

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, 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 (Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

115088, Москва,
ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14,
ОАО «Издательство "Медицина"»

Адрес редакции: 109029, Москва,
ул. Скотопрогонная, дом 29/1,
подъезд 15

Зав. редакцией *Т. М. Курушина*
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru
www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru

www.medlit.ru

**Ответственность за
достоверность информации,
содержащейся
в рекламных материалах,
несут рекламодатели.**

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Л. В. Зюкина

Корректор *Л. В. Кузнецова*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 15.11.2016.

Подписано в печать 09.01.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 014.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2017.

Т. 62. № 1. 1-48

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Свидетельство о регистрации № 1170
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

1

Том 62 · 2017

Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г. (д.м.н., проф.)**

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

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)

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.)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

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

Щелканов М.Ю. (д.б.н., проф.)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

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

Ананьев В.Ю. (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

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

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

Борисевич С.В. (д.м.н., проф.; Сергиев Посад, Россия)

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

Бутаев Т.М. (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

Гарбуз Ю.А. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

Глинских Н.П. (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

Григорьев С.Н. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

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

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

Иванов Л.И. (рук. ФКУЗ "Хабаровская ГЧС"; Хабаровск, Россия)

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

Лебедев Г.Б. (зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Чукотском АО"; Анадырь, Россия)

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

Лисицин Е.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

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

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

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

Мукомолов С.А. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Нетесов С.В. (д.б.н., проф., чл.-кор. РАН; Новосибирск, Россия)

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

Огарков П.И. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Покровский В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

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

Романенко В.В. (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

Сергеев А.Н. (д.м.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

Тутельян А.В. (д.м.н.; Москва, Россия)

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

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

Янович В.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

Яшкулов К.Б. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

Виноград Н.А. (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

Владыко А.С. (д.м.н., проф.; Минск, Республика Беларусь)

Горбунов В.А. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Грибкова Н.В. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Петкевич А.С. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Титов А.П. (д.м.н., проф., чл.-кор. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

Berencsi G. (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

Ciampor F. (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

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

De Paiva T.M. (PhD; San Paulo, Brazil)

Galabov A.S. (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

Klenk H.-D. (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

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

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

Maneekarn N. (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

Matrosovich M.N. (PhD; Marburg, Germany)

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

Petrenkienė V. (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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)

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

Webster R. (PhD, DSc, Memphis, USA)

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

Zeichardt H. (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIRUSOLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

Volume 62 • 1 • 2017

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: LVOV D.K., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,
corresponding member of RAS

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Members of editorial board:

Barinskiy I.F. – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershev F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenko G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D., Prof.; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

Antonov V.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd)

Baranov A.A. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Borisevich S.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Sergiev Posad)

Briko N.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Butaev T.M. – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz)

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

Glinskikh N.P. – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg)

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

Zasedatelev A.S. – Doctor of physical, Prof. (Moscow)

Zlobin V.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

Kutyrev V.V. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov)

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

Leonova G.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok)

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

Loktev V.B. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

Malyshev N.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

Mikhaylov M.I. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Mukomolov S.L. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

Netesov S.V. – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk)

Nikiforov V.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

Ogarkov P.I. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

Pokrovskiy V.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

Romanenko V.V. – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg)

Sergeev A.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Novosibirsk)

Stepanova T.F. – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen')

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc (Moscow)

Chuchalin A.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Shestopalov A.M. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

Vinograd N.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraina)

Vladyko A.S. – MD, PhD, DSc, Prof. (Minsk, Republic of Belarus)

Gorbunov V.A. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

Gribkova N.V. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

Petkevich A.S. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

Becker J. – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

Berenci G. – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

Ciampor F. – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

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

De Paiva T.M. – PhD (San Paulo, Brazil)

Galabov A.S. – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

Klenk H.-D. – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

Kuhn J.H. – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

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

Maneekarn N. – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

Matrosovich M.N. – PhD (Marburg, Germany)

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

Petrenkiene V. – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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)

Turan K. – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

Zeichardt H. – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)



Izdatel'stvo Meditsina

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Галегов Г.А. Фосфазид (никавир) — высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ВИЧ/СПИД-инфекции 5

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., Чичаева М.А., Эспер С.А., Львов Д.К. Природные очаги гриппа А в Западной Арктике 11

Кузнецова Т.В., Смирнова М.С., Леонович О.А., Гордейчук И.В., Бирюкова Ю.К., Зылькова М.В., Тын'о Я.Я., Белякова А.В., Шевелев А.Б. Разработка нового метода получения белка-антигена NS5A вируса гепатита С 17

Борисевич И.В., Черникова Н.К., Марков В.И., Краснянский В.П., Борисевич С.В., Рождественский Е.В. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола 25

Пуховская Н.М., Морозова О.В., Белозерова Н.Б., Бахметьева С.В., Высочина Н.П., Здановская Н.И., Иванов Л.И. Сравнительный анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от комаров и клещей 30

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М., Мордвинцева Э.Ю., Баринский И.Ф. Разработка свечевой формы препарата иммуноглобулинов человека с высокими титрами антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов для лечения хронических форм герпетической болезни 36

Носик Н.Н., Носик Д.Н., Чижов А.И. Сравнительный анализ вирулицидной эффективности дезинфицирующих средств 41

РЕЦЕНЗИИ

Руппрехт Чарльз Е. Рецензия на книгу Д.К. Львова, М.Ю. Щелканова, С.В. Альховского, П.Г. Дерябина «Зоонозные вирусы Северной Евразии: таксономия и экология». Нью-Йорк: Академик Пресс; 2014. 45

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

Профессор Т.И. Тихоненко (к 90-летию со дня рождения). 47

НЕКРОЛОГИ

Памяти Сергея Миновича Клименко 48

Памяти Сергея Григорьевича Дроздова 3-я стр. обл.

CONTENTS

REVIEWS

Galegov G.A. Phosphazide (nikavir) is a highly effective drug for the treatment of HIV/AIDS infection

ORIGINAL RESEARCH

Grebennikova T.V., Syroeshkin A.V., Chichaeva M.A., Esper S.A., Lvov D.K. Influenza A virus in the Western Arctic

Kuznetsova T.V., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Gordeichuk I.V., Biriukova Iu.K., Zylkova M.V., Tyn' o Ya.Ya., Belyakova A.V., Shevelev A.B. A new method of producing NS5A antigen of hepatitis C virus

Borisevich I.V., Chernikova N.K., Markov V.I., Krasnianskiy V.P., Borisevich S.V., Rozhdestvenskiy E.V. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever

Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Belozerova N.B., Bakhmetyeva S.V., Vysochina N.P., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I. Comparative analysis of genomes of tick-borne encephalitis virus strains isolated from mosquitoes and ticks

TO VIROLOGIST'S AID

Lazarenko A.A., Alimbarova L.M., Mordvintseva E.Yu., Barinsky I.F. Development of the suppository form of human immunoglobulin preparation with high titers of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease

Nosik N.N., Nosik D.N., Chizhov A.I. A comparative analysis of virucidal efficiency of biocide agents

BOOK REVIEWS

Rupprecht C.E. Zoonotic viruses of Northern Eurasia: taxonomy and ecology. By D.K. Lvov, M.Y. Shchelkanov, S.V. Alkhovskiy, P.G. Deryabin. Academic Press, New York, 2014.

ANNIVERSARY

90th Anniversary of Professor T.I. Tikhonenko

OBITUARIES

In memory of S.M. Klimenko

In memory of S.G. Drozdov

Журнал «Вопросы вирусологии» входит в **Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК**, в которых должны быть опубликованы значимые результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

ОБЗОРЫ

© ГАЛЕГОВ Г.А., 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:678.828.6]-092:617.017.1.064

Галегов Г.А.

ФОСФАЗИД (НИКАВИР) — ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИЧ/СПИД-ИНФЕКЦИИ

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

Представлены убедительные доказательства высокой терапевтической активности и хорошей переносимости фосфазида в лечении ВИЧ/СПИД-инфекции в плане применения в настоящее время в различных схемах высокоэффективной антиретровирусной терапии, терапии ВИЧ-инфекции у пациентов с одновременно протекающим хроническим вирусным гепатитом С, терапии ВИЧ-инфекции у пациентов с одновременно протекающим туберкулезом. Терапевтические возможности фосфазида четко проявляются в процессе профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку. Имеются все основания для использования фосфазида в схемах антиретровирусной терапии первого ряда.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека; фосфазид; эффективность.

Для цитирования: Галегов Г.А. Фосфазид (никавир) — высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ВИЧ/СПИД-инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 5-11.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-5-11>

Galegov G.A.

PHOSPHAZIDE (NIKAVIR) IS A HIGHLY EFFECTIVE DRUG FOR THE TREATMENT OF HIV/AIDS INFECTION

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

Convincing evidence for high therapeutic activity and tolerability of Phosphazide in the treatment of HIV/AIDS-infection is given. Phosphazide is currently used in various regimens of highly active antiretroviral therapy, as well as in the HIV therapy in patients with simultaneously acquired chronic hepatitis C or tuberculosis. Therapeutic possibilities of Phosphazide were clearly manifested in the prevention of HIV transmission from mother to child. There is every reason to use Phosphazide in first-line antiretroviral therapy.

Key words: immunodeficiency virus; Phosphazide; effective.

For citation: Galegov G.A. Phosphazide (nikavir) is a highly effective drug for the treatment of HIV/AIDS infection.

Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal). 2017; 62(1): 5-11. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-5-11>

For correspondence: George A. Galegov, Professor, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of chemotherapy of viral infections, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation.

E-mail: g.galegov@yandex.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 24 May 2016

Accepted 11 October 2016

Антиретровирусная лекарственная терапия ВИЧ-инфекции и СПИДа впервые стала осуществляться в США с марта 1987 г., когда начали регулярно применять нуклеозидный препарат азидотимидин (АЗТ, ретровир, зидовудин). В последующие годы до настоящего времени в практику вводятся новые модифицированные нуклеозиды. Все они относятся к классу ингибиторов фермента обратной транскриптазы ВИЧ (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). Большое разнообразие антиВИЧ-лекарств обусловлено применением препаратов другой группы — ингибиторов протеазы ВИЧ, а также внедре-

нием в практику ингибитора фузии вируса в клетку фузона (энфувергид, Т-20) и ингибиторов интегразы ВИЧ ральтегравира и долутегравира. Значительно повышена эффективность лечения ВИЧ-инфекции и СПИДа (с 1998 г.) благодаря применению сочетаний (комбинаций) антиВИЧ-лекарств с различным механизмом действия [1, 2].

В середине 80-х годов академик А.А. Краевский предложил исследовать на антиВИЧ-активность новую группу синтезированных в его лаборатории нуклеозидсодержащих соединений, включающих модифицированную

Для корреспонденции: Галегов Георгий Артемьевич, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. химиотерапии вирусных инфекций Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: g.galegov@yandex.ru

фосфатную группу в положении 5'. Такие соединения относятся уже к классу модифицированных нуклеотидов, имеющих двойную структурную модификацию как по сахарному компоненту, так и по 5'-фосфатной группе [2]. Была синтезирована большая серия подобных соединений и подробно исследована их антиВИЧ-активность. Наиболее приемлемым по цитотоксическим свойствам и антиВИЧ-активности оказался 5'-Н-фосфонат АЗТ в виде натриевой соли. Эти результаты были получены отечественными специалистами в 1987 г. и защищены серией патентов (патент РФ 1548.182 от 29.12.1987; патент США 5.043.437.27.8.1991; европейский патент 0-354-246 от 16.03.1994; патент Японии 1963937 от 08.1995; патент Республики Корея 106.957 от 12.01.1996), а также опубликованы в ряде изданий [3—7]. Исследования были выполнены в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН и в Кардиологическом научном центре Минздрава России. Препарат получил название «фосфазид» (никавир), который стал изучаться в последующие годы по программе доклинических исследований, кроме подробно исследованной его антиВИЧ-активности, было предпринято токсикологическое и фармакологическое исследования. Препарат прошел успешно все 3 фазы клинического изучения, был утвержден Фармакологическим комитетом Минздрава России, получил регистрацию и с конца 1999 г. его начали официально использовать в качестве антиретровирусного лекарства. Никавир (фосфазид) в настоящее время производится в виде таблеток (ООО АЗТ ФАРМА К.Б., Москва) и регулярно используется для лечения ВИЧ-инфекции и СПИДа на территории Российской Федерации.

Важно отметить, что достижения отечественных химиков и вирусологов заключаются в том, что они впервые обнаружили (1987) высокие антиретровирусные свойства подобной группы фосфорсодержащих химических соединений, опередив на 2—3 года специалистов США, Бельгии и Чехии [8].

Исследования антиВИЧ-активности фосфазид (никавир) на разработанной в нашей стране химиотерапевтической модели стали выполняться с октября 1986 г. при изучении действия фосфазид и большой группы аналогичных соединений в отношении репродукции ВИЧ-1 в культурах лимфобластоидных клеток H9, MOLT и MT-4. В методическом плане в основе примененных методов культивирования ВИЧ *in vitro* и оценки антиВИЧ-1-действия испытываемых соединений лежали экспериментальные методические разработки группы вирусологов США, которые впервые описали антиВИЧ-1-активность АЗТ [5, 9].

Предварительно исследовали цитотоксическое действие фосфазид сравнительно с АЗТ. Было четко показано, что фосфазид, например, в диапазоне концентраций от 0,25 до 15 мкМ значительно уменьшает количество клеток, экспрессирующих вирусный антиген. Количество живых клеток значительно увеличивается по сравнению с контрольными, т. е. зараженными вирусом культурами без препарата. Например, под влиянием ВИЧ-инфекции количество живых клеток сокращалось с 97 до 18%. Количество клеток, экспрессирующих вирусный антиген, было равно 69%. Под влиянием антиВИЧ-действия фосфазид количество живых клеток увеличилось до 72%, а количество клеток, экспрессирующих вирусный антиген, снизилось до 20%. Вместе с тем было

сделано важное наблюдение, отличающее фосфазид от АЗТ. Фосфазид оказался для всех клеточных линий значительно менее цитотоксичным, чем АЗТ [4, 7, 10].

Благодаря меньшей цитотоксичности индекс селективности фосфазид оказался более чем в 2 раза выше, чем АЗТ. Очень важно, что результаты исследований, свидетельствующие о значительной антиВИЧ-1-активности фосфазид, впервые полученные отечественными специалистами (Галегов Г.А., Корнеева М.Н., Носик Д.Н.) в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва), были принципиально подтверждены в последующем и рядом зарубежных и отечественных авторов. Всеми исследовательскими группами было показано, что фосфазид значительно менее цитотоксичен по сравнению с АЗТ для лимфобластоидных линий клеток. Например, группа канадских авторов установила, что фосфазид (никавир) и АЗТ проявляли выраженную активность в отношении экспериментальной ВИЧ-1-инфекции в мононуклеарных клетках крови. Однако цитотоксичность АЗТ для этих клеток оказалась в 33 раза большей по сравнению с цитотоксичностью фосфазид. Индекс селективности фосфазид был в 13,6 раза выше, чем АЗТ [11—13].

Принципиальной позицией, характеризующей фосфазид, явилось изучение формирования резистентности к этому антиВИЧ-1-лекарственному препарату. Хорошо известно, что к каждому антиретровирусному препарату формируются варианты (мутанты) ВИЧ-1 с лекарственной устойчивостью. Это связано со структурными изменениями в геноме ВИЧ-1 — замнами одного или нескольких нуклеиновых оснований. Было установлено, что репродукция ВИЧ-1 со сниженной в 5—7 раз чувствительностью к АЗТ достоверно подавляется фосфазидом [14]. Далее было обнаружено, что формирование сниженной чувствительности ВИЧ-1 к фосфазиду реализуется достоверно медленнее, чем к АЗТ. Резистентность к фосфазиду развивается при пассивировании вируса в течение 72 дней (10 инфекционных циклов), к АЗТ — 26 дней (6 инфекционных циклов), а к ламивудину — 16 дней (4 инфекционных цикла) [13]. Вместе с тем установлено, что после медленно формируемой в эксперименте сниженной чувствительности ВИЧ-1 к фосфазиду в геноме ВИЧ-1 (область обратной транскриптазы) возникает мутация в кодоне 67, которая характерна и для АЗТ.

В дальнейших доклинических исследованиях фосфазид были изучены его токсикологические и фармакологические свойства по программе Фармакологического комитета Минздрава России. Такие трудоемкие исследования были проведены в НИИ экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-исследовательского комплекса Е.В. Арзамасцевым и Е.Т. Гнеушевым. Первые исследования показали, что фосфазид относится к категории малотоксичных веществ. Величина ЛД₅₀ (средняя смертельная доза) для мышей BALB/c при однократном внутривенном введении составляла 9000—11000 мг/кг, при внутривенном введении — 2400—2800 мг/кг. АЗТ более токсичен по этим базовым показателям [15].

При изучении побочного действия фосфазид в виде таблетированной лекарственной формы не отмечено изменений в гематологических (гранулоцитопении или анемии) и биохимических показателях при ежедневном (в течение 30 дней) введении собакам [15].

Фосфазид не обладал мутагенными свойствами при

использовании базовых методик (определение доминантной летальности и теста Эймса) и не оказывал ДНК-повреждающее и аллергизирующее действие, не тератогенен и не эмбриотоксичен. Фосфазад (никавир) в виде лекарственных форм (таблеток и капсул) хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта (время полного всасывания 3 ч; время полувыведения из организма 2,5 ч; максимальная концентрация в крови 25 мкг/мл достигается через 2,5—3 ч). В этом контексте очевидно, что фосфазад в виде лекарственных форм характеризуется более медленным всасыванием, чем АЗТ.

Важно отметить, что продолжительность среднего временного периода удержания фосфазада в плазме крови почти в 4 раза больше по сравнению с АЗТ. Поэтому реально рекомендовать его более редкий прием по сравнению с АЗТ. Важно также, что фосфазад, используемый в таблетках и капсулах, проникает через гематоэнцефалический барьер и обнаруживается в спинно-мозговой жидкости, попадая в центральную нервную систему [16].

Высокий уровень антиВИЧ-активности фосфазада *in vitro* сочетается с одновременно низким (значительно меньшим, чем у АЗТ) уровнем цитотоксичности, благоприятными фармакокинетическими показателями и низким уровнем токсичности для лабораторных животных. Таким образом, весь комплекс доклинического изучения фосфазада обосновывал целесообразность его дальнейшего изучения в клинике, начиная с первой фазы клинического исследования, т. е. безвредности и переносимости. Такое исследование проводилось в нашей стране в 1997 г. и имело регистрацию RUS 3A98, протокол 125196 [16]. Это трудоемкое клиническое исследование было проведено по мультицентровой системе, в частности в Российском научно-методическом центре по профилактике и борьбе со СПИДом (Москва) [21].

Основные первые полученные результаты: фосфазад достаточно хорошо переносится всеми пациентами, отсутствуют основные нежелательные явления (побочные эффекты), наблюдаемые при приеме АЗТ (наиболее частые — развитие анемии, нейтропении). Такие тщательно проведенные трудоемкие исследования обосновали целесообразность перехода ко второй фазе клинического изучения фосфазада, т. е. исследованию его терапевтической эффективности в качестве средства монотерапии. В ходе 12-недельного приема фосфазада 103 ВИЧ-инфицированными пациентами четко проявилось его антиретровирусное действие, которое выразилось в среднем увеличении количества CD4-позитивных лимфоцитов на 80 в 1 мм³. Снижение вирусной нагрузки было достоверным: уровень РНК ВИЧ в плазме крови снизился на 0,44—0,53 lg.

Первое исследование, посвященное применению фосфазада (никавира) в составе комбинированной антиретровирусной терапии (АРВТ), выявили его большие терапевтические возможности [15, 16].

Относительно применения фосфазада в составе высокоактивной АРВТ можно отметить, что включение его в различные схемы высокоэффективной терапии позволило оценить эффективность и безопасность этого препарата как средства лекарственной терапии ВИЧ/СПИД-инфекции. Реализованы следующие схемы:

- фосфазад + зальцитабин или ламивудин + саквинавир или индинавир (17 пациентов);
- фосфазад + диданозин + невирапин (25 пациентов);
- фосфазад + диданозин + саквинавир/ритонавир (25 пациентов).

Во всех трех исследованиях отмечена низкая токсичность и хорошая переносимость фосфазада (Кравченко А.В., Канестри В.Г., Юрин О.Г.).

В последующем исследовании у 47 ВИЧ-инфицированных пациентов зидовудин (АЗТ) был заменен на фосфазад из-за появления тошноты и рвоты (40,4%), анемии (46,8%) и гранулоцитопении (12,8%), причем у 44,7% пациентов фосфазад применялся в качестве средства монотерапии, а у 55,3% — в составе высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). Ни у одного пациента не наблюдали серьезных нежелательных явлений при приеме фосфазада, и отмены препарата не требовалось ни в одном случае. У 6,4% пациентов отмечено появление тошноты легкой степени выраженности и у 2% — явления анемии I степени токсичности. Через 36—48 недель после замены зидовудина фосфазадом было обнаружено увеличение количества CD4+ Т-лимфоцитов на 80—100 в 1 мм³ [17].

В ходе сравнительного исследования терапевтической эффективности фосфазада и комбивира (зидовудин + ламивудин) получены следующие принципиальные результаты. В исследовании включены 2 группы пациентов, 1-я группа состояла из 18 пациентов. Они получали фосфазад + ламивудин + эфавиренз или лопинавир/ритонавир. Пациенты 2-й группы (28) получали зидовудин + ламивудин + эфавиренз. Исходный уровень вирусной нагрузки у пациентов 1-й группы был на 11,3% ниже, чем у пациентов 2-й группы. У больных 1-й группы исходное число CD4+ Т-лимфоцитов было в 1,4 раза ниже, чем у пациентов 2-й группы. В ходе исследования установлено отсутствие симптомов прогрессирования ВИЧ-инфекции у пациентов обеих групп начиная с 12-й недели приведенной лекарственной терапии. Снижение уровня вирусной нагрузки на 1,86 lg через 4 недели наблюдалось у пациентов 1-й группы, в то время как у пациентов 2-й группы снижение составило 1,36 lg. К 36-й неделе терапии уровень вирусной нагрузки у пациентов обеих групп снизился до уровня чувствительности тест-системы (менее 500 РНК-копий в 1 мл). Достоверный прирост CD4+ Т-лимфоцитов был достигнут у пациентов 1-й группы через 24 недели терапии, а у пациентов 2-й группы — через 36 недель [18]. Следовательно, применение фосфазада (1-я группа) обеспечивает более раннее снижение вирусной нагрузки и достоверный рост количества CD4+ Т-лимфоцитов в условиях более тяжелого исходного состояния пациентов по сравнению с пациентами 2-й группы.

Высокий уровень значимости фосфазада в лечении ВИЧ/СПИД-инфекции был обнаружен у пациентов с одновременно протекающим вирусным гепатитом С и у пациентов с одновременно протекающим туберкулезом легких. Системная лекарственная терапия одновременно протекающих ВИЧ/СПИД-инфекций и хронического гепатита С (ХГС) в настоящее время реализуется на основе строго соблюдаемых принципов совместимости лекарств, учитывая их разнообразие при данных видах инфекционных патологий. Были проведены обстоятельные клинические исследования, предусматривающие лечение одновременно протекающих ВИЧ/СПИД-инфекций и ХГС. В 1-ю группу было включено 50 пациентов. Каждый пациент получал фосфазад, ламивудин, эфавиренз или лопинавир/ритонавир. Параллельно проводилась стандартная терапия ХГС с применением рибавирина и пегилированного альфа-интерферона. Во 2-й группе участвовал 31 пациент, у которого фосфазад

был заменен на абакавир и далее ламивудин, эфавиренз или лопинавир/ритонавир. Результаты лечения следующие: быстрый вирусологический ответ (БВО) — снижение вирусной нагрузки гепатита С до неопределяемых значений через 4 недели лечения у пациентов 1-й группы составил 62,5%, у пациентов 2-й группы — 33,3%. Полный ранний вирусологический ответ (ПРВО) — снижение вирусной нагрузки гепатита С до неопределяемых значений через 12 недель лечения у пациентов 1-й группы составил 95,8%, у пациентов 2-й группы — 54%. У 90% пациентов через 12 недель лечения сохранялся уровень РНК ВИЧ менее 400 копий РНК в 1 мл плазмы крови. Количество CD4+ Т-лимфоцитов в 1-й группе увеличилось на 87 кл/мм³, у пациентов 2-й группы — на 133 кл/мм³. У 90% пациентов обеих групп не наблюдалось развитие гематологических осложнений. На эффективность лечения ХГС в таких условиях указывает показатель снижения уровня активности аланинтрансаминазы сыворотки крови, который проявился после 12 нед лечения. Полученные результаты одновременного лечения ВИЧ/СПИД-инфекции и ХГС свидетельствуют о том, что включение в схему лечения препарата фосфазид обеспечивает в отношении ВИЧ/СПИД-инфекции устойчивый терапевтический эффект, не сопровождающийся развитием явлений анемии с отсутствием необходимости отмены этого препарата. Одновременно с этим было установлено явление полной сочетаемости ежедневного введения фосфазид и рибавирина у такого рода пациентов [19].

В другом исследовании сравнивали применение фосфазид с абакавиром, зидовудином и ставудином в схемах АРВТ у больных, получающих лечение при ХГС [20].

Пациенты были распределены на 4 группы в зависимости от принимаемого нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (НИОТ) в составе комбинации антиретровирусных препаратов: 26 больных получали зидовудин 600 мг в сутки (в составе комбинированного препарата комбивир — зидовудин 300 мг + ламивудин 150 мг) («Виив Хелскер», Великобритания), 26 больных — абакавир 600 мг в сутки (в составе комбинированного препарата кивекса — абакавир 300 мг + ламивудин 150 мг) («Виив Хелскер», Великобритания), 28 больных — ставудин 60 мг в сутки («Эмкюр Фармасьютикалз Инк.», США) + ламивудин 300 мг в сутки («Виив Хелскер», Великобритания) и 29 больных — фосфазид 800 мг в сутки (ООО АЗТ ФАРМА К.Б., Россия) + ламивудин 300 мг в сутки. Третьим препаратом был ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы (ННИОТ) эфавиренз 600 мг в сутки («Мерк Шарп и Доум Б.В.», Нидерланды), который получали 49 (44,9%) больных, или бустированный ритонавиром 100 мг в сутки («Хетеро Драгс Лтд.», Индия) ингибитор протеазы (ИП) атазанавир 300 мг в сутки («Бристол-Майерс Сквипб Компани», США), дарунавир 800 мг в сутки («Янссен-Орто ЛЛС», Пуэрто-Рико), лопинавир 800 мг в сутки («Эбботт ГмбЧ и Ко. КГ», Германия) — 58 (53,3%) больных, 2 (1,8%) больных получали ингибитор интегразы (ИИ) ралтегравир 800 мг в сутки («Мерк Шарп и Доум Б.В.», Нидерланды).

Лечение гепатита проводили в соответствии с рекомендациями по лечению хронических гепатитов у больных ВИЧ-инфекцией [21, 22]. Продолжительность терапии определялась генотипом вируса гепатита С. Применяли пегилированный интерферон ($\alpha 2a$ -пегинтерферон (пегасис) («Хоффманн—ля Рош», Швейцария) в дозе 180 мкг/нед или $\alpha 2b$ -пегинтерферон (пегинтрон) в дозе

1,5 мг/кг/нед («Шеринг Плау», Ирландия) и рибавирин (ООО «Озон», Россия), дозировки которого в целях исключения лекарственного взаимодействия рибавирина с НИОТ рассчитывали исходя из 13,5 мг на 1 кг массы тела в сутки. Эффективность лечения ХГС оценивали по наличию РНК вируса гепатита С в сыворотке крови на 4-й неделе лечения: БВО на 8-й и 12-й неделе; ПРВО на 24-й и 48-й неделе (у больных с генотипом 1) и через 24 недели после окончания терапии — устойчивый вирусологический ответ (УВО).

В результате исследования было установлено, что доля больных с УВО достоверно больше в группах, получавших в составе схем АРВТ зидовудин (73,7%), ставудин (71,4%), фосфазид (65,0%), по сравнению с пациентами, получавшими абакавир (41,7%; $p < 0,05$). Связать эти результаты с большей долей больных, имеющих генотип вируса 1b в этой группе (53,8%) нельзя, так как в группе получавших в схеме фосфазид (51,7%) доля больных с генотипом 1 сопоставима с группой получавших абакавир.

Удельный вес больных, достигших БВО, был достоверно выше в группе фосфазид — 33,3% от числа достигших УВО по сравнению с пациентами (от 10 до 15%), получавшими другие НИОТ. Доля больных с ПРВО (из числа с УВО) достоверно больше в группах, получавших зидовудин (94,8%), ставудин (95,0%), фосфазид (94,6%), по сравнению с пациентами, получавшими абакавир (70,0%; $p < 0,05$).

