- Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Mieth P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1): 207. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0665-5>
- Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine.* 2011; 29(Suppl. 4): D60–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
- Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., et al. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0150110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150110>
- Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1989; 36(7): 537–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x>
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Филатов П.В., Ушкаленко Н.Д., Якубицкий С.Н., Сергеев А.А. и др. Ускоренный способ выявления ортопоксвирусов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-106-113> <https://elibrary.ru/ywbpsy>
- Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>
- Ushkalenko N., Ersh A., Sergeev A., Filatov P., Poltavchenko A. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens. *Viruses.* 2022; 14(11): 2580. <https://doi.org/10.3390/v14112580>
- Полтавченко А.Г., Ерш А.В., Таранов О.С., Якубицкий С.Н., Филатов П.В. Быстрый иммунохимический метод выявления ортопоксвирусов (Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6): 291–7. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297> <https://elibrary.ru/tjsbcf>
- Сергеев А.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Боднев С.А., Кабанов А.С. и др. Чувствительность различных видов животных к вирусу оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; (1): 88–91. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-88-91](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91) <https://elibrary.ru/orihiz>

22. Poltavchenko A., Ersh A., Filatov P., Yakubitskiy S. Rapid protocol of dot-immunoassay for orthopoxviruses detection. *J. Virol. Methods*. 2020; 279: 113859. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113859> <https://elibrary.ru/wxwshr>
23. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell*. 2016; 167(3): 684–94.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049>

REFERENCES

1. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses pathogenic for humans. In: *Orthopoxviruses Pathogenic for Humans*. Springer Science & Business Media; 2005. <https://doi.org/10.1007/b107126> <https://elibrary.ru/ueqvtt>
2. Richter J. Poxviruses. In: *Tropical Dermatology*. Elsevier; 2017: 152–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29634-2.00013-4>
3. Buller R.M.L. 170 – Poxviruses. In: Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M., eds. *Infectious Diseases*. Elsevier; 2017: 1452–7.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00170-2>
4. Sklenovská N. Monkeypox virus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dharma K., eds. *Animal-Origin Viral Zoonoses*. Singapore: Springer; 2020: 39–68. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_2
5. Supotnitskiy M.V. Natural smallpox, monkeypox. In: Supotnitskiy M.V. *Biological Warfare. Introduction to the Epidemiology of Artificial Epidemic Processes and Biological Diseases [Biologicheskaya voyna. Vvedenie v epidemiologiyu iskusstvennykh epidemicheskikh protsessov i biologicheskikh porazheniy]*. Moscow: Kafedra, Russkaya panorama; 2013: 834–86. (in Russian)
6. Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Res.* 2003; 57(1-2): 7–12. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00195-X](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00195-X)
7. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kivalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
8. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12): e1003756. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756>
9. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Methods*. 2013; 187(1): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.023>
10. Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49(1): 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2010.06.003> <https://elibrary.ru/mxekaf>
11. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2011; 175(2): 163–9. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
12. Maksyutov R.A. Complex approach to species-specific detection of cowpox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 60–3. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-60-63> <https://elibrary.ru/xgsxtz> (in Russian)
13. Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Miethel P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1): 207. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0665-5>
14. Rimoin A.W., Graham B.S. Whither monkeypox vaccination. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 4): D60–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.004>
15. Stern D., Pauly D., Zydek M., Miller L., Piesker J., Laue M., et al. Development of a genus-specific antigen capture ELISA for orthopoxviruses – target selection and optimized screening. *PLoS One*. 2016; 11(3): e0150110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150110>
16. Czerny C.P., Meyer H., Mahnel H. Establishment of an ELISA for the detection of orthopox viruses based on neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1989; 36(7): 537–46. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1989.tb00641.x>
17. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Filatov P.V., Ushkalenko N.D., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., et al. Rapid detection of orthopoxviruses. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2021; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-3-106-113> <https://elibrary.ru/ywbpsy> (in Russian)
18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12): 1084–91. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>
19. Ushkalenko N., Ersh A., Sergeev A., Filatov P., Poltavchenko A. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal’s clinical specimens. *Viruses*. 2022; 14(11): 2580. <https://doi.org/10.3390/v14112580>
20. Poltavchenko A.G., Ersh A.V., Taranov O.S., Yakubitskiy S.N., Filatov P.V. Rapid immunochemical method for the detection of orthopoxviruses (Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae). *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 291–7. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-291-297> <https://elibrary.ru/tjsbcf> (in Russian)
21. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P’yankov O.V., Sergeev A.A., Bodnev S.A., Kabanov A.S., et al. Sensitivity of different animal species to monkeypox virus. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2012; (1): 88–91. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-88-91](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-88-91) <https://elibrary.ru/orihiz> (in Russian)
22. Poltavchenko A., Ersh A., Filatov P., Yakubitskiy S. Rapid protocol of dot-immunoassay for orthopoxviruses detection. *J. Virol. Methods*. 2020; 279: 113859. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113859> <https://elibrary.ru/wxwshr>
23. Gilchuk I., Gilchuk P., Sapparapu G., Lampley R., Singh V., Kose N., et al. Cross-neutralizing and protective human antibody specificities to poxvirus infections. *Cell*. 2016; 167(3): 684–94.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.049>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179>

© АСАТРИАН М.Н., ТИМОФЕЕВ Б.И., ШМЫР И.С., ХАЧАТРИАН К.Р., ЩЕРБИНИН Д.Н., ТИМОФЕЕВА Т.А., ГЕРАСИМУК Э.Р., АГАСАРИАН В.Г., ЕРШОВ И.Ф., ШАШКОВА Т.И., ИВАНИСЕНКО Н.В., КАРДЫМОН О.Л., СЕМЕНЕНКО Т.А., НАРОДИЦКИЙ Б.С., ЛОГУНОВ Д.Ю., ГИНЦБУРГ А.Л., 2023

Математическая модель для оценки уровня перекрёстного иммунитета между штаммами вируса гриппа подтипа H_3N_2

Асатрян М.Н.¹, Тимофеев Б.И.¹, Шмыр И.С.¹, Хачатрян К.Р.², Щербинин Д.Н.¹, Тимофеева Т.А.¹, Герасимук Э.Р.³, Агасарян В.Г.¹, Ершов И.Ф.¹, Шашкова Т.И.⁴, Иванисенко Н.В.⁴, Кардымон О.Л.⁴, Семенов Т.А.¹, Народицкий Б.С.¹, Логунов Д.Ю.¹, Гинцбург А.Л.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 123458, г. Москва, Россия;

³Государственный университет «Дубна», 141982, г. Дубна, Россия;

⁴Институт искусственного интеллекта, 121170, г. Москва, Россия

Введение. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) регулярно обновляет рекомендации по вакцинам против гриппа с целью достижения их максимального соответствия очередным циркулирующим штаммам. Тем не менее на протяжении нескольких сезонов эффективность вакцины против гриппа А, а именно её компоненты H_3N_2 , определялась как низкая.

Цель исследования – разработка математической модели перекрёстного иммунитета на основании имеющегося массива опубликованных ВОЗ данных реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

Материалы и методы. В настоящей работе представлена математическая модель, основанная на нахождении с помощью регрессионного анализа зависимости титров РТГА от замен в антигенных сайтах последовательностей. Разработанная нами компьютерная программа имеет возможность обрабатывать данные (GISAID, NCBI и др.) и формировать в режиме реального времени базы данных согласно поставленным задачам.

Результаты. На основе наших исследований был вычленен дополнительный антигенный сайт F. Разница в 1,6 раза скорректированного R^2 на подмножествах вирусов, выращенных в культуре клеток и культивируемых в куриных эмбрионах, демонстрирует обоснованность нашего решения о разделении первоначального массива данных по пассажным историям. Нами введено понятие степени гомологичности между двумя произвольными штаммами, которая принимает значение функции, зависящей от дистанции Хэмминга, и показано, что результаты регрессии существенно зависят от выбора функции. Проведённый анализ показал, что наиболее значимыми антигенными сайтами являются А, В и Е. Полученные результаты прогноза титров РТГА показали достаточно хороший результат, сопоставимый с аналогичными работами наших коллег.

Заключение. Предложенный метод может послужить хорошим инструментом для будущих прогнозов с дальнейшим изучением для подтверждения его устойчивости.

Ключевые слова: вирус гриппа; подтип H_3N_2 ; титры РТГА; перекрёстный иммунитет; антигенное расхождение; антигенный сайт; дистанция Хэмминга; регрессионный анализ; эпидемиологическая модель; иммунный ландшафт; вакцинный штамм

Для цитирования: Асатрян М.Н., Тимофеев Б.И., Шмыр И.С., Хачатрян К.Р., Щербинин Д.Н., Тимофеева Т.А., Герасимук Э.Р., Агасарян В.Г., Ершов И.Ф., Шашкова Т.И., Иванисенко Н.В., Кардымон О.Л., Семенов Т.А., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Математическая модель для оценки уровня перекрёстного иммунитета между штаммами вируса гриппа подтипа H_3N_2 . *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 252-264. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179> EDN: <https://elibrary.ru/rqxvea>

Для корреспонденции: Асатрян Марина Норайровна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник группы эпидемиологической кибернетики отдела эпидемиологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва, Россия. E-mail: masatryan@gamaleya.org

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.05.2023

Принята в печать 22.06.2023

Опубликована 30.06.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179>

Mathematical model for assessing the level of cross-immunity between strains of influenza virus subtype H₃N₂

Marina N. Asatryan¹, Boris I. Timofeev¹, Ilya S. Shmyr¹, Karlen R. Khachatryan², Dmitrii N. Shcherbinin¹, Tatiana A. Timofeeva¹, Elita R. Gerasimuk³, Vaagn G. Agasaryan¹, Ivan F. Ershov¹, Tatyana I. Shashkova⁴, Nikita V. Ivanisenko⁴, Olga L. Kardymon⁴, Tatyana A. Semenenko¹, Boris S. Naroditsky¹, Denis Yu. Logunov¹, Aleksander L. Gintsburg¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

²National Research University Higher School of Economics, 123458, Moscow, Russia;

³State University "Dubna", 141982, Dubna, Russia;

⁴Artificial Intelligence Research Institute, 121170, Moscow, Russia

Introduction. The WHO regularly updates influenza vaccine recommendations to maximize their match with circulating strains. Nevertheless, the effectiveness of the influenza A vaccine, specifically its H₃N₂ component, has been low for several seasons.

The aim of the study is to develop a mathematical model of cross-immunity based on the array of published WHO hemagglutination inhibition assay (HAI) data.

Materials and methods. In this study, a mathematical model was proposed, based on finding, using regression analysis, the dependence of HAI titers on substitutions in antigenic sites of sequences. The computer program we developed can process data (GISAID, NCBI, etc.) and create "real-time" databases according to the set tasks.

Results. Based on our research, an additional antigenic site F was identified. The difference in 1.6 times the adjusted R², on subsets of viruses grown in cell culture and grown in chicken embryos, demonstrates the validity of our decision to divide the original data array by passage histories. We have introduced the concept of a degree of homology between two arbitrary strains, which takes the value of a function depending on the Hamming distance, and it has been shown that the regression results significantly depend on the choice of function. The provided analysis showed that the most significant antigenic sites are A, B, and E. The obtained results on predicted HAI titers showed a good enough result, comparable to similar work by our colleagues.

Conclusion. The proposed method could serve as a useful tool for future forecasts, with further study to confirm its sustainability.

Keywords: influenza virus; subtype H₃N₂; HAI titers; cross-immunity; antigenic distance; antigenic site; Hamming distance; regression analysis; epidemiological model; immune landscape; vaccine strain

For citation: Asatryan M.N., Timofeev B.I., Shmyr I.S., Khachatryan K.R., Shcherbinin D.N., Timofeeva T.A., Gerasimuk E.R., Agasaryan V.G., Ershov I.F., Shashkova T.I., Ivanisenko N.V., Kardymon O.L., Semenenko T.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Mathematical model for assessing the level of cross-immunity between strains of influenza virus subtype H₃N₂. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 252-264. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179> EDN: <https://elibrary.ru/rexvea>

For correspondence: Marina N. Asatryan, PhD (Med.), Senior Researcher, Epidemiological Cybernetics Group of the Epidemiology Department, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: masatryan@gamaleya.org

Information about the authors:

Marina N. Asatryan, <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>

Boris I. Timofeev, <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Ilya S. Shmyr, <https://orcid.org/0000-0002-8514-5174>

Karlen R. Khachatryan, <https://orcid.org/0000-0002-1934-532X>

Dmitrii N. Shcherbinin, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Tatiana A. Timofeeva, <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Elita R. Gerasimuk, <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>

Vaagn G. Agasaryan, <https://orcid.org/0009-0009-3824-7061>

Ivan F. Ershov, <https://orcid.org/0000-0002-3333-5347>

Tatyana I. Shashkova, <https://orcid.org/0000-0002-8754-8727>

Nikita V. Ivanisenko, <https://orcid.org/0000-0002-0333-8117>

Olga L. Kardymon, <https://orcid.org/0000-0002-4827-8891>

Tatyana A. Semenenko, <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Boris S. Naroditsky, <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>

Denis Yu. Logunov, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Aleksander L. Gintsburg, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Contribution: the authors contributed equally to this article.