Средние значения CD4+-лимфоцитов во всех группах пациентов в течение всего периода лечения были стабильны в пределах 350—415 кл/мкл. Комбинированный препарат кивекса, имеющий в составе абакавир, является самым дорогостоящим. В то же время зарегистрирована самая низкая эффективность противовирусной терапии ХГС при использовании в схеме АРВТ абакавира. Это в свою очередь требует повторного курса лечения пегилированными интерферонами и противовирусными препаратами.

Таким образом, фосфазид имеет преимущества перед другими нуклеозидными ингибиторами при лечении сочетанных инфекций (ВИЧ + ХГС).

Авторы работы [20] отмечают, что одним из факторов, способствующих более широкому использованию фосфазид, может стать комбинированный препарат, содержащий фосфазид и ламивудин. Такая комбинированная форма повысит комплаентность пациентов и сделает предпочтительным ее использование при лечении ХГС на фоне АРВТ ВИЧ-инфекции.

Другим важным аспектом, также социально значимым, является лечение ВИЧ/СПИД-инфекции у пациентов с одновременно протекающим туберкулезным процессом [23]. Это требует одновременного применения антиВИЧ- и противотуберкулезных лекарств. Совершенно очевидно, что эффективное лечение ВИЧ/СПИД-инфекции у такого рода пациентов приводит одновременно к повышению эффективности лечения туберкулеза легких.

Рассмотрим эффективность лечения ВИЧ/СПИД-инфекции у пациентов с одновременно протекающим туберкулезом при включении в схему высокоэффективной терапии ВИЧ-инфекции отечественного антиретровирусного препарата фосфазид. Данное клиническое исследование предполагает наличие двух групп пациентов. 1-я группа получала стандартную противотуберкулезную терапию в виде изониазида, пипразинамида, рифампицина и этамбутола, например в случае диссеминиро-

ванного туберкулеза легких. Такая терапия сочеталась с применением антиВИЧ-лекарств фосфазида, комбинируемого с известными антиВИЧ-лекарствами, нуклеозидными (диданозином и ламивудином), а также с нуклеозидным ингибитором эфавиренц. 2-я группа пациентов получала вместо фосфазида и диданозина комбивир и, естественно, стандартную противотуберкулезную терапию. Данное клиническое исследование выполняли в течение 6 мес. Его результаты четко указывают на постоянно прогрессирующее количество CD4+-лимфоцитов в сыворотке, которое наблюдалось у пациентов обеих групп. Количество CD4+-клеток в течение года увеличивалось в 3 раза у пациентов в обеих группах, например со 127 до 407 в 1-й группе и со 122 до 402 во 2-й группе, причем эффективность антиВИЧ-терапии стала проявляться по этому базовому показателю уже через 2 недели лечения, т. е. в 1-й группе пациентов, получавших фосфазад, и во 2-й группе пациентов, получавших комбивир. На фоне лечения у пациентов обеих групп установлено снижение вирусной нагрузки. Исходно количество РНК ВИЧ у пациентов 1-й группы пациентов, получавших фосфазад, было равно 798 993 РНК-копии в 1 мл. Во 2-й группе количество РНК ВИЧ было равно 1 397 344 РНК-копии в 1 мл. В обеих группах уже через 4 недели от начала специфической химиотерапии наблюдалось эффективное снижение количества вирусной РНК в обеих группах. Через 6 мес применения антиретровирусных препаратов у 13 (54,2%) пациентов 1-й группы количество вирусной РНК было ниже определяемого уровня, у пациентов 2-й группы такой эффект наблюдался у 11 (45,8%) пациентов. В этом контексте важно, что отсутствовала отмена АРВТ в 1-й группе, пациенты которой получали фосфазад по причине развития побочных эффектов. Во 2-й группе прекращение антиВИЧ-терапии имело место у 3 пациентов, у которых развились явления анемии, что, как известно, связано с приемом зидовудина. Спустя месяц после АРВТ у пациентов, получавших фосфазад, и в последующие 5 мес уровень гемоглобина был достоверно выше, чем в группе пациентов, получавших зидовудин. Иными словами, применение комбивира (АЗТ + ламивудин) вызывает явления угнетения гемопоэза, которое максимально выражено на 2-м и 3-м месяцах от начала АРВТ. Применение фосфазида, как указывают авторы этого обстоятельного исследования, не приводит к значительным нарушениям уровня клеток крови у ВИЧ-инфицированных пациентов с одновременным течением туберкулезного процесса. Важным итогом этого исследования стало то, что в результате применения ВААРТ наблюдалась положительная клиничко-рентгенологическая динамика по туберкулезу более чем у половины пациентов, а к концу стационарного лечения у большинства прекратилось бактериовыделение.

Важные результаты применения фосфазида (в сравнении с комбивиром) получены при его применении в химиопрофилактике вертикальной передачи ВИЧ-инфекции от матери к новорожденному [18]. В этом плане было предпринято исследование, включавшее 2 группы: 1-я группа — 18 беременных женщин, получавших фосфазад + ламивудин + лопинавир/ритонавир, а также зидовудин во время родового процесса, и зидовудин получали новорожденные. Во 2-ю группу вошли 18 беременных женщин, которые получали зидовудин + ламивудин + лопинавир/ритонавир, а также зидовудин во время родового процесса, и зидовудин получали но-

ворожденные. В обеих группах более чем у половины обследованных ВИЧ-инфицированных женщин (стадия 4А) обнаружены проявления кандидозного поражения слизистой оболочки полости рта. У 12 пациенток был диагностирован гепатит С. Все женщины родили живых детей. Родовой процесс протекал без осложнений. Случаев грудного вскармливания не было. Новорожденные дети через 6 и 12 недель были обследованы на наличие ВИЧ-инфекции с помощью стандартных процедур. Результаты анализа на ВИЧ были отрицательными у всех новорожденных в обеих группах. Следовательно, фосфазад, применяемый беременными женщинами, обеспечивал высокий лечебный химиотерапевтический эффект, блокируя передачу ВИЧ-инфекции от матери к новорожденному ребенку [24].

В другом исследовании проведено сравнение эффективности и безопасности использования фосфазида и зидовудина для профилактики перинатального инфицирования ВИЧ у 209 беременных, наблюдавшихся в 2000—2011 гг. в Нижегородском областном центре по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями (Мошкович Г.Ф., Минаева С.В.). Были сформированы следующие группы наблюдения:

— в 1-й группе 85 беременных получали АЗТ по 600 мг в сутки начиная с 14—16-й недели беременности;

— во 2-й группе 58 беременных получали фосфазад по 800 мг в сутки начиная с 14—16-й недели беременности;

— в 3-й группе 25 беременных получали АЗТ по 600 мг в сутки начиная с 26—28-й недели беременности;

— в 4-й группе 25 беременных получали фосфазад по 800 мг в сутки начиная с 26—28-й недели беременности;

— в 5-й группе 16 беременных получали профилактику с 14—16-й недели беременности АЗТ по 600 мг в сутки, затем, после снижения уровня гемоглобина ниже 110 г/л препарат был заменен на фосфазад по 800 мг в сутки. Чаще всего такое снижение регистрировалось на 24—28-й неделе беременности.

Анализировали динамику гематологических показателей. Самый высокий уровень гемоглобина в начале профилактики установлен в группе со сменой препарата (5-я группа) — среднее значение $113,8 \pm 4,6$ г/л, медиана 112 г/л. При этом в динамике в этой группе наблюдалось самое большое снижение на 26—28-й неделе до $93,6 \pm 5,3$ г/л (медиана 100), т. е. на 20 г/л, однако при смене препарата на фосфазад был достигнут самый высокий уровень на 36—38-й неделе — до $115,7 \pm 11,3$ г/л (медиана 124).

Коррекция анемии при необходимости всем беременным проводилась по общепринятой схеме — использовали препараты, содержащие железо (феррумлек, сорбифер), фолиевую кислоту, поливитамины. Необходимо отметить, что во всех группах химиопрофилактика начиналась при уровне гемоглобина на нижней границе норы либо ниже нормальных значений (120 г/л) при анемии легкой степени. Изменение количества тромбоцитов в течение наблюдения во всех группах было статистически незначимо и не выходило за границы нормальных значений. Также анализировали динамику биохимических показателей билирубина, аланинаминотрансферазы (АЛТ) и сахара крови. Независимо от принимаемого препарата и сроков начала профилактики динамика показателей была незначительной и находилась в пределах физиологической нормы, несмотря на то что в 3-й и 4-й группах пораженность хроническими

вирусными гепатитами достаточно высока. Прирост числа CD4-лимфоцитов был зарегистрирован во всех группах, наименьший — в 1-й группе (9 клеток), наибольший — в 5-й группе (27 клеток).

Вне зависимости от принимаемого препарата отмечено уменьшение вирусной нагрузки в процессе химио-профилактики. Наиболее значительное снижение вирусной нагрузки было достигнуто в группах беременных, получавших химиопрофилактику фосфазидом с 14-й недели, во 2-й группе (в 116 раз), а также начинавших с АЗТ и переведенных на фосфазид в 5-й группе (в 119 раз). Отмечено, что только при применении фосфазидом с 14-й недели был достигнут уровень вирусной нагрузки 365 копий, т. е. менее 1000 копий, значительно снижающий риск инфицирования плода и позволяющий провести родоразрешение через естественных родовые пути.

Риск заражения ребенка ВИЧ-инфекцией перинатальным путем при монотерапии как АЗТ, так и фосфазидом с 14—16-й недели беременности составил менее 2%, что соответствует международным критериям. Все гематологические (гемоглобин, тромбоциты) и биохимические показатели (общий билирубин, АЛТ, сахар крови) подтвердили безопасность фосфазидом. Применение в схемах химио-профилактики фосфазидом показало его хорошую переносимость. Динамика иммунологических показателей — уровня CD4-лимфоцитов — характеризовалась увеличением количества клеток в большей степени при применении фосфазидом по сравнению с зидовудином.

Авторы статьи считают, что использование в схемах химио-профилактики перинатального инфицирования ВИЧ препарата фосфазидом может быть рекомендовано с учетом его высокой эффективности и безопасности как препарата первого ряда или выбора [25].

Таким образом, накоплен большой практический материал в результате успешного применения фосфазидом в различных схемах ВААРТ ВИЧ-инфицированных пациентов, включая схемы, рекомендуемые особым группам пациентов, с анемией [17, 21, 26], беременным [16, 24, 25], с сочетанной инфекцией ВИЧ + ХГС [16, 19, 20], с ВИЧ-инфекцией и туберкулезом [23]. Имеются все основания для использования фосфазидом в схемах АРВТ первого ряда [21].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 6—9, 11—13, 17, 24 см. REFERENCES)

1. Тарусова Н.Б., Хорлин А.А., Краевский А.А., Корнеева М.Н., Носик Д.Н., Круглов Н.Б. и др. Подавление репродукции ВИЧ в культуре клеток 5'-фосфанатами 3'-азидо-2',3'-дидезокси-нуклеозидов. *Молекулярная биология*. 1989; 23(6): 1716—23.
2. Галегов Г.А., Корнеева М.Н., Носик Д.Н., Килессо Т.Ю., Краевский А.А. Азидотимидин и некоторые его аналоги как ингибиторы репродукции ВИЧ в культуре клеток. *Молекулярная биология*. 1988; 22(3): 802—6.
3. Килессо Т.Ю., Тарусова Н.Б., Атражева Е.Д., Куханова М.К., Шуленин С.В., Бобков А.Ф. и др. Сравнительный ингибиторный анализ биосинтеза ДНК, катализируемого ретровирусной обратной транскриптазой. *Биоорганическая химия*. 1990; 16(4): 531—6.
4. Селимова Л.М., Краевский А.А., Галегов Г.А. Комбинация фосфазидом и криксиваном ингибирует репликацию штаммов ВИЧ-1, резистентных к азидотимидину. *Доклады Академии наук*. 1999; 369(6): 847—9.
5. Покровский В.В., ред. *ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика, лечение*. М.: ГЭОТАР-Медицина; 2000.
6. Кравченко А.В. Применение никавира в составе антиретровирусной терапии. *Медицинская кафедра*. 2004; 2(10): 166—72.
7. Иванова Э.С., Воробьева Н.Н. Трехкомпонентная антиретровирусная терапия ВИЧ-инфекции с применением фосфазидом. В кн.: Орлов О.А., Корюкина И.П., ред. *Сборник материалов V (XIV) Международной научной конференции «Онкология — XXI век. Здоровье нации — XXI век»*. Сполето; 2010.
8. Кравченко А.В., Куимова У.А., Канстри В.Г., Ганкина Н.Ю., Серебровская Л.В. Применение препарата фосфазидом в схемах АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией и хроническим гепатитом С, получавших лечение ХГС. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(2): 64—72.
9. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В., Варлова Л.В., Горяева М.П., Гуляева С.С. Тихонова Е.В. Сравнительные исследования применения нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в схемах антиретровирусной терапии у больных, получающих лечение хронического гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(1): 34—9.
10. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Канстри В.Г., Афонина Л.Ю. и др. Протоколы диспансерного наблюдения и лечения больных ВИЧ-инфекцией. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2014; 6 (Прил): 1—43.
11. Барлетт Дж., Галлант Дж., Фам П. *Клинические аспекты ВИЧ-инфекции*. М.: Валент; 2012.
12. Пантелеев А.М., Голиусова М.Ю., Кабанова В.И. Результаты применения фосфазидом (никавира) у больных ВИЧ-инфекцией и туберкулезом. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2010; 2(2): 75—9.
13. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В. Результаты ретроспективного исследования применения фосфазидом и азидотимидина для профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребенку. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2013; 5(1): 90—6.
14. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В. Исследование применения фосфазидом в альтернативных схемах АРВТ у больных с ВИЧ-инфекцией. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2013; 5(4): 57—61.

REFERENCES

1. Barlett J.G., Gallant J.E., eds. *Medical Management of HIV Infection*. Baltimore: John Hopkins University; 2003.
2. DeClercq E. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992; 8(2): 119—34.
3. Krayevsky A.A., Watanabe K.A., eds. *Modified Nucleosides as Anti-AIDS Drugs. Current Status and Perspectives*. Moscow: Bioinform, 1993.
4. Tarusova N.B., Khorlin A.A., Kraevskiy A.A., Korneeva M.N., Nosik D.N., Kруглов N.B. et al. Inhibition of HIV reproduction in cell culture by 5'-phosphonates of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides. *Molekulyarnaya biologiya*. 1989; 23(6): 1716—23. (in Russian)
5. Galegov G.A., Korneeva M.N., Nosik D.N., Kилессо T.Yu., Kraevskiy A.A. The effect of 3'-azido-3'-deoxynucleosides on the reproduction of AIDS virus in cell culture. *Molekulyarnaya biologiya*. 1988; 22(3): 802—6. (in Russian)
6. Krayevsky A.A., Galegov G.A. The anti-HIV activity of nucleotide compounds. *Virology Review*. 1995; 5(4): 55—82.
7. Tarusova N.V., Krayevsky A.A., Korneyeva M.N., Galegov G.A. New phosphonate derivatives of nucleotides analogues as anti-HIV agents. *Collect. Czech. Chem. Commun*. 1990; 55: 133—6.
8. Martin E.J., ed. *The Nucleotide Analogs as Antiviral Compounds*. Washington D.C.: American Chemical Assotion; 1989.
9. Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): an antiviral agent that inhibit the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985; 82(20): 7096—100.
10. Kилессо T.Yu., Tarusova N.B., Aтражева E.D., Kуханова M.K., M.K., Shulenin S.V., Bobkov A.F. et al. Comparative inhibitory analysis of DNA biosynthesis catalyzed by retrovirus reverse transcriptase. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1990; 16(4): 531—6. (in Russian)
11. Krayevsky A.A., Tarusova N.B., Zhu Q.-Y., Vidal P., Chou T.C., Baron P. et al. 5'-Hydrogenphosphonates and 5'-methylphosphonates of sugar-modified pyrimidine nucleosides as potential anti-HIV-1 agents. *Nucleosides & Nucleotides*. 1992; 11(2-4): 177—96.
12. Tarusova N.B., Kуханова M.K., Krayevsky A.A., Karamov E.V., Lukashov V.V., Kornyalaeva G.V. et al. Inhibition of HIV reproduction by 5'-hydrogenphosphonates of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides. *Nucleosides & Nucleotides*. 1991; 10(1-3): 351—4.
13. Machardo J., Salomon H., Oliveira M., Tsoukas C., Krayevsky A.A., Wainberg M.A. Antiviral activity and resistance profile of phospho-

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

Поступила 24.05.16

Принята в печать 11.10.16

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1.083.2

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

ПРИРОДНЫЕ ОЧАГИ ГРИППА А В ЗАПАДНОЙ АРКТИКЕ

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

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

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

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

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

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

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

INFLUENZA A VIRUS IN THE WESTERN ARCTIC

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

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

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

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

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

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

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

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

Information about authors:

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

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

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 29 September 2016

Accepted 11 October 2016

Введение

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

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

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

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

Методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

определения бактериопланктона [13].

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

Результаты

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

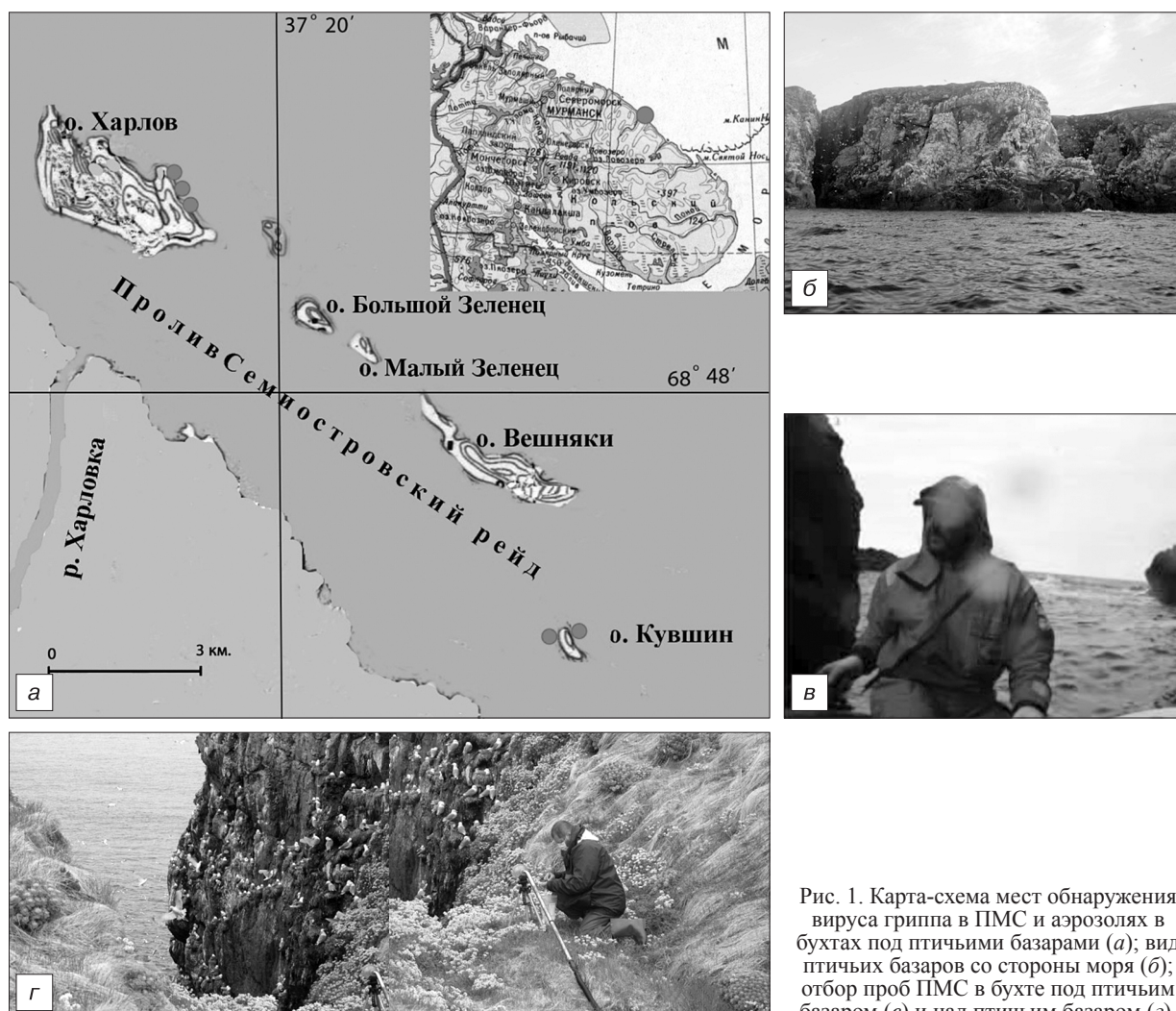


Рис. 1. Карта-схема мест обнаружения вируса гриппа в ПМС и аэрозолях в бухтах под птичьими базарами (а); вид птичьих базаров со стороны моря (б); отбор проб ПМС в бухте под птичьим базаром (в) и над птичьим базаром (г).

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

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

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

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

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

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

В случае вируса гриппа не была

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

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

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

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

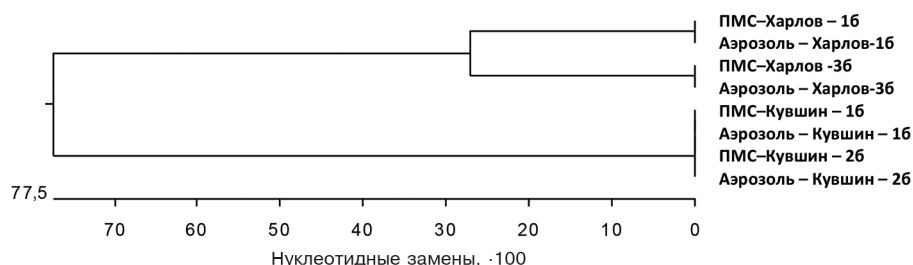


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма и таблица гомологии, построенные на основе данных выравнивания первичных последовательностей проб ПМС и морских аэрозолей в Леонтьевском базаре на о-ве. Харлов.

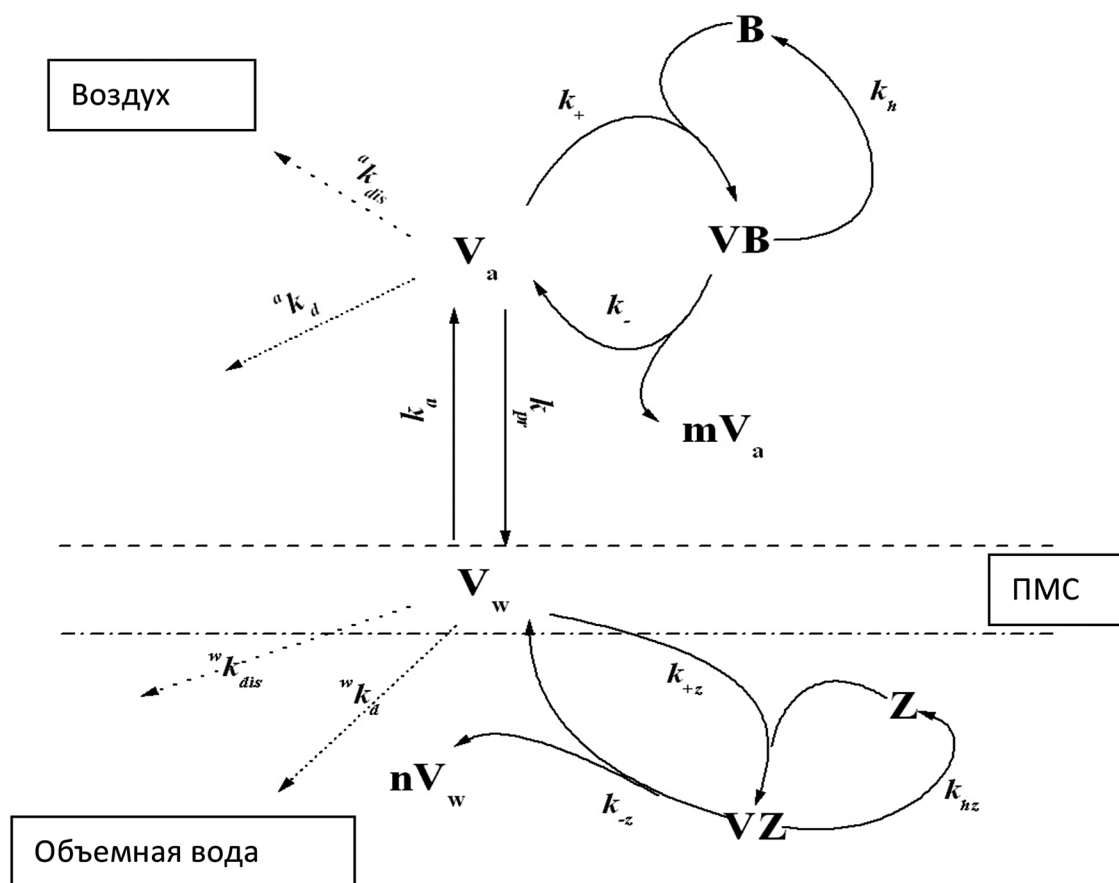


Рис. 3. Кинетическая схема взаимодействия вируса гриппа.
 V — вирус; Z — зоопланктон в ПМС; B — птицы; k — константы.

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

Обсуждение

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

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

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

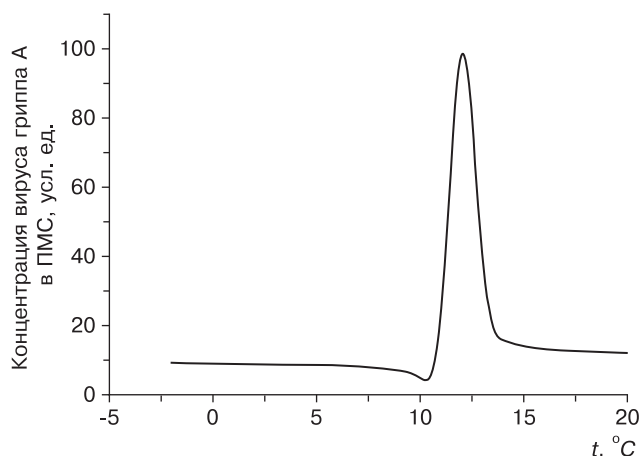


Рис. 4. Зависимость концентрации вируса гриппа А в ПМС от температуры согласно численному решению кинетической модели.

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

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

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

Данная схема описывает следующее кинетическое уравнение:

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

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

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

Заключение

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

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

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

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

REFERENCES

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

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

Поступила 29.09.16

Принята в печать 11.10.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.891:578.11.083.2

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

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА-АНТИГЕНА NS5A ВИРУСА ГЕПАТИТА С

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

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

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

Ключевые слова: вирус гепатита С; скрининг; банк; полимеразная цепная реакция; рэндом-праймер; антиген; продуцент; *E. coli*; NS5A.

Для цитирования: Кузнецова Т.В., Смирнова М.С., Леонович О.А., Гордейчук И.В., Бирюкова Ю.К., Зылькова М.В., Тын'о Я.Я., Белякова А.В., Шевелев А.Б. Разработка нового метода получения белка-антигена NS5A вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 17-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25>

Kuznetsova T.V.^{1,2}, Smirnova M.S.¹, Leonovich O.A.¹, Gordeichuk I.V.¹, Biriukova Iu.K.¹, Zylkova M.V.¹, Tyn'o Ya.Ya.¹, Belyakova A.V.¹, Shevelev A.B.¹

A NEW METHOD OF PRODUCING NS5A ANTIGEN OF HEPATITIS C VIRUS

¹Chumakov institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, 142782, Russian Federation;

²National institute of Public Health Development, Tallinn, 11619, Estonia

A task of creating a universal platform for engineering affordable recombinant producers of viral proteins conserving immunogenicity has not been solved yet. High toxicity of the viral proteins for the host cells, low yield and abnormal folding of the products often present severe obstacles to obtaining producers of the viral proteins. In this work, we report a new method of engineering and screening of deletion libraries from the viral antigen genes. This method allows selection of artificial derivatives of these genes adapted for expression in microbial producer cells. The method involves PCR amplification of the gene fragments using a system of randomized and adapter primers, which allows the spontaneous formation of duplexes from the random primers in the absence of the template DNA to be prevented. For selecting variants capable of *in vivo* expression, the obtained PCR products are cloned to a special vector of a direct phenotypical selection pQL30. It contains *E. coli* β -galactosidase gene with an inserted polylinker producing a frame-shift mutation. Using this screening method, an artificial variant of hepatitis C (HCV) NS5a gene with optimal biotechnological properties was established. 27 clinical specimens of 1670 bp long HCV 1b NS5a fragments were used as a source gene. A PCR bank of the deletion derivatives was produced. 40 LacZ-positive clones based on pQL30 vector with a 50-700 bp long insertion were selected. The LacZ activity of the cell lysates and the immunogenicity of the products were tested. As a result, a single clone encoding a soluble protein with Mr = 114 kDa was selected. Its yield reached 0.3% of the total cell protein. It was highly reactive with sera of HCV 1b infected patients but not with sera of the healthy donors.

К е у о р д с: hepatitis C virus; screening; library; PCR; random primer; antigen; producer; *E. coli*; NS5A.

For citation: Kuznetsova T.V., Smirnova M.S., Leonovich O.A., Gordeichuk I.V., Biriukova Iu.K., Zylkova M.V., Tyn'o Ya.Ya., Belyakova A.V., Shevelev A.B. A new method of producing NS5A antigen of hepatitis C virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 17-25. (In Russ.). DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-17-25)

For correspondence: Iulia K. Biriukova, Ph.D., Researcher of the laboratory of biotechnology, Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, 142782, Russian Federation. E-mail: kudykina_yuliya@mail.ru

Information about authors:

Kuznetsova T.V., <http://orcid.org/0000-0003-4394-7651>

Smirnova M.S., <http://orcid.org/0000-0001-9457-2445>

Leonovich O.A., <http://orcid.org/0000-0002-7463-1505>

Gordeichuk I.V., <http://orcid.org/0000-0002-3369-3638>

Biriukova Iu.K., <http://orcid.org/0000-0002-5804-4001>

Zylkova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-6699-1340>

Tyn'o Ya.Ya., <http://orcid.org/0000-0003-0041-6885>

Belyakova A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4363-6394>

Shevelev A.B., <http://orcid.org/0000-0003-3564-7405>

Acknowledgments. The study was supported within the framework of the Program for basic scientific research of the state academies of science for 2013-2017, Project No. 240 «Development of a new method for obtaining highly effective recombinant producers of virus antigens».

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

Received 18 April 2016

Accepted 24 May 2016

Введение

Доступность очищенных вирусных антигенов до настоящего времени является одним из ключевых факторов, определяющих возможности целенаправленного исследования вирусных инфекций. Они незаменимы для экспериментальной иммунизации животных, при исследовании иммунного ответа на инфекцию у заболевших, разработке и испытаниях вакцин и диагностических систем. Получение очищенных вирусных антигенов с помощью рекомбинантных продуцентов имеет долгую историю и рассматривается в качестве традиционного инструмента многих вирусологических лабораторий. Однако высокая токсичность большинства структурных и неструктурных вирусных белков для любых клеток-хозяев в сочетании с генетически детерминированным механизмом варибельности вирусов нередко создает непреодолимые препятствия для конструирования необходимых для исследований продуцентов вирусных белков.

Одним из способов решения этой задачи является расчленение целевого гена на фрагменты, оптимальные для экспрессии в бактериальных клетках, методом кон-

струирования и скрининга банка делеционных производных.

Получение серийных делеций — актуальная задача на протяжении последних 20 лет. Делеционные производные используются при секвенировании протяженных участков ДНК, выявлении полиморфизма генов с целью исследования структурно-функциональной организации белков и повышения уровня их продукции в гетерологических системах.

Предложен ряд методов создания серийных делеций с использованием экзонуклеазы III, нуклеазы Bal31, транспозонов и ДНКазы.

Исторически первым и в то же время популярным методом является применение экзонуклеазы III [1]. Существенные недостатки данного метода — односторонний характер делеций и большое количество исходной ДНК, необходимой для работы.

Использование нуклеазы Bal31 позволяет получить двусторонние симметричные делеции, но также требует значительное количество исходной ДНК.

Метод получения серийных делеций, основанный на транспозонном принципе [2], дает возможность полу-

чить банк с равномерной представленностью делеций. В качестве недостатков метода следует отметить нестабильность его работы и зависимость от реакций *in vivo*.

В литературе [3] также описан способ получения серийных делеций с помощью ПЦР в сочетании с удалением образующихся димеров случайных праймеров гель-фильтрацией на колонке с носителем сефадекса. Этот метод лишен недостатков ранее описанных методик, но хроматографическая очистка ПЦР-продуктов затруднена и сопровождается высокой степенью контаминации получаемого банка.

В рамках настоящей работы преследовалась цель выработки оптимального подхода к решению проблемы конструирования рекомбинантных продуцентов вирусных белков на базе *E. coli* и других микроорганизмов. Успех в достижении этой цели зависит от возможности идентификации в составе вирусных белков-антигенов структурных доменов, полностью сохраняющих иммуногенность, но лишенных токсичности при продукции в гетерологичных системах. Получение рекомбинантного белка-антигена с высоким выходом возможно при условии расчленения природного белка на минимальные фрагменты цепи (домены), обладающие способностью к автономному фолдингу. В качестве подходов к вычленению таких доменов в структуре белка может использоваться как рациональный дизайн генов, основанный на идентификации доменов, аналогичных структурным элементам ранее охарактеризованных белков различного происхождения, так и метод скрининга, основанный на конструировании и анализе банков делеционных производных полноразмерных генов вирусных антигенов.

В настоящее время имеется много данных, подтверждающих физиологическую значимость полиморфизма неструктурных антигенов вируса гепатита С (ВГС) [4–7]. В первую очередь этот эффект связывают с участием неструктурных антигенов NS5A и NS5B в снижении чувствительности инфицированных клеток к интерферону α . Этот механизм может в значительной мере определять как течение инфекции ВГС в отсутствие терапии, так и результативность применения терапевтических средств на основе интерферонов и индукторов их синтеза.

В то же время практическая возможность идентификации генотипа ВГС по гену NS5A в ходе клинического обследования остается ограниченной. В первую очередь это обусловлено сложностью идентификации физиологически значимых полиморфизмов, определяющих устойчивость вируса к интерферону, на фоне нейтральных замен. Не исключено, что многие пространственно удаленные полиморфные позиции функционально связаны и не могут быть идентифицированы изолированно. Кроме того, существенную практическую трудность представляет наличие в геномной РНК ВГС развитой вторичной структуры, препятствующей проведению ПЦР-анализа. Это приводит к неодинаковой эффективности амплификации кДНК, соответствующей различным генотипам NS5A. В итоге происходят искажения статистических данных о представленности в выборках тех или иных генотипов.

Альтернативу ПЦР для проведения массовых статистических обследований пациентов представляет твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА). Однако в настоящее время не существует коммерчески доступных наборов, позволяющих избирательно выявлять антительный ответ на переменные участки белка NS5A. Более

того, получение в очищенном состоянии полноразмерного белка NS5A для использования в серологических тестах затруднено сложностью его препаративной наработки с использованием рекомбинантных продуцентов. Перспективным решением для улучшения эффективности продукции белка NS5A в искусственных системах и одновременного конструирования панели «моноспецифичных» антигенов, соответствующих физиологически важным полиморфным позициям этого белка, является получение делеционных производных NS5A с использованием современной технологии иммунологического скрининга.

Целью данной работы была отработка нового высокоэффективного метода конструирования и скрининга делеционных банков и демонстрация возможностей этого метода на модели неструктурного белка NS5A ВГС.

Материал и методы

В работе были использованы 27 образцов кДНК гена NS5A—NS5B из ВГС генотипа 1b (GenBank accession number JX022751—JX022777) длиной 1670 п. н., наработанных с помощью ПЦР с праймерами 1b_6117_S_L (TCCCCACGCACTATGTGCC) и 1b_7780_AS_L (CGGTARTGGTTCGTCCAGGAC). Образцы перечисленных фрагментов кДНК были подвергнуты вторичной ПЦР-амплификации с целью накопления ДНК целевого гена NS5A—NS5B, объединены в пул и очищены с помощью набора Silica bead DNA gel extraction kit («Thermo Fisher Scientific») согласно протоколу производителя.

Очищенный ПЦР-продукт, содержащий целевой ген, в количестве 10 мкг разбавляли в объеме 80 мкл в буфере 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ восстановленного дитиотрейтола. Полученную смесь делили на 4 аликвоты объемом 20 мкл каждая. В первую пробирку вносили ДНКазу («Thermo Fisher Scientific») с активностью $1 \cdot 10^{-4}$ ед/мкл, тщательно перемешивали, и аликвоту полученного раствора объемом 2 мкл переносили во вторую пробирку. Операцию серийного разбавления ДНКазы с шагом 10 раз повторяли с третьей и четвертой пробирками. Время приготовления серии разбавлений ДНКазы не превышало 2 мин.

Подготовленную серию разведений инкубировали 20 мин при 37°C, после чего реакцию останавливали, внося в каждую пробирку по 20 мкл смеси водонасыщенного нейтрального фенола и хлороформа (1:1). Степень деградации ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле. Для дальнейшей работы объединяли и использовали образцы с видимой степенью деградации: концентрация ДНКазы равна $1 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ ед/мкл. Объединенную ДНК подвергали фенольной экстракции, осаждали изопропанолом в стандартных условиях и растворяли 10 мкл деионизированной воды.

К 10 мкл каждого образца добавляли 1 мкл (4 ед.) полимеразы 1 из *E. coli* в соответствующем буфере и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали фенольной экстракцией.

ДНК, полученную после фенольной экстракции, растворяли в воде и лигазном буфере общим объемом 30 мкл, добавляли ДНК-лигазу фага T4. Разделяли смесь на 3 равные порции по 10 мкл. В первую пробирку вносили 1 мкл (4 пмоль) праймера (*supl*, *supl-11* или *supl-17*), перемешав, переносили 2 мкл во вторую пробирку и затем 2 мкл - из второй в третью пробирку. Лигирование протекало в течение 14 ч при 4°C. Затем лигазную смесь использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймера-

ми *ES1* и *ES3*. Прохождение реакции оценивали электрофоретически.

ПЦР-продукт, полученный в предыдущей стадии, очищали с помощью набора Gel extraction kit («Thermo Fisher Scientific») согласно протоколу производителя. Очищенный продукт подвергали воздействию эндонуклеазы рестрикции BamHI при 37°C в течение 2 ч. Аналогичным образом обрабатывали плазмидную ДНК вектора pQL30. Лигирование проводили в течение 14 ч при 4°C. Клетки *E. coli* штамма TG1 трансформировали лигазной смесью и высевали на чашки со средой LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 0,05% X-gal. Из колоний с восстановленной активностью β-галактозидазы (синих) была выделена плазмидная ДНК. Наличие соответствующей вставки в клонках по сравнению с нереккомбинантным вектором pQL30 выявлялось с помощью ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC-for*. В качестве отрицательного контроля использовали нереккомбинантный вектор pQL30. Все отобранные клоны, представляющие собой производные штамма *E. coli* TG1 и несущие отобранные из банка плазмиды, использовали для наработки рекомбинантных белков. В качестве отрицательного контроля, не содержащего целевой вставки, был выбран продуцент полноразмерной β-галактозидазы *E. coli* (β-Gal) и ее слитые бифункциональные производные, содержащие гены лектинов из эндоплазматического ретикулума дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: pLacZ-emp46 и pLacZ-emp47.

Полученные продуценты (включая контрольные культуры) культивировали в течение 14 — 18 ч при 30°C в жидкой среде (0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина в пробирках объемом 10 мл с 3 мл среды в каждой. Индукцию промотора в клетках продуцента проводили добавлением IPTG до 1 мМ. Клетки собирали низкоскоростным центрифугированием и подвергали дезинтеграции встряхиванием со стеклянными шариками диаметром 0,5 мм. Для количественного определения активности β-галактозидазы по 100 мкл грубого клеточного лизата разделяли на растворимую и нерастворимую фракции, приведенные к эквивалентному объему (нерастворимую клеточную фракцию суспендировали в воде до объема 100 мкл). По 20 мкл растворимой и нерастворимой клеточных фракций от каждой полученной культуры смешивали с 50 мкл субстратной смеси, содержащей 0,02% X-gal, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,5. В качестве отрицательного контроля использовали клеточный лизат штамма TG1 (pQL30). Смесь инкубировали при 37°C в течение 2—4 ч, затем измеряли сигнал на спектрофотометре при длине волны (λ) 620 нм.

Выход целевого продукта оценивали при помощи электрофоретического разделения белков по Лэммли с последующим вестерн-блоттингом на нитроцеллюлозной мембране и детекцией целевого белка с использованием сывороток крови людей, инфицированных ВГС. Для этого грубый клеточный лизат центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Белки растворимой и нерастворимой клеточных фракций солибилизировали в 30 мкл буфера Лэммли и разделяли в 15% полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. После переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану и обратимого окрашивания перенесенных белков красителем Понсо С наблюдали полосу, соответствующую расчетной массе белка. Для блокировки неспецифического связывания инкубировали мембрану с перенесен-

ными на нее белками в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина, приготовленного на буфере PBS. Затем мембрану с белками инкубировали с пулом сывороток крови 7 пациентов, инфицированных ВГС генотипа 1b (общее разведение пулированной сыворотки в буфере PBST составило 1:300), и далее с вторичными антителами к IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (в PBST-буфере, разведение антител 1:10000). Окрашивание с диаминобензидином — ДАБ (до 0,1 мг/мл) проводили в буфере PBS в присутствии 0,01% пероксида водорода. Наблюдала полосу, соответствующую расчетной массе белка.

Результаты

Принцип нового метода получения серийных делеций состоит в возможности устранения ограничения метода ПЦР со случайной затравкой, состоящего в способности случайной затравки образовывать в растворе дуплексы, самопроизвольно размножающиеся при проведении ПЦР в отсутствие специфической ДНК-матрицы.

В первой стадии процедуры получают банк фрагментов исходного гена в форме смеси продуктов ПЦР, последовательно выполняя следующие операции:

— в случайные сайты целевого гена в форме линейного фрагмента ДНК вносят односторонние разрывы с помощью ограниченного гидролиза панкреатической дезоксирибонуклеазой I (ДНКазой I);

— расширяют бреши в сторону 5'-конца с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* в отсутствие дезоксирибонуклеотидтрифосфатов;

— выполняют отжиг синтетических олигонуклеотидов, имеющих на 3'-конце 6-, 11- или 17-членную случайную последовательность, а на 5'-конце — константный участок (20 нуклеотидов), предназначенный для отжига адаптерного праймера (случайные праймеры); ковалентно присоединяют случайные праймеры, соединившиеся с ДНК-матрицей за счет комплементарных взаимодействий, путем лигирования ДНК-лигазой фага T4;

— удаляют избыток не связанного с матричной ДНК случайного праймера путем батч-хроматографии на микропористом стеклянном сорбенте;

— проводят реакцию ПЦР с адаптерным праймером («однопраймерная» ПЦР).

Для оптимизации концентрации реагентов, нуждающихся в точных стехиометрических соотношениях с целью подбора желательной средней длины фрагментов делеционных производных, готовят серийные разведения панкреатической ДНКазы I и случайного праймера, объединяя продукты реакции, полученные в разных условиях. Для отбора делеционных производных, пригодных для экспрессии *in vivo*, полученные *in vitro* фрагменты (очищенные продукты ПЦР) подвергаются клонированию в вектор прямой селекции pQL30, содержащий ген β-галактозидазы *E. coli* со встроенным полилинкером с мутацией смещения трансляционной рамки считывания. Встройка делеционных производных целевого гена в полилинкер с определенной вероятностью приводит к восстановлению рамки, что позволяет визуально контролировать экспрессию белка в полученных клонках. Существенной особенностью предлагаемого метода является возможность отбора только тех фрагментов исходного гена, которые не только в силу восстановления непрерывности открытой рамки считывания, но и в силу своей последовательности, вторичной и третичной структуры кодируемого продукта обладают

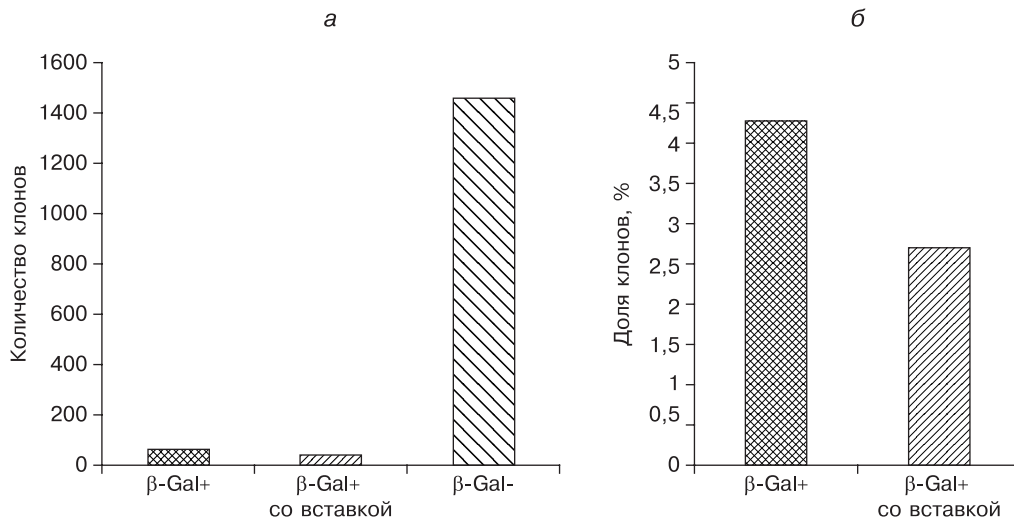


Рис. 1. Характеристика банка клонов, полученных на базе вектора pQL30.

a — распределение количества колоний в зависимости от уровня экспрессии гена LacZ, визуально оцененной в чашечном тесте на индикаторной среде с X-gal: β -Gal — колонии белого цвета, β -Gal+ — колонии синего цвета, β -Gal+ со вставкой — число колоний, несущих вставку целевого размера (более 100 п. н.) по результатам ПЦР. По оси ординат — количество клонов каждого типа; *b* — процентное отношение численности клонов со вставкой (β -Gal+) и клонов со вставкой целевого размера (β -Gal+ со вставкой) к общему числу клонов библиотеки. По оси ординат — процент клонов со вставкой в библиотеке.

способностью к высокоэффективной экспрессии в бактериальных клетках.

В качестве объекта для отработки метода получения и скрининга банков делеционных производных исполь-

зован ген неструктурного белка NS5A ВГС серотипа 1b. В отличие от оболочечных антигенов хантавирусов этот белок способен к продукции в клетках *E. coli*, однако накапливается в виде тел включения. Характерной особенностью большинства крупных неструктурных белков вирусов является многодоменность. NS5A является значимой мишенью естественного гуморального ответа на инфекцию ВГС у человека, однако не используется в качестве антигена в традиционных серологических тест-системах в связи с недостаточной охарактеризованностью эпитопов на фоне существенной штаммовой варибельности его последовательности.

ДНК целевого гена NS5A в форме линейного фрагмента получали с помощью ПЦР с праймерами 1b_6117_S_L (TCCCCACGCACTATGTGCC) и 1b_7780_AS_L (CGGTARTGGTTCGTCAGGAC) с использованием в

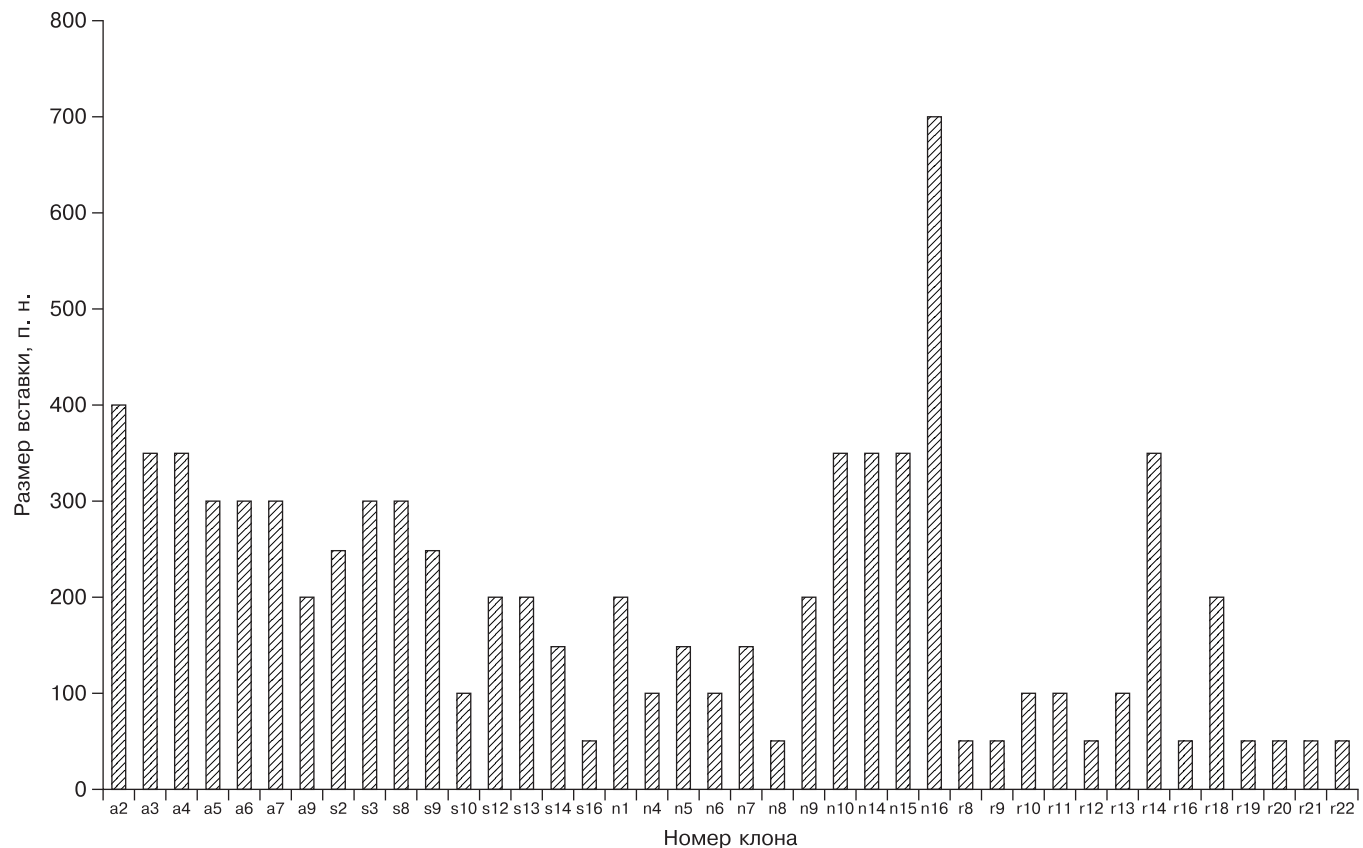


Рис. 2. Распределение величины вставки целевого гена внутри полученной библиотеки клонов по результатам ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC-for*. По оси ординат — величина вставки (п. н.); по оси абсцисс — номера клонов библиотеки.

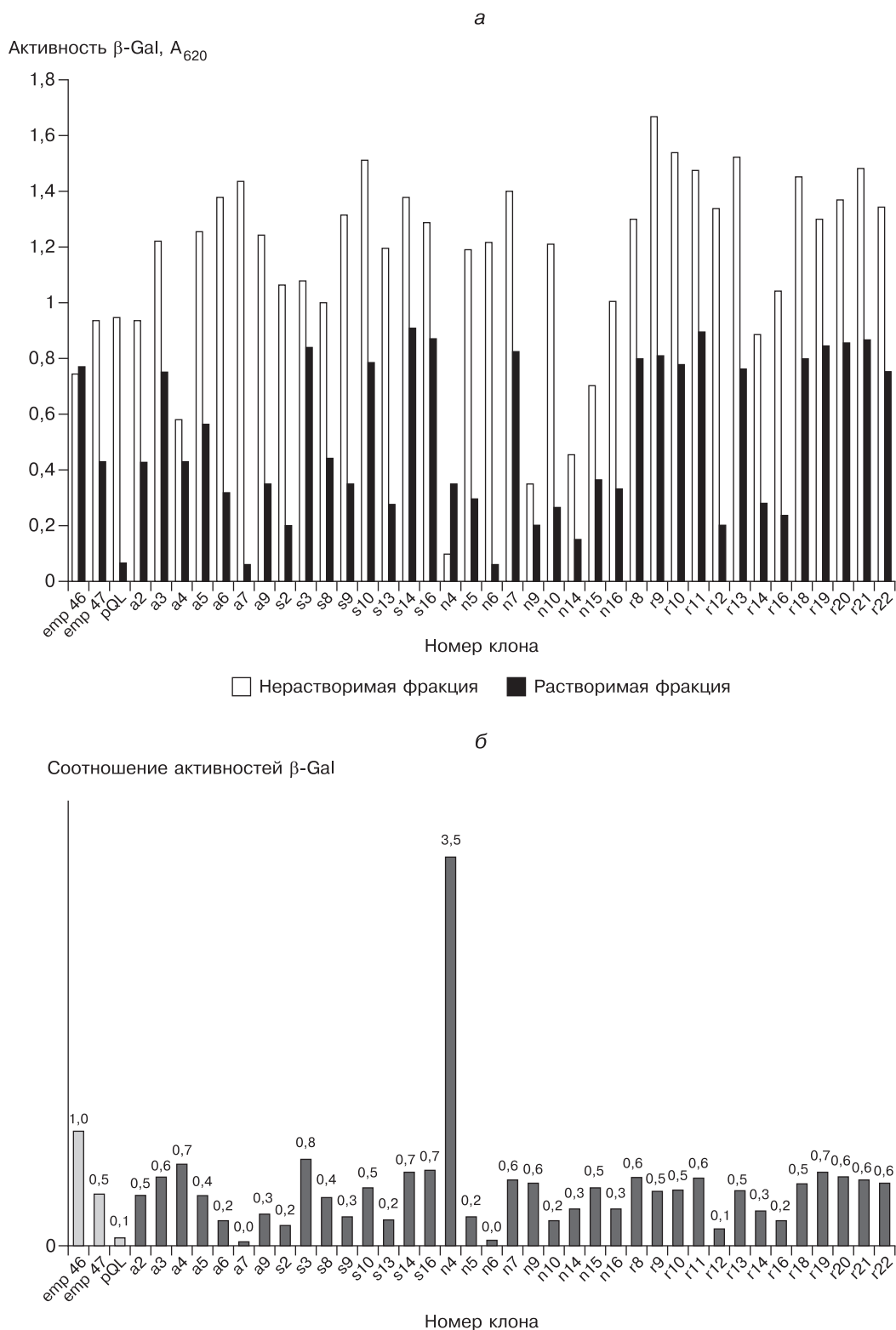


Рис. 3. Распределение активности β -галактозидазы в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях биомассы отобранных клонов.

а — активность β -галактозидазы в растворимой (темные столбцы) и нерастворимой (светлые столбцы) клеточных фракциях. По оси ординат — оптическая плотность при 620 нм (A_{620}); по оси абсцисс — номера клонов банка; *б* — соотношение суммарной активности β -галактозидазы в растворимой фракции по отношению к нерастворимой.

качестве матрицы смеси кДНК, полученной из РНК крови пациентов с ВГС серотипа 1b следующих групп: па-

циентов ($n = 9$), которые благодаря курсу комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином эффективно

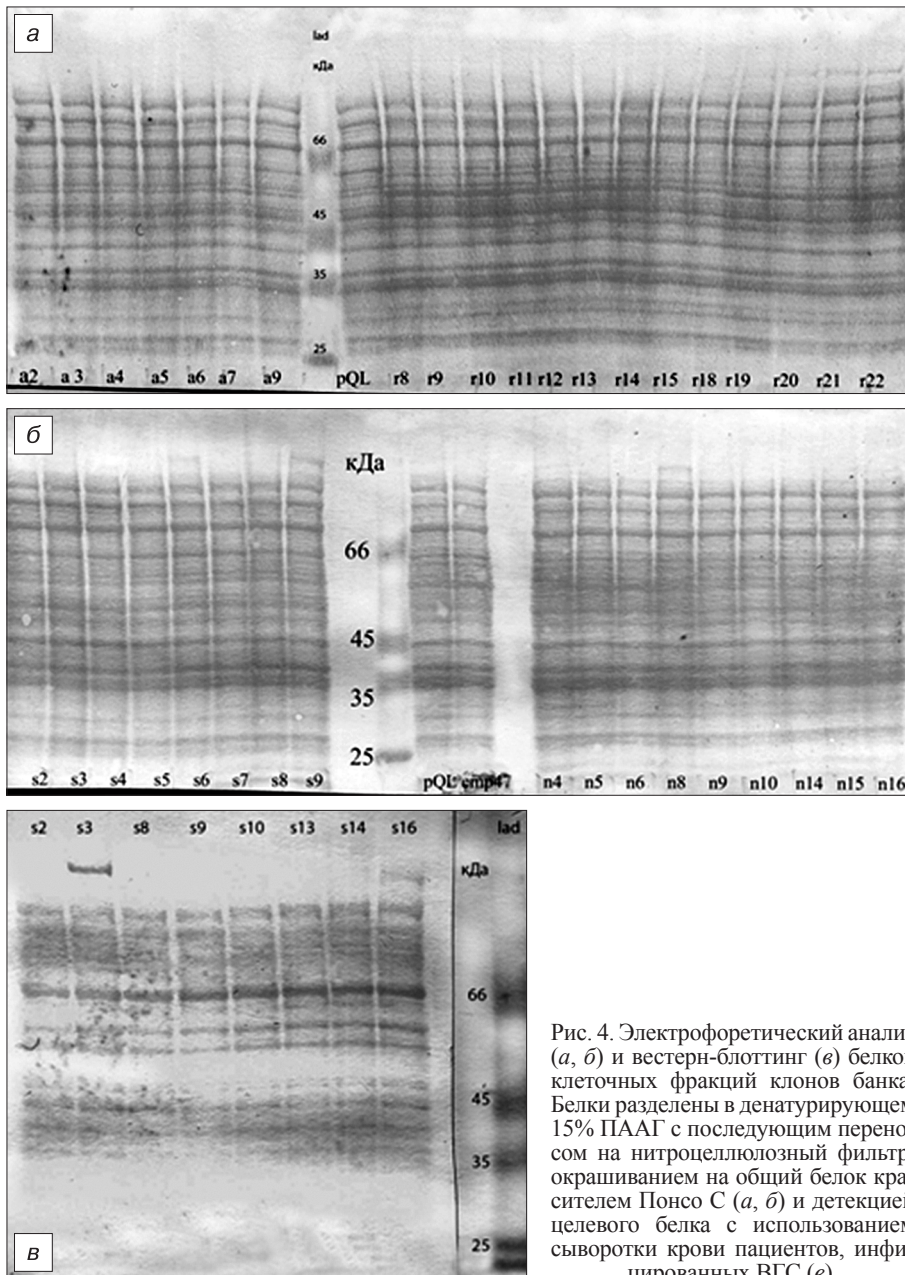


Рис. 4. Электрофоретический анализ (а, б) и вестерн-блоттинг (в) белков клеточных фракций клонов банка. Белки разделены в денатурирующем 15% ПААГ с последующим переносом на нитроцеллюлозный фильтр, окрашиванием на общий белок красителем Понсо С (а, б) и детекцией целевого белка с использованием сыворотки крови пациентов, инфицированных ВГС (в).