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

Received 12 May 2023

Accepted 22 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

Глобальная сеть эпидемиологического надзора за гриппом и ответных мер Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) WHO GISRS (The World Health Organization Global Influenza Surveillance and Response System) отслеживает и анализирует эволюцию и эпидемиологию вирусов гриппа с основной целью – выбор вакцинного штамма и совершенствование этого процесса посредством исследований, направленных на лучшее понимание эволюционной изменчивости, факторов распространения в сочетании с иммунологическим ландшафтом населения и перекрёстным иммунитетом [1]. При этом ВОЗ регулярно обновляет рекомендации по вакцинам против гриппа с целью достижения их максимального соответствия очередным циркулирующим штаммам.

Тем не менее на протяжении нескольких сезонов эффективность вакцины против гриппа А, а именно её компоненты H_3N_2 , определялась как низкая по сравнению с другими штаммами [2–5]. Причиной низкой эффективности может быть несколько факторов. Например, характерные адаптационные изменения при пассировании рекомендованного штамма в куриных эмбрионах в процессе производства вакцин [6]. Поскольку разработка, масштабное производство и распределение вакцины занимают много месяцев, в конечном счёте к предстоящему сезону преобладание циркулирующих штаммов в некоторых сезонах претерпевает существенные изменения [7]. Но даже если рекомендованная вакцина соответствовала циркулирующим штаммам, на её эффективности могло отрицательно сказаться влияние существующего иммунного ландшафта [8]. Поэтому прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа до сих пор представляет большой интерес для общественного здравоохранения [9–12].

Наиболее перспективным направлением в этой области является построение компьютерных моделей, с помощью которых можно комбинировать различные подходы к моделированию, использовать многочисленные источники данных с возможностью интерпретировать результаты для рекомендаций при выборе вакцинного штамма. Для этого необходимо тесное сотрудничество учёных из разных областей и направлений, работающих на всех уровнях эпидемиологического надзора и отбора вакцинных штаммов, а также разработчиков моделей, эпидемиологов и клиницистов [10, 13, 14].

Коллективом Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи в 2020 г. была разработана и успешно зарегистрирована (свидетельство о регистрации № 2020617965 от 15 июля 2020 г.) **компьютерная программа Influenza IDE** – эпидемиологическая модель (ЭМ) по континентам с упрощённой моделью перекрёстного иммунитета и постоянно обновляющейся базой данных (различных видов и подтипов вируса гриппа) **Influenza DB**. Важной особенностью ЭМ является возможность формирования

(учёта) **нулевого иммунного ландшафта** популяции и далее, после пошаговой имитации (симуляции) распространения вируса гриппа, получение иммунного ландшафта на первый день следующего сезона. ЭМ распространения вируса гриппа среди населения мира на протяжении нескольких сезонов, разработанная с помощью агентного подхода, представлена в виде вложенных моделей: модели **поведения популяции**, модели **инфекционного процесса** и модели **инфицирования** (на основании иммунного ответа в организме отдельного агента (индивидуума) с учётом иммунной памяти и **модели перекрёстного иммунитета**). Компьютерная программа спроектирована с возможностью интегрирования различных моделей перекрёстного иммунитета.

Значительное количество работ по изучению перекрёстного иммунитета основано на обнаружении зависимости между титрами РТГА (реакция торможения гемагглютинации) и различиями в генетических последовательностях вирусов. Для нахождения указанной зависимости исследователи применяют различные математические методы, в том числе регрессионный анализ [15–18]. При этом в качестве меры перекрёстного иммунитета используются различные функции от титров РТГА. Так, в работе F.M. Burnet и D. Lush [19] была введена функция, обозначенная как индикатор эффективности вакцины

$$R_{ij} = c_{ij} / c_{ii}$$

где c_{ij} – значение концентрации (разведения) сыворотки к вирусу i в РТГА с вирусом j , c_{ii} – значение концентрации (разведения) сыворотки i в РТГА с собственным вирусом, где концентрация (разведение) сыворотки в РТГА является величиной, обратной титру РТГА. Исследователи I. Archetti и F.L. Horsfall [20] в своей работе в качестве меры антигенной изменчивости вводят среднее геометрическое значение вышеуказанных соотношений $(R_{ij}R_{ji})^{1/2}$. В более поздних работах, положивших начало широко используемой в настоящее время антигенной картографии, A. Lapedes и R. Farber [21], D.J. Smith и соавт. [22] продемонстрировали, что можно построить пространство формы малой размерности, в которой антитела и антигены рассматриваются как точки, а расстояние между ними обозначается как антигенная дистанция. В качестве меры дистанции D_{ij} использовался как логарифм от титров РТГА по основанию 2, так и величины $\log_2(R_{ij})$, $0,5 \times \log_2(R_{ij}R_{ji})$ [15–17].

В качестве меры различия между последовательностями обычно используется либо простая дистанция Хэмминга, либо функция, зависящая от неё. Наиболее часто в рассматриваемых работах используется модель объединения аминокислотных позиций в антигенные сайты [23–25]. В таких случаях рассматривается дистанция Хэмминга между антигенными сайтами [16–18]. Но бывают и сложные случаи, когда в качестве меры различия между антигенными сайтами выступают физико-химические факторы различия аминокислотных позиций, например гликозилирование [18, 26]. В качестве материалов для построения моделей использовались ограниченные массивы дан-

ных, включающие только референсные штаммы, что снижает объективность. В данной работе мы хотим представить регрессионную модель перекрёстного иммунитета на основании всего имеющегося массива опубликованных ВОЗ данных РТГА, что позволит улучшить точность модели, повысить её объективность и возможность проверки.

Применение адекватной ЭМ с верифицированной моделью перекрёстного иммунитета позволит усовершенствовать процесс подбора необходимых вакцинных штаммов для более успешной борьбы с вирусом гриппа.

Цель исследования – разработка математической модели перекрёстного иммунитета на основании имеющегося массива опубликованных ВОЗ ежесезонных данных серологического тестирования (РТГА).

Материалы и методы

При формировании массива данных **Influenza DB (database)** была использована информация из опубликованных ежесезонных данных ВОЗ по результатам тестирования РТГА и данные (последовательности + сопроводительная информация) из платформы GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data). В компьютерной программе **Influenza IDE** [27] также предусмотрен дополнительный модуль **Influenza DP (data processing)**, который представляет собой универсальный обработчик баз данных (GISAID, NCBI и др.).

Для изучения закономерностей в модели перекрёстного иммунитета использовался множественный регрессионный анализ (линейная регрессия) с использованием метода наименьших квадратов (МНК) и метода неотрицательного МНК [28] для оценки параметров регрессии, представленный формулой (1):

$$\text{Modified titre} = c_0 + c_1 \times As_1 + c_2 \times As_2 + c_3 \times As_3 + c_4 \times As_4 + c_5 \times As_5 + c_6 \times As_6, (1)$$

где в качестве значения функции представлены модифицированные титры РТГА, в качестве аргументов $As_1, As_2, As_3, As_4, As_5, As_6$ – значения степени гомологичности антигенных сайтов (Antigenic sites – As) A, B, C, D, E, F соответственно, а $c_0, c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6$ – параметры (коэффициенты) модели.

Для аргументов регрессии мы основывались на собственном методе определения антигенных сайтов. Термин «антигенный сайт» был введён Gerhard и Webster в 1978 г., чтобы описать специфические моноклональные антитела. Антитела, которые конкурировали между собой, рассматривались как связывающие один и тот же антигенный сайт. Каждый антигенный сайт может содержать один эпитоп или более – различные наборы аминокислот на антигене, которые контактируют с аминокислотами антител. Конкуренция между антителами, которые связывают тот же самый антигенный сайт, предполагает, что эпитопы в данном сайте физически перекрываются, но могут быть различными и одна молекула антитела экранирует целый антигенный сайт.

Также для учёта различий между штаммами по антигенным сайтам мы ввели понятие **степени гомологичности** и определили её для двух произвольно взятых штаммов как убывающую функцию от дистанции Хэмминга, принимающую значения от 1 до 0. Обоснование и подбор используемых функций подробно описаны в разделе «Результаты». Для обучения регрессионной модели использовался пакет Stats версии 4.0.3 языка программирования R. Для предварительной обработки данных использовался пакет Pandas версии 1.4.2 языка программирования Python. Анализ стабильности прогностической способности модели перекрёстного иммунитета проводился на ретроспективных данных. В качестве меры адекватности модели мы использовали коэффициент детерминации R^2 [29], а мерой точности прогноза – показатель воспроизводимости титров на одно (± 1) и (или) два (± 2) разведения. Мы опирались на многочисленные исследования, в которых при сравнении результатов РТГА для каждого образца внутри одной лаборатории или между несколькими титры считались эквивалентными, если они различались не более чем на одно разведение (т.е. в 2 раза) [30–32].

Формирование массива данных Influenza DB для изучения модели перекрёстного иммунитета

Подготовка экспериментальных данных РТГА

Отчёты ВОЗ по гриппу публикуются ежесезонно начиная с 2005 г. и находятся в открытом доступе [33]. Представленные титры антител в РТГА выявляют антигенные свойства референсных и тестовых штаммов на основе перекрёстной реактивности антител хорьков, полученных к референсным штаммам, тормозящих агглютинацию эритроцитов морских свинок тестируемыми вирусами гриппа. В связи с тем что ВОЗ в 2008–2009 гг. обнаружила заметное влияние нейраминидазы и различных источников эритроцитов (индейка, человек, морская свинка) на результаты РТГА, в дальнейших исследованиях использовались и обрабатывались только таблицы РТГА с 2009 по 2022 г., выполненные на эритроцитах морской свинки с добавлением 20nM Oseltamivir, который используется для исключения влияния нейраминидазы. Несмотря на предложенную международную кодировку вирусов, исследователи со всего мира встречаются с неточными аннотациями при депонировании последовательностей в общедоступные базы данных [34]. Поэтому отдельной задачей в нашей работе была обозначена процедура обработки и подготовки опубликованных таблиц РТГА для дальнейшего использования. Также в результате подготовки каждой последовательности присваивался уникальный идентификатор.

В качестве меры перекрёстного иммунитета в нашей модели выступают модифицированные титры РТГА. Для этого значения опубликованных титров РТГА преобразовываются на логарифм от титра по основанию 2. Далее проводится усреднение данных по алгоритму: подмножества объединяются в соответствии с аналогичными парами идентификаторов штаммов

(референсных и тестовых); в каждом полученном подмножестве вычисляется среднее арифметическое значение модифицированных титров по одинаковым парам идентификаторов штаммов.

Отдельно хочется отметить, что культивирование (пассажи) вирусов, выполненное в куриных эмбрионах, может содержать характерные адаптационные замены, меняющие рецепторную специфичность вирусов и характер гликозилирования [6, 35] и, как следствие, влиять на перекрёстную реактивность в РТГА. Поэтому в результате анализа первичных данных нами было принято решение выделить в первоначальном массиве данных РТГА несколько подмножеств:

- с пассажной историей в куриных эмбрионах (Egg-Egg 4226);

- с пассажной историей в культуре клеток (Cell-Cell 28 621);

- со смешанной пассажной историей (Egg_s-Cell_t 16 463): референсные вирусы (для получения контрольных антисывороток), культивированные в куриных эмбрионах в сочетании с тестовыми вирусами, выращенными в клеточной культуре;

- со смешанной пассажной историей (Cell_s-Egg_t 5032): референсные вирусы (для получения контрольных антисывороток), выращенные в клеточной культуре в сочетании с тестовыми вирусами, культивированными в куриных эмбрионах.

Наше решение опиралось на многочисленные проведённые сравнительные исследования антигенных мутаций вируса гриппа H_3N_2 при культивировании в куриных эмбрионах и клеточных пассажах [36–38]. Учитывая, что количество данных с пассажной историей Cell-Cell и Egg_s-Cell_t в несколько раз превышает размерность подмножеств с пассажными историями Egg-Egg и Cell_s-Egg_t, регрессионный анализ мы проводили на данных первых двух подмножеств.

Подготовка данных из платформы GISAID

Международная платформа GISAID была запущена в 2008 г. и с тех пор предлагает надёжный механизм обмена всеми генетическими и связанными с гриппом данными для исследователей, учёных и работников здравоохранения [39]. Как и в случае данных РТГА, при депонировании последовательностей (при вводе данных вручную и т.д.) часто происходит искажение формата скачиваемых данных и их неверная классификация. Это в свою очередь затрудняет анализ и обработку имеющейся информации для усовершенствования подходов (методов) к подбору вакцинных штаммов. Поэтому для дальнейших исследований с помощью компьютерной программы **Influenza IDE** и встроенного в неё универсального обработчика **Influenza DP** мы провели тщательную очистку и согласование доступных данных. После завершения процесса верификации данных аминокислотные последовательности были выравнены на соответствующую референсную последовательность: H_3N_2 : A/Aichi/2/1968, 566 AA, включая сигнальный пептид, с помощью оригинального быстрого лексического алгоритма (максимальное совпадение аминокислот референс-последовательно-

сти и образца с минимизацией числа позиций делеций и вставок) или методом Смита–Ватермана [40]. Образцы с отличиями более 20% от референса отбрасывались. Краткие статистические характеристики данных представлены в **табл. 1**.