достигли статуса устойчивого вирусологического ответа (SVR); пациентов ($n = 9$), полностью устойчивых к комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином; пациентов ($n = 9$) с рецидивированием инфекции ВГС после комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином.

Продукт ПЦР очищали с помощью набора Silica bead DNA gel extraction kit («MBI Fermentas»), не используя препаративный электрофорез. Полученную смесь делили на 4 аликвоты и за счет серийного разбавления с шагом 10 раз подбирали концентрацию ДНКазы.

Подготовленную серию разведений инкубировали 20 мин при 37 °С, после чего реакцию останавливали, внося в каждую пробирку по 20 мкл смеси водонасыщенного нейтрального фенола с хлороформом (1:1). Степень деградации ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1,8% агарозном геле. Для дальнейшей работы объединя-

ли и использовали смесь образцов с заметной степенью деградации, но содержащих детектируемые количества ДНК. Для этого объединенную ДНК подвергали фенольной экстракции, осаждали изопропанолом в стандартных условиях и растворяли в минимальном объеме деионизированной воды.

ПЦР-продукт, полученный, как описано выше, очищали с помощью бесколоночной батч-хроматографии на стеклянном сорбенте. Очищенный продукт подвергали воздействию эндонуклеазы рестрикции *VamHI* при 37 °С в течение 2 ч и использовали для получения плазмидного банка на базе вектора pQL30. Банк скринировали визуально на индикаторной среде с X-gal (рис. 1, а). Для дальнейшей работы отбирали клоны, проявляющие активность β -галактозидазы (синяя окраска колоний на среде с X-gal). Результаты определения активности β -галактозидазы в колониях трансформантов учитывали примерно через 40 ч с момента окончания трансформации; температура культивирования 37 °С.

Все отобранные клоны анализировали:

- на размер вставки (рис. 2);
- на наличие β -галактозидазной активности в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях (рис. 3);
- на содержание специфической активности целевого белка в клетках продуцента (методом вестерн-блоттинга) (рис. 4).

Соотношение синих (с экспрессирующейся вставкой) и белых (без вставки или с неэкспрессирующейся вставкой) колоний в ходе описанного эксперимента составило 63:1460 (см. рис. 1, а).

Из колоний с восстановленной активностью β -галактозидазы была выделена плазмидная ДНК. Наличие соответствующей вставки в клонах по сравнению с нерекомбинантным вектором pQL30 определяли с помощью ПЦР со стандартными праймерами *pQE-for* и *pUC(M13)-for*. В качестве отрицательного контроля использовали нерекомбинантный вектор pQL30.

Таким образом, удалось отобрать 40 клонов с размером вставки, визуально превышающим контроль. Размер вставки колебался от 50 до 700 п. н. без существенных различий между группами. Статистические данные, характеризующие клоны банка, представлены на рис. 1, 2.

Все отобранные клоны, представляющие собой производные штамма *E.coli* TG1, несущие отобранные из банка плазмиды, использовали для наработки рекомбинантных белков. Клоны культивировали в течение 14–18 ч при 30 °С в жидкой среде (0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 0,5% NaCl) с добавлением 100 мкг/мл

ампициллина в пробирках объемом 10 мл с 3 мл среды в каждой. Индукцию промотора в клетках продуцента проводили путем внесения раствора IPTG до конечной концентрации 1 мМ.

В качестве отрицательного контроля, не содержащего целевой вставки, был выбран продуцент полноразмерной β -галактозидазы *E. coli* (β -Gal) и ее слитые бифункциональные производные, содержащие гены лектинов из эндоплазматического ретикула дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: pLacZ-emp46 и pLacZ-emp47.

Каждую из полученных культур отобранных клонов дезинтегрировали встряхиванием со стеклянными шариками диаметром 0,5 мм, разделяли гомогенат на водорастворимую и водонерастворимую фракции путем центрифугирования и определяли во фракциях активность β -галактозидазы, используя в качестве субстрата 0,02% X-gal и нормируя ее на содержание общего белка в гомогенате (см. рис. 3, а). Для каждого препарата вычисляли соотношение активности во фракциях (см. рис. 3, б), обращая внимание на клоны, обладающие максимальной активностью в растворимой фракции, поскольку хорошая растворимость продукта является показателем его эффективного фолдинга при синтезе рекомбинантными продуцентами.

Наличие целевого продукта во фракциях определяли также с помощью электрофореза и иммуноблоттинга с антителами сыворотки крови больных, инфицированных ВГС генотипа 1b. Этот метод выявил наличие иммунопозитивного белка массой ~114 кДа в растворимой фракции клона s3 группы SVR (см. рис. 4, б), содержание которого в растворимой клеточной фракции составило ~0,3% общего белка. Этот белок показал ярко выраженную реакцию с антителами пациентов, инфицированных ВГС, но не здоровых пациентов. В растворимых фракциях контрольных клонов с нерекombinantным вектором pQL30 и лизатах других исследованных клонов аналогичного продукта не наблюдалось.

Поскольку также установлена высокая доля активности β -галактозидазы в растворимой клеточной фракции клона s3 (см. рис. 3), данный клон был признан наиболее перспективным для использования в качестве источника укороченного варианта гена NS5A ВГС, имеющего оптимальные биотехнологические характеристики.

Обсуждение

Представленные данные свидетельствуют о том, что предложенный новый метод позволяет добиваться существенного снижения токсичности рекомбинантного продукта для клеток продуцента и улучшения фолдинга целевого продукта в гетерологичной системе. Актуальность этого объясняется высокой склонностью многих практически важных белков прежде всего вирусного происхождения образовывать агрегаты при попытках их продукции в клетках бактерий, а также токсичностью многих таких белков по отношению к клеткам рекомбинантного продуцента. Можно предполагать, что общей причиной такого поведения большинства вирусных белков, а также многих бактериальных антигенов, рецепторов и поверхностных белков клеток эукариот является наличие в их структуре двух доменов и более с выраженной связывающей способностью в отношении клеточных структур: липидных мембран, нуклеиновых кислот, белков, полисахаридов и др. Такая организация с большой вероятностью приводит к образованию в клетке рекомбинантного продуцента нежелательной сети

физических контактов, нарушающих нормальную передачу сигналов в цитоплазме. С точки зрения этой гипотезы расчленение генов природных белков на фрагменты, кодирующие изолированные глобулярные домены, может снизить общую токсичность мультидоменных белков, обеспечить повышение уровня их экспрессии в гетерологичных системах. Однако до настоящего времени не предложен универсальный эвристический подход к расчленению белка на изолированные домены, содержащиеся на флангах линкерные последовательности аминокислот небольшой протяженности, оптимальные для трансляции, котрансляционного фолдинга и релизинга продуктов из рибосом.

Предлагаемый подход нацелен на решение задачи расчленения целевого гена на фрагменты, оптимальные для экспрессии в бактериальных клетках, методом конструирования и скрининга банка делеционных производных. Этот подход позволяет работать с неохарактеризованными генами с неизвестной пространственной организацией продуктов. Эта задача особенно актуальна для большинства структурных и неструктурных вирусных антигенов, предварительные кристаллографические исследования которых затруднены из-за невозможности получения этих белков в нативной водорастворимой форме.

Характеризуя практическую ценность белка-антигена, получаемого с помощью сконструированного продуцента делеционного производного, необходимо отметить, что белок NS5A исследовался в ряде работ и показал свою ценность с точки зрения создания тест-систем для мониторинга течения инфекции ВГС. В частности, в работе [8] показано, что только 68% пациентов с подтвержденным диагнозом ВГС-инфекции имеют детектируемые титры антител к белку NS5A. В работе [9] наличие антител к белку NS5A в крови больных связывают с положительным прогнозом комбинаторной терапии ПЭГ-интерфероном/рибавирином. В работе [10] сообщается, что белок NS5A использовался в качестве одного из компонентов генно-инженерной вакцины. Однако во всех перечисленных исследованиях при выполнении серологических тестов оперировали пептидными антигенами. Очевидно, серологическая реакционная способность таких антигенов отличается от реакционной способности полноразмерных белков. В совокупности это доказывает, с одной стороны, сохраняющуюся неопределенность роли NS5A в патогенезе при ВГС-инфекции, а с другой — необходимость использования рекомбинантных белков для выяснения роли иммунного ответа против NS5A у пациентов.

Финансирование. Научно-исследовательская работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2017 гг., тема № 240 «Разработка нового метода получения высокоэффективных рекомбинантных продуцентов вирусных антигенов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Benkovic S.J., Putney S.D., Schimmel P.R. *Method for Degrading DNA*. Patent USA № 4521509; 1985.
2. Sugino Y., Morita M., Matuo Y., Uchida K. *Method for Producing DNA Nested Deletions by an in Vitro Reaction Using Transposase*. Patent USA № 6265159; 2001.
3. Whitcomb J.M., Rashtchian A., Hughes S.H. A new PCR based method for the generation of nested deletions. *Nucleic Acids Res.* 1993; 21(17): 4143—6.
4. Bouzgarrou N., Hassen E., Mahfoudh W., Gabbouj S., Schwoerer E.,

- Ben Yahia A. et al. NS5A(ISDR-V3) region genetic variability of Tunisian HCV-1b strains: Correlation with the response to the combined interferon/ribavirin therapy. *J. Med. Virol.* 2009; 81(12): 2021—8.
5. MacDonald A., Harris M. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(9): 2485—502.
 6. Muñoz de Rueda P., Casado J., Patón R., Quintero D., Palacios A., Gila A. et al. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J. Virol.* 2008; 82(13): 6644—53.
 7. Noguchi T., Tamori A., Ogura N., Hori Y., Ikeda S., Nishiguchi S. Investigation of interferon- α response by a single amino acid substitution of nonstructural protein 5A in hepatitis C virus-infected patients. *J. Interferon Cytokine Res.* 2011; 31(8): 589—99.
 8. Sillanpää M., Melén K., Porkka P., Fagerlund R., Nevalainen K., Lappalainen M. et al. Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection. *J. Virol.* 2009; 6: 84.
 9. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg M., Quiroga J. et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med Virol.* 2007; 79(6): 701—13.
 10. Swadling L., Capone S., Antrobus R.D., Brown A., Richardson R., Newell E.W. et al. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci. Transl. Med.* 2014; 6(261): 261ra153.

Поступила 18.04.16

Принята в печать 24.05.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.373:547.962.4].03:616.98:578.833.3]-084

Борисевич И.В.¹, Черникова Н.К.², Марков В.И.², Краснянский В.П.², Борисевич С.В.², Рождественский Е.В.²

ОПЫТ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДЕЙ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВА ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА

¹Центр планирования и координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 119002, г. Москва;

²ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад

Цель работы — оценка безопасности и эффективности специфического гетерологичного иммуноглобулина при однократном внутримышечном введении в целях экстренной профилактики геморрагической лихорадки Эбола. **Материалы и методы.** Иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей однократно внутримышечно вводили в качестве средства экстренной профилактики 28 лицам по эпидемическим показаниям после повреждения кожных покровов при работе с инфицированными материалами или контакта с зараженной кровью. Проведено клинико-лабораторное обследование 24 человек после однократного внутримышечного введения гетерологичного иммуноглобулина Эбола. Пробы сывороток крови людей исследовали на наличие иммуноглобулина Эбола и антител к лошадиному гамма-глобулину через 30 и 60 дней после экстренной серопротекции. **Результаты.** После проведения экстренной профилактики специфическим гетерологичным иммуноглобулином ни один человек не заболел лихорадкой Эбола. Клинико-лабораторное обследование не выявило ни одного случая развития аллергической реакции немедленного типа в ответ на введение препарата. Среди лиц с нормальным аллергологическим анамнезом количество местных реакций в ответ на проведение экстренной профилактики составило 31%, общих реакций в виде легкой сывороточной болезни — 13%. У лиц с неблагоприятным анамнезом при введении препарата на фоне десенсибилизирующей терапии реакций практически не было; при ее отсутствии местные реакции имели место у 50%, сывороточная болезнь легкой степени — у 17%, средней степени — у 33% указанных лиц. В целом при соблюдении правильной тактики применения иммуноглобулина количество местных и распространенных аллергических реакций замедленного типа составило 28 и 6%, развитие сывороточной болезни легкой степени зарегистрировано у 11% пациентов. Ожидаемый период невосприимчивости реципиента к вирусу лихорадки Эбола при экстренной профилактике специфическим гетерологичным иммуноглобулином составляет не более 30 сут. **Заключение.** Применение иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики эффективно и при соблюдении принципа десенсибилизации по показаниям относительно безопасно.

Ключевые слова: иммуноглобулин из сыворотки крови лошадей; эффективность; безопасность; экстренная профилактика; анафилактикогенность.

Для цитирования: Борисевич И.В., Черникова Н.К., Марков В.И., Краснянский В.П., Борисевич С.В., Рождественский Е.В. Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(1): 25-29.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-25-29>

Borisevich I.V.¹, Chernikova N.K.², Markov V.I.², Krasnianskiy V.P.², Borisevich S.V.², Rozhdestvenskiy E.V.²
**AN EXPERIENCE IN THE CLINICAL USE OF SPECIFIC IMMUNOGLOBULIN FROM HORSE BLOOD
SERUM FOR PROPHYLAXIS OF EBOLA HAEMORRHAGIC FEVER**

¹Centre for Research Planning and Coordination, Scientific Centre for Expertise of Medical Application Products, Moscow, 119002, Russian Federation;

²Central Research Institute № 48, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

Для корреспонденции: Черникова Наталья Константиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБУ «48 Центрального научно-исследовательского института» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад. E-mail: 48cni@mil.ru

The aim of this work was to estimate the efficacy and safety of single intramuscular introduction of specific heterologous immunoglobulin as prophylactic drug against Ebola hemorrhagic fever.

Materials and methods. The specific heterologous immunoglobulin was introduced as a special prophylactic drug to 28 patients in epidemic situations, after skin hurt with infectious materials or contact with infectious blood. Clinico-laboratory observation was performed in 24 subjects after single intramuscular introduction of heterologous immunoglobulin Ebola. The samples of blood serum were investigated for immunoglobulin Ebola and antibodies to horse gamma-globulin on the 30th and 60th days after prophylaxis.

Results. None of the subjects of the study contracted Ebola fever. There were no anaphylactic reactions after special prophylaxis with specific heterologous immunoglobulin. Among the subjects with normal allergic state 31% responded with local reactions; 13%, with a general reaction (mild case of the serum disease). Almost no reaction was observed in patients with unfavorable allergic state subjected to desensitizing therapy; in the absence of desensitizing therapy, 50% of patients with unfavorable allergic state exhibited local reactions; 17%, mild cases of the serum disease; 33%, moderate cases of the serum disease. In summary, if the tactics of immunoglobulin application was right, the quantity of local allergic reactions was 28%; of wide spread reactions, 6%. Weak serum disease was observed in 11% of the subjects. The prognostic period of resistance to Ebola fever was less than 30 days.

Conclusion. The prophylactic use of specific immunoglobulin from horse blood serum against hemorrhagic Ebola fever is effective and relatively safe in patients subjected to desensitizing therapy.

Key words: *specific immunoglobulin from horse blood serum; efficacy; safety; prophylactic use; anaphylactogenicity.*

For citation: Borisevich I.V., Chernikova N.K., Markov V.I., Krasnianskiy V.P., Borisevich S.V., Rozhdestvenskiy E.V. An experience in the clinical use of specific immunoglobulin from horse blood serum for prophylaxis of Ebola haemorrhagic fever. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 25-29. (In Russ.).

DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-25-29](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-25-29)

For correspondence: Natalya K. Chernikova, Professor, Candidate of Biological Sciences, Senior research scientist, Central Research Institute № 48, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 03 March 2016

Accepted 29 March 2016

Введение

Возбудитель геморрагической лихорадки Эбола является особо опасным вирусом, относящимся к I группе патогенности. Он вызывает у человека высококонтагиозное тяжелое и быстротечное инфекционное заболевание с летальностью до 90%. Заражение в основном происходит в результате прямого контакта с контаминированными материалами при попадании вируса на кожу и слизистые оболочки. Общий индекс контагиозности для незащищенного медицинского персонала составляет 81%, в семейных очагах — 23% [1]. Имеются данные, подтверждающие возможность аэрозольной передачи вируса Эбола от человека к человеку [2], данный путь заражения также экспериментально доказан на обезьянах [3, 4].

Ареал распространения вируса Эбола — зона влажных тропических лесов Центральной и Западной Африки, однако в условиях развития туризма, постоянного увеличения международных грузовых и пассажирских перевозок велика вероятность завозных случаев лихорадки Эбола в Россию из эндемичных стран. Крупные вспышки лихорадки Эбола перманентно регистрируют в странах Африки. Особую озабоченность международной общественности вызвала эпидемия 2014—2015 гг., которая охватила Гвинею, Сьерра-Леоне и Либерию, а затем распространилась на территорию Сенегала и Нигерии. По данным на 8 мая 2015 г., в результате эпидемии погибли более 11 тыс. человек и более 26 тыс. были инфицированы, включая 5 тыс. детей [5].

Средства профилактики и лечения лихорадки Эбола до сих пор практически отсутствуют. В Научно-исследовательском институте микробиологии МО РФ в 90-е годы XX столетия разработан иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкий [6]. Препарат был зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств и разрешен для

медицинского применения и промышленного выпуска в РФ (регистрационное удостоверение № 96/309/123/8) [7—9].

Имуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей высокоэффективен благодаря высокой специфической активности, его получение не сопряжено с риском контаминации ВИЧ, возбудителями гепатита С и других гемоконтактных инфекций, а объем выпуска не ограничен количеством донорской крови [6, 10—12]. Однако существенным недостатком препарата является анафилактикогенность, характерная для всех гетерологичных иммуноглобулинов. Применение иммуноглобулина против лихорадки Эбола особенно актуально в целях экстренной профилактики, поскольку любой контакт с возбудителем может быть приравнен к заражению. Наиболее эффективно его введение непосредственно после контакта с материалами, содержащими вирулентный штамм вируса, или с больным лихорадкой Эбола [6, 11].

Цель работы — оценка безопасности и эффективности специфического гетерологичного иммуноглобулина при однократном внутримышечном введении в целях экстренной профилактики геморрагической лихорадки Эбола.

Материал и методы

В период с 1996 по 1999 г. иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей был введен однократно в объеме 6 мл в целях экстренной профилактики 28 лицам в возрасте от 12 до 59 лет. Эффективность оценивали по отсутствию заболевания, безвредность — по результатам двухмесячного наблюдения (20 дней в условиях стационара) за 24 здоровыми лицами после однократного внутримышечного введения иммуноглобулина [13]. Обследование включало клинико-лабораторные исследования, а также определение в

крови пациентов остаточного уровня лошадиного иммуноглобулина и антител к гамма-глобулину из сыворотки крови лошадей методом количественного твердофазного иммуноферментного анализа (ТФИФА) через 30 и 60 сут после введения.

Реакции на введение иммуноглобулина классифицировали как немедленные, наступившие сразу после инъекции (с 4-х по 6-е сутки) и отдаленные (через 2 нед и позднее).

Тактику введения препарата определяли на основании анамнеза и уровня сенсибилизации человека к лошадиному иммуноглобулину по результатам внутрикожной пробы. 16 из 24 человек ранее не получали препараты лошадиной сыворотки и имели отрицательную реакцию на внутрикожную пробу, поэтому иммуноглобулин вводили без десенсибилизирующей терапии. В анамнезе 8 человек отмечено применение гетерологичных сывороточных препаратов. Двум из них, показавшим положительную реакцию на внутрикожную пробу, иммуноглобулин вводили на фоне десенсибилизирующей терапии (10% раствор глюконата кальция внутримышечно и 30 мг преднизолона внутримышечно), 6 пациентам с неблагоприятным анамнезом, но отрицательной пробой — без сопровождающих средств.

Статистическую обработку данных проводили согласно общепринятым методам [14].

Результаты

Об эффективности иммуноглобулина свидетельствует отсутствие заболевания лихорадкой Эбола после экстренной профилактики у 28 человек. Трех из них иммуноглобулин ввели в связи с повреждением кожных покровов при работе с животными или культурой клеток, инфицированными вирулентным вирусом Эбола (штамм Заир), одному — после контакта с предположительно инфицированной вирусом Эбола кровью, 24 — по эпидемическим показаниям.

Результаты клинико-лабораторного обследования 24 лиц (табл. 1) показали, что при профилактическом введении специфического иммуноглобулина не отмечено ни одной выраженной реакции немедленного типа. В 1-й группе из 16 человек (ранее гетерологичные препараты из сыворотки крови лошадей не вводили) 5 (31%) ответили на инъекцию иммуноглобулина только кожной местной реакцией замедленного типа: на 5—6-е сутки пациенты жаловались на зуд в области инъекции, который у 4 человек регистрировали в течение 2—3 последующих суток, у пятого — в течение 5 сут. У двух других лиц из

данной группы отмечены общие реакции: у одного из них наблюдали повышение температуры тела до 37,1°C на следующие сутки после инъекции, на 9-е сутки в месте введения препарата появилась сыпь по типу крапивницы (площадь высыпания 10 × 10 см), у другого на 5-е сутки регистрировали зуд и сыпь уртикарного характера, на 6-е сутки — тахикардию (ЧСС 120 в минуту), боли в области желчного пузыря, обострение хронического холецистита и, наконец, болезненность и ограничение подвижности в области правого коленного сустава (анализ крови на 14-е сутки после применения иммуноглобулина выявил увеличение СОЭ (18 мм/ч) и незначительное повышение количества палочкоядерных нейтрофилов. Обоим пациентам поставлен диагноз «сывороточная болезнь в легкой форме», симптомы которой купировали применением супрастина и диклофенака. Кроме того, у 1 из 16 человек при отсутствии реакции кожи в месте введения препарата наблюдали обострение хронического холецистита, сопровождающееся появлением сыпи на теле на 9-е сутки после инъекции с одновременным подъемом температуры тела до 37,1°C. По словам пациента, такие явления у него бывали и ранее при изменении характера питания, что ставит под сомнение обусловленность данных изменений специфическим иммуноглобулином. Помимо перечисленных реакций, у 1 из 16 пациентов на 2-е сутки после введения препарата регистрировали повышение температуры тела до 37,2°C и развитие острого респираторного заболевания, а у другого на 9-й день однократно регистрировали боль в области грудины. Остальные 6 из 16 человек не имели жалоб. Следовательно, в 1-й группе у 31% обследованных лиц отмечены местные аллергические реакции слабого характера, у 13% они переросли в общие реакции в виде сывороточной болезни легкой степени тяжести. Реакция одного пациента оценена как сомнительная.

Во 2-й группе лиц из 8 человек с отягощенным анамнезом у двух внутрикожная проба была положительной, поэтому иммуноглобулин им ввели на фоне десенсибилизирующей терапии. В результате у одного пациента аллергической реакции на препарат не было, а у другого в течение 3 сут, начиная с 6-х суток после инъекции, наблюдали реакцию в виде уртикарной сыпи на теле, которая исчезла после применения супрастина.

У 6 пациентов с неблагоприятным анамнезом, которым препарат вводили без десенсибилизирующего прикрытия, реакции на лошадиный белок были выражены сильнее. У трех из них развилась местная кожная аллергическая реакция на 2—6-е сутки после инъекции,

Таблица 1

Реактогенность иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей при клиническом применении

Анамнез в группе лиц	Десенсибилизация	Число пациентов	Клинические проявления, %			
			аллергические замедленные реакции		сывороточная болезнь	
			местные	распространенные	легкой степени	средней степени
Нормальный	Отсутствовала	16	31	0	13	0
Неблагоприятный*	Имела место	2	0	50	0	0
Неблагоприятный*	Отсутствовала	6	50	0	17	33
Всего по трем группам...	—	24	33	4	13	8
При правильной тактике экстренной профилактики	—	18	28	6	11	0

Примечание. Здесь и в табл. 2: * — в анамнезе отмечено применение препаратов из сыворотки крови лошадей.

Таблица 2

Уровень антител к лошадиному гамма-глобулину у людей после применения иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей

Анамнез в группе лиц	Уровень сероконверсий к лошадиному гамма-глобулину, %		Титр ИФАт	
	через 30 сут	через 60 сут	через 30 сут	через 60 сут
Нормальный	58	87	1:25	1:160
Неблагоприятный*	71	71	1:2540	1:160
Всего...	62	82	1:2540	1:160

у четвертого — сывороточная болезнь легкой степени тяжести, у пятого — сывороточная болезнь средней тяжести (сливная сыпь по всему телу, субфебрильная температура на 7-е и 8-е сутки, отек Квинке, увеличение и болезненность паховых лимфоузлов, тахикардия, боли в суставах верхних и нижних конечностей), у шестого — также сывороточная болезнь средней степени тяжести с начинающимся отеком Квинке, осложнившаяся полиартритом и обострением миокардита.

В целом по всем группам количество местных кожных реакций составило 33%, распространенных местных реакций — 4%, общих реакций в виде сывороточной болезни — 21% (из них легких 13% и средней степени тяжести 8%). Если исключить группу из 6 человек, которым, несмотря на неблагоприятный анамнез, иммуноглобулин вводили без предварительной десенсибилизации (заведомо неправильная тактика экстренной профилактики), количество местных и распространенных кожных реакций составило 28 и 6% соответственно, общих реакций в виде сывороточной болезни легкой степени — 1%, сывороточной болезни средней тяжести не зарегистрировано.

Результаты клинико-лабораторного обследования через 2 мес после введения иммуноглобулина (общий и биохимический анализы крови, ЭКГ, осмотр врачами-специалистами) свидетельствовали об отсутствии на тот момент влияния специфического иммуноглобулина на состояние здоровья пациентов. Исключением стал 1 человек с отягощенным анамнезом, которому иммуноглобулин ввели без десенсибилизирующей терапии, в результате чего развилась сывороточная болезнь средней степени тяжести, осложнившаяся полиартритом и обострением миокардита. Этот факт еще раз подтверждает необходимость выбора правильной тактики введения гетерологичных иммуноглобулинов при выявлении в анамнезе человека сенсibilизации или факта применения препаратов из сыворотки крови лошадей.

Проведенный анализ проб сывороток крови не выявил даже следовых количеств лошадиного иммуноглобулина через 30 и 60 дней после проведения экстренной серо-профилактики, что согласуется с данными литературы о периоде катаболизма гетерологичных иммуноглобулинов у здоровых людей [12].

Результаты определения антител к гамма-глобулину из сыворотки крови лошадей у людей после введения иммуноглобулина Эбола представлены в табл. 2. Они свидетельствуют о серологической перестройке в виде появления ИФА-антител (ИФАт) у большинства обследованных (через 1 мес 62%, через 2 мес — 82%). Медиана титров указанных антител через 30 сут достоверно выше в группе лиц, ранее получавших инъекцию сы-

вороточных препаратов, однако к 60-м суткам (срок наблюдения) уровень титров в обеих группах уравнивался. У 2 человек (которым серо-профилактику проводили без десенсибилизирующей терапии при неблагоприятном анамнезе), отреагировавших сывороточной болезнью средней степени тяжести, титры антител достигали 1:40 960. Напротив, у одного из лиц, ответивших положительной внутрикожной пробой, после инъекции иммуноглобулина на фоне антигистаминных препаратов титры антител на 30-е и 60-е сутки отсутствовали.