Результаты

Определение антигенных сайтов гемагглютинина вируса гриппа H_3N_2

Объединение аминокислотных последовательностей в антигенные сайты проводилось согласно собственному методу с вычлениением дополнительного антигенного сайта F. Чтобы определить, к какому именно антигенному сайту вируса гриппа относится конкретная позиция, мы в первую очередь ориентировались на экспериментальные исследования [24]. В дальнейшем мы расширили количество позиций в антигенных сайтах, исследовав вариабельность каждой позиции гемагглютинина начиная с 1968 г. В полученном на первом этапе массиве сиквенсов проводился подсчёт встречаемости каждой аминокислоты в каждой позиции. Параллельно проводился анализ на способность той или иной аминокислоты гемагглютинина взаимодействовать с антителами, определяя погружённость или, наоборот, экспонирование аминокислот на поверхности гемагглютинина. При работе использовали программное обеспечение GETAREA [41], на вход которой подавались третичные структуры молекул гемагглютинина из базы данных PDB (Protein Data Bank) [42]. В результате на основании вариабельности позиций, их экспонирования в третичной структуре белка на поверхности, а также с учётом их максимальной близости к существующим антигенным сайтам были определены вариабельные экспонированные позиции, которые были отнесены к существующим антигенным сайтам. Более того, помимо широко известных антигенных сайтов A, B, C, D и E, нами был вычленен ещё один антигенный сайт, названный соответственно F. Этот антигенный сайт состоит из множества схожих эпитопов в стеблевой части молекулы гемагглютинина. В базе данных третичных структур содержится более 20 комплексов гемагглютининов с моноклональными антителами к данному сайту. Детально об этом сайте изложено в исследовании, проведённом Д.Н. Щербининым и соавт. [43].

Таким образом, для гемагглютинина субтипа H_3 было определено 6 антигенных сайтов. Ниже представлен список аминокислотных позиций, составляющих эти антигенные сайты, всего 109 позиций (**табл. 2**). Нумерация приведена по зрелому гемагглютинуину H_3 [44]. Следует отметить, что антигенный сайт F, в отличие от сайтов A–E, расположен в основном в HA_2 -субъединице гемагглютинина.

Полученная информация была загружена в базу данных **Influenza DB** и послужила лекалом для объединения в антигенные сайты имеющегося массива с выровненными аминокислотными последовательностями. Далее массив с антигенными последовательностями был расширен путём добавления в него информации

Таблица 1. Статистическая характеристика данных

Table 1. Data statistical characteristic

Показатель / Parameter	Значение / Value	
	Cell-Cell	Egg_s-Cell_t
Общее количество наблюдений Total number of observations	28 621	16 463
Общее количество пар штаммов Total number of pairs of strains	21 394	12 444
Количество наблюдений в отчетном периоде Number of observations in the reporting period	2009	21
	2010	46
	2011	132
	2012	2142
	2013	1738
	2014	2891
	2015	1907
	2016	1209
	2017	1948
	2018	659
	2019	2236
	2020	2496
2021	902	
2022	10294	
Значение титра / Titer value, Me [Q ₁ ; Q ₃]	160 [40; 320]	160 [40; 320]
Распределение по значениям титра Distribution by titer values	20	3404 (11,9%)
	40	4154 (14,5%)
	80	4232 (14,8%)
	160	6328 (22,1%)
	320	6170 (21,6%)
	640	3491 (12,2%)
	1280	772 (2,7%)
	2560	60 (0,2%)
	5120	10 (< 0,1%)
Дистанция Хэмминга по антигенным сайтам Hamming distance across antigenic sites	A	2 [0; 4]
	B	2 [1; 4]
	C	1 [0; 2]
	D	1 [0; 1]
	E	1 [0; 2]
	F	1 [0; 2]

о содержании количества аминокислотных замен между любыми двумя штаммами в каждом из 6 антигенных сайтов. В результате вышеприведённых действий мы получили по каждому из 6 антигенных сайтов для произвольно взятой или отдельной (каждой) пары штаммов как значение титров РТГА, так и количество аминокислотных замен (расстояние Хэмминга). При этом замены в антигенных сайтах вне зависимости от типа и конкретной позиции приняты равнозначными. В нашей модели последовательности, не имеющие

замены в антигенных сайтах, но имеющие изменения в других позициях, считались антигенно одинаковыми.

Разработка математической модели перекрестного иммунитета вируса гриппа

Анализ и подбор функции для оценки степени гомологичности

Для проведения регрессионного анализа были выбраны подмножества с наибольшим количеством на-

Таблица 2. Аминокислотные позиции в антигенных сайтах

Table 2. Amino acid positions at antigenic sites

Сайт Site	Номера аминокислотных позиций Amino acid position numbers
A	121, 122, 124, 126, 131, 133, 135, 137, 138, 140, 142, 143, 144, 145, 146
B	128, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 163, 186, 188, 189, 190, 192, 193, 194, 196, 197, 198, 199
C	45, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 271, 273, 275, 276, 278, 280, 304, 311, 312
D	171, 172, 173, 201, 202, 207, 208, 212, 213, 214, 217, 219, 220, 221, 222, 223, 225, 226, 227, 229, 230, 242, 244, 246, 248
E	57, 58, 62, 63, 75, 78, 82, 83, 88, 92, 94, 96, 260, 261, 262
F	25, 31, 33, 326, 347, 361, 375, 384, 386, 450, 452, 453, 476, 479, 484, 487, 489, 501, 505

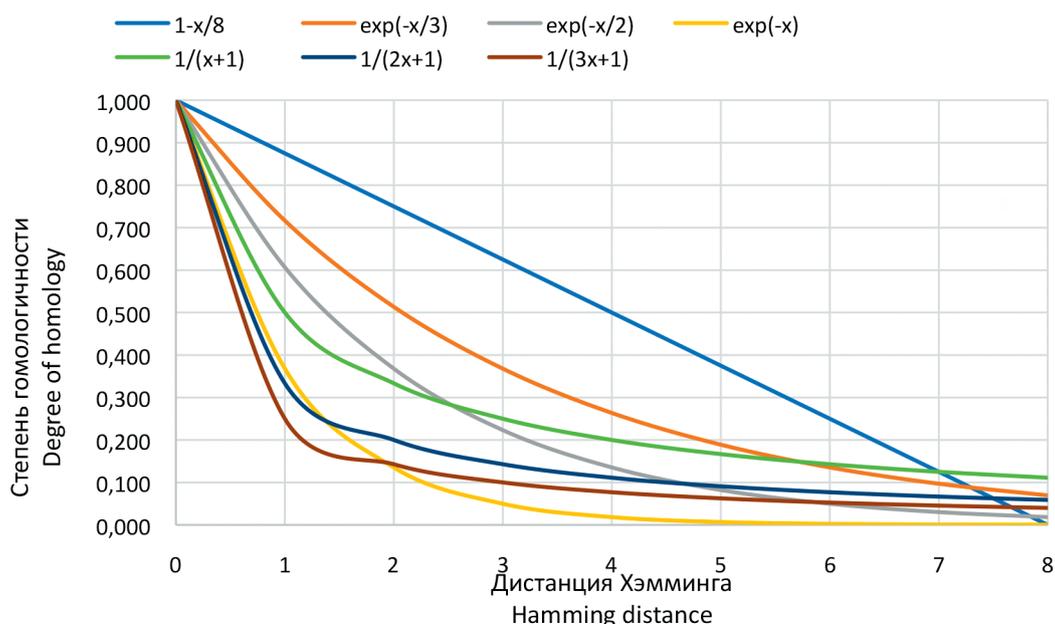


Рисунок. Функции для оценки степени гомологичности.

Figure. Functions for evaluating the degree of homology.

блюдений: Cell-Cell **28 621** и Egg_s-Cell_t **16 463**. Также вместо простой дистанции Хэмминга мы решили использовать функцию от неё, тем самым вводя понятие **степени гомологичности** между двумя произвольными антигенными последовательностями, обозначающее, насколько близки друг к другу антигенные сайты двух различных штаммов с точки зрения антигенных свойств, и принимающее значение этой функции. Необходимо было выбрать функцию, которая могла бы и удовлетворить предъявленным требованиям, и не противоречила бы биологическим процессам: в ситуации полной (абсолютной) гомологичности двух штаммов (при отсутствии замен в антигенных сайтах) функция принимает значение 1, а в случае отсутствия гомологичности (изменения отмечались в каждой аминокислотной позиции, входящей в антигенный сайт) значение функции должно быть равно 0 (либо близко к 0). Очевидно, что функция должна убывать при увеличении дистанции Хэмминга.

Кроме того, как показано в работе [45], функция, зависящая от дистанции Хэмминга и описывающая пере-

крестную реактивность антигенов, является вогнутой. Исходя из этого, мы ввели дополнительное ограничение для рассматриваемой нами функции, а именно то, что она является вогнутой или по крайней мере не выпуклой, т.е. каждая следующая замена вносит не больший вклад в уменьшение гомологичности, чем предыдущая.

Опираясь на результаты исследований коллег [16, 45], которые показали, что при количестве аминокислотных замен в антигенном сайте, равном или больше 7, перекрестная реактивность распознающих антител между штаммами практически не наблюдается, мы ввели дополнительное требование к искомой функции: для 7 замен значение функции должно принимать столь малое значение, которым можно пренебречь. Мы использовали также функцию: $1 - x / 8$, в качестве ограничивающей сверху рассматриваемые функции (для значений $x = \{1; 7\}$), и в качестве порога значимости при 7 заменах мы приняли значение: $1 - 7 / 8 = 0,125$.

С учётом указанных требований были рассмотрены следующие функции (**рисунок**):

Таблица 3. Значения R^2 по пассажным историям для рассматриваемых функцийTable 3. R^2 values by passage histories for the considered functions

Функция Function	Cell-Cell (21 580 пар штаммов 2009–2022) (21 580 pairs of strains 2009–2022)						Egg_s-Cell_t (12 444 пары штаммов 2009–2022) (12 444 pairs of strains 2009–2022)					
	1_20%	2_20%	3_20%	4_20%	5_20%	ср_20%	1_20%	2_20%	3_20%	4_20%	5_20%	ср_20%
$1 - x / 8$	0,457	0,483	0,471	0,486	0,490	0,477	0,273	0,252	0,277	0,282	0,255	0,268
$\exp(-x / 3)$	0,494	0,519	0,504	0,520	0,530	0,513	0,326	0,293	0,317	0,336	0,295	0,313
$\exp(-x / 2)$	0,476	0,498	0,478	0,494	0,509	0,491	0,331	0,294	0,313	0,328	0,293	0,312
$\exp(-x)$	0,366	0,380	0,346	0,363	0,393	0,370	0,253	0,205	0,200	0,242	0,207	0,222
$1 / (x + 1)$	0,441	0,461	0,438	0,453	0,471	0,453	0,312	0,272	0,283	0,315	0,275	0,292
$1 / (2x + 1)$	0,376	0,391	0,358	0,375	0,399	0,380	0,268	0,220	0,216	0,258	0,224	0,237
$1 / (3x + 1)$	0,328	0,340	0,301	0,320	0,348	0,327	0,213	0,162	0,149	0,196	0,168	0,178

- $1 - x / 8$;
- $\exp(-a \times x)$, где $a = 1/3; 1/2; 1$;
- $1 / (a \times x + 1)$, где $a = 1; 2; 3$.

Значения титров РТГА, обозначенные в оригинальных таблицах ВОЗ как $< (< 40)$ в нашей модели были заменены на значение 20. В качестве коэффициента c_0 мы принимаем фиксированное значение наименьшего значения модифицированного титра, т.е. $\log_2(20) \approx 4,322$.

В левой части табл. 3 представлены результаты для подмножества с пассажной историей на культуре клеток (Cell-Cell); в правой части таблицы – со смешанной пассажной историей (Egg_s-Cell_t).