Обсуждение

В результате исследования подтверждена эффективность иммуноглобулина против лихорадки Эбола для людей в качестве средства специфической профилактики в ситуациях, сопряженных с риском заболевания лихорадкой Эбола. Несмотря на более выраженную анафилактикогенность по сравнению с гомологичными сывороточными препаратами, гетерологичные специфические иммуноглобулины остаются востребованными, поскольку они являются единственным средством защиты от новых особо опасных вирусных инфекций, против которых средства активной профилактики еще не разработаны, а получение гомологичных иммуноглобулинов невозможно. Клинические результаты совпадают с данными литературы о частоте реакций после применения препаратов лошадиной сыворотки, согласно которым количество случаев сывороточной болезни может достигать 16—20% [12, 15]. О.Г. Анджапаридзе и соавт. показали, что после введения гетерологичного специфического коммерческого иммуноглобулина 43 здоровым лицам они отвечали развитием сывороточной реакции легкой степени тяжести (сыпь и зуд в области инъекции и незначительное повышение температуры тела) в 16,1% случаев, средней степени в 4,6% случаев, тяжелой степени в 2,3% случаев, а подъем температуры тела выше 38°C зафиксировали у 20,9% пациентов [10].

Частота и тяжесть клинических реакций на введение специфических иммуноглобулинов из сыворотки крови лошадей зависят от показателей, характеризующих как качество самого препарата, так и реактивность организма, в частности его предшествующую специфическую и неспецифическую сенсibilизацию. В первую очередь к группам риска относятся лица, ранее получавшие сывороточные препараты из крови лошадей. Повторное введение гетерологичных иммуноглобулинов может сопровождаться нежелательными осложнениями, по этой причине перед их введением необходимо обязательное определение индивидуальной чувствительности организма к белкам лошадиной сыворотки крови. Осложнения в ответ на гетерологичный иммуноглобулин могут возникнуть и при первичном введении лицам, страдающим различными аллергическими заболеваниями или сенсibilизированным другими антигенами, в связи с чем необходимо изучить анамнез на предмет наличия у пациентов любых проявлений аллергии.

Соотношение между риском причинения вреда здоровью и эффективностью использования противовирусных специфических иммуноглобулинов свидетельствует в пользу экстренной профилактики опасных геморрагических лихорадок с помощью этих препаратов [11, 16].

Заключение

Таким образом, профилактическое применение гетерологичного иммуноглобулина против лихорадки

Эбола целесообразно в случаях высокого риска инфицирования, т. е. при любых контактах с возбудителем, которые практически всегда ведут к заражению человека. Его использование в качестве средства экстренной профилактики эффективно, относительно безопасно и допустимо в условиях медицинского учреждения при строгом соблюдении рекомендаций по применению и принципов предварительной десенсибилизации по показаниям.

Ожидаемый период невосприимчивости реципиента к вирусу лихорадки Эбола при экстренной профилактике иммуноглобулином против этого заболевания из сыворотки крови лошадей составляет не более 30 сут после введения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—5 см. REFERENCES)

1. Борисевич С.В., Храмов Е.Н., Ковтун А.Л., ред. *Неэндемические и экзотические вирусные инфекции: этиология, диагностика, индикация и профилактика*. М.: Комментарий; 2014.
2. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Краснянский В.П., Градобоев В.Н., Лебединская Е.В., Потрываева Н.В. и др. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1995; (6): 270—3.
3. Государственный Реестр лекарственных средств. М.: Минздрав России; 1996.
4. ФСП 42-0102-0242-00 и ФС 42-0030-00 на иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкий. М.: Минздрав России; 2000.
5. Инструкция по применению иммуноглобулина против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкого. М.: Минздрав России; 2001.
6. Анджапаридзе О.Г. *Серопрофилактика и серотерапия вирусных инфекций в эксперименте и клинике*. М.: Медицина; 1968.
7. Маркин В.А., Михайлов В.В., Краснянский В.П., Борисевич И.В., Фирсова И.В. Разработка принципов экстренной профилактики и лечения лихорадки Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1997; (1): 31—4.
8. Медуницин Н.В. *Вакцинология*. М.: Триада-Х; 2004.
9. Хмелев А.Л., Борисевич И.В., Черникова Н.К., Махлай А.А., Михайлов В.В., Яковлев А.К. и др. Оценка безопасности профилактического использования иммуноглобулинов против вирусных геморрагических лихорадок из сывороток крови лошадей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; (6): 103—6.
10. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Ленинград: Медгиз; 1962.
11. Сняк К.М., Жарко Т.Р., Вернер О.М. *Пособие по медицинским иммунологическим препаратам*. Киев: Здоров'я; 1992.
12. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Евсеев А.А. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок. *Вопросы вирусологии*. 2006; 51(5): 8—16.
1. Borisevich S.V., Khramov E.N., Kovtun A.L., eds. *The Non-Endemic and Exotic Viral Infections: Etiology, Diagnosis, Indication and Prophylaxis [Neendemicheskie i ekzoticheskie virusnye infektsii: etiologiya, diagnostika, indikatsiya i profilaktika]*. Moscow: Kommentariy; 2014. (in Russian)
2. Roels T.H., Bloow A.S., Buffington J., Muhungu G.L., Mac Kenzie W.R., Khan A.S. et al. Ebola hemorrhagic fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: risk factors for patients without a reported exposure. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(Suppl. 1): S92-7.
3. Johnson E., Jaax N., White J., Jarling P. Lethal experimental infections of rhesus monkeys by aerosolized Ebola virus. *Int. J. Exp. Pathol.* 1995; 76(4): 227—36.
4. Jaax N., Jarling P., Geisbert T., Geisbert J., Steele K., McKee K. et al. Transmission of Ebola virus (Zair strain) to uninfected control monkeys in biocontainment laboratory. *Lancet.* 1995; 346(8991-8992): 1669—71.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Ebola (Ebola Virus Disease). Available at: <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html>
6. Borisevich I.V., Mikhaylov V.V., Krasnyanskiy V.P., Gradoboev V.N., Lebedinskaya E.V., Potryvaeva N.V. et al. Development and study of the properties of the immunoglobulin against fever Ebola. *Voprosy virusologii*. 1995; (6): 270—3. (in Russian)
7. The State Register of Medicines. Moscow: Minzdrav Rossii; 1996. (in Russian)
8. Pharmacopeial article enterprises 42-0102-0242-00 and Pharmacopeial article 42-0030-00 on immunoglobulin against fever Ebola from blood serum of horses, liquid. Moscow: Minzdrav Rossii; 2000. (in Russian)
9. Instruction for the use of immunoglobulin against Ebola from blood serum of horses, liquid. Moscow: Minzdrav Rossii; 2001. (in Russian)
10. Andzhaparidze O.G. *Seroprevention Serotherapy and Viral Infections in Experimental and Clinical [Seroprofilaktika i seroterapiya virusnykh infektsiy v eksperimente i klinike]*. Moscow; 1968. (in Russian)
11. Markin V.A., Mikhaylov V.V., Krasnyanskiy V.P., Borisevich I.V., Firsova I.V. Development of the principles of emergency prevention and treatment of Ebola. *Voprosy virusologii*, 1997; (1): 31—4. (in Russian)
12. Medunitsin N.V. *Vaccinology [Vaksinologiya]*. Moscow: Triada-X; 2004. (in Russian)
13. Khmelev A.L., Borisevich I.V., Chernikova N.K., Makhlay A.A., Mikhaylov V.V., Yakovlev A.K. et al. The safety assessment of preventive use of antibodies against viral hemorrhagic fevers from the blood serum of horses. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; (6): 103—6. (in Russian)
14. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statistical Methods in Microbiological Research [Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh]*. Leningrad: Medgiz; 1962. (in Russian)
15. Snyak K.M., Zharko T.R., Verner O.M. *Allowance for Medical Immunological Medications [Posobie po meditsinskim immunologicheskim preparatam]*. Kiev: Zdorov'ya; 1992. (in Russian)
16. Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Khamitov R.A., Maksimov V.A., Evseev A.A. Epidemiology, prevention, symptoms and treatment of hemorrhagic fevers. *Voprosy virusologii*. 2006; 51(5): 8—16. (in Russian)

Поступила 03.03.16

Принята в печать 29.03.16

Пуховская Н.М.¹, Морозова О.В.^{2,3}, Белозерова Н.Б.¹, Бахметьева С.В.¹, Высочина Н.П.¹, Здановская Н.И.¹, Иванов Л.И.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМОВ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ КОМАРОВ И КЛЕЩЕЙ

¹ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора, 680037, г. Хабаровск;

²ФГБУ «Федеральный центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА России, 119435, г. Москва

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) штамм Лазо MP36 выделен из пула комаров *Aedes vexans*, отловленных в районе имени Лазо Хабаровского края в августе 2014 г. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности полноразмерного генома штамма Лазо MP36 (номер доступа в GenBank KT001073) показал его соответствие дальневосточному типу ВКЭ и отличия от штаммов: от клещей *Ixodes persulcatus* P. Schulze, 1930 (вакцинного штамма 205 (JX498939) и выделенных в 2012—2013 гг. штаммов Хехцир 1230 (KF880805), Чичаговка 1222 (KP844724), Биробиджан 1354 (KP844726)); от комаров (штамма Мальшево, изолированного в 1978 г. от *Aedes vexans nipponii* (KJ744034), и штамма Сахалин 6-11 сибирского типа ВКЭ, выделенного из пула комаров в 2011 г. (KF826916)); из мозга погибших людей (вакцинного штамма Софьин (KC806252), Глубинное/2004 (DQ862460), Кавалерова (FJ402885), Светлогорье (GU121642)). Пептид слияния, необходимый для проникновения флавивирусов в клетки, у трех штаммов ВКЭ, выделенных от комаров, — Лазо MP36, Мальшево и Сахалин 6-11 — сохранил каноническую структуру 98-DRGWGNHCGFLFGKGS-113 для флавивирусов, переносимых клещами. Аминокислотная замена H104G, типичная для флавивирусов, переносимых комарами, не обнаружена. Последовательности нетранслируемых областей генома штаммов ВКЭ от комаров гомологичны на 85—98% штаммам всех типов ВКЭ без рекомбинации с флавивирусами, переносимыми комарами и выявляемыми на территории Дальнего Востока России. Вторичные структуры 5'- и 3'-нетранслируемых областей генома, а также последовательности циклизации типов А и В консервативны у всех изолятов ВКЭ вне зависимости от биологических хозяев или переносчиков. Сходство структур геномов изолятов ВКЭ от комаров, клещей и больных людей при патогенности изолятов ВКЭ от комаров для новорожденных лабораторных мышей и их цитопатическом действии для культур клеток животных могут свидетельствовать о возможной роли комаров в качестве случайных или дополнительных переносчиков вируса.

Ключевые слова: флавивирусы, переносимые клещами и комарами; филогенетический анализ полноразмерных кодирующих областей геномов; пептид слияния; нетранслируемые области; последовательности циклизации.

Для цитирования: Пуховская Н.М., Морозова О.В., Белозерова Н.Б., Бахметьева С.В., Высочина Н.П., Здановская Н.И., Иванов Л.И. Сравнительный анализ геномов штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных от комаров и клещей. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 30-35.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-30-35>

Pukhovskaya N.M.¹, Morozova O.V.^{2,3}, Belozerova N.B.¹, Bakhmetyeva S.V.¹, Vysochina N.P.¹, Zdanovskaya N.I.¹, Ivanov L.I.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENOMES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS STRAINS ISOLATED FROM MOSQUITOES AND TICKS

¹Khabarovsk Antiplague Station, Khabarovsk, 680037, Russian Federation;

²Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

³Federal Research Clinical Center of Physico-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russian Federation

The tick-borne encephalitis virus (TBEV) strain Lazo MP36 was isolated from the pool of mosquitoes *Aedes vexans* collected in Lazo region of Khabarovsk territory in August 2014. Phylogenetic analysis of the strain Lazo MP36 complete genome (GenBank accession number KT001073) revealed its correspondence to the TBEV Far Eastern subtype and differences from the following strains: 1) from ticks *Ixodes persulcatus* P. Schulze, 1930 [vaccine strain 205 (JX498939) and strains Khekhtzir 1230 (KF880805), Chichagovka (KP844724), Birobidzhan 1354 (KF880805) isolated in 2012-2013]; 2) from mosquitoes [strain Malyshevo (KJ744034) isolated in 1978 from *Aedes vexans nipponii* in Khabarovsk territory; strain Sakhalin 6-11 isolated from the pool of mosquitoes in 2011 (KF826916)]; 3) from human brain [vaccine strain Sofjin (JN229223), Glubinnoe/2004(DQ862460), Kavalero (DQ862460), Svetlogorie (DQ862460)]. The fusion peptide necessary for flavivirus entry to cells of the three TBEV strains isolated from mosquitoes (Lazo MP36, Malyshevo and Sakhalin 6-11) has the canonical structure 98-DRGWGNHCGFLFGKGS-113 for the tick-borne flaviviruses. Amino acid transition H104G typical for the mosquito-borne flaviviruses was not found. Structures of 5'- and 3'-untranslated (UTR) regions of the TBEV strains from mosquitoes were 85-98% homologous to the TBEV strains of all subtypes without recombination with mosquito-

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунологии Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: omorozova2010@gmail.com

borne flaviviruses found in the Far East of Russia. Secondary structures of 5'- and 3'-UTR as well as cyclization sequences (CS) of types A and B are highly homologous for all TBEV isolates independently of the biological hosts and vectors. Similarity of the genomes of the TBEV isolates from mosquitoes, ticks and patients as well as pathogenicity of the isolates for new-borne laboratory mice and tissue cultures might suggest a possible role of mosquitoes in the TBEV circulation in natural foci as an accidental or additional virus carrier.

Key words: tick-borne and mosquito-borne flaviviruses; phylogenetic analysis of complete coding regions of genomes; fusion peptide; untranslated regions; cyclization sequences.

For citation: Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Belozeroва N.B., Bakhmetyeva S.V., Vysochina N.P., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I. Comparative analysis of genomes of tick-borne encephalitis virus strains isolated from mosquitoes and ticks. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 30-35. (In Russ.).

DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2017-62-1-30-35](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-30-35)

For correspondence: Olga V. Morozova, Dr. Sci. (Biol.), Senior research scientist, Laboratory of immunology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation.

E-mail: omorozova2010@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 14 March 2016

Accepted 29 March 2016

Введение

Семейство флавивирусов включает патогенные для человека и животных РНК-содержащие вирусы. Представителей рода *Flavivirus* традиционно делят на 3 группы: переносимые комарами, клещами и без известного переносчика. Их стабильная циркуляция в природных популяциях среди многочисленных позвоночных и беспозвоночных резервуарных хозяев не поддается регулируемому контролю [1]. В последние годы в мире обнаружили много флавивирусов, специфичных только для насекомых (insect-specific flaviviruses — ISFV), которые не могут реплицироваться в культурах клеток млекопитающих, поэтому их патогенность остается неизвестной, но ДНК-копии фрагментов их геномов обнаружены в составе хромосом комаров [2]. У членистоногих обнаружены вирусы, подобные флавивирусам (flavi-like viruses) по размерам, структурам и организации геномов с наиболее консервативными генами *NS3* и *NS5*, со сходной стратегией репликации, имеющие общего древнего предшественника [3]. Число флавивирусов, специфичных только для млекопитающих (mammal-only pegivirus-heracivirus group), также увеличивается [3]. Молекулярные маркеры флавивирусов, переносимых комарами и клещами, включают пептид слияния (fusion peptide) [4] и последовательности циклизации (cyclization sequences — CS) вблизи 5'- и 3'-концов геномной РНК [5].

В России наиболее распространен и изучен вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который с 1937 г. считали флавивирусом, переносимым клещами. Клещи являются основными переносчиками и резервуарными хозяевами ВКЭ благодаря разнообразию их прокормителей среди позвоночных, внутриклеточному перевариванию крови, длинному жизненному циклу, превышающему продолжительность жизни мелких млекопитающих, а также трансвариальной и трансстадиальной передаче ВКЭ. Спонтанная инфицированность вирусом выявлена для 16 видов иксодовых клещей [6, 7].

Цель данной работы состояла в выделении, идентификации и сравнительном молекулярно-генетическом анализе ВКЭ от комаров.

Материал и методы

Сбор комаров. В 2014 г. комаров отлавливали в Вяземском районе и районе имени Лазо Хабаровского

края. Виды комаров определяли по морфологическим признакам [8]. Было сформировано 38 пулов комаров в зависимости от вида, времени и места сбора [9]. Пул комаров *Aedes vexans*, из которого был изолирован штамм Лазо МР36, собран в августе 2014 г. в окрестностях с. Киинск района имени Лазо (47°59' с. ш., 134°47' в. д.).

Выделение ВКЭ. Новорожденным мышам ICR 1—2-дневного возраста интрацеребрально и подкожно вводили осветленные центрифугированием гомогенаты пулов комаров [9]. Последующее пассирование осуществляли также на новорожденных мышках-сосунках. Штамм Лазо МР36 был выделен от комаров в сентябре 2014 г.

Выделение РНК проводили с использованием набора для экстракции ДНК/РНК из сыворотки (плазмы) крови производства НПО «Литех» (Москва).

Обратную транскрипцию (ОТ) выполняли с использованием набора «Реверта L» производства ООО «ИнтерЛабСервис», г. Москва.

ПЦР проводили с праймерами [10, 11] и набором «АмплиСенс PCR» («ИнтерЛабСервис», г. Москва) с использованием амплификатора MyCycler («Bio-Rad Laboratories Headquarters», США).

Определение нуклеотидных последовательностей продуктов ОТ-ПЦР из мозговых суспензий второго пассажа ВКЭ осуществляли с праймерами для ПЦР [10, 11] и набором BigDye 3.1 с применением автоматического анализатора ДНК модели ABI 3500 («Applied Biosystems», США). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей выполняли при помощи программного обеспечения Mega 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>) с использованием 5 альтернативных алгоритмов при 1000 репликаций [12].

Результаты

В 2014 г. выделен штамм Лазо МР36 из пула комаров *Aedes vexans*, собранных в районе имени Лазо Хабаровского края в период снижения весенне-летней активности иксодовых клещей и низкой заболеваемости населения этого региона клещевым энцефалитом [13; GenBank KT001073]. Филогенетический анализ полно-размерных кодирующих областей геномов ВКЭ показал сходство штамма Лазо МР36 со штаммами ВКЭ дальневосточного типа (рис. 1). Совпадение топологии филогенетических деревьев с применением 5 альтерна-

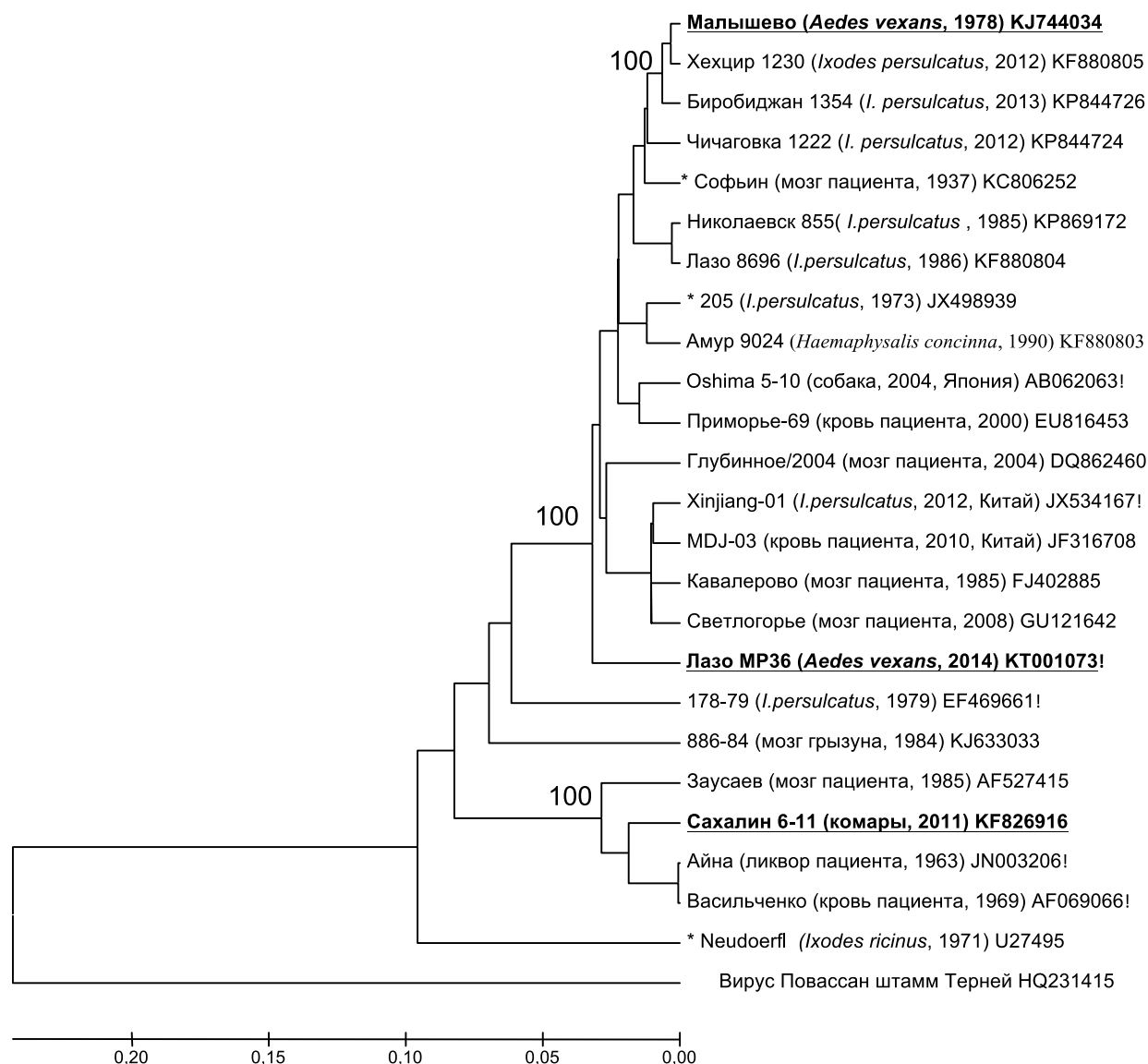


Рис. 1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов, выделенных от комаров (подчеркнуты), клещей и пациентов (вакцинные штаммы дальневосточного и европейского типов отмечены звездочками) и относящихся к 5 генетическим типам ВКЭ (дальневосточному (1), европейскому (2), сибирскому (3), 178-79 (4) и 886-84 (5)), с помощью программного обеспечения Mega 6.06 [12], алгоритм UPGMA, 1000 репликаций. Внешняя группа — штамм Терней вируса Повассан, выделенный из мозга погибшего пациента на Дальнем Востоке России в 2006 г

тивных алгоритмов и высокие индексы поддержки кладиических групп свидетельствуют о кластеризации вне зависимости от времени, места выделения штаммов и переносчика или хозяина ВКЭ. Штамм Лазо МР36 дальневосточного типа ВКЭ отличается от штаммов, выделенных нами в 2012—2013 гг. в Хабаровском крае (Хехцир 1230 (KF880805), Чичаговка 1222 (KP844724)) и Еврейской автономной области (Биробиджан 1354 (KP844726)), находящихся в одной группе с вакцинным штаммом Софьин, изолированным в пос. Обор района имени Лазо Хабаровского края в 1937 г. Штамм Лазо МР36 также отличается и от штаммов, выделенных в 1985—1990 гг. в Хабаровском крае (Николаевск 855 (KP869172) и Лазо 8696 (KF880804)), Амурской области (Амур 9024 (KF880803)), и от штамма Ошима 5-10 из Японии (AB062063) с группой филогенетически близких ему приморских штаммов (Приморье-69

(EU816453) и других) [10]. Несмотря на филогенетическую близость генома Лазо МР36 к третьей группе дальневосточных штаммов из Китая (Xinjiang-01 (JX534167), MDJ-03 (JF316708)), а также штаммам из России Глубинное/2004 (DQ862460), Кавалерово (JQ650523) и Светлогорье (GU121642), выделенным от погибших людей в Приморье, достоверного родства также не отмечено. В то же время штамм Малышево от комаров [14; номер доступа в GenBank KJ744034] также дальневосточного типа ВКЭ филогенетически близок выделенным от клещей в 2012 г. штаммам Чичаговка 1222 (места сбора комаров и клещей в окрестностях озера Петропавловское Хабаровского края), Хехцир 1230 и вакцинному штамму Софьин. Третий штамм, изолированный из пула комаров, Сахалин 6-11 [15; GenBank KF826916], относится к подтипу Айна сибирского типа ВКЭ (см. рис. 1).

Сравнение пептида слияния флавивирусов, переносимых клещами и комарами

Флавивирусы	Пептид слияния
Переносимые комарами без вируса Денге	DRGWGN G CGLFGKGS I
Денге 1	DRGWGN G CGLFGKGS L
Денге 2	DRGWGN G CGLFGKGS I
Денге 3	DRGWGN G CGLFGKGS L
Денге 4	DRGWGN G CGLFGKGS V
Переносимые клещами:	
БКЭ (штаммы от клещей, позвоночных и больных людей)	DRGWGN H CGLFGKGS I
штамм Малышево (1978) от <i>Aedes vexans</i>	DRGWGN H CGLFGKGS I
штамм Сахалин 6-11 (2011) от комаров	DRGWGN H CGLFGKGS I
штамм Лазо МР36 (2014) от <i>Aedes vexans</i>	DRGWGN H CGLFGKGS I
Повассан и вирус оленей	DRGW H N G CGFFGKGS I
Флавивирусы, специфичные для насекомых (ISFV):	
вирус Чаоянг	DRGWGN G CGLFGKGS M
вирус Чаоянг изолят HLD115 (JQ308185)	DRGWGN G CGLFGKGS M
вирус Чаоянг штамм ROK144 (JQ068102)	DRGWGN G CGLFGKGS M
вирус Чаоянг штамм Deming (FJ883471)	DRGWGN G CGLFGKGS M
<i>Aedes flavivirus</i> strain: Toyama-26 (AB488421)	DRLASQ H YHVRD S LK S G
<i>Culex flavivirus</i> (NC_008604)	DRT F PRIP K VH G V K IS G

Примечание. Серым фоном выделены аминокислотные остатки (а. о.) глицина и гистидина, характерные для консервативного пептида слияния флавивирусов, переносимых комарами и клещами соответственно. Жирным шрифтом выделены а. о., отличающиеся от канонической структуры пептида слияния флавивирусов.

Сравнение пептида слияния штаммов БКЭ, выделенных от комаров и клещей

Проникновение флавивирусов в клетки опосредуется консервативным пептидом слияния, состоящим из 16 аминокислотных остатков (а. о.) в домене II гликопротеина оболочки вирионов E. Консервативность канонической структуры пептида слияния необходима для проникновения в клетки эволюционно удаленных беспозвоночных и позвоночных хозяев вируса с последующими рН-зависимыми конформационными изменениями [4]. Пептид слияния всех штаммов БКЭ, выделенных от комаров, клещей, позвоночных хозяев или больных людей, сохраняет идентичную структуру DRGWGNHCGLFGKGS**I**, характерную для флавивирусов, переносимых клещами без аминокислотных замен (см. таблицу). В пептиде слияния флавивирусов, специфичных для насекомых (ISFV), а. о. G104 соответствует структурам этого пептида для флавивирусов от комаров, а M113 является характерным только для флавивирусов Чаоянг (см. таблицу). Необходимо отметить отсутствие канонической структуры пептида слияния в полипротеинах-предшественниках flavi-like вирусов (см. таблицу).