Рассмотрение выбранных функций производилось путём кросс-валидации: весь объём данных 5 раз случайным образом делился в отношении 80% на 20%, где первая часть бралась за обучающую выборку, а вторая – за тестовую. Результаты оценивались по наибольшему среднему значению скорректированного R^2 , полученному для тестовых выборок. Мы также провели ранжирование результатов для всех функций. При сравнении результатов между подмножествами Cell-Cell и Egg_s-Cell_t наблюдалось практически полное соответствие рангов (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $\rho = 0,96$) функций применительно к подмножествам. Между тем при сравнении значений коэффициентов детерминации для двух подмножеств соответствующие наивысшие величины отмечались для подмножества Cell-Cell (в 1,6 раза), что подтверждает целесообразность разделения имеющихся данных по пассажирам, а также подтверждает, что пассажи на куриных эмбрионах содержат характерные адаптационные замены, меняющие рецепторную специфичность вирусов и характер гликозилирования [6, 35] и, как следствие, влияют на перекрёстную реактивность в РТГА. Поэтому дальнейшие расчёты мы проводили на подмножестве Cell-Cell. В качестве функции, описывающей степень гомологичности, была выбрана $\exp(-x / 3)$, показавшая наилучший результат для подмножества Cell-Cell и наилучший результат для подмножества Egg_s-Cell_t.

Результаты регрессионного анализа с подмножеством Cell-Cell (21 580 наблюдений после усредне-

ния по парам штаммов) с применением выбранной функции с требованием неотрицательности коэффициентов представлены в табл. 4. В первой колонке таблицы, помимо уже упомянутого выше скорректированного R^2 , представлены обозначения соответствующих антигенных сайтов, далее в колонке Estimate приведены значения искомым коэффициентов С1–6 регрессии, в третьей колонке, Standard error, перечислены/зафиксированы стандартные отклонения этих коэффициентов. В строке Standard deviation представлено стандартное отклонение зависимой переменной (модифицированных титров). О вкладе каждого антигенного сайта можно судить по значению его коэффициента. Чем больше значение коэффициента при определённом антигенном сайте, тем больше его вклад в перекрёстный иммунитет. После определения коэффициентов регрессионной модели проводится проверка статистической гипотезы о равенстве нулю истинных значений коэффициентов по критерию Стьюдента с уровнем значимости 0,05. Результаты проверки представлены в пятой колонке, $\Pr(> |t|)$ p-value, вероятность того, что t-статистика больше модуля t-value (отношение значений коэффициентов к их стандартному отклонению). Если это значение меньше уровня доверия 0,05, гипотеза отвергается, а параметр признаётся значимым. В нашем случае все антигенные сайты, кроме С и F, признаны значимыми. Коэффициенты при антигенном сайте С и F приняли значение 0, а это равносильно незначимости.

Анализ стабильности прогностической способности модели перекрёстного иммунитета на ретроспективных данных

Для более детального понимания влияния фактора времени и количества наблюдений, участвующих в настройке модели на точность прогноза, следующим действием мы разделили подмножество Cell-Cell_2009–2022 на различные временные (1-, 2-, 3-, 4-, 5-летние) настраиваемые периоды с прогнозом на каждый последующий за ними год. Полные результаты регрессионного анализа представлены в приложении.

На основе представленных в **табл. 5.1** и **5.2** результатов можно констатировать, что скорректированный R^2 , принимающий значение не выше 0,3 в настраиваемых периодах, начинает существенно увеличиваться с 2019 г., меняясь от 0,32 до 0,64 (чем больше лет в настраиваемом интервале, тем меньше значение). Из этой тенденции выбивается 2021 г., что связано с низкой заболеваемостью и малым количеством данных вследствие пандемии COVID-19. Динамика величины скорректированного R^2 находит прямое отражение и в прогнозных периодах, принимая значения не выше 0,4 (в том числе отрицательные) и далее увеличиваясь с 2020 г. (от 0,47 до 0,6).

Также мы оценивали прогностическую способность результатов, представленных в табл. 5.1 и 5.2, по воспроизводимости титров на одно (± 1) и два (± 2) разведения. При сопоставлении расчётных титров с опубликованными в прогнозных периодах, за ис-

ключением 2016 и 2021 гг. (малое количество наблюдений – 841 и 478 соответственно) и 2015 г. (когда рекомендованные вакцинные штаммы не смогли обеспечить эффективную защиту), была продемонстрирована воспроизводимость титров на одно (± 1) разведение более чем в 50% случаев, а периодами доходила и до 67% случаев. Что касается воспроизводимости титров на два (± 2) разведения, то на всех временных периодах стабильно наблюдается примерно 90% случаев и выше.

Результаты регрессионного анализа по настраиваемым (1–5-летним временным) интервалам продемонстрировали значение вклада каждого антигенного сайта в иммунный ответ. Коэффициенты при антигенных сайтах А и В имеют высокие значения во всех прогнозных периодах. Особенно наглядно это можно увидеть на 3–5-летних настраиваемых периодах. Антигенный сайт С фактически принимает нулевые значения лишь за редкими исключениями. Практически на всех временных интервалах устойчивый вклад, соразмерный со вкладом А и В, также демонстрирует антигенный сайт D, но лишь вплоть до 2018 г. с последующим резким обнулением. Умеренную по сравнению с антигенными сайтами А и В, но при этом устойчивую значимость демонстрирует антигенный сайт Е с ощутимым увеличением к 2018–2021 гг. Диаметрально меняется вклад антигенного сайта F в зависимости от временных интервалов – от устойчиво значимого до обнуления. Следует отметить, что в целом результаты регрессии не выявляют существенной зависимости от количества лет, входящих в настраиваемый период. В то же время результаты прогноза существенно хуже в те сезоны, когда в прогнозном периоде мало данных. Кроме того, проведённый нами корреляционный анализ показал, что отсутствует корреляция между значениями коэффициентов при антигенных сайтах и количеством замен в позициях. Учитывая тот факт, что количество наблюдений только за 2022 г. составляет более 1/3 от общего объёма наблюдений за 2009–2022 гг., было принято решение о проведении отдельных расчётов по наблюдениям 2022 г. В **табл. 6** представлены результаты рас-

Таблица 4. Результаты регрессии для функции $\exp(-x / 3)$

Table 4. Regression results for the $\exp(-x / 3)$ function

Антигенные сайты Antigenic sites	Cell-Cell_2009–2022 (21 580 пар штаммов) (21 580 pairs of strains)		
	значение estimate	стандартная ошибка standard error	P-r(> t) p-value
A	1,233	0,034	<0,001
B	2,506	0,034	<0,001
C	0,000		
D	0,083	0,027	0,002
E	0,622	0,039	<0,001
F	0,000		
CR ²	0,514		
Стандартное отклонение Standard deviation	1,161		

Таблица 5.1. R^2

Table 5.1. R^2

Год Year	1 год year	2 года year	3 года year	4 года year	5 лет year
2014	0,135	0,099	0,099	0,101	0,101
2015	-0,223	-0,204	-0,354	-0,355	-0,348
2016	0,043	-0,225	-0,278	-0,540	-0,546
2017	0,005	0,198	0,158	0,083	0,071
2018	0,092	0,001	0,100	0,071	0,052
2019	0,124	0,244	0,405	0,318	0,277
2020	0,596	0,592	0,577	0,561	0,543
2021	0,044	0,095	0,125	0,135	0,128
2022	0,600	0,472	0,497	0,540	0,561

Таблица 5.2. ± 1 разведение

Table 5.2. ± 1 dilution

Год Year	1 год year	2 года year	3 года year	4 года year	5 лет year
2014	67,84	67,94	67,94	67,24	67,24
2015	46,46	46,69	45,67	45,59	45,75
2016	40,43	38,41	36,50	34,48	34,36
2017	56,40	59,40	63,40	55,83	59,54
2018	65,27	59,62	62,97	60,88	61,09
2019	45,44	50,94	59,41	57,20	57,57
2020	57,70	57,03	58,33	57,32	56,79
2021	46,03	48,12	50,63	53,35	51,88
2022	55,27	50,18	54,16	55,66	60,49

Таблица 6. Результаты регрессии по данным 2022 г.

Table 6. Regression results for 2022 data

Настраиваемые периоды Customizable period	2022 г.	Данные февральского отчета 2022 г. February 2022 report data
Количество наблюдений Number of observations	8183	1994
Скорректированный R ² Adjusted R ²	0,728	0,625
Стандартное отклонение Standard deviation	0,874	0,966
Прогнозные периоды Forecast periods	Данные сентябрьского отчета 2022 г. September 2022 report data	
Количество наблюдений Number of observations	6675	
Скорректированный R ² Adjusted R ²	0,734	
Стандартное отклонение Standard deviation	0,933	
±1 разведение / dilution	69,33%	
±2 разведения / dilution	98,73%	

чётов прогностической способности разработанной модели перекрёстного иммунитета на опубликованных данных по РТГА в 2022 г. (весеннего и осеннего сезонов).

Обсуждение

Из обзора научной литературы следует, что в большинстве работ изучение перекрёстного иммунитета проводилось на ограниченном массиве данных, включающем только референсные штаммы, что снижает объективность исследований и затрудняет возможность проверки прогноза. Проведение расчётов на основании всего имеющегося массива опубликованных ВОЗ данных РТГА позволило обойти эти ограничения. С помощью встроенного дополнительного модуля **Influenza DP (data processing)**, который представляет собой универсальный обработчик баз данных (GISAID, NCBI и др.), нами был разработан алгоритм, позволяющий в режиме реального времени формировать базы данных согласно поставленным задачам для последующего анализа и расчётов. Для изучения закономерностей в модели перекрёстного иммунитета рассматривались подмножества с наибольшим количеством наблюдений – Cell-Cell и Egg_s-Cell_t. Мы также ввели степени гомологичности между двумя произвольными штаммами, которая принимает значение функции, зависящей от дистанции Хэмминга.

При рассмотрении функций для выбора варианта, описывающего степень гомологичности, была отмечена существенная зависимость значений коэффициента детерминации от вида функции. При том что всем функциям предъявлялись одинаковые необходимые условия, соответствующие биологическим

процессам, полученные в результате значения скорректированного R² колебались довольно существенно и принимали значения от 0,327 до 0,513 для подмножества Cell-Cell и 0,178 до 0,313 для подмножества Egg_s-Cell_t соответственно. Столь существенное различие между верхними и нижними границами показателя указывает на то, что использование простой дистанции Хэмминга [16, 18] в качестве меры гомологичности может накладывать существенные ограничения на используемые модели. Также было проведено ранжирование результатов для всех функций. При сравнении результатов с подмножествами Cell-Cell и Egg_s-Cell_t наблюдалось практически полное соответствие рангов функций по значению скорректированного R² применительно к подмножествам. Полученные результаты могут свидетельствовать об определённом соответствии биологическим механизмам нашего подхода к выбору функции.

Сравнение значений скорректированного R² на подмножествах Cell-Cell и Egg_s-Cell_t (0,523 и 0,313 соответственно) демонстрирует обоснованность нашего решения о разделении первоначального массива данных по пассажным историям. Разница скорректированного R² также позволяет предположить, что вирусы, культивированные в куриных эмбрионах, вносят большую погрешность в результаты РТГА.

В своих расчётах мы опирались на результаты собственных исследований объединения аминокислотных позиций в антигенные сайты, описали дополнительный сайт F, тем самым расширив количество антигенных сайтов до 6. Результаты регрессионного анализа на всех подмножествах Cell-Cell продемонстрировали, что наибольший вклад в иммунный ответ внесли антигенные сайты A, B. Их умеренно догоняет по устойчивым значениям антигенный сайт E с ощутимым ростом в 2018–2021 гг. Антигенный сайт C практически не вносит вклад в иммунный ответ во всех рассматриваемых интервалах. В значительной степени уверенно демонстрирующий значимость в начале прогнозных периодов антигенный сайт D начинает сдавать позиции в 2018–2021 гг. Довольно чувствительным к временным интервалам оказался антигенный сайт F со своим сдержанно неустойчивым вкладом в перекрёстный иммунитет.

Кроме того, был произведён анализ стабильности прогностической способности нашей модели для разных временных интервалов (с 2009 по 2022 г.). После разделения подмножества Cell-Cell на 1–5-летние временные интервалы отмечалось, что значение скорректированного R² в настраиваемых периодах возрастает начиная с 2019 г., достигая порядка 0,5 и выше, за исключением 2021 г., в котором количество наблюдений очень мало (478) вследствие пандемии COVID-19. Аналогичная картина наблюдается и в прогнозных периодах. Выраженное высокое значение скорректированного R² для более поздних данных может являться следствием увеличения проводимых исследований (РТГА) на культуре клеток и улучшения их качества.

При сравнении расчётных значений с опубликованными титрами результаты воспроизводимости на

одно (± 1) разведение довольно стабильны по годам прогноза и имеют значения больше 50% (со средним значением около 60%), за исключением 2015, 2016 и 2021 гг. При этом основную причину более низких результатов мы видим в малом количестве данных прогнозных периодов.

Как было показано в результатах, отмечаемое беспрецедентно многочисленное количество наблюдений за 2022 г. предоставило нам возможность провести настройку модели по данным на начало 2022 г. (скорректированный $R^2 = 0,728$) и проверить результаты прогноза на осеннем сезоне. Результаты прогноза (скорректированный $R^2 = 0,734$) продемонстрировали воспроизводимость титров на одно (± 1) разведение в 69,33% случаев и оказались существенно лучше всех ранее рассматриваемых периодов, что можно уже считать достаточным для практического применения. Объяснением такого результата может быть как качество данных, так и прогнозный период, ограниченный сезоном. В работе Т. Bedford и соавт. [15], которые проводили регрессионный анализ на всём массиве данных РТГА для подтипа вируса H_3N_2 , был получен $R^2 = 0,372$, что ниже по сравнению с нашими показателями скорректированного $R^2 = 0,523$ на всём подмножестве Cell-Cell. На результатах коллег могло сказаться отсутствие разделения данных по пассажным историям и на временные интервалы. Также на результаты, возможно, повлияло использование простой дистанции Хэмминга. Важно признать, что, несмотря на все усилия по стандартизации проведения РТГА [32] и независимо от выбранного подхода для исследований зависимости титров РТГА от аминокислотных замен, изначально заложенная высокая погрешность методики РТГА (17%) [46] остаётся фактором, существенно влияющим на результаты.

Заключение

Разработанная нами компьютерная программа, основанная на эпидемиологической модели и с хорошо настроенной моделью перекрёстного иммунитета, предоставляет возможность предсказания наиболее распространённых штаммов с учётом влияния иммунного ландшафта и подбора вакцинного штамма на предстоящий сезон.

Возможность проводить расчёты на основании всего имеющегося массива опубликованных ВОЗ еже-сезонных данных по РТГА, наблюдаемое улучшение результатов за последние годы (начиная с 2019 г.), а также большой объём наблюдений и полученные результаты прогноза за 2022 г. (скорректированный $R^2 = 0,734$; воспроизводимость титров на одно (± 1) разведение в 69,33% случаев) позволяют утверждать, что предложенный метод может служить хорошим инструментом для будущих прогнозов с дальнейшим изучением для подтверждения его устойчивости.

В свою очередь, преимущество применения компьютерной программы **Influenza IDE** с постоянно обновляющейся базой данных различных видов и суб-типов вируса гриппа в перспективе позволит воспроизвести полученные результаты на других вариантах

и подтипах вируса гриппа и тем самым протестировать разработанную модель и расширить витрину рекомендуемых вакцинных штаммов. Полученный опыт и навыки при определении антигенных сайтов в будущем позволят объединить аминокислотные позиции в антигенные сайты по нескольким сценариям и провести расчёты уже с их учётом. Дальнейшее развитие модели перекрёстного иммунитета может быть достигнуто за счёт одностороннего нормирования титров всего массива тестовых штаммов по референсным штаммам, что позволит уменьшить ошибку, связанную с индивидуальными особенностями используемых экспериментальных животных. Также улучшение модели может быть достигнуто за счёт учёта таких процессов, как гликозилирование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Russell C.A., Jones T.C., Barr I.G., Cox N.J., Garten R.J., Gregory V., et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl. 4): 31–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.078>
2. Belongia E.A., Simpson M.D., King J.P., Sundaram M.E., Kelley N.S., Osterholm M.T., et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect. Dis*. 2016; 16(8): 942–51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8)
3. Jackson M.L., Chung J.R., Jackson L.A., Phillips C.H., Benoit J., Monto A.S., et al. Influenza vaccine effectiveness in the United States during the 2015–2016 season. *N. Engl. J. Med*. 2017; 377(6): 534–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1700153>
4. Rolfes M.A., Flannery B., Chung J.R., O'Halloran A., Garg S., Belongia E.A., et al. Effects of influenza vaccination in the United States during the 2017–2018 influenza season. *Clin. Infect. Dis*. 2019; 69(11): 1845–53. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz075>
5. Doyle J.D., Chung J.R., Kim S.S., Gaglani M., Raiyani C., Zimmerman R.K., et al. Interim estimates of 2018–2019 seasonal influenza vaccine effectiveness – United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep*. 2019; 68(6): 135–9. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6806a2>
6. Zost S.J., Parkhouse K., Gumina M.E., Kim K., Diaz P.S., Wilson P.C., et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017; 114(47): 12578–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712377114>
7. Gouma S., Weirick M., Hensley S.E. Antigenic assessment of the H3N2 component of the 2019–2020 northern hemisphere influenza vaccine. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 2445. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16183-y>
8. Cobey S., Gouma S., Parkhouse K., Chambers B.S., Ertl H.C., Schmader K.E., et al. Poor immunogenicity, not vaccine strain egg adaptation, may explain the low H3N2 influenza vaccine effectiveness in 2012–2013. *Clin. Infect. Dis*. 2018; 67(3): 327–33. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy097>
9. Klingen T.R., Reimering S., Guzmán C.A., McHardy A.C. In silico vaccine strain prediction for human influenza viruses. *Trends Microbiol*. 2018; 26(2): 119–31. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.001>
10. Morris D.H., Gostic K.M., Pompei S., Bedford T., Luksza M., Nether R.A., et al. Predictive modeling of influenza shows the promise of applied evolutionary biology. *Trends Microbiol*. 2018; 26(2): 102–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.004>
11. Тимофеева Т.А., Асатрян М.Н., Альштейн А.Д., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л., Каверин Н.В. Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа А. *Acta Naturae*. 2017; 9(3): 104–11. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-3-48-54> <https://elibrary.ru/zqitor>
12. Боев Б.В. Модель развития эпидемии гриппа А(H1N1) в России в сезон 2009–2010 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; (1): 52–8. <https://elibrary.ru/laedxn>
13. Huddleston J., Barnes J.R., Rowe T., Kondor R., Wentworth D.E., Whittaker L., et al. Integrating genotypes and phenotypes improves

- long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *eLife*. 2020; 9: e60067. <https://doi.org/10.7554/eLife.60067>
14. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). Available at: <https://www.cdc.gov/flu/>
 15. Bedford T., Suchard M.A., Lemey P., Dudas G., Gregory V., Hay A.J., et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife*. 2014; 3: e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
 16. Anderson C.S., McCall P.R., Stern H.A., Yang H., Topham D.J. Antigenic cartography of H1N1 influenza viruses using sequence-based antigenic distance calculation. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19(1): 51. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2042-4>
 17. Lee M.S., Chen J.S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(8): 1385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1008.040107>
 18. Lees W.D., Moss D.S., Shepherd A.J. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2. *Bioinformatics*. 2010; 26(11): 1403–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq160>
 19. Burnet F.M., Lush D. The action of certain surface active agents on viruses. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1940; 18: 141–50.
 20. Archetti I., Horsfall F.L. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.* 1950; 92(5): 441–62. <https://doi.org/10.1084/jem.92.5.441>
 21. Lapedes A., Farber R. The geometry of shape space: application to influenza. *J. Theor. Biol.* 2001; 212(1): 57–69. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2347>
 22. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*. 2004; 305(5682): 371–6. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>
 23. Wiley D.C., Skehel J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 365–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002053>
 24. Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*. 1981; 289(5796): 373–8. <https://doi.org/10.1038/289373a0>
 25. Wilson I.A., Cox N.J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 737–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.003513>
 26. Liao Y.C., Lee M.S., Ko C.Y., Hsiung C.A. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus. *Bioinformatics*. 2008; 24(4): 505–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm638>
 27. Асатрян М.Н., Агасарян В.Г., Щербинин Д.Н., Тимофеев Б.И., Ершов И.Ф., Шмыр И.С. и др. Influenza IDE. Свидетельство о регистрации № 2020617965; 2020.
 28. Lawson C.L., Hanson R.J. *Solving Least Squares Problems*. New Jersey: Englewood Cliffs; 1974.
 29. Халафян А.А. *Математическая статистика с элементами теории вероятности*. М.: Бином; 2010.
 30. Stephenson I., Gaines Das R., Wood J.M., Katz J.M. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine*. 2007; 25(20): 4056–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.039>
 31. Wood J.M., Major D., Heath A., Newman R.W., Höscher K., Stephenson I., et al. Reproducibility of serology assays for pandemic influenza H1N1: collaborative study to evaluate a candidate WHO International Standard. *Vaccine*. 2012; 30(2): 210–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.019>
 32. Zacour M., Ward B.J., Brewer A., Tang P., Boivin G., Li Y. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(3): 236–42. <https://doi.org/10.1128/CVI.00613-15>
 33. The Francis Crick Institute. Worldwide Influenza Centre lab. Annual and interim reports. Available at: <https://www.crick.ac.uk/research/platforms-and-facilities/worldwide-influenza-centre/annual-and-interim-reports>
 34. DuPai C.D., McWhite C.D., Smith C.B., Garten R., Maurer-Stroh S., Wilke C.O. Influenza passing annotations: what they tell us and why we should listen. *Virus Evol.* 2019; 5(1): vez016. <https://doi.org/10.1093/ve/vez016>
 35. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., Oyen D., Nycholat C.M., McBride R., et al. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine. *PLoS Pathog.* 2017; 13(10): e1006682. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006682>
 36. Park Y.W., Kim Y.H., Jung H.U., Jeong O.S., Hong E.J., Kim H. Comparison of antigenic mutation during egg and cell passage cultivation of H3N2 influenza virus. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2020; 9(1): 56–63. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.56>
 37. Popova L., Smith K., West A.H., Wilson P.C., James J.A., Thompson L.F. Immunodominance of antigenic site B over site A of hemagglutinin of recent H3N2 influenza viruses. *PLoS One*. 2012; 7(7): e41895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041895>
 38. Klein N.P., Fireman B., Goddard K., Zerbo O., Asher J., Zhou J. Vaccine effectiveness of cell-culture relative to egg-based inactivated influenza vaccine during the 2017–2018 influenza season. *PLoS One*. 2020; 15(2): e0229279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229279>
 39. GISAID. Eurosurveillance; 2017. Available at: <https://gisaid.org/resources/commentary-on-gisaid/>
 40. Smith T.F., Waterman M.S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 1981; 147(1): 195–7. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)
 41. GetArea. Available at: <http://curie.utmb.edu/getarea.html>
 42. RCSB PDB: Homepage. Available at: <https://www.rcsb.org/>
 43. Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютинаина вирусов гриппа. *Acta Naturae*. 2016; 8(1): 14–22. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20> <https://elibrary.ru/vsjiyh>
 44. A standardised numbering for all subtypes of Influenza A hemagglutinin (HA) sequences based on the mature HA sequence. Available at: <https://antigenic-cartography.org/surveillance/evergreen/HANumbering/>
 45. Smith D.J., Forrest S., Hightower R.R., Perelson A.S. Deriving shape space parameters from immunological data. *J. Theor. Biol.* 1997; 189(2): 141–50. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0495>
 46. Кильбурн Э.Д., ред. *Вирусы гриппа и грипп*. Пер. с англ. М.: Медицина; 1978.

REFERENCES

1. Russell C.A., Jones T.C., Barr I.G., Cox N.J., Garten R.J., Gregory V., et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl. 4): 31–4. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.078>
2. Belongia E.A., Simpson M.D., King J.P., Sundaram M.E., Kelley N.S., Osterholm M.T., et al. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(8): 942–51. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8)
3. Jackson M.L., Chung J.R., Jackson L.A., Phillips C.H., Benoit J., Monto A.S., et al. Influenza vaccine effectiveness in the United States during the 2015–2016 season. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(6): 534–43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1700153>
4. Rolfes M.A., Flannery B., Chung J.R., O'Halloran A., Garg S., Belongia E.A., et al. Effects of influenza vaccination in the United States during the 2017–2018 influenza season. *Clin. Infect. Dis.* 2019; 69(11): 1845–53. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz075>
5. Doyle J.D., Chung J.R., Kim S.S., Gaglani M., Raiyani C., Zimmerman R.K., et al. Interim estimates of 2018–2019 seasonal influenza vaccine effectiveness – United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2019; 68(6): 135–9. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6806a2>
6. Zost S.J., Parkhouse K., Gumina M.E., Kim K., Diaz P.S., Wilson P.C., et al. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017; 114(47): 12578–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712377114>
7. Gouma S., Weirick M., Hensley S.E. Antigenic assessment of the H3N2 component of the 2019–2020 northern hemisphere influenza vaccine. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 2445. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16183-y>
8. Cobey S., Gouma S., Parkhouse K., Chambers B.S., Ertl H.C., Schmader K.E., et al. Poor immunogenicity, not vaccine strain egg adaptation, may explain the low H3N2 influenza vaccine