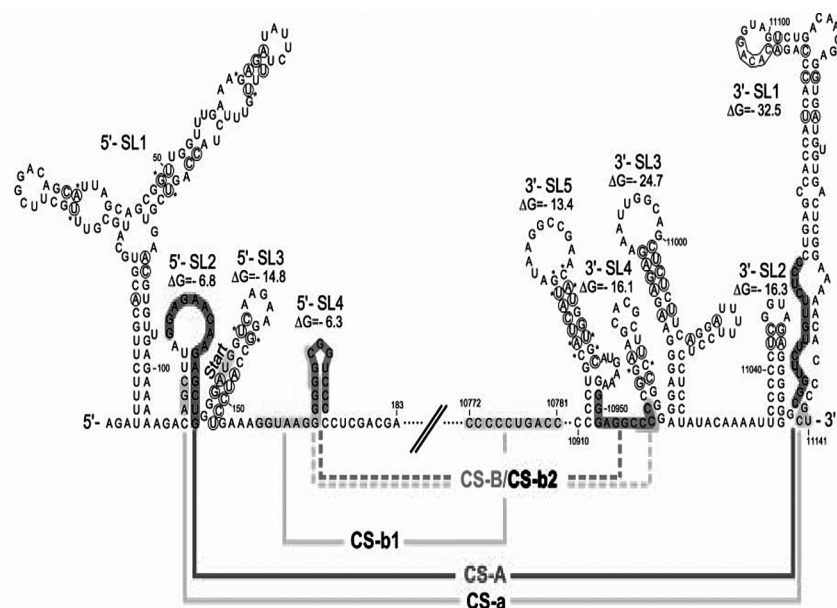
Сравнение нетранслируемых областей генома и последовательностей циклизации штаммов БКЭ, переносимых комарами

При 85—98% гомологии нуклеотидных последовательностей нетранслируемых областей генома штаммов БКЭ, выделенных от комаров, клещей, млекопитающих или больных людей, 3'-нетранслируемая область (untranslated region (UTR)) штамма Лазо МР36 составляет 727 нуклеотидных остатков (н.о.) с мини-делециями 1—2 н.о. при множественном выравнивании с аналогичными последовательностями других штаммов и не содержит ни протяженных делеций, ни олиго(А)-трактов в гипервариабельной области непосредственно после терминирующего кодона. Для двух других штаммов БКЭ от комаров последовательности 3'UTR не депонированы в GenBank. Многочисленные термодинамически выгодные вторичные структуры 3'UTR штамма Лазо МР36, построенные с применением альтернативных алгоритмов, имеют $\Delta G = -115,25 \div -110,47$ с выраженной шпильечно-петлевой архитектурой (рис. 2). Необходимо отметить протяженные делеции в 3'UTR штаммов Софьин, Глубинное/2004, MDJ-03 и Лазо 8696 (данные не представлены).

Последовательности циклизации 5'-CS-A и 3'-CS-A штамма Лазо МР36 БКЭ идентичны описанным для вакцинного штамма Найдорф, выделенного в 1971 г. от *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758 и относящегося к эволюционно удаленному европейскому типу вируса [5] (см. рис. 2). Для двух других штаммов БКЭ от комаров эти структуры расположены вне депонированных полных кодирующих областей генома (coding sequence (CDS)). Для второй пары CS-B, локализация которой соответствует флавивирусам, переносимым комарами, отмечены вариации нуклеотидных последовательностей между штаммом Найдорф и тремя штаммами БКЭ, выделенными от комаров, при сохранении вероятности комплементарных взаимодействий между G- и C-богатыми фрагментами геномов (см. рис. 2).

Обсуждение

Со времени открытия в 1937 г. БКЭ относят к флавивирусам, переносимым клещами. Однако единичные штаммы БКЭ были выделены от комаров на Дальнем Востоке. Штамм Малышево дальневосточного типа БКЭ выделен от комаров *Aedes vexans nipponii*, отловленных в 1978 г. на северном побережье озера Петропавловское в Хабаровском крае (48°40' с. ш., 135°40' в. д.). Штамм Сахалин 6-11 сибирского типа БКЭ выделен из пула комаров, собранных на Сахалине в 2010 г. в Александровск-Сахалинском районе острова. В 2014 г. выделен штамм Лазо МР36 из пула комаров *Aedes vexans*, собранных в районе имени Лазо (47°59' с. ш., 134°47' в. д.) Хабаровского края в период снижения весенне-летней активности иксодовых клещей и низкой заболеваемости населения этого региона клещевым энцефалитом. Филогенетический анализ полноразмерных кодирующих областей геномов штаммов БКЭ, выделенных от комаров, показал их родство со штаммами дальневосточного и сибирского типов вируса вне зависимости от времени и места выделения штаммов, а также от переносчика или хозяина. Структура пептида слияния идентична у всех изолятов БКЭ, выделенных от комаров, клещей, позвоночных и больных людей. Несмотря на нуклеотидные замены и мини-делеции в 3'-нетранслируемой области генома штаммов БКЭ, пространственные конформации



Штамм ВКЭ	5'-CS-A	3'-CS-A	5'-CS-B	3'-CS-B	CS-b1	CS-b2
Лазо МР36	GGAGAACAAGAGCUG	CGGUUCUUGUUCUCC	GGGGCGGUCC	GGGAGGCCCC	GGAAGG	CCCCGGCCA
Мальшево	GGAGAACAAGAGCUG	-	GGGGCGGUCC	GGACAACCC	GGAAGG	UCCCCAAAUCC
Сахалин 6-11	-	-	GGGGCGGUCC	GGACAACCC GGGAGCGGUG	AGGAAGG	UCCCCAAGGCC
Найдорф [5]	GGAGAACAAGAGCUG	CGGUUCUUGUUCUCC	GGGGCGGUCC	GGGAGGCCCC	GGUAAGG	CCCCUGACC

Рис. 2. Локализация и структура последовательностей циклизации у штаммов ВКЭ, выделенных от комаров и клещей.

и потенциальные последовательности циклизации были сходными у изолятов ВКЭ от клещей и комаров.

Выделение штаммов ВКЭ от комаров с сохранением их патогенности при пассировании, возможно, свидетельствует о том, что комары являются случайными или дополнительными переносчиками вируса в природных очагах. Для двух других флавивирусов — вируса Западного Нила (номера доступа в GenBank FJ159129-FJ159131, AY277251, DQ411030, DQ377178 и другие) и вируса омской геморрагической лихорадки [16] также известны изоляты как от комаров, так и от клещей, несмотря на принадлежность первого к флавивирусам, переносимым комарами, а второго — клещами. Разнообразие резервуарных хозяев и членистоногих переносчиков флавивирусов, включая ВКЭ, обусловлено возможностью фенотипических перестроек вирусных квазивидов при адаптациях и переадаптациях к эволюционно отдаленным беспозвоночным и позвоночным хозяевам [17, 18].

Заключение

Филогенетический анализ полноразмерных кодирующих областей геномов штаммов ВКЭ, выделенных от комаров, показал их родство со штаммами дальневосточного и сибирского типов вируса вне зависимости от времени и места выделения штаммов, а также от

переносчика или хозяина. Структура пептида слияния идентична у всех изолятов ВКЭ, выделенных от комаров, клещей, позвоночных и больных людей. Потенциальные последовательности циклизации также были сходными у изолятов ВКЭ от комаров и клещей. Сходство структур геномов изолятов ВКЭ от комаров, клещей и больных людей при патогенности изолятов ВКЭ от комаров для новорожденных лабораторных мышей и их цитопатическом действии для культур клеток животных могут свидетельствовать о возможной роли комаров в качестве случайных или дополнительных переносчиков вируса.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1—5, 10, 12, 13, 17, 18 см. REFERENCES)

- Коренберг Э.И. Клещевой энцефалит. В кн.: Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я., ред. *Арбовирусы и арбовирусные инфекции*. М.: Медицина; 1989: 256—64.
- Богданов И.И. Иксодовые клещи Западной Сибири. Сообщение VII. Типы популяций иксодовых клещей. *Вестник Омского Педагогического Университета*. 2006; 03.00.08 — зоология. Available at: <http://www.omsk.edu/article/vestnik-omgpu-37.pdf>.

8. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. *Комары. Семейство Culicidae*. Ленинград: Наука; 1970.
9. Гайдамович С.Я., ред. *Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований)*. М.: Наука; 1986.
11. Ткачев С.Е. *Генетическая вариабельность вируса клещевого энцефалита в природных очагах Новосибирска и его окрестностей*: Дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск; 2015.
14. Львов Д.К., Альховский С.В., Шелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Гительман А.К. и др. Генетическая характеристика вируса Пвассан (POWV — Powassan virus), изолированного от клещей *Haemophysalis longicornis* в Приморском крае, и двух штаммов вируса клещевого энцефалита (Flaviviridae, Flavivirus): Алма-Арасан (AAV-Alma-Atasan virus), изолированного от клещей *Ixodes persulcatus* в Казахстане, и Мальшево, изолированного от комаров *Aedes vexans nipponii* в Хабаровском крае. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(5): 18—22.
15. Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Борисова Т.И., Вершинин Е.А., Татарникова С.А., Бренева Н.В. и др. Оценка эпизоотолого-эпидемической ситуации по природно-очаговым инфекциям в Александровск-Сахалинском районе Сахалинской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; (3): 11—5.
16. Харитонов Н.Н., Леонов Ю.А. *Омская геморрагическая лихорадка*. Новосибирск; 1978.
1. Baier A. Flavivirus infections and potential targets for antiviral therapy. In: Ruzek D., ed. *Flavivirus Encephalitis*. Intech, Croatia; 2011: 89—104.
2. Calzolari M., Zé-Zé L., Vázquez A., Sánchez Seco M.P., Amaro F., Dottori M. Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40: 381—8.
3. Shi M., Lin X.D., Vasilakis N., Tian J.H., Li C.X., Chen L.J. et al. Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. *J. Virol.* 2015; 90(2): 659—69.
4. Seligman S.J. Constancy and diversity in the flavivirus fusion peptide. *Virology*. 2008; 5: 27.
5. Kofler R.M., Hoenninger V.M., Thurner C., Mandl C.W. Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne Flaviviruses. *J. Virol.* 2006; 80(8): 4099—113.
6. Korenberg E.I. The tick-borne encephalitis. In: L'vov D.K., Klimenko S.M., Gaydamovich S.Ya., eds. *Arboviruses and Arboviral Infections [Arbovirusy i arbovirusnye infektsii]*. Moscow: Meditsina; 1989: 256—64. (in Russian)
7. Bogdanov I.I. Ixodid ticks of the Western Siberia. Report VII. Population types of ixodid ticks. *Vestnik Omskogo Pedagogicheskogo Universiteta*, 2006; 03.00.08 — zoologiya. Available at: <http://www.omsk.edu/article/vestnik-omgpu-37.pdf>. (in Russian)
8. Gutsevich A.V., Monchadskiy A.S., Shtakel'berg A.A. *Mosquitoes. Family Culicidae [Komary. Semeystvo Culicidae]*. Leningrad: Nauka; 1970. (in Russian)
9. Gaydamovich S.Ya., ed. *Arboviruses (methods of laboratory and field assays) [Arbovirusy (metody laboratornykh i polevykh issledovaniy)]*. Moscow: Nauka; 1986. (in Russian)
10. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The Relationship between the Structure of the Tick-Borne Encephalitis Virus Strains and Their Pathogenic Properties. *PLoS One*. 2014; 9(4): 1—16.
11. Tkachev S.E. *Genetic Variability of the Tick-Borne Encephalitis Virus in Natural Foci of Novosibirsk and its Surrounding Regions*: Diss. Novosibirsk; 2015. (in Russian)
12. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12): 2725—9.
13. Pukhovskaya N.M., Belozeroва N.B., Bakhmetyeva S.V., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., Morozova O.V. Isolation of the tick-borne encephalitis virus from mosquito in Khabarovsk region of the Far East of Russia. *J. Neuroinfect. Dis.* 2015. Available at: <http://dx.doi.org/10.4172/2314-7326.S2-e001>.
14. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Shchelkanov M.Yu., Shchetinina A.M., Deryabin P.G., Gitel'man A.K. et al. Genetic characterisation of Powassan virus (POWV) isolated from *Haemophysalis longicornis* ticks in Primorye and two strains of Tick-borne encephalitis virus (TBEV) (Flaviviridae, Flavivirus): Alma-Atasan virus (AAV) isolated from *Ixodes persulcatus* ticks in Kazakhstan and Malyshevo virus isolated from *Aedes vexans nipponii* mosquitoes in Khabarovsk kray. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(5): 18—22. (in Russian)
15. Andaeв E.I., Chesnokova M.V., Borisova T.I., Verшинin E.A., Tatarnikova S.A., Breneva N.V. et al. Estimation of epizootological and epidemical situation of natural foci infections in Alexandrovsk-Sakhalinsk area of the Sakhalin region. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; (3): 11—5. (in Russian)
16. Kharitonova N.N., Leonov Yu.A. *Omsk Hemorrhagic Fever [Omskaya gemorragicheskaya likhораdka]*. Novosibirsk; 1978. (in Russian)
17. Domingo E. Quasispecies in virology. *J. Virol.* 2002; 76: 463—5.
18. Romanova L.Iu., Gmyl A.P., Dzhivaniyan T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V. et al. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362(1): 75—84.

Поступила 14.03.16

Принята в печать 29.03.16

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

©КОЛЛЕКТИВАВТОРОВ, 2017

УДК 615.373:547.962.4|.03:616.98:578.825.11|.012

Лазаренко А.А.¹, Алимбарова Л.М.¹, Мордвинцева Э.Ю.², Баринский И.Ф.¹

РАЗРАБОТКА СВЕЧЕВОЙ ФОРМЫ ПРЕПАРАТА ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА С ВЫСОКИМИ ТИТРАМИ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-го И 2-го ТИПОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКИХ ФОРМ ГЕРПЕТИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;²ЗАО «ФИРМА «ВИТАФАРМА», 125124, г. Москва

Терапия герпесвирусной инфекции (ГИ) представляет большие трудности, несмотря на обширный арсенал терапевтических средств, особенно у беременных, новорожденных и детей первых лет жизни, а также у лиц с иммунной недостаточностью. В связи с этим в настоящее время внимание врачей привлекает возможность использования иммуноглобулинов для лечения ГИ. Целью работы явилось создание технологии получения свечевой формы препарата, содержащей иммуноглобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2), для лечения хронических форм герпетической болезни. Дизайн исследования включал следующие этапы: отбор гамма-глобулинов с высоким титром антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в иммуноферментном тесте; определение уровня вируснейтрализующих антител в отобранных сериях гамма-глобулинов в опытах на культуре ткани и животных; лиофилизацию иммуноглобулинов; разработку свечевой формы препарата, содержащей гамма-глобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2; изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата с иммуномодулятором гиалуроновой кислоты. В результате проведенных работ была получена лекарственная форма иммуноглобулина в виде суппозитория, которая соответствовала требованиям безопасности и эффективности, не обладала токсичностью, пирогенностью. Обсуждаются вопросы клинического применения этого препарата в качестве метода терапии ГИ.

Ключевые слова: *стандартный образец; иммуноглобулины человека; герпес; гиалуроновая кислота; реакция нейтрализации.*

Для цитирования: Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М., Мордвинцева Э.Ю., Баринский И.Ф. Разработка свечевой формы препарата иммуноглобулинов человека с высокими титрами антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов для лечения хронических форм герпетической болезни. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(1): 36-41.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-36-41>*Lazarenko A.A.¹, Alimbarova L.M.¹, Mordvintseva E.Yu.², Barinsky I.F.¹*

DEVELOPMENT OF THE SUPPOSITORY FORM OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PREPARATION WITH HIGH TITERS OF ANTIBODIES TO HERPES SIMPLEX VIRUS TYPES 1 AND 2 FOR THE TREATMENT OF CHRONIC FORMS OF HERPETIC DISEASE

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;²ZAO FIRMA "VITAFARMA", Moscow, 125124, Russian Federation

In spite of the vast arsenal of therapeutic agents, therapy of herpes virus infection (HVI) is very difficult, particularly in pregnant women, newborns and children in the first years of life, as well as in patients with immune deficiency. In this regard, possibility of using immunoglobulins for the treatment of HVI is currently attracting the attention of doctors. The aim of this work was to develop a suppository form of the drug containing donor immunoglobulins with high levels of neutralizing antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. The study included the following steps: 1) selection of gamma-globulins with high antibody titer for HSV-1 and HSV-2 ELISA test; 2) determination of the level of neutralizing antibodies in the selected series of gamma-globulins in tests in tissue cultures and animals; 3) lyophilization of immunoglobulins; 4) development of the suppository form of the preparation containing gamma-globulin donors with high levels of neutralizing antibodies to HSV-1 and HSV-2; 5) study of the safety of the activity of neutralizing antibodies to HSV-1 and HSV-2 in the suppository form of the drug with hyaluronic acid used as immunomodulator. As the result of this work, immunoglobulin preparation in the suppository form was developed. The developed preparation meets the requirements for safety and efficacy. It is not toxic or pyrogenic. The problems of clinical use of this drug as a method of HVI therapy are discussed.

Key words: *standard sample; human immunoglobulins; herpes; hyaluronic acid; neutralization reaction.*

Для корреспонденции: Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаб. сравнительной вирусологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: virology@mail.ru

For citation: Lazarenko A.A., Alimbarova L.M., Mordvintseva E.Yu., Barinsky I.F. Development of the suppository form of human immunoglobulin preparation with high titers of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 36-41. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-36-41>

For correspondence: Ludmila M. Alimbarova, Ph.D., leading researcher of the Laboratory of comparative virology, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: virology@mail.ru

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 19 March 2016

Accepted 29 March 2016

Герпесвирусная инфекция (ГИ), обусловленная вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2), является актуальной проблемой здравоохранения. Распространенность инфицирования ВПГ в развитых странах составляет 60—85% среди взрослых и 65% среди детей школьного возраста [1]. Риск манифестации симптоматической инфекции возрастает во время беременности, у новорожденных и лиц с иммунной недостаточностью. Терапия ГИ представляет большие трудности, несмотря на обширный арсенал терапевтических средств. Этиотропная терапия, к которой относят применение химиопрепаратов, специфических иммуноглобулинов, является одним из эффективных направлений лечения ГИ [1—3]. Иммуноглобулинотерапия как иммунотерапевтический подход к лечению ГИ имеет ряд преимуществ перед другими средствами, что подтверждается данными ряда отечественных и зарубежных авторов [2, 4, 5]. Однако в клинической практике использование иммуноглобулинов при лечении ГИ остается не до конца востребованным, что обусловлено рядом причин, основными из которых являются широкое использование химиопрепаратов (синтетических аналогов пуриновых нуклеозидов (Ацикловир (АЦВ)), ограниченный опыт применения иммуноглобулинов врачами общей практики и фобия перед иммуноглобулинами как потенциально опасными средствами, вызывающими при внутривенном введении побочные эффекты [1, 6, 7]. Следует отметить, что иммуноглобулины обычно хорошо переносятся, нежелательные реакции регистрируются лишь у 1—15% пациентов [8, 9]. Как и для любого белкового препарата, для них характерны «инфузионные реакции», которые появляются у части больных, не являются тяжелыми и купируются после прекращения инфузии или снижения дозы препарата [1, 8]. Однако в связи с регистрируемым ростом частоты иммунодефицитных состояний, увеличением резистентности микроорганизмов к химиопрепаратам, а также наличием противопоказаний для назначения АЦВ беременным отношение к специфическим иммуноглобулинам коренным образом меняется, о чем свидетельствуют работы отечественных и зарубежных авторов [2, 3, 7, 10, 11]. Перспективность данного направления обусловлена также 100-летним опытом использования антител в составе лечебных сывороток для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. В связи с этим целью данной работы было создание технологии получения свечевой формы препарата для лечения ГИ, содержащей иммуноглобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ 1-го и 2-го типов.

Материал и методы

Дизайн исследования: отбор гамма-глобулинов с высоким титром антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в иммуноферментном тесте; определение уровня вируснейтрализующих антител в отобранных сериях гамма-глобулинов в опытах на культуре ткани и животных; лиофилизация иммуноглобулинов; разработка свечевой формы препарата, содержащей гамма-глобулины доноров с высоким уровнем вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2; изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата. Опыты повторяли трехкратно.

Материалы. В работе использовали штаммы ВПГ-1 УС (Herpes simplex virus type 1) и ВПГ-2 ВН (Herpes simplex virus type 2), полученные из лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Вирусы культивировали на монослое клеток Vero. Специфическую инфекционную активность штаммов ВПГ определяли по наличию цитопатической дозы (ЦПД) вируса в клетках Vero и выражали в Ig ТЦД₅₀/мл. Клетки Vero культивировали в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 100 мкг/мл гентамицина.

Объектами исследования являлись лабораторные животные, полученные из питомника «Столбовая»: белые крысы, аутбредные, самцы, 100—120 г; морские свинки, самцы, 250—300 г; кролики, шиншилла, самцы, 2,5—3 кг; белые мыши, аутбредные, самцы (7—8, 18—20 г). Все манипуляции с зоологическими объектами осуществляли при строгом соблюдении правил, предписанных для работ с экспериментальными животными.

В работе использовали 150 экспериментально-производственных образцов нормальных иммуноглобулинов человека, полученных от доноров плазмы, не вакцинированных герпетической вакциной («Микроген» Минздрава РФ («Иммунопрепарат», Уфа); станция переливания крови ФМБА, Москва). Экспериментально-производственные образцы иммуноглобулина получены методом многостадийного низкотемпературного этанольного фракционирования белков плазмы по Кону и проверены в соответствии с международными требованиями и нормативными документами по исследованию плазмы крови человека и препаратов иммуноглобулинов [10, 11—17].

Титры антител к ВПГ (IgG) в плазме крови доноров и препаратах иммуноглобулина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя коммерческие наборы для ИФА «ВектоВПГ-IgG-стрип» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск). ИФА выполняли в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc», США) при λ 450 нм. Содержание антител к ВПГ (IgG) вычисляли относительно отраслевого стандартного образца ОСО IgG анти-ВПГ-1,2 (ОСО 42-28-377-05), содержащего вируснейтрализующие антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2. ОСО 42-28-377-05 применяется в системе здравоохранения РФ для оценки ИФА-методом содержания вируснейтрализующих антител в донорском сырье, препаратах иммуноглобулинов для получения специфического иммуноглобулина, а также для оценки эффективности проводимой иммунотерапии. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие иммуноглобулины производства ЧАО «Биофарма», Украина, — «Гаммалин®» (Иммуноглобулин против ВПГ-1) и Иммуноглобулин против ВПГ-2 [12]. В качестве отрицательной сыворотки, не содержащей антител IgG к ВПГ-1 и ВПГ-2, использовали стандартную сыворотку производства Нижегородского предприятия по производству бакпрепаратов «ИмБио» по фармакопейной статье (ФС) 42-3641-98. Вируснейтрализующую активность и специфичность антител в образцах ОСО, экспериментально-производственных образцах

Таблица 1

Состав ингредиентов в свече

Ингредиент	На одну свечу	Соответствие нормативным документам
Имуноглобулин человека лиофилизированный	80 мг	
Гиалуроновая кислота	0,005 г	ТУ.9358.-005-12466809—98
Антибиотик: гентамицина сульфат	Не более 2 мкг	ВФС-42-3709—99
Наполнитель: кондитерский жир	До 75%	ГОСТ 28414—89
Парафины нефтяные твердые	7,5%	ГОСТ 23683—89
Эмульгатор Т-2	7,5%	ТУ 10-04-40-24—89

и референс-препаратах определяли с помощью реакции нейтрализации (РН): в культуре клеток, а также у животных [15, 18]. В первом варианте индикаторной системой РН являлись клетки Vero. Степень цитодеструкции оценивали под микроскопом по общепринятой четырехкрестовой системе (ФСП 42-71, ВС 93). Во втором варианте индикаторной системой РН являлась модель менингоэнцефалита у мышей, которую воспроизводили интрацеребральным введением смеси 100 ТЦД₅₀/мл вируса (штамм УС или ВН) с разведениями образцов иммуноглобулинов. Животным вводили по 0,03 мл смеси. Результаты учитывали по проценту летальности животных. Обработку результатов РН в двух модификациях проводили по методу Спирмена—Кербера [15]. Разность логарифмов титров вируса в контрольных и опытных образцах соответствовала логарифму индекса нейтрализации (ИН).

Разработка свечевой формы иммуноглобулина. При разработке состава и технологии изготовления суппозитория с иммуноглобулином особое внимание уделяли соблюдению требований к суппозиторным основам с целью обеспечения максимальной терапевтической эффективности препарата и стабильности качества свечей, а также учитывали значение вспомогательных веществ. Иммуностимулятор гиалуроновую кислоту вводили в свечу одновременно с препаратом иммуноглобулина. Для определения содержания гиалуроновой кислоты в 1 свече 10 свечей помещали в водяную баню при 37°C со 100 мл свежеекипяченой, охлажденной воды, встряхивали в течение 5 мин и фильтровали через бумажный фильтр (ГОСТ 12026—76). Суппозитории готовили по стандартной схеме [16, 17]. Состав ингредиентов в свече представлен в табл. 1.

Изучение сохранности активности вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата. Полученный препарат должен быть специфически активен, т. е. вызывать специфический иммунитет к ВПГ при трехкратном введении белым крысам. Наличие антител в сыворотках животных изучали в РН (в культуре клеток). Вируснейтрализующая активность сывороток по показателю ИН должна быть не менее 2,0 lg ТЦД₅₀/мл для штамма УС и не менее 1,5 lg ТЦД₅₀/мл для штамма ВН.

Определение биологических характеристик *полуфабриката препарата, а также готового препарата* иммуноглобулина (стерильности, пирогенности и токсичности) выполняли по методикам, описанным в Государственной фармакопее XI 1. Пирогенность препаратов оценивали на кроликах, токсичность — на белых мышках массой 18—20 г и морских свинок (по МУК 4.1/4.2.588—96, с. 51). Состояние животных оценивали ежедневно по изменению массы тела, поведению, состоянию кожного покрова (наличию некроза или абсцесса в месте введения) и шерсти.

Отсутствие антител к вирусу гепатита С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, поверхностного антигена вируса гепатита В в образцах иммуноглобулинов подтверждали с использованием коммерческих наборов для ИФА «ИФА-НВsAg/м» и «ДС-ИФА-ВИЧ-АГ+АТ» (ООО «НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород), «ИФА-анти-НСV», «Бест анти-ВГС» (комплект 2), «Бест анти-ВГС — СПЕКТР», «Бест анти-ВГС-IgM» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

По результатам проводимых исследований делали вывод о соответствии разработанной формы препарата иммуноглобулина требованиям безопасности (не содержит антител к ВИЧ и антигенов к гепатитам В и С) и о сохранности вируснейтрализующей активности в свечевой форме препарата (режим ускоренного старения) [18, 19].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Excel 4.0 и Statistica 6.0 для Windows XP.

Результаты

Отбор иммуноглобулинов доноров крови человека со специфическими антителами к ВПГ 1-го и 2-го типов в

ИФА. Методом ИФА был проведен скрининг 150 серий экспериментально-производственных образцов нормальных иммуноглобулинов, из которых были отобраны 43 образца, содержащие антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2 в различных титрах. Фоновое содержание антител в образцах иммуноглобулинов составило 1:1600. Образцы, в которых титры антител превышали в 4—6 и более раз фоновое значение, считали специфическими. В дальнейшем из тестируемых образцов были отобраны 9 имеющих титр антител к ВПГ-1 и ВПГ-2, определенный методом ИФА, от 1: 3200 до 1:25600 (табл. 2).

Полученные результаты (см. табл. 2) свидетельствуют о том, что титры антител в отобранных сериях иммуноглобулинов статистически значимо превышали фоновые значения.

Важным свойством специфического иммуноглобулина должно быть наличие в нем вируснейтрализующих антител к вирусам ВПГ-1 и ВПГ-2, определение которых проводили в РН с использованием культуры клеток Vero, 100 ТЦД₅₀/мл доз вируса ВПГ-1 или ВПГ-2 и разведений исследуемых препаратов от 1:5 до 1:160. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку доноров, не содержащую антитела к ВПГ-1 и ВПГ-2. Критерием оценки являлись 2 параметра: титры антител и ИН, который должен быть не менее 2,0 lg ТЦД₅₀/мл для штамма УС и не менее 1,5 lg ТЦД₅₀/мл для штамма ВН. С этой целью были исследованы 9 отобранных ранее серий (№ 1—9). Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что титры антител к ВПГ-1, ВПГ-2 в сериях иммуноглобулинов № 1—9 с высокой степенью достоверности превышали фоновые значения и составляли 1:80—1:320. ИН был в диапазоне 1,0—3,0 lg. По результатам проведенных исследований были отобраны 5 серий препаратов иммуноглобулинов с наилучшими показателями в РН — серии № 1—4, 9.

Известно, что препараты крови человека, получаемые путем

Таблица 2

Титры антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в препаратах исследуемых иммуноглобулинов в ИФА

№ препарата	Разведение иммуноглобулинов				
	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	—
6	+	+	+	+	—
7	+	+	+	+	—
8	+	+	+	+	—
9	+	+	+	+	+

Примечание. * — $p < 0,05$.

Таблица 3

Результаты определения титра вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в РН на культуре клеток

Иммуноглобулин, серия №	Тест-вирус			
	ВПГ-1 (штамм УС)		ВПГ-2 (штамм ВН)	
	титр антител	ИН, lg	титр антител	ИН, lg
1	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
2	1:320*	3,0*	1:320*	2,25*
3	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
4	1:320*	2,0*	1:320*	1,5*
5	1:160	1,75	1:320*	1,75*
6	1:80	1,75	1:320*	2,0*
7	1:160	1,75	1:80	1,0
8	1:80	1,5	1:160*	1,5*
9	1:320*	2,5*	1:320*	2,0*
ОСО IgG анти-ВПГ-1,2 (ОСО 42-28-377-05)	1: 320		1: 160	
«Гаммалин®» (Иммуноглобулин против ВПГ-1, ЧАО «Биофарма», Украина)	1:320		Отр.	
Иммуноглобулин против ВПГ-2, ЧАО «Биофарма», Украина	Отр.		1:160	
Контрольная стандартная сыворотка	Отр.		Отр.	

Примечание. * — $p < 0,01$; отр. — антитела отсутствуют.

фракционирования, не могут быть в полной мере вирусобезопасными. Даже карантинизация всех порций плазмы не гарантирует отсутствие инфекционных агентов. Е.Б. Жибурт и В.Н. Тазев [20] указывают, что вирусная безопасность продуктов крови обеспечивается отбором доноров, тестированием донаций и пулов плазмы, инаktivацией и удалением вирусов в процессе производства. В связи с этим был проведен контроль отобранных в РН 5 серий иммуноглобулинов на отсутствие указанных выше вирусов, который не выявил наличие патогенов ни в одной из 5 серий иммуноглобулинов, что свидетельствовало об эффективности процессов вирусной инаktivации исходного материала и его безопасности [19].

Исследования продолжались по показателю специфической безопасности отобранных серий иммуноглобулинов в соответствии с ФС [16]. Определение специфической безвредности (на отсутствие инфекционного ВПГ) отобранных 5 серий препаратов иммуноглобулинов проводили двумя последовательными пассажами на культуре клеток и двумя последующими последовательными пассажами на животных. Материалом второго пассажа специфической безвредности на культуре клеток были интрацеребрально заражены мыши (массой 8—10 г) в объеме 0,03 мл. Наблюдение за животными, проводившееся ежедневно в течение 2 нед, не выявило признаков заболевания или гибели ни у одного животного, что свидетельствовало о безвредности отобранных серий иммуноглобулинов.

Далее жидкие формы полученных серий иммуноглобулинов подвергались лиофилизации при $60 \pm 10^\circ\text{C}$. Сухую субстанцию иммуноглобулина получали на сублимационных установках LZ-45 (Чехия). Общая продолжительность лиофилизации составила 36 ч.

Одной из аттестуемых характеристик препаратов иммуноглобулинов, содержащих противогерпетические антитела, является сохранение специфической активности препарата при лиофилизации, которая была изучена по наличию вируснейтрализующих антител в РН на культуре клеток Vero.

Анализ всех стадий технологического процесса показал, что процесс лиофилизации как наиболее критичный не влиял на уровень вируснейтрализующих антител в препаратах (ИН в сериях № 1—4, 9 были идентичны данным, полученным в РН с препаратами до их лиофильной сушки и составили 1,5—2,5 lg) и позволил отобрать из них наиболее стабильные 3 серии (№ 2, 3 и 9), которые и стали основой для разработки свечевой формы препарата.

Получение готового препарата. Состав свечи приведен ранее (см. табл. 1). Одна единица свечевой формы содержала 80 мг лиофилизированного иммуноглобулина. Сохранность уровня вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в свечевой форме препарата определяли в РН в культуре клеток и в опытах на животных, как было описано ранее. Вируснейтрализующая активность образцов иммуноглобулинов по показателю ИН составила $2,5 \pm 0,5$ lg для штамма УС и $2,0 \pm 0,5$ lg для штамма ВН, что соответствовало требованиям нормативных документов.

Анализ стабильности уровня вируснейтрализующих антител в образцах свечевой формы препарата в зависимости от времени хранения проводили методом ускоренного старения согласно методическим рекомендациям «Определение стабильности ОСО и других МИБП ускоренным методом», разработанным в ГИСК им. Л.А. Тарасевича (2003). Исследования показали, что время хранения готового препарата не влияло на его качественные характеристики, в том числе ИН.

Готовые свечевые формы иммуноглобулинов (№ 2, 3, 9) далее были тестированы на токсичность, стерильность и пирогенность. Результаты исследований показали, что технология приготовления препарата не влияла на его иммунобиологические характеристики и разработанные свечевые формы иммуноглобулинов соответствовали требованиям ФС.

Обсуждение

Иммуноглобулины человека — группа иммунобиологических препаратов крови, представляющих собой выделенную промышленным способом иммунологически активную белковую фракцию плазмы крови здоровых доноров, несущую антительную активность различной специфичности. Препараты иммуноглобулинов в основном содержат иммуноглобулины класса G — антитела к различным возбудителям бактериальных и вирусных инфекций и/или их токсинам, обладают иммунозаместительной и иммуномодулирующей активностью и используются в терапии различных форм иммунодефицитов, а также для специфической профилактики и лечения ряда бактериальных и вирусных инфекций. На российском фармацевтическом рынке зарегистрировано более 100 наименований препаратов крови человека отечественного и зарубежного производства [1], в том числе для профилактики и лечения рецидивов ГИ (препараты иммуноглобулинов человека нормальные, специфические, специфические гипериммунные для внутривенного и внутримышечного введения, комплексные для перорального и местного введения) [12, 21—23]. За рубежом и в РФ разработаны свечевые формы препаратов иммуноглобулинов, которые используются для лечения различных инфекционных заболеваний людей, а также применяются в ветеринарии. Преимущество энтерального применения иммуноглобулинов очевидно: исключение инъекционного пути введения, возможность использования больших доз, хорошая переносимость.

Нами проведены эксперименты по разработке и получению препарата иммуноглобулина человека с высокими титрами вируснейтрализующих антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в виде свечевой формы. В соответствии с международными требованиями основой для разработки гипериммунных препаратов явились отобранные нами экспериментально-производственные серии иммуноглобулинов, полученные из плазмы специально отобранных доноров, с исходно более высокими титрами специ-

фических антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 (по данным ИФА и РН), чем в популяции [21, 22]. По нашим данным, титры антител к ВПГ-1, ВПГ-2 составили 1:3200—1:51200, были сопоставимы с титрами противогерпетических антител в ОСО 42-28-377—05, представляющего пул плазмы, полученной от 800 доноров (IgG ВПГ-1 — 1:25000, IgG ВПГ-2 — 1:1280), и титрами антител в коммерческих иммуноглобулинах для внутривенного введения — «Гаммалин®», ЧАО «Биофарма», Украина (IgG ВПГ-1 — 1:25000, IgG ВПГ-2 — 1:640). На основе отобранных серий иммуноглобулинов была разработана технология получения свечевой формы препарата со стабильными иммунобиологическими характеристиками, основной из которых является наличие вируснейтрализующих антител, которые играют существенную роль в патогенезе ГИ. Защитное действие специфических антител связано как с их непосредственным участием в нейтрализации вирусных частиц, так и с активацией комплементопосредованного лизиса. Вируснейтрализующая активность в разработанных свечевых формах иммуноглобулинов по показателю ИН составила для штамма УС 2,5 ± 0,5 Ig, для штамма ВН — 2,0 ± 0,5 Ig, что соответствовало требованиям нормативных документов. Исследования показали, что технология производства препарата не влияет на характеристики конечного продукта (по содержанию вируснейтрализующих антител к ВПГ-1, ВПГ-2 свечевая форма иммуноглобулина сохраняла активность, характерную для жидкого образца, что полностью соответствовало требованиям ФС). Следует отметить, что разработанная форма иммуноглобулина в виде свечей не является дженериком коммерческих препаратов, так как у них разные источники получения плазмы доноров и технологии производства, состав подклассов IgG (общее содержание IgG > 95%), способы и количество стадий инактивации и элиминации вирусов.

Заключение

Таким образом, разработанная нами лекарственная форма иммуноглобулина в виде суппозитория вирусологически безопасна, соответствует требованиям безопасности и эффективности, не обладает токсичностью, пирогенностью и может быть использована в качестве метода терапии ГИ у иммунокомпрометированных пациентов, беременных женщин, для лечения активной ГИ у новорожденных и детей раннего возраста, а также для профилактики манифестации заболевания у инфицированных больных в трансплантологии.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 3, 6, 10, 11, 13, 14, 17 см. REFERENCES)

- Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. *Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей. 2-е издание.* СПб.: СпецЛит; 2013.
- Люттов А.Г., Алешкин В.А., Мостовская Е.В., Усольцева В.В. Отечественный иммуноглобулин для внутривенного введения: инновационная технология и перспективы применения. *Лечение и профилактика.* 2012; (3): 109—12.
- Супотницкий М.В., Елапов А.А., Борисевич И.В., Кудашева Э.Ю., Климов В.И., Лебединская Е.В. Иммуноглобулины для внутривенного введения в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности. *Успехи современного естествознания.* 2015; (5): 182—3.
- Алешкин В.А., Люттов А.Г., Афанасьев С.С. Место иммуноглобулиновых препаратов в лечении и реабилитации инфекционных больных. *Новые лекарственные препараты.* 2003; (4): 6—10.
- Иванов В., Мосягин В., Вдовиченко М., Кудашева Э., Бондарев В., Борисевич И. Иммуноглобулин человека нормальный: эффективность и безопасность применения. *Врач.* 2015; (11): 17—20.
- Аверченков В.М., Палагин И.С. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы действия и возможности клинического применения. *Клиническая микробиологическая и антимикробная химиотерапия.* 2004; 6(3): 273—81.
- Кудашева Э.Ю., Иванов В.Б., Борисевич И.В., Бондарев В.П., Миронов А.Н. Качество исходной плазмы — основа эффективности про-

изводства препаратов донорской крови. *Медицинская иммунология.* 2015; 17(5): 401—5.

- Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
- Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журравлева М.В., Лепяхин В.К., ред. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты).* Часть 2. М.: Гриф и К; 2012.
- Общая фармакопейная статья «Иммуноглобулины человека»: утверждена приказом Министерства здравоохранения России от 21.11.2014 № 768. Режим доступа: <http://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/1/materialy-po-deyatelnosti-deparatamenta/stranitsa-856/utverzhdennyye-farmakopeynnye-stati-i-obshchie-farmakopeynnye-stati-po-preparatam-krovi>.
- ВОЗ. Рекомендации по эпидемиологическому надзору за энтеровирусами для поддержки программы ликвидации полиомиелита. Женева: ВОЗ; 2005.
- Корнилова О.Г., Кривых М.А., Кудашева Э.Ю., Бунатян Н.Д., Лебединская Е.В., Нечаев А.В. и др. Гармонизация требований к специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека с мировыми стандартами качества. *Фармация.* 2015; (2): 43—6.
- Жибурт Е.Б., Тазаев В.Н. Проблема донорских кадров: изучение и возможные пути решения. *Трансфузиология.* 2005; 6(4): 22—30.
- Алешкин В.А., Новикова Л.И., Афанасьев С.С., Борисова И.В., Зуева М.М., Зорик А.В. *Способ получения иммуноглобулинового препарата для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций, иммуноглобулиновый препарат для профилактики и терапии бактериальных и вирусных инфекций (варианты) и суппозитории на основе иммуноглобулинового препарата.* Патент РФ № 2255766; 2003.
- Кудашева Э.Ю., Исрафилов А.Г., Загидуллин Н.В., Хабибуллина В.В., Хазиев А.Ф. Разработка препарата антицитомегаловирусного иммуноглобулина для внутривенного введения. *Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение.* 2010; (3): 51—2.
- Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Новикова Л.И., Борисова И.В., Волков А.В., Зуева М.М. и др. *Иммуноглобулиновая основа для иммунобиологических препаратов и способов ее получения, суппозитории и мазь для профилактики и терапии бактериальных и вирусных заболеваний.* Патент РФ № 2361612; 2007.

REFERENCES

- Isakov V.A., Arkhipova E.I., Isakov D.V. *Human Herpesvirus infection. Guidelines for Doctors [Герпесвирусные инфекции человека. Руководство для врачей]. 2nd ed.* St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
- Ljutov A.G., Aleshkin V.A., Mostovskaya E.V., Usol'tseva V.V. Domestic immunoglobulin for intravenous administration: innovative technology and application prospects. *Lechenie i profilaktika.* 2012; (3): 109—12. (in Russian)
- Dalakas M.C., Späth P.J., eds. *Intravenous Immunoglobulins in the Third Millennium.* Boca Raton, London, New York, Washington: Parthenon Publishing Group; 2004.
- Supotnitskiy M.V., Elapov A.A., Borisevich I.V., Kudasheva E.Yu., Klimov V.I., Lebedinskaya E.V. Immunoglobulins for intravenous administration in the aspect of quality, efficiency and security. *Uspekhi sovremenogo estestvoznaniya.* 2015; (5): 182—3. (in Russian)
- Aleshkin V.A., Lyutov A.G., Afanas'ev S.S. Place immunoglobulin preparations in the treatment and rehabilitation of infectious diseases *Novye lekarstvennye preparaty.* 2003; (4): 6—10. (in Russian)
- leBlanc, Pesnicak L., Godleski M., Straus S.E. Treatment of HSV-1 infection with immunoglobulin or acyclovir: comparison of their effects on viral spread, latency, and reactivation. *Virology.* 1999; 1: 230—262.
- Ivanov V., Mosyagin V., Vdovichenko M., Kudasheva E., Bondarev V., Borisevich I. Human Immunoglobulin Normal: efficacy and safety. *Vrach.* 2015; (11): 17—20. (in Russian)
- Averchenkov V.M., Palagin I.S. Intravenous immunoglobulin: mechanism of action and clinical applications. *Klinicheskaya mikrobiologicheskaya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2004; 6(3): 273—81. (in Russian)
- Kudasheva E.Yu., Ivanov V.B., Borisevich I.V., Bondarev V.P., Mironov A.N. The quality of the original plasma — the basis of a production efficiency of donor blood products. *Meditinskaya immunologiya.* 2015; 17(5): 401—5. (in Russian)
- Concept paper on Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg) and Core SmPC (EMA/CHMP/BPWP/572805/2013). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2014/08/WC500170555.pdf.
- Bertolini J., Goss N., Curling J. *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use.* New Jersey: John Wiley & Sons; 2013: 363—4.
- State Register of Medicinal Products of the Russian Federation Ministry of Health. Available at: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>. (in Russian)
- WHO recommendations for the production, control and regulation of hu-

- man plasma for fractionation, annex 4. WHO Technical Report, Series № 941. Geneva; 2007.
14. International Quality Plasma Program (IQPP) Available at: <http://www.pptaglobal.org/safety-quality/standards/iqpp>.
 15. Mironov A.N., Bunatyay N.D., Vasil'ev A.N., Verstakova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., eds. *Guidelines for Preclinical Studies of Drugs (immunobiological drugs). Part 2 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv (immunobiologicheskie lekarstvennye preparaty). Chast' 2]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
 16. General pharmacopoeial article «human immunoglobulin»: approved by the order of Russian Ministry of Health on 21 November 2014 №768. Available at: <http://www.rosmin-zdrav.ru/ministry/61/11/materialy-poduyatelnosti-departamenta/stranitsa-856/utverzhdennye-farmakopeynnye-stati-i-obschie-farmakopeynnye-stati-po-preparatam-krovi>. (in Russian)
 17. WHO Expert Committee on Biological Standardization: forty-third report. WHO Technical Report Series 840. Geneva; 1992. Available at: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_840.pdf.
 18. WHO. Guidelines for Surveillance of enteroviruses in support of polio eradication. Geneva: WHO; 2005.
 19. Kornilova O.G., Krivykh M.A., Kudasheva E.Yu., Bunatyay N.D., Lebedinskaya E.V., Nechaev A.V. et al. Harmonization of safety requirements for specific human immunoglobulin preparations with the international quality standards. *Farmatsiya*. 2015; (2): 43—6. (in Russian)
 20. Zhiburt E.B., Tazaev V.N. The problem of donor staff: study and possible solutions. *Transfuziologiya*. 2005; 6(4): 22—30. (in Russian)
 21. Aleshkin V.A., Novikova L.I., Afanas'ev S.S., Borisova I.V., Zueva M.M., Zorik A.B. *A Method of Producing Immunoglobulin Preparation for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Infections, the Immunoglobulin Preparation for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Infections (variants) and Suppositories Based on Immunoglobulin Preparation*. Patent RF № 2255766; 2003. (in Russian)
 22. Kudasheva E.Yu., Israfilov A.G., Zagidullin N.V., Khabibullina V.V., Khaziev A.F. Development of the drug antitsitomegalovirusnogo immunoglobulin for intravenous administration. *Biopreparaty. Profilaktika. Diagnostika. Lechenie*. 2010; (3): 51—2. (in Russian)
 23. Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., Novikova L.I., Borisova I.V., Volkov A.V., Zueva M.M. et al. *Immunoglobulin Framework for Immunobiological Preparations and Methods for its Preparation, Suppository and Ointment for the Prophylaxis and Therapy of Viral and Bacterial Diseases*. Patent RF № 2361612; 2007. (in Russian)

Поступила 19.03.16

Принята в печать 29.03.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.28.036.8

Носик Н.Н., Носик Д.Н., Чижов А.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУЛИЦИДНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ

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

В статье представлены результаты изучения вирулицидной активности 4 основных групп соединений, входящих в состав дезинфицирующих средств, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), аминов, гуанидинов, альдегидов. В работе были использованы полиовирус, вакцинный штамм Сэбина, тип 1; аденовирус, тип 5; вирус иммунодефицита человека; вирус гепатита С и вирусы гриппа А. Показано, что ЧАС, входящие в состав многих дезинфицирующих средств, не обладают достаточным потенциалом эффективной инактивации ($\geq 4,0 \text{ Ig TCID}_{50}$) безоболочечных вирусов, но эффективны в отношении оболочечных вирусов в концентрации 0,02—0,5%. Аналогичные результаты наблюдаются при использовании комбинации ЧАС с аминами. Для безусловной инактивации как оболочечных, так и безоболочечных вирусов следует применять комплексные дезинфицирующие средства, в состав которых входят ЧАС, амины и гуанидины (эффективные концентрации 0,166—0,280% для безоболочечных и 0,08—0,185% для оболочечных вирусов) или ЧАС с альдегидами (0,04—0,64% для безоболочечных вирусов).

Ключевые слова: вирулицидные дезинфицирующие средства; вирусы; полиовирус; амины; альдегиды; четвертичные аммониевые соединения; гуанидины.

Для цитирования: Носик Н.Н., Носик Д.Н., Чижов А.И. Сравнительный анализ вирулицидной эффективности дезинфицирующих средств. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 41-45.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-41-45>

Nosik N.N., Nosik D.N., Chizhov A.I.

A COMPARATIVE ANALYSIS OF VIRUCIDAL EFFICIENCY OF BIOCIDES AGENTS

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

The main groups of biocide agents used for inactivation of bacteria and viruses were studied for their virucidal activity against enveloped (HIV, viral hepatitis C, influenza virus A) and non-enveloped viruses (poliovirus, adenovirus). Their efficiency was analyzed. Quarterly ammonium compounds (QAC) themselves are not able to properly inactivate non-enveloped viruses. However, they can be successfully applied in combination with other biocides (guanidines, aldehydes). Effective composition of QAC with amines and guanidines provided inactivation of viruses (4.0 IgTCID_{50}) in concentrations of 0.166-0.280% for non-enveloped viruses and 0.08-0.185% for enveloped viruses. The combination of QAC with aldehydes is especially effective (0.04-0.64% for non-enveloped viruses). The virucidal efficiency does not directly depend on the QAC concentration in the chemical disinfectants.

Для корреспонденции: Носик Николай Николаевич, д-р мед. наук, проф., рук. лаб. онтогенеза вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: nosiknn@yandex.ru

Key words: *virucidal efficiency; poliovirus; adenovirus; HIV; VHC; influenza virus A; amines; guanidines; aldehydes; quarterly ammonium compounds.*

For citation: Nosik N.N., Nosik D.N., Chizhov A.I. A comparative analysis of virucidal efficiency of biocide agents. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(1): 41-45. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-1-41-45>

For correspondence: Nikolay N. Nosik, doctor of medical Sciences, Professor, Head of Laboratory of ontogenesis of viruses D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: nosiknn@yandex.ru

Acknowledgements. The authors are grateful to Prof. P.G. Deryabin for conveying a number of studies of the hepatitis C and the avian and human influenza A viruses.

The study had no sponsorship.

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

Received 16 May 2016

Accepted 24 May 2016

Введение

Особое значение для дезинфицирующих средств (ДС) имеет их способность инактивировать вирусы. Это обусловлено тем, что более 80% всех инфекционных болезней вызываются вирусами, а средств борьбы с ними явно недостаточно (к большинству из них нет вакцин, отсутствуют и этиотропные препараты). В связи с этим существенную роль в успешной борьбе с вирусными инфекциями играют ДС, обладающие доказанными вирулицидными свойствами [1].

На степень инактивации инфекционности вирусов влияют различные причины, среди которых основной является природная устойчивость к воздействию факторов внешней среды и химических веществ.

Устойчивость вирусов к ДС определяется их структурой и химическим составом. Большое разнообразие вирусов, многочисленность форм их архитектоники лежат в основе широких вариаций устойчивости вирусов к различным воздействиям [2].

В целях подтверждения вирулицидной активности средств дезинфекции используют тест-вирусы (вирус полиомиелита, аденовирус), обладающие высокой устойчивостью к химических веществам. Необходимой степенью инактивации считают снижение титра инфекционности вируса не менее чем на $4,0 \lg \text{ТЦИД}_{50}$. В этом случае средство считается вирулицидным и может быть использовано для дезинфекции при любой вирусной (включая особо опасные) инфекции, имеющей значение в инфекционной патологии человека. Средство, не имеющее достаточной эффективности против вируса полиомиелита или аденовируса, но активное против других менее устойчивых вирусов (вирусов гриппа, гепатита С (ВГС), иммунодефицита человека (ВИЧ)) считается ограничено вирулицидным и может применяться только в отношении инфекционных заболеваний, вызванных конкретным возбудителем [3].

Несмотря на то что количество групп действующих веществ, применяемых для создания ДС, относительно ограничено, зарегистрировано большое число препаративных форм с заявленной вирулицидной активностью. Однако в инструкциях по применению ДС содержатся противоречивые сведения как об их вирулицидности, так и о диапазонах режимов применения [4].

В связи с этим нами было проведено исследование, целью которого явилось изучение сравнительной вирулицидной эффективности ДС на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), аминов, гуанидинов и альдегидов в отношении безоболочечных (полиовирус, аденовирус) и оболочечных (ВИЧ, ВГС, вирусы гриппа А) вирусов.

Материал и методы

Исследования проводили в соответствии с МУ 3.5.2431—08 «Методические указания по изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств» [3] в рамках

испытаний ДС перед дезинфектологической экспертизой в целях государственной регистрации (аттестат аккредитации № RA.RU.21ВИ01 от 23.10.15).

В настоящей работе представлены результаты испытания вирулицидной эффективности наиболее распространенных действующих веществ (ДВ).

Тест-вирусы, использованные в испытаниях, — вирус полиомиелита, аденовирус, ВИЧ, ВГС, вирус гриппа А (H1N1, H5N1).

Вирус полиомиелита, вакцинный штамм Сэбина, тип 1, получен из НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова. Титр вируса $6,5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$.

Аденовирус, тип 5, получен из Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского. Титр вируса $6,0 \log_{10} \text{ТЦИД}_{50}$.

ВИЧ, тип 1 (ВИЧ-1). В качестве источника ВИЧ использовали штамм ВИЧ-1_{899A} из коллекции штаммов ВИЧ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского». Титр вируса $6,5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$.

ВГС. В качестве вирусосодержащего материала использовали культуральную жидкость, собранную из ВГС-инфицированных культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) в стадии развития цитопатических явлений. Титр вируса $7,5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$.

Вирус гриппа А. В качестве источника вируса использовали штамм вируса гриппа человека А/H1N1 (титр вируса $6,5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$, культура клеток почек собаки (МДСК)) и штамм гриппа А птиц (H5N1), титр вируса $8,5 \lg \text{ТЦИД}_{50}$, из коллекции штаммов НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского.

Клетки. Для работы с вирусами использовали перевиваемые культуры клеток: клетки почки зеленых мартышек Vero (с вирусом полиомиелита), линию клеток человека HeLa (с аденовирусом), лимфобластоидные клетки человека МТ-4 (с ВИЧ), СПЭВ (с ВГС), МДСК (с вирусом гриппа А человека).

Структура исследования. Проводили инфицирование чувствительных культур клеток вирусом, подвергшимся воздействию ДС, инкубировали их при оптимальной температуре и определяли наличие или отсутствие инфекционного вируса. Репродукцию вируса в клетках оценивали по вирусиндуцированному цитопатическому эффекту с помощью метода микроскопии или метилтетразолиевого теста.

Критерии учета результатов испытаний. Эффект вирулицидного действия ДС оценивали по степени ингибирования инфекционного вируса, измеряемого в $\lg \text{ТЦИД}_{50}$. Критерием эффективности является степень ингибирования репродукции вируса, которая должна быть не менее $4,0 \lg \text{ТЦИД}_{50}$.

Концентрацию ДВ в растворе рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(C \cdot M)}{100},$$

где X — искомая концентрация ДВ в растворе (в %); C — концентрация рабочего раствора по препарату, рекомендованная в инструкции (в %); M — количество ДВ в средстве, указанное в инструкции по применению (в %) [5].

Таблица 1
Вирулицидная эффективность ДС на основе ЧАС

Средство №	Состав, %	Вирусы	Концентрации по ДВ, %, при экспозиции 60 мин	
			протираание	погружение
1	<i>N</i> -алкил- <i>N,N</i> -диметил- <i>N</i> -бензиламмоний хлорид — 6,4, <i>N,N</i> -дидецил- <i>N,N</i> -диметиламмоний хлорид — 3,0, суммарно 9,4, пропанол-2 — 5,9, рН 11,5	Б*	0,047 — н. э.	0,047 — н. э.
		О**	0,02	0,28
2	Алкилдиметилбензиламмоний хлорид — 11,0, рН 7,5	Б	0,66 — н. э.	0,66 — н. э.
3	Алкилдиметилбензиламмоний хлорид — 4,5, алкилдиметил(этилбензил)аммоний хлорид — 4,5, суммарно 9,0, рН 10,5	О	0,31	0,38
		Б	0,45 — н. э.	0,54 — н. э.
4	Дидецилдиметиламмоний хлорид — 0,5, рН 12,5	Б		0,5 — н. э.
		О		0,5
5	Алкил(С14-16)диметилбензиламмоний хлорид — 2,0, рН 9,5	Б	0,2 — н. э.	0,2 — н. э.
		О	0,2	0,2
6	<i>n</i> -алкилдиметилбензиламмоний хлорид — 5,75, <i>n</i> -алкилдиметил(этилбензил)аммоний хлорид — 5,75, суммарно 11,5	Б	0,46 — н. э.	0,46 — н. э.
		О	0,06	0,12

Примечание. * — Б — вирусы без оболочки вириона; ** — О — вирусы с липидной оболочкой вириона. Здесь и в табл. 2: н. э. — не эффективны (снижение титра вируса менее 4,0 lg ТЦИД₅₀).

Результаты

Проведено изучение вирулицидных свойств 6 ДС на основе одного или смеси нескольких ЧАС (табл. 1). Исследования выполняли с применением двух способов обеззараживания контаминированных вирусом объектов: протираания поверхностей и погружения изделий медицинского назначения (ИМН). Концентрации ДВ составили от 0,047 до 0,66%, при этом степень инаktivации безоболочечных вирусов варьировала от 1,0 до 2,0 lg ТЦИД₅₀ и не достигала критерия эффективности при экспозиции в течение 60 мин. Относительно инаktivации оболочечных вирусов, таких как вирус гриппа человека, ВИЧ или ВГС, эффективные ингибирующие концентрации при экспозиции 60 мин колебались от 0,02 до 0,31% (m = 0,147 ± 0,12%) при обработке поверхностей способом протираания и от 0,2 до 0,5% (m = 0,296 ± 0,13%) при обработке ИМН способом погружения.

ЧАС в качестве одного ДВ используются относительно редко. Значительно чаще они входят в состав комплексных ДС в сочетании с аминами, гуанидинами, альдегидами.

Концентрация испытанных комплексных средств на основе аминов составляла от 7,7 до 10,0% при суммарном содержании с ЧАС от 14,0 до 50,0%. Степень инаktivации вируса полиомиелита колебалась от 1,3 до 3,0 lg ТЦИД₅₀ при суммарной концентрации действующих веществ от 0,28 до 1,0% (табл. 2). При этом результаты инаktivации суспензионным методом и способом погружения металлических замковых инструментов не различались. Степень ингибирования инфекционности оболочечных вирусов (ВИЧ, ВГС) достигала 4,0 lg ТЦИД₅₀, а

эффективные концентрации колебались от 0,13 до 0,4 %.

Четкой зависимости минимально-эффективных концентраций от процентного содержания амина не отмечено.

Комплексные средства на основе сочетания гуанидинов в концентрации 0,6 и 9,0% с ЧАС при суммарном их содержании от 3 до 10% не повышали степень инаktivации вируса полиомиелита при общем содержании ДВ в рабочих растворах от 0,1 до 0,15%. Эти средства снижали инфекционность полиовируса при концентрации 0,1% (способ протираания) не более чем на 2,0 lg ТЦИД₅₀ и в то же время обладали вирулицидной активностью в отношении ВИЧ и ВГС в концентрации 0,06 и 0,15%.

Результаты изучения вирулицидной активности комплексных средств на основе смесей трех действующих веществ (ЧАС, аминов, гуанидинов) против безоболочечных и оболочечных вирусов представлены в табл. 3. Исследование проводили при обеззараживании протираанием поверхностей и погружением ИМН. Комплексные средства оказались эффективными, и суммарная концентрация для безоболочечных вирусов колебалась от 0,166 до 0,24% при способе протираания и от 0,24 до 0,28% при способе погружения ИМН, для оболочечных вирусов — от 0,08 до 0,09% при способе протираания и от 0,166 до 0,185% при способе погружения ИМН. Комплексные ДС, содержащие в качестве ДВ гуанидины, амины и ЧАС, являются эффективными вирулицидными средствами. На основании полученных данных нет возможности определить зависимость вирулицидного эффекта от содержания того или иного компонента.

Достаточно широко используются комплексные ДС, в состав которых входят альдегиды. Как правило, применяют глутаровый альдегид или альдегид щавелевой кислоты (глиоксаль). Нами были исследованы двухкомпонентные средства, содержащие в качестве ДВ глутаровый альдегид и ЧАС или глиоксаль и ЧАС.

Результаты изучения вирулицидности в отношении без-

Таблица 2
Вирулицидная эффективность ДС на основе смесей ЧАС с аминами или гуанидинами в отношении вируса полиомиелита при экспозиции в течение 60 мин

Средство №	Состав, %	Концентрация, %	Объект, способ применения	Степень ингибирования, lg ТЦИД ₅₀
7	Амин — 9,8, ЧАС — 4,2, суммарно 14,0	0,196/0,084 /0,28	Смешивание: вирус/средство (1:9)	2,0
			ИМН — погружение: замковый	1,3
8	Амин — 10,0, ЧАС — 40,0, суммарно 50,0	0,2/0,8 /1,0	Смешивание: вирус/средство (1:9)	3,0
			ИМН — погружение: замковый	2,0
9	Амин — 7,7, ЧАС — 22,5, суммарно 30,2	0,154/0,45/0,6	Смешивание: вирус/средство (1:9)	2,0
			ИМН — погружение: замковый	2,0
10	ЧАС — 0,6, гуанидин — 2,4, суммарно 3,0	0,024/0,096/0,12 — н. э.	Протираание поверхности	2,0
11	ЧАС — 9,0, гуанидин — 1,0, суммарно 10,0	0,09/0,01/0,1 — н. э.	То же	2,0
			0,13/0,01/0,15 н. э.	ИМН — погружение: замковый

Таблица 3

Вирулицидная эффективность ДС на основе комплекса трех ДВ (ЧАС, амины, гуанидины) в отношении оболочечных и безоболочечных вирусов при экспозиции 60 мин

Средство №	Состав, %	Концентрации по ДВ, %			
		безоболочечные вирусы		оболочечные вирусы	
		поверхность	ИМН	поверхность	ИМН
12	ЧАС — 5,7	0,114	0,114		
	Амин — 3,8	0,076	0,076	Нет данных	Нет данных
	Гуанидин — 2,5	0,05	0,05		
	Суммарно 12,0	0,24	0,24		
13	ЧАС — 7,5	0,075	0,125	0,0375	0,075
	Амин — 5,1	0,051	0,085	0,0255	0,051
	Гуанидин — 4,0	0,04	0,066	0,02	0,04
	Суммарно 16,6	0,166	0,28	0,08	0,166
14	ЧАС — 3,5		0,05	0,0175	0,035
	Амин — 10,0	Нет данных	0,15	0,05	0,1
	Гуанидин — 5,0		0,075	0,025	0,05
	Суммарно 18,5%		0,28	0,09	0,185

оболочечных вирусов некоторых комплексных средств на основе смесей альдегидов и ЧАС представлены в табл. 4. Исследование проводили при обеззараживании способом протирания поверхностей и погружения ИМН. Комплексные средства на основе альдегидов в сочетании с ЧАС обладали высокими вирулицидными свойствами. Эффективные концентрации альдегидов против вируса полиомиелита при способе протирания составили от 0,009 до 0,32% при соответствующих концентрациях ЧАС от 0,032 до 0,32%. При способе погружения металлических ИМН концентрации глутарового альдегида варьировали от 0,016 до 0,32% при соответствующем значении ЧАС от 0,018 до 0,32%. Существенного влияния на вирулицидность в суммарном эффекте ЧАС при наличии альдегидов не выявлено.

Сравнительный анализ вирулицидной эффективности рассмотренных групп ДС представлен в табл. 5.

Обсуждение

Результаты исследования показали, что ЧАС в виде монопрепаратов, а также их двухкомпонентные смеси в сочетании с аминами или гуанидинами не обладают достаточной вирули-

цидностью в отношении безоболочечных вирусов в искомых режимах. В нашем исследовании все изученные группы химических веществ — ЧАС, смеси ЧАС с аминами или гуанидинами — показали достаточную вирулицидную эффективность против ВИЧ, ВГС, вирусов гриппа А в различных концентрациях от 0,02 до 0,4% при экспозиции в течение 60 мин. При этом не наблюдалось четкой зависимости вирулицидного действия от концентрации ДВ в ДС и рабочих растворах.

Приведенные выше материалы подтверждают сложившееся представление о малой эффективности ЧАС против безоболочечных вирусов [6—8]. По данным ЕРА США, в отношении оболочечных вирусов, таких как ВИЧ, гепатита В и С, зарегистрированы средства при концентрации ДВ от 0,0489 до 0,21% [9, 10], что согласуется с нашими данными.

Средства дезинфекции, содержащие смеси ЧАС, амины и гуанидины, обладают вирулицидностью против вирусов полиомиелита и аденовируса в исследованных концентрациях рабочих растворов от 0,166 до 0,28% суммарных концентраций ДВ при экспозиции не менее 60 мин. Выявить зависимость вирулицидности от процентного соотношения компонентов не удалось.

Сложные композиционные ДС, содержащие несколько ДВ, обладают высокой вирулицидной эффективностью, особенно имеющие в своем составе альдегиды.

Композиции ЧАС с альдегидами характеризуются вирулицидностью в отношении безоболочечных вирусов при снижении суммарной концентрации ДВ в рабочих растворах. Однако существенного влияния ЧАС на степень инактивации вирусов не выявлено. Эффективные вирулицидные концентрации средств, содержащих альдегиды, находились в пределах от 0,041 до 0,64% при экспозиции не менее 60 мин. Имеются данные, полученные на модели вируса гепатита А, который предлагается как суррогатный тест-вирус для определения вирулицидной эффективности в отношении вируса гепатита В, эффективные концентрации глутарового альдегида находятся в таких же пределах (0,05%) [11].

Средства, подтвердившие вирулицидность против безоболочечных вирусов, могут быть использованы для дезинфекции при любой вирусной (включая особо опасные) инфекции, имеющей значение в инфекционной патологии человека [3].

Средства, не имеющие достаточной эффективности в отношении вируса полиомиелита или аденовируса, но обладающие вирулицидной активностью в отношении менее устойчивых вирусов (вируса гриппа, ВГС, ВИЧ), т. е. ограниченной вирулицидностью, могут применяться только против тех инфекций, к возбудителям которых подтверждена их эффективность.

Общим является то, что для ингибирования инфекционно-

Таблица 4

Вирулицидная активность в отношении вируса полиомиелита комплексных средств на основе альдегидов и ЧАС

Средство №	Состав, %	ДВ суммарно, %	Эффективные концентрации по ДВ, %, при экспозиции 60 мин, ГА/ЧАС	
			протирание	погружение
15	ГА — 0,8	1,7	0,016/0,018	0,016/0,018
	ЧАС — 0,9		$\Sigma^* = 0,034$	$\Sigma = 0,34$
16	ГА — 9,0	41,0	0,009/0,032	0,045/0,16
	ЧАС — 32,0		$\Sigma = 0,041$	$\Sigma = 0,20$
17 (30 мин)	ГА — 8,0	16,0	0,32/0,32	0,32/0,32
	ЧАС — 8,0		$\Sigma = 0,64$	$\Sigma = 0,64$
18	Глиоксаль — 9,0	15,0	0,27/0,18	0,27/0,18
	ЧАС — 6,0		$\Sigma = 0,45$	$\Sigma = 0,45$

Примечание. ГА — глутаровый альдегид; * — сумма концентраций (в %).

Таблица 5

Сравнительный анализ вирулицидности в отношении оболочечных и безоболочечных вирусов ЧАС, смесей ЧАС с аминами, гуанидинами и альдегидами

ДВ	Безоболочечные вирусы	Оболочечные вирусы
ЧАС	Не эффективны при концентрации от 0,047 до 0,66%	Эффективны при концентрации от 0,02 до 0,5%
ЧАС, амины	Не эффективны при концентрации от 0,28 до 1,0%	Эффективны при концентрации от 0,13 до 0,4%
ЧАС, гуанидины	Не эффективны при концентрации от 0,1 до 0,15%	Эффективны при концентрации от 0,06 до 0,15%
ЧАС, амины, гуанидины	Эффективны при концентрации от 0,166 до 0,28%	Эффективны при концентрации от 0,08 до 0,185
ЧАС, альдегиды	Эффективны при концентрации от 0,04 до 0,64	Нет данных

сти безоболочечных вирусов требуются более высокие концентрации ДВ, чем для инактивации оболочечных, т. е. более сложных по структуре вирусов.

Выводы

1. ЧАС не обладают эффективностью в отношении безоболочечных вирусов.

2. Ингибирование инфекционности безоболочечных вирусов требует более высоких концентраций ДВ, чем для инактивации оболочечных, более сложных по структуре вирусов.

3. Комплексные средства на основе ЧАС, аминов и гуанидов или альдегидов обладают вирулицидной эффективностью в отношении как безоболочечных, так и оболочечных вирусов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность проф. П.Г. Дерябину за проведение ряда исследований с вирусами гепатита С и гриппа А человека и птиц.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 9—11 см. REFERENCES)

1. Шандала М.Г. Место и роль дезинфекции в профилактике инфекционных заболеваний людей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (4): 16—9.
2. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
3. МУ 3.5.2431—08. Методические указания по изучению и оценке вирулицидной активности дезинфицирующих средств. М.; 2010.
4. Канищев В.В., Еремеева Н.И. Проблемы выбора и применения современных дезинфицирующих средств. Available at: http://niid.ru/s/210/files/press/release/125515_478.pdf.
5. Национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации по выбору химических средств дезинфекции и стерилизации для использования в медицинских организациях. М.; 2015. Available at: <http://www.med-obr.info/education/docs/himia.pdf>.
6. Пантелеева Л.Г., Федорова Л.С., Цвирова И.М., Белова А.С. Вирулицидная, туберкулоцидная и фунгицидная активность новых средств

из группы поверхностно-активных веществ. *Дезинфекционное дело*. 1998; (3): 16.

7. Рейнбабен Ф. *Основы противовирусной дезинфекции*. М.: Летний сад; 2014.
8. Носик Н.Н., Носик Д.Н., Дерябин П.Г., Желтухин С.Л. Вопросы безопасности и вирулицидные свойства дезинфицирующих средств. *Дезинфекционное дело*. 2006; (3): 36—8.

REFERENCES

1. Shandala M.G. Place and role of disinfection in preventive measures of human infectious diseases. *Epidemiologia i infeksionnye bolezni*. 2013; (4): 16—9. (in Russian)
2. L'vov D.K., ed. *Handbook on Virology. Viruses and Human and Animal Viral Infections. [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
3. MU 3.5.2431—08. Guidelines to study and evaluate virucidal effect of disinfectants. Moscow; 2010. (in Russian)
4. Kanishchev V.V., Eremeeva N.I. The problems on the selection and administration of modern disinfectants. Available at: http://niid.ru/s/210/files/press/release/125515_478.pdf. (in Russian)
5. The National Association of Professionals for the control of infections associated with health care. Federal recommendations for selection of chemical means for disinfection and sterilization in clinics. Moscow; 2010. (in Russian)
6. Panteleeva L.G., Fedorova L.S., Tsvirova I.M., Belova A.S. Virucidal, tubercocidal and fungicidal activity of new compounds in tensides group. *Dezinfeksionnoe delo*. 1998; (3): 16. (in Russian)
7. Rheinbaben F. *Handbuch der Viruswirksamen Desinfektion*. Springer Berlin Heidelberg; 2002. (in German)
8. Nosik N.N., Nosik D.N., Deryabin P.G., Zheltukhin S.L. Problems of biosafety and virucidal facilities of disinfectants. *Dezinfeksionnoe delo*. 2006; (3): 36—8. (in Russian)
9. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs List F: EPA's Registered Antimicrobial Products Effective Against Hepatitis C Virus. January 9, 2009. USA; 2009: 6—16.
10. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs List D: EPA's Registered Antimicrobial Products Effective Against Human HIV-1 and Hepatitis B Virus January 9, 2009. USA; 2009.
11. Sauerbrei A., Schacke M., Glück B., Bust U., Rabenau H.F., Wutzler P. Does limited virucidal activity of biocides include duck hepatitis B virucidal action? *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 276. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/276>.

Поступила 16.05.16

Принята в печать 24.05.16

РЕЦЕНЗИИ

Глубокоуважаемые коллеги!

25 июня 2015 г. в издательстве Elsevier Academic Press вышла из печати новая книга ведущих отечественных специалистов в области изучения природноочаговых вирусных инфекций:

L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G.

Zoonotic viruses of Northern Eurasia.

Taxonomy and ecology.

452 стр. (235 мм × 191 мм)

В книге представлены результаты собственных исследований и анализ данных отечественных и зарубежных авторов по таксономии, экологии, распространению, эпидемиологии, эпизоотологии, патогенности для человека и животных зоонозных вирусов, изолированных в различных экосистемах разных ландшафтно-климатических поясов (от Арктики до субтропиков) Северной Евразии.

Книга содержит данные по циркуляции и эволюции свыше 80 вирусов, принадлежащих к трем отрядам, 10 семействам, 19 родам вирусов, а также прионов. Для молекулярно-генетической характеристики использовали метагеномный анализ (next generation sequencing). Исследования проводились в рамках проблем изучения биоразнообразия и биобезопасности, прогноза, глобального распространения новых инфекций, порой протекающих с высокой смертностью и существенным экономическим ущербом, что определяет национальную и международную значимость проблемы

Приобрести книгу можно на сайте издательства:

http://store.elsevier.com/product.jsp?isbn=9780128017425&_requestid=213451

Рецензия на книгу **D.K. Lvov, M.Y. Shchelkanov, S.V. Alkhovsky, P.G. Deryabin «Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology»**. Academic Press, New York, USA. 2014. 452 pp. ISBN 978-0-12-801742-5. US\$130.00; paperback or eBook. Разрешение на публикацию любезно предоставлено 19 августа 2016 г. от имени редакции Journal of Wildlife Diseases Daniel M. Mulcahy, PhD, DVM, and James N. Mills, PhD, www.jwildlifediseases.org

Автор рецензии: Чарльз Е. Руппребхт, доктор биологических наук, профессор (С. Е. Rupprecht, The Wistar Institute, 3601 Spruce St., Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA (charles_rupprecht@yahoo.com)).

Большинству читателей Journal of Wildlife Diseases на первый взгляд совершенно незачем приобретать книгу о вирусах, которые встречаются в местах весьма от них далеких. Все же случилось ли вам вести беседу с коллегами с бесконечным рефреном «я искренне стараюсь оставаться аполитичным в своих исследованиях?» А разговаривать со студентом, проявляющим абсолютное незнание истории и пугающее отсутствие хотя бы малейшего интереса к ней? Увы, подчас является безумием полагать, что наша профессиональная деятельность никоим образом не зависит от исторических и политических событий, особенно когда есть риск политических предубеждений. Если говорить начистоту, какие ассоциации возникают у специалиста в области заболеваний животных при упоминании зоонозов и здоровья человека и животных на территории бывшего СССР? Сибирская язва? Авария в Чернобыле? Заводы «Биопрепарат»? Удивительно, ничто из этого даже отдаленно не напоминает сцены из, например, классического фильма Стенли Кубрика «Доктор Стрейнджлав»? Я, взрослеющий представитель поколения бэби-бум, должен признаться, что подходил к этому обзору с легким трепетом. Мой отец был офицером воздушных сил США, поэтому среди моих детских воспоминаний и апокрифичное постукивание башмаком в ООН, и последующий Карибский кризис, омраченный неверно истолкованным «Мы вас похороним», иными словами, в 50—60-е годы прошлого века ничто не могло изгладить волнения в моей любящей природу и научную фантастику душе.

Впоследствии как участник многолетней программы исследований в области биологического оружия во Владимирской области с американской стороны я понял, что за рубежом зачастую желательнее сохранять здоровый скептицизм. Именно поэтому, возвращаясь в наши дни, при виде отнюдь не умиротворяющих газетных заголовков об Украине, странах Прибалтики, Сирии, Афганистане, территориальных спорах бывших союзных республик, Турции и пр. становится очевидным, что не удастся избежать своевременных размышлений о намерениях «путинского медведя», как и с трудом удастся побороть потенциальный скептицизм во время чтения. Так, не удалось не вообразить легкого налета шпионских страстей и не ставить под сомнение достоверность описания вирусологических механизмов в этой части Северной Евразии со времен холодной войны до наших дней.

Всему этому есть веская причина. Чтобы хотя бы попытаться понять, какое влияние завтрашние глобальные потрясения будут оказывать на возникновение и распространение инфекционных заболеваний из какого-нибудь беспокойного региона, для сравнения необходимо держать в уме некую отправную точку. Д.К. Львову и его соавторам удалось сделать важный и решительный шаг в этом направлении, объединив вирусную таксономию и экологию около 80 патогенов, обитающих на огромной территории в 15 млн км², включающей биомы от Арктики до субтропических пустынь. Авторы не просто собирали вирусы как марки, а совместили свой многолетний опыт с применением передовых технологий вроде

секвенирования нового поколения. К тому же они не упустили из внимания, присущего настоящим натуралистам, и такие детали, как возможное значение всех этих наблюдений с прагматической точки зрения не только для людей, но и для домашних животных и дикой природы.

Текст разделен на две основные части: «История и методология» и «Зоонозные вирусы». В первой задается исторический контекст, описывается методология и примененный в исследовании экологический подход. Вторая часть сосредоточена на описании вирусов с точки зрения таксономии, истории, распространения, эпизоотологии, диагностики, клиники и патологии, а также приведены данные о хозяевах и возможностях контроля заболеваемости. Удобный список сокращений представляет собой набросок номенклатуры вирусов. Каждая глава сопровождается таблицами позвоночных хозяев, картами изоляции вирусов, фотографиями и филогенетическим анализом. В конце каждой главы ссылки сгруппированы по возбудителю и включают как западную, так и российскую литературу. В общей сложности приведено около 50 цветных и более 100 черно-белых рисунков. Интересной особенностью являются фотографии и мини-биографии многих пионеров российской вирусологии, включая Д.И. Ивановского и В.М. Жданова и их эпохальный вклад в науку. Именно такого персонального подхода, особенно в Новом Свете, зачастую сегодня не хватает. Как и ожидалось, описаны привычные арбо- и зоонозные вирусы, такие как вирус классической геморрагической лихорадки, гриппа, японского энцефалита, клещевого энцефалита и другие. Для полноты картины в работе дано описание пригоршни асфарвирусов и прионов. Помимо этого, представлены и гораздо менее известные вирусы, такие как Бханджа, Иссук-Куль, Кемерово, лихорадка долины Сыр-Дарьи, Тамды и Укуниемеи.

В целом книга достаточно легко читается, несмотря на несколько неприятных опечаток и грамматических ошибок, которые должны были исправить в издательстве, и встречающиеся иногда красочные или причудливые синонимы английских терминов, перепутанные при переводе. Впрочем, это всего лишь мелкие неточности. Учитывая как минимум колоссальный географический размах и весьма далекий от идеального уровень научного общения во время холодной войны, эта книга необходима всем настоящим сравнительным вирусологам и любому продолжающему учиться всю жизнь человеку, серьезно интересующемуся работой с новыми природными зоонозами обширного Старого Света. Вы можете не согласиться с умозаключениями и выводами авторов, однако их аргументы следует использовать для проверки или опровержения ваших собственных представлений о концепции природных очагов инфекций и того, как на них может повлиять изменение климата и давление антропогенного фактора сейчас и на протяжении всего XXI века. Сходным образом эта книга также может послужить основой для наведения мостов с коллегами по ту сторону океана для работы над масштабными международными проектами, связанными с регионами, ранее закрытыми «железным занавесом».

весом». В конце концов мелкие политические трения никогда не ограничат личный интерес и профессиональное стремление специалистов к изучению возникновения, адаптации и эволюции патогенов в наше время. Таким образом, верить в то, что эти патогены так и останутся в Северной Евразии, не позволяют ни биология, ни история, ни ежедневные газетные заголовки.

Настоящая книга — не «Вирусология» Филдса, не чашка чая для всех. Она, пожалуй, более личная, специализированная, сфокусированная, неортодоксальная и продуманная. Это, конечно, никак не связано с целью работы, однако описание огромного множества местных вирусов, большое количество из которых остаются слабо изученными, легко позволяет понять, что именно привело к расцвету программ биооружия. Чтобы еще больше насладиться приобретен-

ным для себя подарком, помимо внимательного его прочтения, запланируйте на выходные что-нибудь напоминающее об эпохе холодной войны вроде провокационного триллера Майкла Эптеда «Парк Горького» или сентиментальной ностальгии по агенту 007 в исполнении Шона Коннери в «Из России с любовью». Также перед прочтением можете посмотреть новую кинокартину Стивена Спилберга «Шпионский мост», которая должна помочь вам настроиться на правильную волну для восприятия этой исторической, но в то же время актуальной вещи, лишенной какого-либо неуместного реваншизма. Ознакомьтесь со свежими идеями о микробиологии в контексте природных патогенов — уверен, вы получите от чтения моральное удовлетворение; в конце концов, что вы можете потерять?

Перевод рецензии: А.А. Еремян, Е.Т. Алипер.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

ПРОФЕССОР ТОМАС ИОСИФОВИЧ ТИХОНЕНКО

(к 90-летию со дня рождения)

Среди выдающихся ученых-вирусологов нашей страны имя Т.И. Тихоненко занимает видное место. Он является одним из основоположников в нашей стране молекулярной вирусологии и биохимии вирусов, создателем крупной научной школы, членом-корреспондентом РАН, профессором, доктором биологических наук, лауреатом премии Совета Министров СССР, заведующим лабораторией биохимии вирусов и заместителем директора по науке Института вирусологии им. Д.И. Иванковского и одним из создателей кафедры вирусологии биофака Московского университета, где преподавал с 1964 по 1995 г.

Томас Иосифович родился в октябре 1926 г. в Белоруссии в селе Селавщина. С середины 1944 г. Томас Иосифович как военный служащий стал участником боевых действий Красной Армии. Был награжден боевыми медалями.

После войны Томас Иосифович поступил в Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова на философский факультет. Учился блестяще.

Однако его высшее образование было прервано: студент-фронтвик Тихоненко был арестован по совершенно необоснованным обвинениям. После освобождения из заключения (1949—1953) Томас Иосифович продолжил учебу в МГУ на биолого-почвенном факультете, специализируясь на кафедре биохимии растений, которой заведовал выдающийся биохимик академик Андрей Николаевич Белозерский, учеником которого и стал Томас Иосифович.

Работая с 1963 г. в Институте вирусологии, Томас Иосифович и его молодые сотрудники сосредоточились на изучении структуры вирусных нуклеиновых кислот. Большой вклад в то время был сделан Томасом Иосифовичем в изучение организации структуры вирусной ДНК *in situ*. Опубликованные результаты его исследований получили большую известность и признание среди ученых ведущих стран мира.

Однако по-настоящему талант Томаса Иосифовича раскрылся, когда он одним из первых в СССР начал развивать и одновременно использовать как инструмент технологию генной инженерии.

Под руководством Томаса Иосифовича разрабатывалась технология получения комплекса ферментов для генной инженерии и одновременно шли пионерские работы по конструированию векторных систем для будущей генной терапии на основе рекомбинантных аденовирусов. Основной этап этой работы был успешно завершен в 1982—1983 гг. Похожие векторные системы практически одновременно были созданы во Франции и Швеции.

Сегодня векторы на основе вирусов стали обычным инструментом при разработке лекарственных средств для генной терапии и векторных вакцин.

Фактически Томас Иосифович — один из основателей нового направления в биотехнологии молекулярной биотехнологии. Работы в этой области были им продолжены в Институте сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН (1984—1997) в лаборатории генной инженерии.

Талант Томаса Иосифовича был многогранен. Поражала его способность четко и ясно излагать свои мысли не только вербально, но и «на бумаге», практически без последующей редакции. Им написано множество научных статей и обзоров, монографий и учебников. Он был соавтором первого учебника по молекулярной биологии вирусов совместно с В.И. Аголом, Г.И. Атабековым и В.Н. Крыловым.

Томас Иосифович был широко эрудированным человеком. Его интересовали вопросы общебиологические, например проблема биологической эволюции и роль вирусов в этом процессе. Этот вопрос рассматривался им в нескольких печатных работах.

Во всех лабораториях, которыми руководил Томас Иосифович, постоянно находились и активно работали студенты старших курсов и аспиранты. Школа Томаса Иосифовича Тихоненко насчитывает десятки научных сотрудников, многие из которых и сейчас успешно работают и преподают в России и за рубежом.

Редакция поздравляет доктора биологических наук, профессора РАН, ответственного секретаря редакционной коллегии журнала «Вопросы вирусологии» Татьяну Владимировну Гребенникову с избранием в члены-корреспонденты РАН по специальности «Эпидемиология».

НЕКРОЛОГИ

ПАМЯТИ СЕРГЕЯ МИНОВИЧА КЛИМЕНКО

(17.02.1929 — 04.11.2016)



4 ноября 2016 г. на 88-м году жизни скончался выдающийся ученый, специалист в области морфологии и молекулярной биологии вирусов, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Сергей Минович Клименко.

С.М. Клименко — известный ученый в области вирусологии, автор более 200 опубликованных работ в нашей стране и за рубежом, ряда патентов и монографий.

Научные исследования С.М. Клименко были посвящены ультраструктурным исследованиям различных патогенных для человека вирусов и анализу их репродукции в инфицированных клетках и тканях. Проведенные им исследования по проблемам структурной организации вирионов целого ряда арбовирусов, вируса гриппа и парагриппа, вируса иммунодефицита человека, а также бактериофагов и нуклеиновых кислот легли в основу нового направления, которое можно назвать как «молекулярно-структурная характеристика вирионов». Результаты этих исследований были опубликованы в двух монографиях и многочисленных статьях. Кроме того, С.М. Клименко параллельно тщательно исследовал морфогенез этих вирусов, т. е. процессы вхождения, этапы развития вирионов в клетке вплоть до выхода вирионов из разрушающихся клеток в окружающее пространство.

Сергей Минович являлся создателем лаборатории структуры и морфогенеза вирусов (60—70-е годы про-

шлого века) и основоположником научной школы, которая на протяжении более 50 лет активно работает в Российской Федерации, а некоторые ее представители и за рубежом. Под его руководством были защищены 11 кандидатских и 3 докторские диссертации. С.М. Клименко сам многократно работал в зарубежных лабораториях (США, Франция, Швейцария) и активно контактировал с ведущими иностранными специалистами (лауреатами Нобелевской премии У. Стенли, Д. Гайдушеком, Дж. Палладе, проф. В. Бернардом). Следует отметить, что возглавляемая С.М. Клименко лаборатория оснащена лучшей зарубежной техникой (японские микроскопы и другие приборы, необходимые для плодотворной работы в области ультраструктурных исследований).

Научная деятельность С.М. Клименко началась еще в стенах II Медицинского института (лечебный факультет), куда он поступил в 1947 г. На кафедре патологической физиологии он выполнил исследование по изучению влияния длительного применения пенициллина на секрецию желудочного сока. Данные о повышении кислотного желудочного сока были доложены на 2-й Всесоюзной конференции студенческих обществ (Москва, 1952). Защитив кандидатскую диссертацию под руководством акад. В.Д. Тимакова, Сергей Минович поступил на работу в Институт вирусологии, и началась 58-летняя научная деятельность ученого в стенах института. В 1970 г. он защищает докторскую диссертацию, а с 1987 по 2010 г., помимо заведования лабораторией, руководит отделом молекулярной вирусологии и занимает должность заместителя директора института по научной работе. В 1992 г. научная деятельность С.М. Клименко была отмечена премией РАМН им. Д.И. Ивановского. В 1999 г. ему с группой ученых института во главе с акад. РАН Д.К. Львовым присуждают Государственную премию за цикл работ по изучению арбовирусов и арбовирусных инфекций. Сергей Минович — член редколлегий двух научных журналов «Вопросы вирусологии» и «Бюллетень Академии медицинских наук» и долгое время являлся членом совета ВАК по эпидемиологии, микробиологии и вирусологии.

С.М. Клименко был ведущим специалистом в области молекулярной вирусологии в нашей стране. Он был добросовестным, внимательным и заботливым человеком, пользовался заслуженным авторитетом в научном мире и у сотрудников института.

*Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский
центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»,
редакционная коллегия журнала
«Вопросы вирусологии»*