- effectiveness in 2012–2013. *Clin. Infect. Dis.* 2018; 67(3): 327–33. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy097>
9. Kligen T.R., Reimering S., Guzmán C.A., McHardy A.C. In silico vaccine strain prediction for human influenza viruses. *Trends Microbiol.* 2018; 26(2): 119–31. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.001>
 10. Morris D.H., Gostic K.M., Pompei S., Bedford T., Łuksza M., Neher R.A., et al. Predictive modeling of influenza shows the promise of applied evolutionary biology. *Trends Microbiol.* 2018; 26(2): 102–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.004>
 11. Timofeeva T.A., Asatryan M.N., Al'tshiteyn A.D., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L., Kaverin N.V. Predicting the evolutionary variability of the influenza A virus. *Acta Naturae.* 2017; 9(3): 48–54. <https://doi.org/10.32607/20758251-2017-9-3-48-54> <https://elibrary.ru/zqitjr>
 12. Boev B.V. Modeling of the epidemic of influenza A(H1N1) in Russia season 2009–2010. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika.* 2010; (1): 52–8. <https://elibrary.ru/laedxn> (in Russian)
 13. Huddleston J., Barnes J.R., Rowe T., Kondor R., Wentworth D.E., Whittaker L., et al. Integrating genotypes and phenotypes improves long-term forecasts of seasonal influenza A/H3N2 evolution. *eLife.* 2020; 9: e60067. <https://doi.org/10.7554/eLife.60067>
 14. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). Available at: <https://www.cdc.gov/flu/>
 15. Bedford T., Suchard M.A., Lemey P., Dudas G., Gregory V., Hay A.J., et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife.* 2014; 3: e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
 16. Anderson C.S., McCall P.R., Stern H.A., Yang H., Topham D.J. Antigenic cartography of H1N1 influenza viruses using sequence-based antigenic distance calculation. *BMC Bioinformatics.* 2018; 19(1): 51. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2042-4>
 17. Lee M.S., Chen J.S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(8): 1385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1008.040107>
 18. Lees W.D., Moss D.S., Shepherd A.J. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2. *Bioinformatics.* 2010; 26(11): 1403–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq160>
 19. Burnet F.M., Lush D. The action of certain surface active agents on viruses. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1940; 18: 141–50.
 20. Archetti I., Horsfall F.L. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J. Exp. Med.* 1950; 92(5): 441–62. <https://doi.org/10.1084/jem.92.5.441>
 21. Lapedes A., Farber R. The geometry of shape space: application to influenza. *J. Theor. Biol.* 2001; 212(1): 57–69. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2347>
 22. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., et al. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science.* 2004; 305(5682): 371–6. <https://doi.org/10.1126/science.1097211>
 23. Wiley D.C., Skehel J.J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 365–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.002053>
 24. Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature.* 1981; 289(5796): 373–8. <https://doi.org/10.1038/289373a0>
 25. Wilson I.A., Cox N.J. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 737–71. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.08.040190.003513>
 26. Liao Y.C., Lee M.S., Ko C.Y., Hsiung C.A. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus. *Bioinformatics.* 2008; 24(4): 505–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm638>
 27. Asatryan M.N., Agasaryan V.G., Shcherbinin D.N., Timofeev B.I., Ershov I.F., Shmyr I.S., et al. Influenza IDE. Registration certificate № 2020617965; 2020. (in Russian)
 28. Lawson C.L., Hanson R.J. *Solving Least Squares Problems.* New Jersey: Englewood Cliffs; 1974.
 29. Khalafyan A.A. *Mathematical Statistics with Elements of Probability [Matematicheskaya statistika s elementami teorii veroyatnosti].* Moscow: Binom; 2010. (in Russian)
 30. Stephenson I., Gaines Das R., Wood J.M., Katz J.M. Comparison of neutralising antibody assays for detection of antibody to influenza A/H3N2 viruses: an international collaborative study. *Vaccine.* 2007; 25(20): 4056–63. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.039>
 31. Wood J.M., Major D., Heath A., Newman R.W., Höschler K., Stephenson I., et al. Reproducibility of serology assays for pandemic influenza H1N1: collaborative study to evaluate a candidate WHO International Standard. *Vaccine.* 2012; 30(2): 210–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.019>
 32. Zacour M., Ward B.J., Brewer A., Tang P., Boivin G., Li Y. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(3): 236–42. <https://doi.org/10.1128/CVI.00613-15>
 33. The Francis Crick Institute. Worldwide Influenza Centre lab. Annual and interim reports. Available at: <https://www.crick.ac.uk/research/platforms-and-facilities/worldwide-influenza-centre/annual-and-interim-reports>
 34. DuPai C.D., McWhite C.D., Smith C.B., Garten R., Maurer-Stroh S., Wilke C.O. Influenza passaging annotations: what they tell us and why we should listen. *Virus Evol.* 2019; 5(1): vez016. <https://doi.org/10.1093/ve/vez016>
 35. Wu N.C., Zost S.J., Thompson A.J., Oyen D., Nycholat C.M., McBride R., et al. A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine. *PLoS Pathog.* 2017; 13(10): e1006682. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006682>
 36. Park Y.W., Kim Y.H., Jung H.U., Jeong O.S., Hong E.J., Kim H. Comparison of antigenic mutation during egg and cell passage cultivation of H3N2 influenza virus. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2020; 9(1): 56–63. <https://doi.org/10.7774/cevr.2020.9.1.56>
 37. Popova L., Smith K., West A.H., Wilson P.C., James J.A., Thompson L.F. Immunodominance of antigenic site B over site A of hemagglutinin of recent H3N2 influenza viruses. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041895>
 38. Klein N.P., Fireman B., Goddard K., Zerbo O., Asher J., Zhou J. Vaccine effectiveness of cell-culture relative to egg-based inactivated influenza vaccine during the 2017–2018 influenza season. *PLoS One.* 2020; 15(2): e0229279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229279>
 39. GISAID. Eurosurveillance; 2017. Available at: <https://gisaid.org/resources/commentary-on-gisaid/>
 40. Smith T.F., Waterman M.S. Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 1981; 147(1): 195–7. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)
 41. GetArea. Available at: <http://curie.utmb.edu/getarea.html>
 42. RCSB PDB: Homepage. Available at: <https://www.rcsb.org/>
 43. Shcherbinin D.N., Alekseeva S.V., Shmarov M.M., Smirnov Yu.A., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. The analysis of B-cell epitopes of influenza virus hemagglutinin. *Acta Naturae.* 2016; 8(1): 13–20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20> <https://elibrary.ru/vsnklb>
 44. A standardised numbering for all subtypes of Influenza A hemagglutinin (HA) sequences based on the mature HA sequence. Available at: <https://antigenic-cartography.org/surveillance/evergreen/HAnumbering/>
 45. Smith D.J., Forrest S., Hightower R.R., Perelson A.S. Deriving shape space parameters from immunological data. *J. Theor. Biol.* 1997; 189(2): 141–50. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0495>
 46. Kilbourne E.D., ed. *The Influenza Viruses and Influenza.* London: Academic Press Inc.; 1975.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ



КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-176>

© КАРТАШОВ М.Ю., СВИРИН К.А., БЕКБОЛОТОВ А., МОМУШЕВА К., ИСКАНОВА Б., СОЛПУЕВА А., МОТОРОВ У., НАРМАТОВА Е., КРИВОШЕИНА Е.И., ГЛАДЫШЕВА А.В., ЧУБ Е.В., ГАШНИКОВА Н.М., 2023

Анализ мутаций резистентности среди изолятов вируса гепатита С, циркулирующих в Кыргызстане

Карташов М.Ю.¹, Свирин К.А.¹, Бекболотов А.², Момушева К.², Исканова Б.², Солпуева А.², Моторов У.³, Нарматова Е.³, Кривошеина Е.И.¹, Гладышева А.В.¹, Чуб Е.В.¹, Гашникова Н.М.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

²Республиканский центр по контролю за гемоконтактными вирусными гепатитами и вирусом иммунодефицита человека Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, г. Бишкек, Кыргызская Республика;

³Ошский областной центр по контролю за гемоконтактным вирусным гепатитами и вирусом иммунодефицита человек, г. Ош, Кыргызская Республика

Введение. Страны Центральной Азии, включая Кыргызстан, характеризуются высокими показателями распространения и инфицирования вирусом гепатита С (ВГС). Определение генотипической принадлежности и мутаций резистентности к препаратам прямого противовирусного действия (ПППД) среди изолятов ВГС играет важную роль не только при проведении молекулярно-эпидемиологических исследований, но и при выборе тактики назначаемой терапии.

Цель работы – изучение генотипического разнообразия вариантов ВГС, циркулирующих на территории Кыргызстана, и выявление среди них мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к ПППД.

Материалы и методы. В работе проанализировано 38 сывороток от ВГС-инфицированных жителей Кыргызстана. Определение нуклеотидных последовательностей анализируемых фрагментов вирусных генов *NS3*, *NS5A* и *NS5B* проводили прямым секвенированием ампликонов по методу Сэнгера. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами ON841497–ON841534 (для фрагмента *NS5B*), ON841535–ON841566 (для фрагмента *NS5A*) и ON841567–ON841584 (для фрагмента *NS3*).

Результаты. Основными субтипами ВГС, циркулирующими на территории Кыргызстана, являются 1b (52,6%; 95% ДИ 37,3–67,5%) и 3a (44,8%; 95% ДИ 30,2–60,2%), в единичном случае обнаружен субтип 1a (2,6%; 95% ДИ 0,5–13,4%). У 37% (95% ДИ 19–59%) изолятов субтипа 1b выявлена мутация С316N в *NS5A*-гене; у 46% (95% ДИ 23–70%) обнаружена мутация F37L в *NS5A*-гене; у 45% (95% ДИ 22–72%) обнаружена мутация Y56F в *NS3*-гене. Мутаций резистентности в регионе *NS5B* среди изучаемых изолятов ВГС субтипа 3a обнаружено не было; у 22% (95% ДИ 9–45%) изолятов выявлена мутация Y93H в *NS5A*-гене; среди всех проанализированных последовательностей *NS3*-гена выявлен набор мутаций Y56F + Q168 + I170. При анализе единичного изолята субтипа 1a мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к ПППД, выявлено не было ни в одном из изучаемых генов.

Заключение. Показана достаточно высокая распространённость мутаций, ассоциированных с развитием резистентности или значительным снижением чувствительности к терапии ПППД среди изолятов ВГС, циркулирующих в Кыргызстане. Актуализация данных по генотипическому разнообразию ВГС необходима для своевременного планирования санитарно-эпидемиологических мероприятий.

Ключевые слова: вирус гепатита С; генотипирование; препараты прямого противовирусного действия; Кыргызстан

Для цитирования: Карташов М.Ю., Свирин К.А., Бекболотов А., Момушева К., Исканова Б., Солпуева А., Моторов У., Нарматова Е., Кривошеина Е.И., Гладышева А.В., Чуб Е.В., Гашникова Н.М. Анализ мутаций резистентности среди изолятов вируса гепатита С, циркулирующих в Кыргызстане. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(3): 265–270. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-176> EDN: <https://elibrary.ru/gyhyaa>

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Участие авторов: Карташов М.Ю. – концепция и дизайн исследования, проведение исследований, написание текста статьи; Свиринов К.А. – проведение исследований, написание текста статьи; Бекболотов А. – проведение исследований; Момушева К. – проведение исследований; Исканова Б. – проведение исследований; Солпиева А. – проведение исследований; Моторов У. – проведение исследований; Нарматова Е. – проведение исследований; Кривошеина Е.И. – проведение исследований; Гладышева А.В. – проведение исследований; Чуб Е.В. – общее руководство, научное редактирование; Гашникова Н.М. – общее руководство, научное редактирование.

Финансирование. Исследование проведено в рамках реализации распоряжения Правительства Российской Федерации от 01.12.2018 № 2656-р и ГЗ-2/22 (№ 122040600156-3 в ЕГИСУ НИОКТР).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решениями этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022) и этического комитета при Научно-производственном объединении «Профилактическая медицина» МЗ Кыргызской Республики (протокола № 11 от 25.11.2022).

Поступила 10.05.2023

Принята в печать 22.06.2023

Опубликована 30.06.2023

SHORT COMMUNICATION

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-176>

Analysis of resistance-associated substitutions in hepatitis C virus sequences from Kyrgyzstan

Mikhail Yu. Kartashov¹, Kirill A. Svirin¹, A. Bekbolotov², K. Momusheva², B. Iskanova², A. Solpueva², U. Motorov³, E. Narmatova³, Ekaterina I. Krivosheina¹, Anastasia V. Gladysheva¹, Elena V. Chub¹, Natalya M. Gashnikova¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia;

²Republican Center of AIDS of Ministry of Health of Kyrgyzstan, Bishkek, Kyrgyzstan;

³Osh Regional Center of AIDS Treatment and Prevention, Osh, Kyrgyzstan

Introduction. The countries of Central Asia, including Kyrgyzstan, are characterized by high prevalence and morbidity of HCV infection. Identification of HCV genotype and mutations associated with resistance to direct-acting antiviral (DAA) plays an important role either in conducting molecular epidemiological studies or choosing the treatment tactics.

The aim of the work was to research of the genotype diversity of HCV variants circulating in Kyrgyzstan and the identification among them the mutations associated with the development of resistance to DAA.

Materials and methods. 38 serum samples from HCV-infected residents of Kyrgyzstan were analyzed in this study. The nucleotide sequences of viral gene fragments (*NS3*, *NS5A*, *NS5B*) were determined by Sanger’s sequencing and deposited in the international GenBank database under the numbers ON841497–ON841534 (*NS5B*), ON841535–ON841566 (*NS5A*), and ON841567–ON841584 (*NS3*).

Results. The HCV subtypes 1b (52.6%; 95% CI 37.3–67.5%), 3a (44.8%; 95% CI 30.2–60.2%) and 1a (2.6%; 95% CI 0.5–13.4%) are circulating in Kyrgyzstan. 37% (95% CI 19–59%) of subtype 1b isolates had C316N mutation in the *NS5A* gene; 46% (95% CI 23–70%) had F37L mutation in the *NS5A* gene; 45% (95% CI 22–72%) had Y56F mutation in the *NS3* gene. Among subtype 3a isolates, resistance-associated mutations in *NS5B* fragment were not found. 22% (95% CI 9–45%) of subtype 3a sequences had a Y93H mutation in the *NS5A* gene. A combination of Y56F + Q168 + I170 mutations was identified among all sequences of *NS3* gene. DAA resistance mutations were not found in *NS3*, *NS5A*, *NS5B* genes of subtype 1a sequence.

Conclusion. A rather high prevalence of mutations associated with resistance or significant decrease in sensitivity to DAA among HCV sequences from Kyrgyzstan was shown. Updating of data on HCV genetic diversity is necessary for timely planning of measures to combat epidemic.

Keywords: hepatitis C virus; genotyping; direct-acting antiviral drugs; Kyrgyzstan

For citation: Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Bekbolotov A., Momusheva K., Iskanova B., Solpueva A., Motorov U., Narmatova E., Krivosheina E.I., Gladysheva A.V., Chub E.V., Gashnikova N.M. Analysis of resistance-associated substitutions resistance analysis in hepatitis C virus sequences from Kyrgyzstan. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(3): 265-270 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-176> EDN: <https://elibrary.ru/ryhyaa>

For correspondence: Mikhail Yu. Kartashov, Researcher, Department of molecular virology, State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Information about the authors:

Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Svirin K.A., <https://orcid.org/0000-0001-9083-1649>

Bekbolotov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9931-3311>
Momusheva K., <https://orcid.org/0009-0000-6524-3386>
Iskanova B.A., <https://orcid.org/0000-0002-2493-1788>
Solpueva A., <https://orcid.org/0000-0002-1502-9207>
Motorov U., <https://orcid.org/0009-0000-4534-338X>
Narmatova E.B., <https://orcid.org/0000-0001-9263-0525>
Krivosheina E.I., <https://orcid.org/0000-0001-5181-0415>
Gladysheva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>
Chub E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1521-897X>
Gashnikova N.M., <https://orcid.org/0000-0002-0891-0880>

Contribution: Kartashov M.Yu. – concept and design of the study, conducting research, writing the text of the article; Svirin K.A. – conducting research, writing the text of the article; Bekbolotov A. – conducting research; Momusheva K. – conducting research; Iskanova B. – conducting research; Solpueva A. – conducting research; Motorov U. – conducting research; Narmatova E. – conducting research; Krivosheina E.I. – conducting research; Gladysheva A.V. – conducting research; Chub E.V. – general guidance, scientific editing; Gashnikova N.M. – general guidance, scientific editing.

Funding. The study was conducted as part of the implementation of the Decree of the Government of the Russian Federation dated December 1, 2018 No. 2656-r and GZ-2/22 (No. 122040600156-3 in EGISU R&D).

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the decisions of the Ethics Committee of the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор (protocol No. 5 dated July 21, 2022) and the Ethics Committee at the Scientific and Production Association "Preventive Medicine" of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic (protocol No. 11 dated November 25, 2022)

Received 10 May 2023

Accepted 22 June 2023

Published 30 June 2023

Введение

Вирус гепатита С (ВГС) представляет собой одну из актуальнейших проблем медицинской науки и общественного здравоохранения во всём мире. Центральная Азия считается одним из регионов с очень высокой распространённостью ВГС в мире. При этом динамика распространения и заболеваемости гепатитом С (ГС) в странах Центральной Азии в последнее время не снижается, в отличие от общемировой тенденции, что, однако, может быть частично связано с недостаточным количеством исследований в этом регионе, большая часть которых относится только к последнему десятилетию. Высокая серопревалентность к ВГС наблюдается прежде всего среди инфицированных ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), потребителей инъекционных наркотиков и заключённых, что свидетельствует о важной роли употребления инъекционных наркотиков в передаче ВГС-инфекции. Страны данного региона географически расположены вдоль основных маршрутов наркотрафика, идущих из Афганистана, и характеризуются одним из самых высоких показателей употребления инъекционных наркотиков в мире.

Распространённость ВГС среди населения Кыргызстана оценивается в пределах от 0,8 до 5,0% (медианное значение – 2,0%); среди потребителей инъекционных наркотиков это значение колеблется от 17,0 до 60,4% (медианное значение – 46,4%) [1]. Оценочное число лиц с хронической инфекцией ГС в Кыргызстане составляет порядка 83 тыс. (95% ДИ 70,480–99,501%). Согласно оценкам ряда авторов, от 2,6 до 3,3% взрослого населения Кыргызстана в возрасте от 16 до 64 лет являются потребителями наркотических средств; 1,8% прибегают к употреблению инъекционных наркотиков [2]. Исследований о генотипическом разнообразии вариантов ВГС, циркулирующих на территории Кыргызстана, нам не удалось обнаружить.

Ряд исследований подтверждают влияние генотипа/субтипа ВГС на тяжесть течения инфекции ГС и скорость развития заболевания. Определение генотипа также является одним из важнейших прогностических факторов устойчивого вирусологического ответа на использование пролонгированных форм интерферона- α в сочетании с рибавирином в качестве противовирусной терапии. В последние годы для лечения ГС стали доступны высокоэффективные препараты прямого противовирусного действия (ПППД), мишенями которых являются белки, играющие ключевые роли в жизненном цикле вируса (NS3, NS5a, NS5b). ПППД демонстрируют высокую эффективность и хорошую переносимость пациентами. Однако особенностью ВГС является способность к быстрой замене нуклеотидов при репликации его генома, что приводит к образованию большого числа генотипов, субтипов и мутантных штаммов. На сегодняшний день известно, что в генах ВГС, отвечающих за синтез белков и являющихся мишенями ПППД, встречаются мутации, повышающие устойчивость вируса к этиотропной терапии. Для всех пациентов, не отвечающих на терапию ПППД, обязательным является определение последовательностей генов *NS3*, *NS5A*, *NS5B*, картирование мутаций и выбор новой схемы лечения с учётом полученной информации.

Целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия изолятов ВГС, циркулирующих на территории Кыргызстана, а также выявление среди них мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к ПППД.

Материал и методы

В работе проанализировано 38 сывороток от ВГС-инфицированных жителей Кыргызстана.

Первичный скрининг образцов на наличие РНК ВГС осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием набора реагентов HCV-FL («АмплиСенс», Россия). Выявленные положительные образцы изолятов ВГС генотипировали путём амплификации фрагмента гена *NS5B* в двухраундовой ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности полученных ампликонов методом Сэнгера. Для 20 выявленных изолятов ВГС также был амплифицирован и просеквенирован фрагмент гена *NS5A*, для 17 изолятов удалось проанализировать фрагмент гена *NS3*. Анализ на наличие мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к терапии ПППД для изучаемых изолятов ВГС, проводили с помощью онлайн-сервиса HCV-GLUE (University of Glasgow Centre for Virus Research, Великобритания).

Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами ON841497–ON841534 (для фрагмента *NS5B*), ON841535–ON841566 (для фрагмента *NS5A*) и ON841567–ON841584 (для фрагмента *NS3*).

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решениями этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022) и этического комитета при Научно-производственном объединении «Профилактическая медицина» МЗ Кыргызской Республики (протокола № 11 от 25.11.2022).

Результаты и обсуждение

Филогенетический анализ, проведённый по *NS5B*-региону изучаемых изолятов ВГС, показал, что доминирующими субтипами ВГС, циркулирующими на территории Кыргызстана, являются 1b (52,6%; 95% ДИ 37,3–67,5%) и 3a (44,8%; 95% ДИ 30,2–60,2%), в единичном случае обнаружен субтип 1a (2,6%; 95% ДИ 0,5–13,4%). Информацию о генотипическом разнообразии изолятов ВГС, циркулирующих на территории Кыргызстана, в литературе нам найти не удалось, но оно ожидаемо схоже с распределением генотипов ВГС в соседних странах и России. Доминирующими генотипами в странах региона, согласно репозиторию

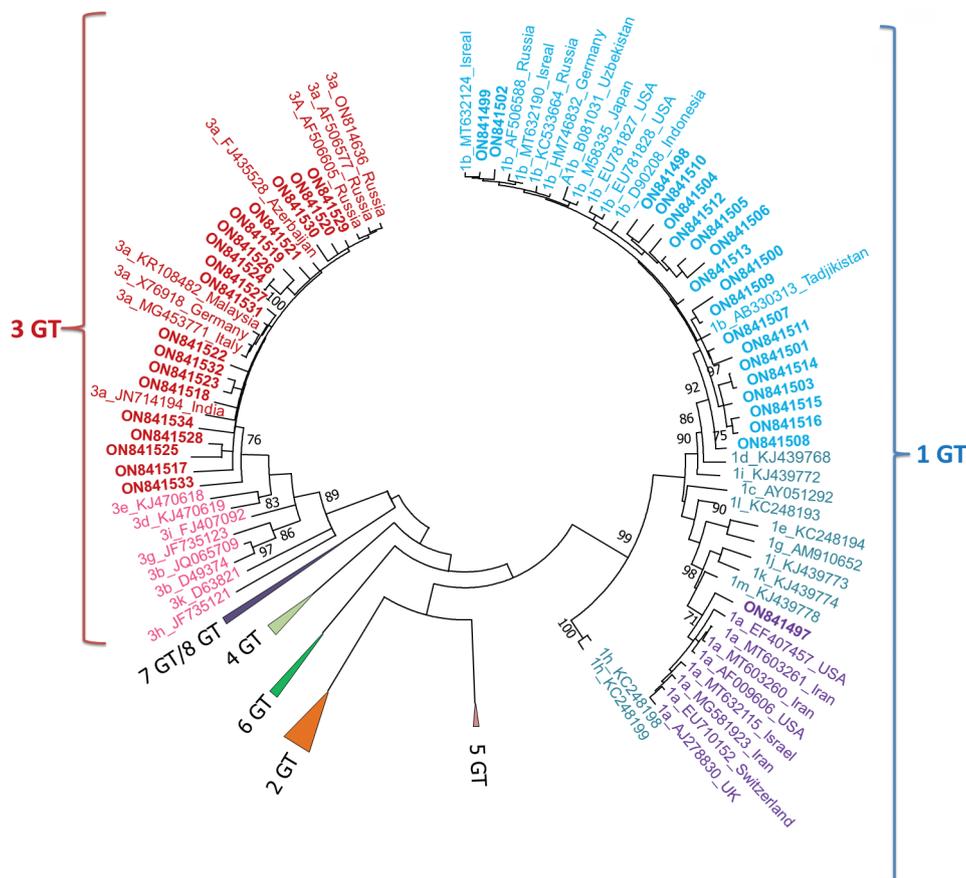


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, для нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *NS5b* вируса гепатита С.

Исследованные в работе изоляты вируса гепатита С, выделенные в Кыргызстане, отмечены жирным шрифтом и обозначены номером депонирования в GenBank.

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed by the maximum likelihood method for the nucleotide sequences of HCV *NS5b* gene fragments.

Лос-Аламосовской базы данных нуклеотидных последовательностей ВГС являются 1b и 3a (например, 43,9% – 1b и 43,9% – 3a для Узбекистана; 47,5% – 1b и 38,2% – 3a для России; 81,1% – 1b и 7,5% – 3a для Таджикистана).

При анализе нуклеотидной последовательности единичного изолята, относящегося к субтипу 1a, мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к ПППД, выявлено не было ни в одном из изучаемых генов. Среди изолятов субтипа 1b 35% имеют мутации резистентности к лечению ПППД и 30% мутации, снижающие чувствительность к терапии ПППД. У 37% (7/19; 95% ДИ 19–59%) изолятов 1b субтипа была выявлена мутация С316N в NS5A-гене. Замена С316N ассоциирована с развитием резистентности к лечению дасабувиром [3] и софосбувиром [4]. При анализе 35 нуклеотидных последовательностей NS5B-региона изолятов ВГС субтипа 1b из Узбекистана (AB081031–AB081061, AB327116–AB327119), которые нам удалось найти в GenBank, 30 вариантов (85%; 95% ДИ 71–94%) имеют мутацию С316N. Для изолятов 1b субтипа ВГС из Таджикистана (AB330313–AB330346) данная мутация обнаружена у 40% (95% ДИ 25–57%). При исследовании вариантов ВГС у ВИЧ-инфицированных лиц Новосибирской области доля изолятов субтипа 1b ВГС, имеющая мутацию С316N, составила 84% [5].

Мутация С316N описывается как одна из наиболее распространённых среди субтипа 1b ВГС во многих исследованиях, проводимых в разных регионах мира. Так, данная мутация обнаружена среди 31% не прошедших никакого лечения ВГС-инфицированных пациентов в Португалии [6] и среди 53% ВГС-позитивных лиц в Италии [7], у 71% ВГС-инфицированных пациентов в Китае, плохо отвечающих на терапию ГС [8]. У 46% изолятов 1b (6/13; 95% ДИ 23–70%) обнаружена мутация F37L в NS5A-гене, снижающая чувствительность к терапии деклатасвиром [9]. У одного изолята, помимо данной, обнаружена мутация Н54Q. У 45% (5/11; 95% ДИ 22–72%) обнаружена мутация Y56F в NS3-гене, ассоциированная со снижением эффективности grazoprevira. [10].

Наибольшее количество мутаций среди изолятов субтипа 3a было обнаружено в NS3-регионе, где среди всех 7 анализируемых последовательностей выявлен набор мутаций Y56F + Q168 + I170; у двух изолятов также выявлена мутация A166S. У 22% (4/18; 95% ДИ 9–45%) изолятов субтипа 3a была выявлена мутация Y93H, которая ассоциирована с резистентностью к даклатасвиру [11], пибрентасвиру [12], велпатасвиру [13], а также сниженной чувствительностью к таким препаратам, как элбасвир [14] и омбитасвир [15]. У двух изолятов, помимо мутации Y93H, обнаружена и мутация S62T, также снижающая чувствительность к деклатасвиру [16]. Мутаций резистентности в регионе NS5B среди изучаемых изолятов ВГС субтипа 3a обнаружено не было.

Заключение

В работе показана достаточно высокая распространённость мутаций, ассоциированных с разви-

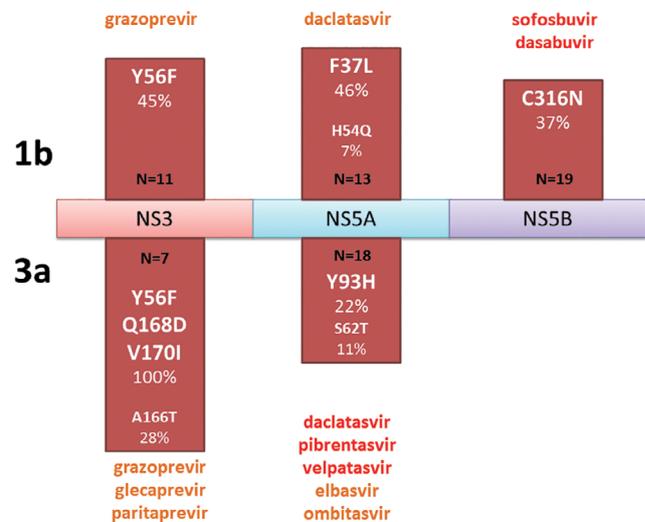


Рис. 2. Встречаемость и локализация мутаций, ассоциированных с развитием резистентности к препаратам прямого противовирусного действия, среди изученных изолятов вируса гепатита С.

Красным цветом отмечены препараты, к которым развивается резистентность; оранжевым – к которым в результате обнаруженных мутаций значительно снижается эффективность лечения.

Fig. 2. Occurrence and location of mutations associated with resistance to DAA among the studied HCV isolates.

DAA to which resistance is developing are marked in red; DAAs for which the effectiveness of treatment is significantly reduced are marked in orange.

тием резистентности или значительным снижением чувствительности к терапии ПППД среди изолятов ВГС, циркулирующих в Кыргызстане. Причём данные мутации обнаружены во всех генах, на белковые продукты которых направлены ПППД. Актуализация данных по генотипическому разнообразию ВГС позволяет отслеживать пути передачи, появление и распространение на территории Киргизской Республики новых вариантов этого вируса, знание чего необходимо для своевременного планирования необходимых санитарно-эпидемиологических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

- Baimakhanov Z. Liver transplantation in Kazakhstan: current status and outcomes. In: *The 2017 Joint Conference of the ILTS, ELITA, & LICAGE*. Prague; 2017. <https://doi.org/10.26226/morressier.58b975ed462b80290b4f9c5>
- Rosenkranz M., Kerimi N., Takenova M., Impinen A., Mamyrov M., Degkwitz P., et al. Assessment of health services for people who use drugs in Central Asia: Findings of a quantitative survey in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Harm Reduct. J.* 2016; 13: 3. <https://doi.org/10.1186/s12954-016-0093-2>
- Dietz J., Susser S., Vermehren J., Peiffer K.H., Grammatikos G., Berger A., et al. Patterns of resistance-associated substitutions in patients with chronic HCV infection following treatment with direct-acting antivirals. *Gastroenterology*. 2018; 154(4): 976–88.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.11.007>
- Wang G.P., Terrault N., Reeves J.D., Liu L., Li E., Zhao L., et al. Prevalence and impact of baseline resistance-associated substitutions on the efficacy of ledipasvir/sofosbuvir or simeprevir/sofosbuvir against GT1 HCV infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21303-2>
- Карташов М.Ю., Свиринов К.А., Кривошеина Е., Чуб Е.В., Терновой В.А., Кочнева Г.В. Распространённость и молекуляр-

- но-генетическая характеристика вирусов парентеральных гепатитов В, С и D у ВИЧ-позитивных лиц в Новосибирской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 423–38. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-133> <https://elibrary.ru/wldbqc>
- Palladino C., Ezeonwumelu I.J., Marcelino R., Briz V., Moranguinho I., Serejo F., et al. Epidemic history of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Portugal. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 12266. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30528-0>
 - Marascio N., Costantino A., Taffon S., Lo Presti A., Equestre M., Bruni R., et al. Phylogenetic and molecular analyses of more prevalent HCV1b subtype in the Calabria Region, Southern Italy. *J. Clin. Med.* 2021; 10(8): 1655. <https://doi.org/10.3390/jcm10081655>
 - Chen H., Liu J., Kang Q., Luo H., Tan N., Pan J., et al. Resistant-associated substitutions do not affect HCV RNA and HCV core antigen clearance during direct-acting antiviral agent treatment in a real-world setting. *Infect. Drug Resist.* 2022; 15: 3373–80. <https://doi.org/10.2147/idr.s352873>
 - Mawatari S., Oda K., Tabu K., Ijuin S., Kumagai K., Inada Y., et al. New resistance – associated substitutions and failure of dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir. *J. Gastroenterol.* 2017; 52(7): 855–67. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1303-0>
 - Komatsu T.E., Boyed S., Sherwat A., Tracy L., Naeger L.K., O’Rear J.J., et al. Regulatory analysis of effects of hepatitis C virus NS5A polymorphisms on efficacy of elbasvir and grazoprevir. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 586–97. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.017>
 - Wang C., Valera L., Jia L., Kirk M.J., Gao M., Fridell R.A. In vitro activity of daclatasvir on hepatitis C virus genotype 3 NS5A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(1): 611–3. <https://doi.org/10.1128/aac.01874-12>
 - Ng T.I., Krishnan P., Pilot-Matias T., Kati W., Schnell G., Beyer J., et al. In vitro antiviral activity and resistance profile of the next-generation hepatitis C virus NS5A inhibitor pibrentasvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(5): e02558-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02558-16>
 - Gane E.J., Shiffman M.L., Etzkorn K., Morelli G., Stedman C.A.M., Davis M.N., et al. Sofosbuvir-velpatasvir with ribavirin for 24 weeks in hepatitis C virus patients previously treated with a direct-acting antiviral regimen. *Hepatology*. 2017; 66(4): 1083–9. <https://doi.org/10.1002/hep.29256>
 - Gottwein J.M., Pham L.V., Mikkelsen L.S., Ghanem L., Ramirez S., Scheel T.K.H., et al. Efficacy of NS5A inhibitors against hepatitis C virus genotypes 1–7 and escape variants. *Gastroenterology*. 2018; 154(5): 1435–48. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.015>
 - Krishnan P., Beyer J., Mistry N., Koev G., Reisch T., DeGoey D., et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(2): 979–87. <https://doi.org/10.1128/aac.04226-14>
 - Hernandez D., Zhou N., Ueland J., Monikowski A., McPhee F. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J. Clin. Virol.* 2013; 57(1): 13–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.12.020>
 - Dietz J., Susser S., Vermehren J., Peiffer K.H., Grammatikos G., Berger A., et al. Patterns of resistance-associated substitutions in patients with chronic HCV infection following treatment with direct-acting antivirals. *Gastroenterology*. 2018; 154(4): 976–88.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.11.007>
 - Wang G.P., Terrault N., Reeves J.D., Liu L., Li E., Zhao L., et al. Prevalence and impact of baseline resistance-associated substitutions on the efficacy of ledipasvir/sofosbuvir or simeprevir/sofosbuvir against GT1 HCV infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21303-2>
 - Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Krivosheina E., Chub E.V., Ternovoy V.A., Kochneva G.V. Prevalence and molecular genetic characteristics of parenteral hepatitis B, C and D viruses in HIV positive persons in the Novosibirsk region. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(5): 423–38. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-133> <https://elibrary.ru/wldbqc> (in Russian)
 - Palladino C., Ezeonwumelu I.J., Marcelino R., Briz V., Moranguinho I., Serejo F., et al. Epidemic history of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Portugal. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 12266. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30528-0>
 - Marascio N., Costantino A., Taffon S., Lo Presti A., Equestre M., Bruni R., et al. Phylogenetic and molecular analyses of more prevalent HCV1b subtype in the Calabria Region, Southern Italy. *J. Clin. Med.* 2021; 10(8): 1655. <https://doi.org/10.3390/jcm10081655>
 - Chen H., Liu J., Kang Q., Luo H., Tan N., Pan J., et al. Resistant-associated substitutions do not affect HCV RNA and HCV core antigen clearance during direct-acting antiviral agent treatment in a real-world setting. *Infect. Drug Resist.* 2022; 15: 3373–80. <https://doi.org/10.2147/idr.s352873>
 - Mawatari S., Oda K., Tabu K., Ijuin S., Kumagai K., Inada Y., et al. New resistance – associated substitutions and failure of dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir. *J. Gastroenterol.* 2017; 52(7): 855–67. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1303-0>
 - Komatsu T.E., Boyed S., Sherwat A., Tracy L., Naeger L.K., O’Rear J.J., et al. Regulatory analysis of effects of hepatitis C virus NS5A polymorphisms on efficacy of elbasvir and grazoprevir. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 586–97. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.017>
 - Wang C., Valera L., Jia L., Kirk M.J., Gao M., Fridell R.A. In vitro activity of daclatasvir on hepatitis C virus genotype 3 NS5A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(1): 611–3. <https://doi.org/10.1128/aac.01874-12>
 - Ng T.I., Krishnan P., Pilot-Matias T., Kati W., Schnell G., Beyer J., et al. In vitro antiviral activity and resistance profile of the next-generation hepatitis C virus NS5A inhibitor pibrentasvir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(5): e02558-16. <https://doi.org/10.1128/aac.02558-16>
 - Gane E.J., Shiffman M.L., Etzkorn K., Morelli G., Stedman C.A.M., Davis M.N., et al. Sofosbuvir-velpatasvir with ribavirin for 24 weeks in hepatitis C virus patients previously treated with a direct-acting antiviral regimen. *Hepatology*. 2017; 66(4): 1083–9. <https://doi.org/10.1002/hep.29256>
 - Gottwein J.M., Pham L.V., Mikkelsen L.S., Ghanem L., Ramirez S., Scheel T.K.H., et al. Efficacy of NS5A inhibitors against hepatitis C virus genotypes 1–7 and escape variants. *Gastroenterology*. 2018; 154(5): 1435–48. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.015>
 - Krishnan P., Beyer J., Mistry N., Koev G., Reisch T., DeGoey D., et al. In vitro and in vivo antiviral activity and resistance profile of ombitasvir, an inhibitor of hepatitis C virus NS5A. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(2): 979–87. <https://doi.org/10.1128/aac.04226-14>
 - Hernandez D., Zhou N., Ueland J., Monikowski A., McPhee F. Natural prevalence of NS5A polymorphisms in subjects infected with hepatitis C virus genotype 3 and their effects on the antiviral activity of NS5A inhibitors. *J. Clin. Virol.* 2013; 57(1): 13–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.12.020>

REFERENCES

- Baimakhanov Z. Liver transplantation in Kazakhstan: current status and outcomes. In: *The 2017 Joint Conference of the ILTS, ELITA, & LICAGE*. Prague; 2017. <https://doi.org/10.26226/morressier.58eb975ed462b80290b4f9c5>
- Rosenkranz M., Kerimi N., Takenova M., Impinen A., Mamyrov M., Degkwitz P., et al. Assessment of health services for people who use drugs in Central Asia: Findings of a quantitative survey in Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Harm Reduct. J.* 2016; 13: 3. <https://doi.org/10.1186/s12954-016-0093-2>

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii