

**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 (на базе Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

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

Адрес редакции: 129515, Москва,
ул. 1-я Останкинская, д. 26

Зав. редакцией *Т.М. Курушина*

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

www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

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 *М. В. Козлова*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 14.03.2017.

Подписано в печать 06.04.2017.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 271.

Отпечатано в типографии ООО

«Подольская Периодика»,

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

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

Т. 62. № 4. 145-192

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.

4

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:

Альховский С.В. (д.б.н.)

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)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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.; член-корр. РАН, 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., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Негесов С.В. (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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., член-корр. 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, 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)

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)

VOPROSY VIROSOLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 62 • 4 • 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:

Al'khovskiy S.V. – Doctor of Biological Sciences; **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; **Zvrev 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; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

Editorial council

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

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 A.G. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk)

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

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

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

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

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

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

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

Shchelkanov M.Yu. – Sc.D, Prof. (Vladivostok)

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)

Gribova 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)



СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В.* Геморрагическая лихорадка Луйо. 149

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Казеннова Е.В., Лага В.Ю., Громов К.Б., Санков М.Н., Попова Е.С., Игумнова Е.Г., Опарина Е.Н., Сорокина Т.А., Бобкова М.Р.* Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в северных портовых городах России. 154
- Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Чернорыж Я.Ю., Коваль В.С., Иванов А.А., Жузе А.Л., Куц А.А.* Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. 162
- Санин А.В., Дерябин П.Г., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Кожевникова Т.Н.* Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А(Н5N1) в культуре клеток. 168
- Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В.* Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1 174
- Коноплева М.В., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семененко Т.А., Суслов А.П.* Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности 179
- Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Морозова О.В.* Цитокины и антитела при экспериментальном заражении диких и лабораторных грызунов (Rodentia) вирусом клещевого энцефалита. 186

ЮБИЛЕЙ

Петр Григорьевич Дерябин (к 70-летию со дня рождения)

CONTENTS

REVIEWS

- Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisovich S.V.* Lujo hemorrhagic fever

ORIGINAL RESEARCH

- Kazenнова E.V., Laga V.Yu., Gromov K.B., Sankov M.N., Popova E.S., Igumnova E.G., Oparina E.N., Sorokina T.A., Bobkova M.R.* Molecular epidemiological analysis of HIV infection in northern seaports of Russia
- Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Chernoryzh Ya.Yu., Koval V.S., Ivanov A.A., Zhuze A.L., Kushch A.A.* Dimeric bisbenzimidazoles suppress the herpes simplex virus and human cytomegalovirus infections in cell cultures
- Sanin A.V., Deryabin P.G., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Kozhevnikova T.N.* Antiviral activity of Phosprenyl and Gamapren against infection caused by influenza A (H5N1) virus in cell culture
- Manapova E.R., Fazylov V.Ch., Guryanova S.V.* Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1
- Konopleva M.V., Borisova V.N., Sokolova M.V., Feldsherova A.A., Krymskij M.A., Semenenko T.A., Suslov A.P.* A comparative characteristic of antigenic properties of recombinant and native HBs-antigens with G145R mutation and evaluation of their immunogenicity
- Bakvalova V.N., Panov V.V., Potapova O.F., Morozova O.V.* Cytokines and antibodies in experimental infection of wild and laboratory rodents with tick-borne encephalitis virus

ANNIVERSARY

70th Anniversary of Professor P.G. Deryabin

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:578.833.29]-036.1

*Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В.***ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА ЛУЙО**

ФГБУ «48 ЦНИИ» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6

Геморрагическая лихорадка Луйо (ГЛЛ) — вирусное заболевание, сопровождающееся повышением температуры, головной болью, рвотой, диареей, артралгией, миалгией и многочисленными проявлениями геморрагического синдрома. Клиническая картина ГЛЛ сходна с таковой геморрагической лихорадки Ласса. Первый случай ГЛЛ зарегистрирован в 2008 г. в г. Йоханнесбурге (ЮАР). От заболевшего впоследствии заразились 4 медицинских работника, 4 из 5 заболевших погибли. Этиологическим агентом заболевания является вирус Луйо (Lujo — LUJV), принадлежащий к роду *Arenavirus* семейства *Arenaviridae*. Вирус Луйо является вторым после вируса Ласса патогенным для человека аренавирусом, выделенным в Африке за последние 40 лет. В обзоре рассмотрены данные об эпидемиологии, клинике, диагностике заболевания, свойства вируса Луйо (с проведением филогенетического анализа возбудителя), а также рекомендованные меры предосторожности для предотвращения вторичных случаев заболевания.

Ключевые слова: обзор; вирусные геморрагические лихорадки; геморрагическая лихорадка Луйо; аренавирусы; вирус Луйо — LUJV; геномная РНК; структурные белки вируса; филогенетический анализ; резервуар инфекции; методы диагностики.

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В. Геморрагическая лихорадка Луйо. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 149-153.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-149-153>*Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V.***LUJO HEMORRHAGIC FEVER**

48th Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

Lujo hemorrhagic fever (LHF) is a viral disease accompanied with fever, headache, vomiting, diarrhea, arthralgia, myalgia and numerous signs of hemorrhagic syndrome. LHF causes a clinical syndrome remarkably similar to Lassa hemorrhagic fever. The first case of LHF occurred in Johannesburg, South Africa, in 2008. There was a secondary transmission from the index patient to four healthcare workers. Four of the five patients died. The etiologic agent of LHF is Lujo virus (LUJV) belonging to *Arenavirus* genus of the *Arenaviridae* Family. Virus Lujo is the second pathogenic arenavirus, after Lassa virus, to be recognized in Africa during the last 40 years. Data about epidemiology, clinical characteristics and diagnostics of LHF, properties of Lujo virus (according to phylogenetic analysis), and recommended precautions for preventing secondary transmission are considered in this paper.

Key words: review; viral hemorrhagic fever; Lujo hemorrhagic fever; arenaviruses; Lujo virus (LUJV); RNA; viral structural proteins; phylogenetic analysis; reservoir of infection; methods of diagnostics.

For citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Syromyatnikova S.I., Borisevich S.V. Lujo hemorrhagic fever. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 149-153. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-149-153>

For correspondence: Sergey V. Borisevich, Doctor of Biology, Professor, Head of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about authors:Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>Syromyatnikova S.I., <http://orcid.org/0000-0002-1490-9448>Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5742-3919>**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 10 February 2017

Accepted 28 February 2017

Геморрагическая лихорадка Луйо (ГЛЛ) (Lujo virus (LUJV), Lujo hemorrhagic fever (LHF)) — вирусное заболевание, сопровождающееся повышением температуры,

головной болью, рвотой, диареей, артралгией, миалгией и кровоизлияниями [1].

Возбудитель и его характеристика. Этиологическим

Для корреспонденции: Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ. E-mail: 48cnii@mil.ru

агентом заболевания является вирус Луйо, выделенный в 2008 г. от погибшего больного, умершего в г. Йоханнесбурге (ЮАР). Вызываемое им заболевание получило название с учетом его географического происхождения по первым слогам названий городов, в которых были зарегистрированы случаи заболевания (г. Лусака, Замбия, и г. Йоханнесбург, ЮАР) [2].

Возбудитель — РНК-содержащий вирус семейства *Arenaviridae*, рода *Arenavirus*, антигенная группа аренавирусов Старого Света (комплекс лимфоцитарный хориоменингит (ЛХМ) — Ласса). Морфология вируса Луйо является типичной для представителей рода *Arenavirus* (средний диаметр вирионов 90—120 нм, оболочка с пепломерами размером 8—10 нм, представляющими собой тетрамеры гликопротеинов G1 и G2, два циркулярных нуклеокапсидных образования, нефункциональные рибосомы внутри вирионов, напоминающие песчинки) [3].

Геномная РНК состоит из двух сегментов одноцепочечной минус-РНК, обладающих амбисенсной стратегией кодирования (L — большой сегмент размером 7,2 тыс. нуклеотидных оснований (т. н. о.), S — малый сегмент размером 3,2 т. н. о.). РНК-геномные сегменты соединены между собой консервативными комплементарными последовательностями на 3'- и 5'-концах [3, 4].

В состав вириона входит РНК-зависимая РНК-полимераза, принимающая участие в транскрипции на геномной минус-РНК, комплементарной мРНК. мРНК содержит две открытые рамки считывания, разделенные межкодирующей областью [2].

S-сегмент кодирует белок нуклеокапсида (N) из 598 аминокислотных остатков (а. о.) с молекулярной массой (ММ) 63,1 кДа и изоэлектрической точкой (pI) 9,0 и предшественник гликопротеинов G1 и G2 (GPC) из 498 а. о., ММ 52,3 кДа, pI 9,0. Гены, кодирующие указанные белки, расположены у 3'- и 5'-концов S-сегмента [2]. Посттрансляционная модификация включает расщепление белка GPC на гликопротеины G1 (162 а. о., ММ 18,9 кДа, pI 6,4) и G2 (233 а. о., ММ 26,8 кДа, pI 9,5) соответственно, формирующие тетраэдрические шипы оболочки вириона [2, 5, 6]. Белок G1 содержит эпитопы, ответственные за взаимодействие с вируснейтрализующими антителами. Белок G2 является более консервативным, содержит 9 остатков цистеина, формирующих третичную структуру белка. Три из этих остатков входят в состав цинксвязывающего участка, участвующего в формировании функционально активного комплекса поверхностных гликопротеинов, кото-

рый ранее был выявлен у вируса Хунин, аренавируса Нового Света [7]. Белок G2 отвечает за проникновение вирионов через мембрану инфицированных клеток. Белок нуклеокапсида формирует комплекс с геномной РНК [8].

L-сегмент РНК содержит гены, имеющие информацию о синтезе L-белка (вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, ММ 256 кДа, pI 6,4), соответствующая последовательность расположена у 3'-конца L-сегмента геномной РНК, и Z-белка (цинксвязывающего белка, ММ 10,5 кДа, pI 9,3), соответствующая последовательность расположена у 5'-конца L-сегмента геномной РНК [3, 9].

При использовании праймеров, специфичных по отношению к 5'- и 3'-концам каждого фрагмента генома, проведено секвенирование геномной РНК вируса Луйо. Геномная последовательность L-сегмента зарегистрирована в GenBank под № FJ 952384, геномная последовательность S-сегмента — № FJ 952385 [2]. Следует указать, что при секвенировании геномной РНК изолятов вируса Луйо, выделенных из сыворотки крови больных, печени погибших от заболевания, полученных в результате проведения обогатительного пассажа в культуре клеток, различий между отдельными изолятами не выявлено [2]. Данный факт можно объяснить как ограниченным количеством исследуемых изолятов (пробы были получены от трех заболевших), так и высоким уровнем консервативности геномной РНК вируса Луйо.

Филогенетический анализ вируса Луйо, основанный на сравнении первичных структур РНК L- и S-фрагментов геномной РНК генов G1, G2 и NP вируса Луйо с аренавирусами Старого и Нового Света, показал, что данный возбудитель является ответвлением от группы аренавирусов Старого Света, из которых наиболее близкий ему вирус ЛХМ. При сравнении по любой из вышеперечисленных структур вирус Луйо занимает промежуточное положение между аренавирусами Старого и Нового Света, заняв тем самым особую генетическую нишу между ними. Аналогичный результат получен при анализе расчетных первичных структур аминокислотных последовательностей, соответствующих L-сегментам геномных РНК патогенных для человека аренавирусов Старого и Нового Света [10]. Уровни дивергенции нуклеотидной последовательности по различным генам представлены в табл. 1.

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что вирус Луйо, являясь наиболее родственным вирусом ЛХМ, филогенетически отличается от всех

Таблица 1

Результаты оценки уровня дивергенции нуклеотидной последовательности геномов вируса Луйо и патогенных для человека аренавирусов Старого и Нового Света. Данные анализа геномной последовательности L-сегмента (зарегистрирована в GenBank под № FJ 952384) и геномной последовательности S-сегмента (зарегистрирована в GenBank под № FJ 952385)

Группа	Вирус	Уровень дивергенции вируса Луйо и сравниваемого аренавируса по сегментам РНК, генам структурных белков, %				
		L-сегмент	S-сегмент	NP	G1	G2
Аренавирусы Старого Света	ЛХМ	30	15	14	37	25
	Ласса	42	19	17	39	23
Аренавирусы Нового Света	Мачупо	62	25	30	44	21
	Хунин	61	24	30	43	22
	Сабиа	62	25	30	44	21
	Гуанарито	60	24	30	42	23

Таблица 2
Клинические признаки заболевания у больных ГЛЛ [19]

Признак заболевания	Частота проявления признака/доля	Первое проявление признака после начала заболевания, сут (диапазон)	Примечания
Лихорадка	5/5	1	t 38,2—40 °С
Головная боль	5/5	1	
Кашель	1/5	1	У больной ранее был выявлен СПИД
Насморк	1/5	1	То же
Боли в мышцах	5/5	1,2 (1—2)	
Боли в горле, фарингит	5/5	3,2 (1—6)	
Боли в области грудной клетки	2/5	4,0 (1—7)	
Тошнота и рвота	4/5	4,3 (2—8)	
Диарея	4/5	4,5 (2—7)	Без признаков кровотечения
Сыпь	4/5	5,8 (4—8)	Типичная макулопапулезная с распространением по всему телу
Олигурия	3/5	9,3 (7—11)	
Брадикардия	1/5	5	
Геморрагии	5/5	4,3 (3—8)	Вагинальные кровотечения, кровотечения в местах инъекций у одной больной
Поражение конъюнктивы	3/5	6,7 (6—)	
Отеки на лице и/или шее	4/5	7,0 (5—9)	
Неврологические признаки	2/5	7,5 (5—10)	Тремор, судороги
Фотофобия	1/5	8	У больной ранее был выявлен СПИД
Лимфаденопатия	1/5	8	То же

ранее выявленных аренавирусов, более тесно связан с аренавирусами Старого Света, чем с аренавирусами Нового Света. От другого аренавируса Старого Света вируса Ласса (возбудителя одноименной геморрагической лихорадки Ласса) вирус Луйо на нуклеотидном уровне отличается более чем на 40%.

Секвенирование участка генома, расположенного у 3'-конца S-сегмента вируса Луйо, и ближайшего к нему по филогенетическому древу вируса ЛХМ выявляет нуклеотидные замены (урацил в позиции 6 у вируса ЛХМ на аденин у вируса Луйо, аденин в позиции 8 у вируса ЛХМ на урацил у вируса Луйо) [2, 11]. Максимальный уровень различий нуклеотидной структуры по гену белка G1 указывает на целесообразность при выявлении вируса Луйо с помощью обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) использовать праймеры, геномом-мишенью для которых является указанная область.

Анализ аминокислотной структуры белков вируса Луйо, рассчитанной исходя из соответствующей нуклеотидной последовательности генов, позволяет опреде-

лить участки, специфичные только для данного возбудителя, участки, общие для вируса Луйо и других аренавирусов Старого Света, и участки, общие для вируса Луйо и аренавирусов Нового Света. Белок L содержит 6 участков, уникальных для вируса Луйо, и 3 участка, общих для вируса Луйо и других аренавирусов Старого Света. Цинксвязывающий белок содержит 3 участка, уникальных для вируса Луйо, 4 участка, общих для вируса Луйо и других аренавирусов Старого Света, и 1 участок, общий для вируса Луйо и аренавирусов Нового Света. Для белков G1 и G2 эти соотношения выглядят как (4—1—1) и (4—0—0) соответственно [2, 12].

Как и другие аренавирусы, вирус Луйо размножается в цитоплазме инфицированных клеток и формирует негативные колонии в ряде постоянных линий культур клеток, главным образом различных линий клеток почки африканской зеленой мартышки. В основном используют линию постоянных культур клеток Vero E-6 — именно их применяют для накопления биомассы возбудителя и определения биологической активности методом негативных колоний [13, 14].

В качестве лабораторной модели для экспериментальных аренавирусных геморрагических лихорадок обычно используют сирийских хомячков. После подкожного инфицирования у них наблюдают повышение температуры, вялость, петехии, тремор, параличи конечностей, снижение массы тела. Животные погибают через 14—21 сут после инфицирования [13, 15].

Для характеристики патогенеза аренавирусных заболеваний существует несколько лабораторных моделей — это низшие приматы, инбредные и беспородные морские свинки, сирийские золотистые хомячки, а также различные иммунодефицитные линии мышей. Для вируса Луйо подходя-

щая лабораторная модель для первичного накопления и изучения свойств некоторое время не была определена. По данным В.Н. Bird и соавт. [16], мыши-сосунки 2-суточного возраста и мыши 14-суточного возраста реагировали на внутримозговое введение вируса Луйо только формированием специфических антител, при этом специфических признаков заболевания не наблюдалось. В качестве положительного контроля использовали вирус Хунин (штамм ХJ13), вызвавший гибель 2-суточных, но не 14-суточных животных, и вирус Ласса (штамм Josiash), вызвавший гибель 14-суточных, но не 2-суточных животных. Особенностью, отличающей вирус Луйо от других патогенных для человека аренавирусов (вирусов Ласса и Хунин), является то, что данный возбудитель не вызывает смертельного заболевания у белых беспородных мышей различного возраста независимо от способа инфицирования и инфицирующей дозы (вплоть до максимально испытанной $2 \cdot 10^3$ БОЕ). Этими же авторами установлено, что в качестве лабораторной модели для изучения вируса Луйо, разработки средств диагностики, профилактики и лечения ГЛЛ могут быть использованы

Таблица 3

Результаты выявления вируса Луйо в пробах от заболевших [16]

№ больного	Т, сут	Вид образца	Результаты ОТ-ПЦР	Данные о выделении вируса из пробы
1	11	Кровь	+	+
2	5	«	—	+
2	9	«	—	+
2	10	«	—	+
2	12	Печень*	+	+
3	11	Кровь	—	+
3	13	Печень*	+	+
4	10	Кровь	+	+
5	2	«	+	+

Примечание. Т — время взятия образца от начала заболевания; * — образец от погибшего больного.

морские свинки экспериментальной линии 13/N. Заболевание животных сопровождается лихорадкой, потерей массы тела, анорексией, конъюнктивитом, частичной утратой ориентации в пространстве, атаксией, обезвоживанием, летаргическим состоянием и заканчивается гибелью на 11—16-е сутки после внутрибрюшинного инфицирования. При лабораторном исследовании проб от инфицированных животных наблюдается лейкопения (в том числе полное отсутствие лейкоцитов), лимфоцитопения, тромбоцитопения, анемия, коагулопатия, нарушение свертываемости крови и уровня трансаминаз, во многих тканях выявляют специфические вирусные антигены [16].

A.L. Rasmussen и соавт. [17, 18] провели изучение патогенности вируса Луйо для яванских макаков (*Macaca fascicularis* (synomolgus macaques)). У инфицированных животных наблюдались проявления геморрагического синдрома при выраженной вирусемии. Однако (в отличие от людей) заболевание данных животных не заканчивается летальным исходом.

Данные об оценке устойчивости вируса Луйо к неблагоприятным факторам внешней среды и дезинфектантам в литературе отсутствуют. Вероятно, как и другие аренавирусы, вирус Луйо будет инактивироваться такими органическими растворителями, как эфир, хлороформ, дезинфицирующие растворы (β -пропиолактон, гипохлорит натрия и дезоксихолат натрия), и утрачивать свою инфекционность под воздействием низких и высоких значений pH, высоких температур и ультрафиолетового облучения [3, 13, 15].

Из всех аренавирусных геморрагических лихорадок наряду с бразильской геморрагической лихорадкой ГЛЛ является наименее изученной нозологической формой. В настоящее время имеются сообщения только о 5 случаях заболеваний (1 первичном, 3 вторичных и 1 третичном). Среди заболевших было 2 белые женщины (у одной из них зарегистрирован первичный случай заболевания), 2 черные женщины и белый мужчина. Возраст больных колебался от 33 до 47 лет. Вероятная величина инкубационного периода колебалась от 9 до 13 сут. Четыре из 5 заболевших умерли [19].

Клинические признаки заболевания у больных ГЛЛ, обобщенные по всем пяти зарегистрированным случаям и представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что

клиническая картина ГЛЛ является неспецифической и варибельной, что затрудняет установление диагноза.

Патогномоничные признаки в начальный период заболевания отсутствуют и в общем соответствуют такому не только вирусных геморрагических лихорадок, но и целого ряда других нозологических форм. Без проведения лабораторной диагностики с использованием вирусологических и молекулярно-биологических методов исследований поставить диагноз ГЛЛ невозможно. По клинической картине ГЛЛ напоминает геморрагическую лихорадку Ласса, несмотря на то, что генетически вирус Луйо гораздо более близок другим аренавирусам Старого Света [19].

Четыре зарегистрированных случая нозокомиальной инфекции (без отмеченных нарушений специальной техники безопасности) указывают на опасность, которой подвергается больничный персонал при лечении и уходе за больными. Наиболее вероятно заражение могло произойти при выполнении таких процедур, как интубация трахеи, введение рентгеноконтрастных внутрисосудистых катетеров и диализ [1, 19]. Поскольку по всем вторичным случаям заболевания отсутствует информация о возможном повреждении кожных покровов, наиболее вероятный способ заражения — аэрозольный путем вдыхания вирусосодержащего аэрозоля в ходе проведения лечебных процедур или гигиенической уборки больничной палаты. По косвенным данным (с учетом использования всеми заболевшими сотрудниками медицинских учреждений хирургических масок) можно сделать вывод о том, что инфицирующая доза достаточно мала. Высокий риск внутрилабораторного заражения обуславливает необходимость проведения работ с вирусом ГЛЛ по условиям BSL-4 [20].

Остается неясным источник заражения в первом случае заболевания ГЛЛ. Вероятно, естественным резервуаром возбудителя в природе являются грызуны неустановленных видов, заболевание у которых протекает в хронической и персистирующей формах с экскрецией вируса с мочой. Необходимо отметить, что при первичном случае заболевания при осмотре кожных покровов у больной выявлено повреждение, напоминающее струп от укуса клеща, в связи с этим был поставлен ошибочный предварительный диагноз (риккетсиоз, вызванный *Rickettsia africae*) [19]. Определение естественного ареала природного резервуара для вируса Луйо является главным фактором для предупреждения дальнейшего распространения заболевания на эндемичные территории. Потребление пищи, загрязненной экскрементами зараженных грызунов, — распространенный путь заражения аренавирусами. Однако нередко распространение инфекции может происходить при вдыхании аэрозольных контаминированных частиц от больных в лечебных учреждениях и через загрязненное медицинское оборудование.

При широком диапазоне признаков и симптомов (присущих многим вирусным инфекциям), которые могут варьировать от бессимптомных до мультисистемной недостаточности и смерти, их ошибочно принимают за проявления других лихорадочных заболеваний. Дифференциальную диагностику ГЛЛ проводят с другими возможными геморрагическими лихорадками, а также с малярией, брюшным тифом, бруцеллезом, сифилисом и аутоиммунными заболеваниями. Этиологическую диагностику осуществляют путем выделения с последующей идентификацией вируса из сыворотки крови боль-

ных, полученной в острой фазе заболевания (1—10-е сутки после появления клинических признаков болезни), или из органов погибших людей. Для выделения возбудителя рекомендовано использовать постоянную линию культуры клеток Vero E-6, для его идентификации — ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ [12, 13].

Данные об использовании метода ОТ-ПЦР для выявления вируса Луйо в пробах от заболевших (табл. 3) свидетельствуют о том, что вирус Луйо удалось идентифицировать методом ОТ-ПЦР в 3 из 7 проб крови и во всех исследуемых пробах печени. С помощью биопробы вирус Луйо удалось выделить из всех исследуемых проб. Возможной причиной ложноотрицательных результатов ОТ-ПЦР является недостаточно высокая концентрация вируса Луйо в крови, находящаяся ниже пороговой чувствительности метода.

Лечение ГЛЛ, как и других аренавирусных геморрагических лихорадок, должно быть направлено на устранение последствий интоксикации и синдрома диссеминированной внутрисосудистой коагуляции [1, 13, 21]. Судя по описанным случаям заболевания, терапия инфекции, вызываемой вирусом ГЛЛ, в основном является поддерживающей, что характерно для стратегии лечения вирусных геморрагических лихорадок. По аналогии с другими аренавирусными геморрагическими лихорадками при лечении заболевших ГЛЛ помимо общеукрепляющих средств использовали рибавирин (противовирусный препарат широкого спектра действия). С нашей точки зрения, из химиопрепаратов для экстренной профилактики и лечения ГЛЛ перспективным является фа-випиравир (6-фтор-3-гидрокси-2-пирозинкарбоксамид). Данный препарат избирательно действует на РНК-зависимую РНК-полимеразу РНК-содержащих вирусов, в частности аренавирусов, и поэтому особенно эффективен в отношении вирусов с геномной минус-РНК, для которых данный фермент является структурным белком вириона [3, 19]. Средства специфической профилактики ГЛЛ в настоящее время отсутствуют.

Таким образом, исключительно высокая летальность при ГЛЛ (80%) определяет ее серьезную опасность для человека. В результате значительного расширения торгово-экономических связей между РФ и ЮАР в рамках БРИКС, увеличения числа наших соотечественников, посещающих ЮАР, не исключен завоз ГЛЛ в нашу страну, что обуславливает необходимость разработки мер противодействия в отношении данной инфекции, в первую очередь методов ускоренной диагностики.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА [пп. 1—9, 11—21 см. REFERENCES]

- Львов Д.К., Щелканов М.Ю. Аренавирусы. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013: 271-4.

REFERENCES

- Paweska J.T., Sewlall N.H., Ksiazek T.G., Blumberg L.H., Hale M.J., Ian Lipkin W., et al. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, Southern Africa. *Emerg. Inf. Dis.* 2009; 15(10): 1596-602.

- Briese T., Paweska J.T., McMullan L.K., Hutchison S.K., Street C., Palacios G., et al. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever - associated arenavirus from Southern Africa. *PLoS Pathog.* 2009; 5(5): 1-8.
- Buchmeier M.J., Peters C.J., de la Torre J.C. Arenaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe D.M.H., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2007: 1791-827.
- McLay L., Liang Y., Ly H. Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenavirus infection. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(10): 1-15.
- Igonet S., Vaney M.C., Vornrhein C., Bricogne G., Stura E.A., Hengartner H., et al. X-ray structure of the arenavirus glycoprotein GP2 in its postfusion hairpin conformation. *PNAS.* 2011; 108(50): 19967-72.
- Lenz O., ter Meulen J., Feldman H., Klenk H., Garten W. Identification of a novel consensus sequence at the cleavage site of the Lassa virus glycoprotein. *J. Virol.* 2000; 74: 11418-21.
- York J., Nunberg J.H. A novel zinc-binding domain is essential for formation of the functional Junin virus envelope glycoprotein complex. *J. Virol.* 2007; 81(24): 13385-91.
- Bederka L.H., Bonhomme C.J., Ling E.L., Buchmeier M.J. Arenavirus stable signal peptide is the keystone subunit for glycoprotein complex organization. *MBio.* 2014; 5(6): 1-14.
- Cajimat M.N.B. *Genetic diversity and taxonomical relationships among the Tacaribe serocomplex viruses (family arenaviridae)*. Diss. Texas; 2007.
- L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu. Arenaviruses (Arenaviridae). In: L'vov D.K., ed. *Handbook for Virology. Viruses and Virus Infections of Man and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh.]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agestvo; 2013: 271-4. (in Russian)
- Bergeron E., Chakrabarti A.K., Bird B.H., Dodd K.A., McMullan L.K., Spiropoulou C.F., et al. Reverse genetics recovery of Lujo virus and role of virus RNA secondary structures in efficient virus growth. *J. Virol.* 2012; 86(19): 10759-65.
- Atkinson B., Chamberlain J., Dowall S.D., Cook N., Bruce C., Hewson R. Rapid molecular detection of Lujo virus RNA. *J. Virol. Methods.* 2014; 195: 170-3.
- Ishii A., Thomas Y., Moongra L., Nakamura I., Ohnuma A. Novel arenavirus Zambia Emerging. *Inf. Dis.* 2011; 17(10): 1921-4.
- Tani H. Analyses of entry mechanisms of novel emerging viruses using pseudotype VSV system. *Trop. Med. Health.* 2014; 42(2): 71-82.
- Vela E. Animal models, profilaxis, and therapeutics for arenavirus infection. *Viruses.* 2012; 4(9): 1802-29.
- Bird B.H., Dodd K.A., Erickson B.R., Albarino C.G., Chakrabarti A.K., McMullan L.K., et al. Severe hemorrhagic fever in strain 13/N guinea pigs infected with Lujo virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(8): 1-13.
- Rasmussen A.L., Safronetz D., Proll S.C., Belisle S.E., Bryan J.T., Carter V.S., et al. Transcriptional signatures of lethality in Macaca fascicularis models of Lujo virus and Lassa virus infection. 5th International Conference on Primate Genomics. Human Genome Sequencing Center Baylor College of Medicine. Available at: <http://www.primategenomics2012.com>
- Rasmussen A.L., Tchitchek N., Safronetz D., Carter V.S., Williams C.M., Haddock E., et al. Delayed inflammatory and cell death responses are associated with reduced pathogenicity in Lujo virus-infected Cynomolgus Macaques. *J. Virol.* 2015; 89(5): 2543-52.
- Sewlall N.H., Richards G., Duse A., Swanepoel R., Paweska J., Blumberg L., et al. Clinical features and patient management of Lujo hemorrhagic fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(11): 1-11.
- Tani H., Iha K., Shimojima M., Fukushi S., Taniguchi S., Yochikawa T., et al. Analysis of Lujo virus cell Entry using pseudotype vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 2014; 88(13): 7317-30.
- Zapata J.C., Cox D., Salvato M. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6): 1-12.

Поступила 10.02.17

Принята в печать 28.02.17

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]:577.2.08

*Казеннова Е.В.¹, Лага В.Ю.¹, Громов К.Б.¹, Санков М.Н.¹, Попова Е.С.², Игумнова Е.Г.², Опарина Е.Н.²,
Сорокина Т.А.², Бобкова М.Р.¹*

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ В СЕВЕРНЫХ ПОРТОВЫХ ГОРОДАХ РОССИИ

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;

²ГБУЗ АО «Архангельский клинический центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 163000, г. Архангельск

Представлены результаты молекулярно-эпидемиологического анализа вариантов ВИЧ-1, распространенных в Архангельске и Мурманске. Показано, что в этих городах доминирует вариант ВИЧ-1 подтипа А1 — 83 и 93% соответственно. В регионах выявлены варианты вирусов и других подтипов (В, С, D) и рекомбинантных форм (CRF03_AB, CRF02_AG), причем частота встречаемости этих штаммов в Архангельске выше, чем в Мурманске. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал, что все штаммы ВИЧ-1 подтипа А1 принадлежат к варианту IDU-A, доминирующему в России, а рекомбинант CRF02_AG аналогичен циркулирующим в странах Центральной Азии бывшего СССР. Все выявленные варианты подтипа В кластеризуются с нуклеотидными последовательностями западноевропейских штаммов. Проведен анализ мутаций лекарственной устойчивости и показано, что среди пациентов из Архангельска и Мурманска ($n = 124$), которые на момент сбора материала в 2013 г. не получали антиретровирусную терапию, первичная резистентность составила менее 5%.

Ключевые слова: ВИЧ-1; подтипы; филогенетический анализ.

Для цитирования: Казеннова Е.В., Лага В.Ю., Громов К.Б., Санков М.Н., Попова Е.С., Игумнова Е.Г., Опарина Е.Н., Сорокина Т.А., Бобкова М.Р. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в северных портовых городах России. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 154-161. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-154-161>

*Kazenнова E.V.¹, Laga V.Yu.¹, Gromov K.B.¹, Sankov M.N.¹, Popova E.S.², Igumnova E.G.², Oparina E.N.²,
Sorokina T.A.², Bobkova M.R.¹*

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF HIV INFECTION IN NORTHERN SEAPORTS OF RUSSIA

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

²Arkhangelsk Clinical Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Arkhangelsk, 163000, Russian Federation

The results of the molecular-epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Arkhangelsk and Murmansk – northern seaports of Russia – were presented. In these seaports the HIV-1 variants belonging to subtype A1 were predominant (93% in Murmansk, 83% in Arkhangelsk). In addition to these variants, viruses of other subtypes such as B, C, D and recombinant forms CRF02_AG and CRF03_AB were identified. The heterogeneity of circulating HIV-1 variants was higher in Arkhangelsk than in Murmansk. According to the results of phylogenetic analysis, subtype A1 sequences formed the common branch with nucleotide sequences of IDU-A strains found in other regions of Russia. HIV-1 variants of subtype B sub-clustered with sequences of East European B-variants. The recombinant strains CRF02_AG formed the common branch with HIV-1 sequences from Central Asia republics of the former USSR. Among 124 therapy-naive patients from Arkhangelsk and Murmansk ($n = 124$) the transmitted resistance was less than 5%.

Key words: HIV-1; subtype; phylogenetic analysis.

For citation: Kazennova E.V., Laga V.Yu., Gromov K.B., Sankov M.N., Popova E.S., Igumnova E.G., Oparina E.N., Sorokina T.A., Bobkova M.R. Molecular epidemiological analysis of HIV infection in northern seaports of Russia.

Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal). 2017; 62(4): 154-161. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-154-161>

For correspondence: Elena V. Kazennova, Dr. Sci. Biol., leading researcher, Laboratory of T-Lymphotropic Viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Federal State Budgetary Institution «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation.
E-mail: kazenнова@rambler.ru

Для корреспонденции: Казеннова Елена Валерьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории вирусов лейкозов 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: kazenнова@rambler.ru

Information about authors:Kazenova E. V., <http://orcid.org/0000-0002-7912-4270>Bobkova M. R., <http://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Acknowledgements. The authors are grateful to researchers from Murmansk Regional Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases and Arkhangelsk Clinical Center for Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases for collecting samples.

This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00050).

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

Received 01 December 2016

Accepted 13 December 2016

В целях слежения за распространением вариантов ВИЧ практически во всех странах мира проводится молекулярно-эпидемиологический анализ, основанный на генотипировании вируса. Такой мониторинг предназначен для определения циркулирующих подтипов и других генетических вариантов ВИЧ-1 [1] в пределах групп риска заражения или региона, анализа динамики эпидемии, слежения за вариантами вируса, выявляемыми у мигрантов из приграничных государств. Необходимость молекулярно-эпидемиологического мониторинга обусловлена несколькими причинами:

— возможными различиями в эффективности молекулярных лабораторных методов по отношению к разным подтипам ВИЧ-1 [2];

— возможными различиями в эффективности антиретровирусных препаратов (АРВ) между вирусами разных подтипов [3];

— генетическими различиями подтипов, ассоциированными с устойчивостью к противовирусным лекарственным средствам [4];

— необходимостью учитывать разнообразие вариантов вируса при разработке вакцины против ВИЧ [5].

В Российской Федерации начиная с первого случая ВИЧ-инфекции, зафиксированного у российского гражданина в 1987 г., проводится постоянный мониторинг распространения вариантов ВИЧ в разных регионах европейской и азиатской территорий страны. С момента проникновения в 1995 г. в среду потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) и их половых партнеров варианта ВИЧ-1 подтипа А1, названного в России IDU-A (англ. injecting drug users) или A_{FSU} (англ. former Soviet Union) в зарубежной литературе, началось стремительное распространение этого варианта вируса по всей стране. В начале 2000-х годов вариант IDU-A вышел за пределы данной группы риска и стал распространяться гетеросексуальным путем [6—10].

За весь период наблюдений на территории России выявлено всего несколько регионов, где доминировали варианты не-А-подтипа ВИЧ. Две вспышки были вызваны рекомбинантной формой CRF03_AB ВИЧ-1: первая в Калининградской области в 1998 г., когда штамм CRF03_AB был впервые выделен [11], вторая в 2006 г. в г. Череповце Вологодской области [12, 13]. Эти штаммы встречались и продолжают встречаться в других регионах РФ, но все они обнаруживаются спорадически и эпидемиологически, как правило, связаны с Калининградской областью.

В 2013 г. в Томске среди вновь инфицированных лиц превалировал вариант ВИЧ CRF63_02A1 [14]. Данная рекомбинантная форма впервые была выявлена и описана в Новосибирске в 2008 г. [15], а в настоящее время все чаще встречается в других регионах азиатской части РФ, а также в странах Центральной Азии [16].

В 2012—2013 гг. нами были проведены молекулярно-

эпидемиологические исследования в крупных городах Дальнего Востока России — Хабаровске, Благовещенске, Владивостоке, где традиционно сосредоточены морские и сухопутные торговые пути. В этих городах наблюдается оживленная регулируемая и нерегулируемая коммерция, активное перемещение потоков рабочей силы как в пределах страны, так и из-за рубежа. Географическое положение этих городов создает базу для постоянно растущих экономических и культурных связей России с пограничными государствами — Китаем и Японией, а также государствами, связанными с Россией морскими торговыми путями. В связи с вышесказанным возможен занос и заражение ВИЧ в результате «рискованного» поведения как местных жителей, так и временно посещающих эти города людей, генетическими вариантами вируса с разных территорий. В литературе имеются данные о том, что в крупных портовых городах соотношение циркулирующих вариантов ВИЧ-1 может отличаться от ситуации в стране в целом [17]. Для России в силу гомогенности эпидемии ВИЧ-инфекции это должно было бы быть особенно заметно.

Исследования показали, что в Благовещенске, как и в целом по России, доминирует вариант вируса подтипа А1 и выявлены лишь единичные случаи инфицирования не-А-подтипами. В то же время профиль вариантов ВИЧ в Хабаровске заметно отличается от такового на территории России. Несмотря на преобладание типичной для России генетической формы ВИЧ подтипа А1, в этом регионе широко распространены варианты ВИЧ подтипов В и С, а также рекомбинантной формы CRF02_AG [18].

Особый интерес вызвали результаты филогенетического анализа вирусов подтипа В, циркулирующих во Владивостоке. Ранее было показано, что, кроме вариантов подтипа В, передающихся гомо- или гетеросексуальным путем и широко распространенных в мире, среди ПИН на территории России и Украины с низкой частотой циркулируют варианты ВИЧ-1 того же подтипа (восточноевропейский вариант, или IDU-B), генетически отличающиеся от циркулирующих как среди мужчин, имеющих сексуальные отношения с мужчинами (МСМ) (западноевропейский вариант), так и в других группах риска в Западной Европе и Америке [19]. По данным наших исследований, во Владивостоке наблюдается распространение именно восточноевропейского варианта вируса подтипа В, который был обнаружен в 67 и 33% случаев заражения ПИН и гетеросексуалов, а не занос ВИЧ этого подтипа из Китая или Японии, как можно было ожидать. Кроме того, во Владивостоке представлены подтипы А, С и рекомбинантный вариант CRF02_AG.

Таким образом, ни географическое положение, ни экономические и культурные связи с пограничными государствами существенным образом не повлияли на формирование генетического профиля вариантов ВИЧ на Дальнем Востоке, который определяется прежде все-

го миграционными процессами внутри России. Тем не менее в одном случае вариант ВИЧ подтипа С из Владивостока оказался филогенетически близок к штаммам из Китая/Индии [10]. Данный факт свидетельствует о том, что эпидемиологическая ситуация может измениться, и в регионе начнут распространяться и другие не-А-, не-В-варианты ВИЧ.

Полученные результаты вызвали интерес к проведению молекулярно-эпидемиологических исследований ВИЧ-инфекции и в других крупных портовых городах России для изучения распространения вариантов ВИЧ-1 и их роли в эпидемическом процессе в этих регионах. Для исследования были выбраны северные города-порты Архангельск и Мурманск.

Архангельский морской порт — основная база Северного пароходства, выполняющего морские перевозки по Белому, Баренцеву, Карскому морям, Северному морскому пути и на заграничных линиях. Мурманский морской порт — один из крупнейших незамерзающих портов России. С 2010 г. Мурманск был официально объявлен особой экономической зоной для создания мощной транспортно-торговой инфраструктуры, привлечения инвестиций и в конечном счете развития социальной сферы.

Таким образом, целью настоящей работы явилось молекулярно-эпидемиологическое исследование вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории крупнейших северных портов России Архангельска и Мурманска в настоящее время, включая анализ мутаций лекарственной устойчивости (ЛУ).

Материал и методы

В исследовании была использована коллекция мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) и/или плазмы крови, собранная от 66 ВИЧ-инфицированных лиц из Архангельска и 66 ВИЧ-инфицированных лиц из Мурманска. Вирусная нагрузка (ВН) в образцах составляла от 246 до 1 682 228 копий РНК/мл. Все пациенты были зарегистрированы в региональных центрах СПИД с диагнозом ВИЧ-инфекции в период с 2001 по 2014 г.

Выявление факторов риска, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и регион постановки диагноза ВИЧ-инфекции. Сведения о применении/неприменении пациентом АРВ-препаратов получали, руководствуясь записями в амбулаторных картах. Весь полученный клинический материал использовали при информированном согласии пациентов на основании одобрения Локального комитета по этике на базе ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России на проведение научно-исследовательской работы (протокол 06-13 заседания Локального комитета по этике от 05.06.13).

Выделение геномной ДНК, включающей интегрированную провирусную ДНК, из клеток крови ВИЧ-инфицированных пациентов проводили с применением наборов QIAmp DNA Blood Mini Kit и прибора QIAcube («Qiagen», США) в соответствии с инструкцией производителя.

Генотипирование вируса от ВИЧ-инфицированных пациентов из Архангельска и Мурманска выполняли путем анализа нуклеотидных последовательностей об-

ласти гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием набора ViroSeq (версия 2) («Celera Diagnostics», США) и методом *in house* посредством прямого секвенирования амплифицированных фрагментов гена *pol*, как описано ранее [20]. Нуклеотидные последовательности определяли с использованием генетического анализатора ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США). Анализ мутаций ЛУ проводили с применением ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v.2.8 и базы данных Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Подтипы ВИЧ-1 определяли с использованием референс-программы HIVdbProgram: Sequence Analysis, а также программ REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 2), представленных на сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu/>), и COMET HIV-1 (<http://comet.retrovirology.lu/>).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей методом ClustalW и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей методом «ближайших соседей» выполняли с помощью пакета программ MEGA v.5.05, доступного на сайте <http://megasoftware.net/>.

Результаты

Анализ исследованных групп показал, что на момент забора крови возраст пациентов из Архангельска (АРН) варьировал от 20 лет до 51 года, из Мурманска (МРК) — от 25 до 59 лет. Соотношение мужчин и женщин в исследуемых когортах из Архангельска и Мурманска составило 1:1,1 и 1,2:1 соответственно.

В Архангельске 49 (49/66; 74%) человек были инфицированы в результате половых контактов, включая 5 МСМ. Остальные 17 пациентов из анализируемой группы заразились при употреблении инъекционных наркотиков (17/66; 26%).

В Мурманске основным путем передачи оказался инъекционный, среди обследованных пациентов потребители наркотиков составили большинство — 38 (38/66; 58%) человек. Остальные пациенты были инфицированы в результате половых контактов (28/66; 42%).

На момент забора крови 8 пациентов из Архангельска находились на лечении АРВ-препаратами. Пациенты из Мурманска на момент исследования терапию не получали, 5 из них самостоятельно прекратили прием препаратов в 2011—2013 гг.

Генотипирование. Результаты молекулярно-эпидемиологического исследования образцов из Архангельска и Мурманска приведены в таблице. Как следует из представленных данных, подавляющее большинство ВИЧ-инфицированных лиц из Мурманска заражено вирусом варианта подтипа А1 (62/66; 93%) как в результате употребления психоактивных препаратов внутривенно (38/62; 61%), так и при половых контактах (24/62; 39%). Лишь у 4 пациентов, заразившихся половым путем, выявлен вирус не-А-подтипа: один из них инфицирован вирусом подтипа В (1/66; 1,5%), 3 — вирусом рекомбинантной формы CRF02_AG (3/66; 4,5%).

Генетический профиль вариантов ВИЧ из Архангельска более разнообразен. Среди анализированных вариантов, как и в Мурманске, доминирует ВИЧ подтипа А1 (55/66; 83%), в результате употребления наркотиков инфицированы 38 (38/55; 69%) человек, при половых контактах — 17 (17/55; 31%). Помимо вирусов подтипа А1 выявлены варианты ВИЧ подтипов В (7/66; 10,6%), С (1/66; 1,5%) D (1/66; 1,5%), а также рекомбинантные

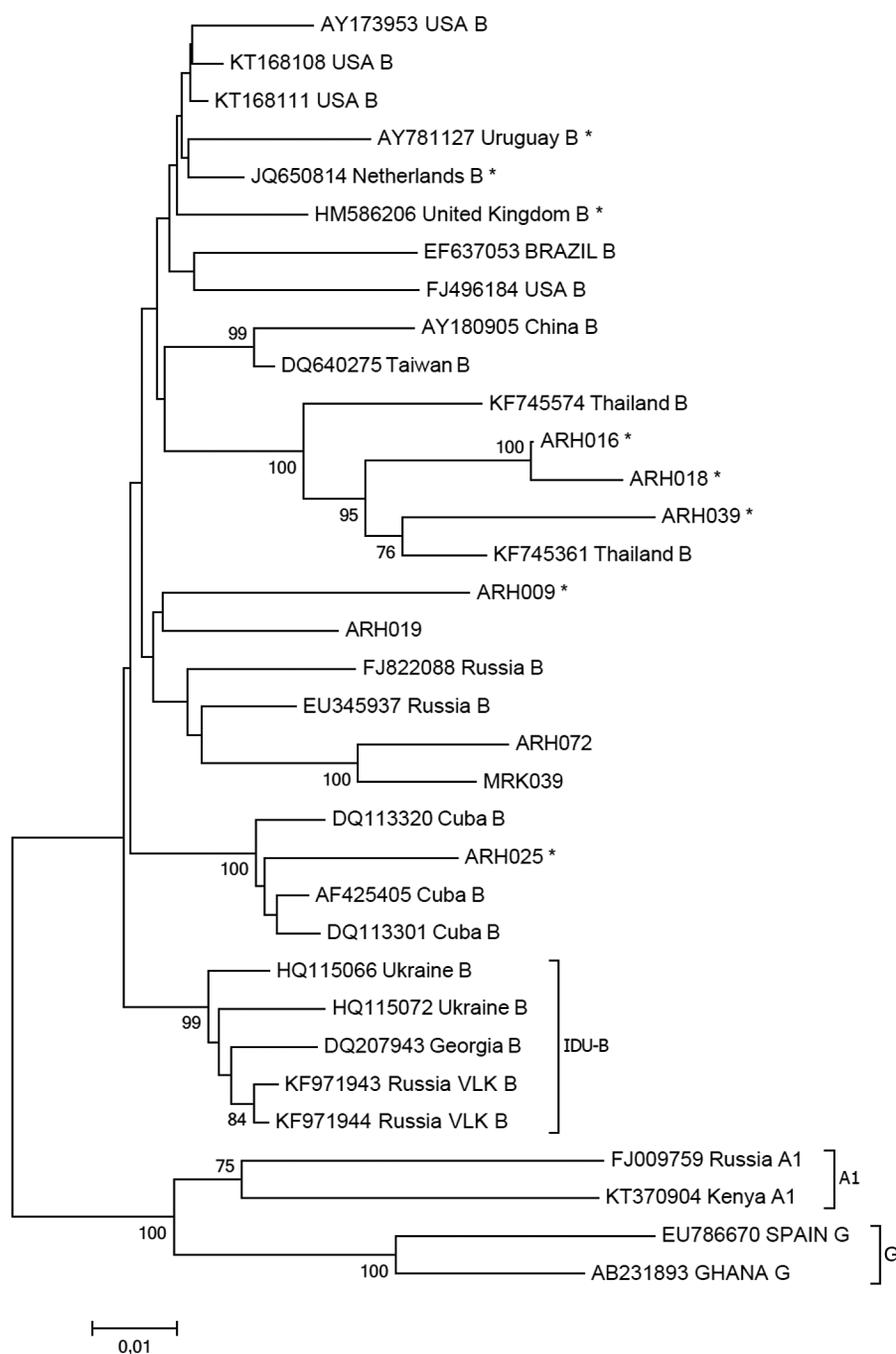


Рис. 2. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ-1, кодирующих протеазу и 2/3 обратной транскриптазы, образцов подтипа В из Архангельска и Мурманска.

Звездочками отмечены образцы от МСМ. IDU-B — восточноевропейский вариант ВИЧ-1 подтипа В, циркулирующий среди ПИН в России.

одной CRF03_AB, выявленных в Архангельске и Мурманске. Как видно на рисунке, все последовательности вирусов подтипа А1 из анализированных регионов располагаются на одной ветви филогенетического древа вместе с доминирующим вариантом IDU-A из других регионов России и его предшественником А-от, что указывает на принадлежность исследуемых последовательностей к данному варианту. Все не-А-варианты, выделенные в настоящем исследовании, кластеризо-

вались между собой и с референс-штаммами известных подтипов и рекомбинантных форм из других регионов мира и поддержаны бустреп-значением более 90%.

Кроме того, был проведен дополнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вариантов подтипа В, выявленных в Мурманске и Архангельске, в сравнении с последовательностями ВИЧ-1 того же подтипа из разных регионов мира. На представленной филограмме (рис. 2) видно, что ни один из анализируемых вариантов не кластеризуется с последовательностями ВИЧ IDU-B (восточноевропейский вариант), циркулирующих среди ПИН на территории стран Восточной Европы [10]. Нуклеотидные последовательности, полученные от МСМ (ARH009, ARH016, ARH018, ARH025, ARH039), не формировали общую ветвь как между собой, так и с другими последовательностями ВИЧ подтипа В от МСМ из других регионов мира. Филогенетический анализ показал, что пациенты ARH016 и ARH018 являются половыми партнерами, о чем свидетельствует общая ветвь на филограмме, и уточненные эпидемиологические данные это подтвердили.

Для выявления возможного источника вариантов CRF02_AG в Архангельске и Мурманске был проведен дополнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей исследованных образцов (ARH022, MRK055, MRK074, MRK092) в сравнении с последовательностями ВИЧ-1 AG-рекомбинантов из разных регионов мира. Как следует из филограммы, представленной на рис. 3, три последовательности ARH022, MRK055, MRK074 образуют общую ветвь с последовательностями вариантов CRF02_AG, циркулирующих на территории стран Центральной Азии [20]. Лишь одна последовательность от пациента из Мурманска — MRK092 — кластеризовалась с последовательностями «африканских» рекомбинантов.

Анализ резистентности ВИЧ. Из

двух анализируемых групп только в Архангельске были образцы от 8 пациентов, получавших АРВ-препараты на момент исследования. Использовали следующие схемы терапии:

- комбивир (AZT + 3TC), третий препарат схемы либо эфавиренз (стокрин — EFV) (4/8; 50%) или калетра (лопинавир/ритонавир — LPV/r) (1/8; 12,5%) либо реатаз (атазанавир — ATV) (1/8; 12,5%);
- кивекса (абакавир + ламивудин — 3TC + ABC),

Распределение генетических вариантов ВИЧ-1 по группам риска заражения в Архангельске и Мурманске

Регион	Генетические варианты							Итого
	A1		B	C	D	CRF03_AB	CRF02_AG	
	ПИН*	половой	половой	половой	половой	половой	половой	
Архангельск	38 (57,6%)	17 (25,8%)	7 (10,6%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	1 (1,5%)	66 (100%)
Мурманск	38 (57,6%)	24 (36,4%)	1 (1,5%)	—	—	—	3 (4,5%)	66 (100%)

Примечание. * — указаны только те группы риска, в которых выявлены ВИЧ-инфицированные пациенты.

третий препарат схемы реатаз (атазанавир — ATV) (1/8; 12,5%) либо калетра (лопинавир/ритонавир — LPV/r) (1/8; 12,5%).

Показатель ВН у пациентов из Архангельска, которые на момент исследования получали АРВ-терапию, колебался от 153 до 1 682 228 копий/мл. В соответствии с записями в амбулаторной карте лечение пациента с ВН 153 копии/мл началось за 2 нед до забора крови для молекулярно-эпидемиологического исследования в регионе, и данный показатель свидетельствует об эффективности назначенной схемы. Лишь у 1 пациента из 8 была выявлена первичная, т. е. непосредственно связанная с ЛУ мутация к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) — K103S на фоне приема в течение 3 лет препаратов схемы комбивир — стокрин. Возможно, ее нали-

чие и привело к повышению ВН до 79 005 копий/мл. У 6 пациентов с детектируемой ВН (более 1000 копий/мл) на фоне приема препаратов первичные мутации ЛУ не обнаружены, что может свидетельствовать о низкой приверженности лечению данных лиц. У 4 из 58 «наивных» пациентов из Архангельска была выявлена первичная резистентность, или заражение мутантными штаммами, к лекарственным препаратам (мутации ЛУ D30N, D67N, M41L, G190S) [22]. Ранее было показано, что частота встречаемости мутации ЛУ G190S на фоне применения ННИОТ для российских вариантов IDU-A ВИЧ-1 выше, чем у других вариантов вирусов подтипа A1. Как было установлено, это определяется кодирующим аминокислоту глицин триплетом, что приводит к предрасположенности вариантов IDU-A к возникновению мутации G190S на фоне применения ННИОТ [23].

Следует отметить, что мы впервые столкнулись со случаем заражения мутантным штаммом, несущим замену G190S. По данным эпидемиологического расследования, пациентка ARH021 была инфицирована в 2010 г. половым партнером ARH003. Пациент ARH003 в свою очередь заразился ВИЧ в результате употребления наркотических препаратов в Красноярске в 2004 г., а с декабря 2009 г. начал получать АРВ-терапию комбивир — стокрин. У пациентки ARH021 еще в октябре 2010 г. (по результатам ИФА) отсутствовали антитела к ВИЧ, но уже в январе 2011 г. результат ИФА оказался положительным. В 2013 г. у ARH021 при генотипировании до начала терапии была выявлена мутация G190S. К сожалению, вирус донора ARH003 не удалось генотипировать, но судя по высокой ВН (648 564 копии/мл) на момент забора крови в июне 2013 г. на фоне лечения, пациент отличался низкой приверженностью к лечению, что в конечном счете и привело к формированию резистентного штамма, выявленного впоследствии у полового партнера.

По данным литературы, мутации ЛУ по-разному влияют на размножение ВИЧ. Так, замена M184V/I (устойчивость к нуклеотидным ингибиторам обратной транскриптазы — НИОТ) приводит к резкому снижению репликативной способности, в то время как мутация K103N (устой-

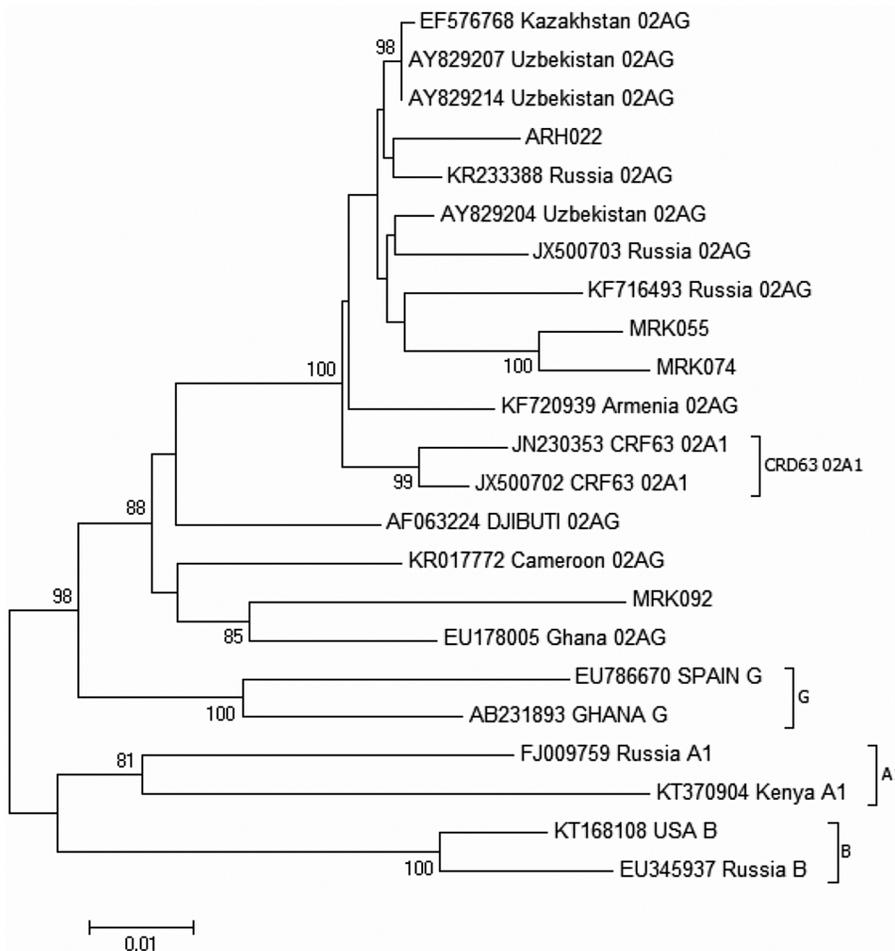


Рис. 3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *pol* ВИЧ-1, кодирующих протеазу и 2/3 обратной транскриптазы, вариантов CRF02_AG из Архангельска и Мурманска.

чивость к ННИОТ) практически не влияет на данное свойство вируса. Следствием этого становится способность мутантного штамма, содержащего замену K103N, персистировать в организме инфицированного долгие годы. Вероятно, то же происходит и с выявленным резистентным штаммом, содержащем мутацию LУ G190S, который появился и циркулировал у донора на фоне применения ННИОТ, а в дальнейшем попал в организм реципиента [24].

Анализ мутаций ЛУ 66 последовательностей от ВИЧ-инфицированных пациентов из Мурманска, которые на момент сбора материала не получали АРВ-терапию, показал наличие 2 мутаций резистентности у разных пациентов — K103N и M46L. Следует отметить, что у 5 пациентов с ВН от 1300 до 280 000 копий/мл, самостоятельно прервавших лечение, мутаций ЛУ не обнаружено. Таким образом, первичная резистентность среди пациентов из Архангельска и Мурманска, которые на момент сбора материала в 2013 г. не получали АРВ-терапию, составила менее 5% (6 мутаций ЛУ у 124 ВИЧ-инфицированных «наивных» пациентов).

Кроме того, у 18% пациентов из анализируемых групп, инфицированных IDU-A (24/132), выявлена вторичная, или компенсаторная, мутация A62V, которая обычно регистрируется в комбинации с первичными мутациями K65R или Q151M на фоне лечения НИОТ. Для варианта ВИЧ IDU-A замена A62V является полиморфной (частота встречаемости более 60%) и не обуславливает лекарственной устойчивости в отсутствие первичных мутаций [25].

Обсуждение

Проведенные молекулярно-эпидемиологические исследования ВИЧ-инфекции в северных портах России Архангельске и Мурманске показали, что в этих городах, как и на всей территории России, доминирует вариант ВИЧ-1 подтипа А1 — 55/66 (83%) и 62/66 (93%) соответственно. В регионах выявлены варианты вирусов и других подтипов (В, С, D) и рекомбинантных форм (CRF03_AB, CRF02_AG), но частота их встречаемости в городах неодинакова. Так, в Архангельске не-А-подтипы составляют 17%, в то время как в Мурманске лишь 7%, при этом и генетический профиль вариантов ВИЧ в Архангельске разнообразнее (см. таблицу). Следует отметить, что все не-А-варианты обнаружены у пациентов, заразившихся половым путем. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей показал, что все варианты ВИЧ-1 подтипа А1 принадлежат к варианту IDU-A (см. рис. 1), доминирующему в России, и распространяются как половым, так и инъекционным путем среди потребителей наркотиков.

Вариант вируса подтипа В, занимающий второе место по частоте встречаемости в анализируемых регионах, выявлен в 6% (8/132) случаев. По эпидемиологическим данным, заражение этих лиц произошло в результате как гетеросексуальных (3 случая), так и гомосексуальных (5 случаев) контактов.

По данным филогенетического анализа, пациенты, инфицированные вирусами рекомбинантной формы CRF02_AG, имеют тот же вариант ВИЧ-1, который циркулирует в странах Центральной Азии бывшего СССР [26]. Нетрудно предположить, что этот вирус попал в Архангельск и Мурманск вместе с мигрантами из этих государств.

Таким образом, несмотря на доминирование в исследу-

ванных регионах варианта IDU-A ВИЧ-1, генетический профиль ВИЧ-инфекции в северных портовых городах России достаточно разнообразен. Причины такого разнообразия, с одной стороны, могут определяться основным видом деятельности городов-портов Архангельска и Мурманска, однако в этих портах в отличие от дальневосточных крупных городов-портов РФ (Владивосток, Хабаровск) с большим пассажиропотоком не наблюдается столь активной миграции населения как внутри государства, так и из-за рубежа, что, вероятно, связано со специализацией и пропускной способностью северных портов. С другой стороны, как было сказано выше, в отдельных городах страны наблюдается увеличение частоты не-А-подтипов ВИЧ, связанное с миграцией населения в пределах России и бывшего СССР, а также заносом вариантов ВИЧ из других регионов мира. Иллюстрацией могут служить выявленные в нашем исследовании варианты вирусов подтипов С и D, частота встречаемости которых в России очень мала. По данным эпидемиологического расследования, пациент был инфицирован вариантом подтипа D ВИЧ-1 в результате гетеросексуального контакта в Уганде.

На сегодняшний день не-А-варианты не играют заметной роли в эпидемическом процессе на исследованных территориях, однако налицо достоверная тенденция к изменению прежде однообразного генетического ландшафта. По этой причине представляет интерес проведение молекулярно-эпидемиологических исследований ВИЧ-инфекции и в других крупных портовых городах России для изучения распространения вариантов ВИЧ-1 и их роли в эпидемическом процессе в этих регионах.

Полученные и анализированные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank № KX432074-432139, KU557639-KU557648, KU933329- KU933340, KU670321-KU670329, KU645849-KU645883 (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>).

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам ГУЗ «Мурманский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» и ГБУЗ АО «Архангельский клинический центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» за сбор коллекции образцов.

Финансирование. Исследование выполнено с привлечением средств гранта Российского научного фонда (проект № 15-15-00050).

Конфликт интересов. Конфликт интересов отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА (1–5, 8, 10–12, 14, 15, 17, 19, 21–24, 26 см. REFERENCES)

- Бобков А.Ф., Казеннова Е.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А., Ладная Н.Н., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ. *Вестник Российской Академии медицинских наук.* 2003; (12): 83-5.
- Гришечкин А.Е., Казеннова Е.В., Суханова А.Л., Белых С.И., Султанов Л.В., Демьяненко Э.Р. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика ВИЧ-инфекции на территории Алтайского края. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2006; (1): 15-9.
- Богачев В.В., Тотменин А.В., Барышев П.Б., Мещерякова Ю.В., Черноусова Н.Я., Гашникова Н.М. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1 субтипов А и В, выделенных на территории Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2012; (6): 45-52.
- Казеннова Е.В., Бронникова А.В., Кузин С.Н., Кириллова И.Л.,

- Ершова О.Н., Афанасьева Л.Р. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в г. Череповце Вологодской области: второй случай эпидемической вспышки, вызванной рекомбинантом gagAenvB. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(5): 23-7.
16. Лаповок И.А., Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Дзисюк Н.В., Утегенова А.К. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-1 в Казахстане в 2009 – 2013 гг. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(4): 29-37.
 18. Казеннова Е.В., Нешумаев Д.А., Рукавицин Д.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Ракчеева О.В. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии ВИЧ-инфекции в Благовещенске и Хабаровске (Дальний Восток России). *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(4): 31-6.
 20. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 26-32.
 25. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена *pol* варианта ВИЧ IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(4): 44-51.
- REFERENCES**
1. Salemi M. Toward a robust monitoring of HIV subtypes distribution worldwide. *AIDS*. 2011; 25(5): 713-4.
 2. Peeters M., Aghokeng A.F., Delaporte E. Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(10): 1525-31.
 3. Easterbrook P.J., Smith M., Mullen J., O'Shea S., Chrystie I., de Ruiter A., et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J. Int. AIDS Soc.* 2010; 13: 4.
 4. Wainberg M.A., Brenner B.G. The Impact of HIV Genetic Polymorphisms and Subtype Differences on the Occurrence of Resistance to Antiretroviral Drugs. *Mol. Biol. Int.* 2012; 2012: 256982.
 5. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J. Infect.* 2013; 66(5): 391-400.
 6. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ladnaya N.N., Bobkova M.R., et al. The molecular and virological specificities of the epidemic of HIV infections in Russia and other CIS countries. *Vestnik Rossiyskoy Akademii meditsinskikh nauk*. 2003; (12): 83-5. (in Russian)
 7. Grishechkin A.E., Kazennova E.V., Sukhanova A.L., Belykh S.I., Sultanov L.V., Dem'yanenko E.R., et al. Molecular and epidemiological characterization of HIV-infection in the Altai Territory. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2006; (1): 15-9. (in Russian)
 8. Romyantseva O.A., Olkhovskiy I.A., Malysheva M.A., Ruzaeva L.A., Vasiliev A.V., Kazennova E.V., et al. Epidemiological networks and drug resistance of HIV type 1 in Krasnoyarsk region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2009; 25(9): 931-6.
 9. Bogachev V.V., Totmenin A.V., Baryshev P.B., Meshcheryakova Yu.V., Chernousova N.Ya., Gashnikova N.M. Molecular-genetic characteristic of HIV-1 A and B subtypes variants isolated in Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; (6): 45-52. (in Russian)
 10. Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumaev D., Vasilyev A., et al. HIV-1 Genetic Variants in the Russian Far East. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(8): 742-52.
 11. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., Bobkova M., Khanina T., Ladnaya N., et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: Identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14(8): 669-76.
 12. Smolskaya T., Liitsola K., Zetterberg V., Golovanova E., Kevlova N., Konovalova N., et al. HIV epidemiology in the Northwestern Federal District of Russia: dominance of HIV type 1 subtype A. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2006; 22(11): 1074-80.
 13. Kazennova E.V., Bronnikova A.V., Kuzin S.N., Kirillova I.L., Ershova O.N., Afanas'eva L.R., et al. Molecular genetic characteristics of HIV-1 variants circulating in Cherepovets, Vologda region: the second case of the epidemic outbreak caused by the recombinant gagAenvB. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(5): 23-7. (in Russian)
 14. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., et al. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; 31(4): 456-60.
 15. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. Genetic characterization of an isolate of HIV type 1 AG recombinant form circulating in Siberia, Russia. *Arch. Virol.* 2012; 157(12): 2335-41.
 16. Lapovok I.A., Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Dzisyuk N.V., Utegenova A.K., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 in Kazakhstan in 2009-2013. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(4): 29-37. (in Russian)
 17. Chen S., Cai W., He J., Vidal N., Lai C., Guo W., et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in Guangdong province of Southern China. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e48747.
 18. Kazennova E.V., Neshumaev D.A., Rukavitsin D.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Rakcheeva O.V., et al. Molecular epidemiological analysis of the HIV infection in the Blagoveshchensk and Khabarovsk Area (Russian Far East). *Voprosy virusologii*. 2014; 59(4): 31-6. (in Russian)
 19. Bobkov A.F., Lukashov V.V., Goudsmit J., Weber J.N. Silent mutation in the V3 region characteristic of HIV type 1 env subtype B strains from Injecting Drug Users in the Former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2000; 16(3): 291-4.
 20. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N., et al. Molecular genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirgiziia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(5): 26-32. (in Russian)
 21. Riva C., Romano L., Saladini F., Lai A., Carr J.K., Francisci D., et al. Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008; 24(10): 1319-25.
 22. Bennett D.E., Camacho R.J., Otelea D., Kuritzkes D.R., Fleury H., Kiuchi M., et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*. 2009; 4(3): e4724.
 23. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014; 28(17): F1-8.
 24. Hofstra L.M., Schmit J.C., Wensing A.M.J. Transmission of HIV-1 drug resistance. In: *Handbook of Antimicrobial Resistance*. New York: Springer Science – Business Media; 2015: 455-78.
 25. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant *pol* gene. *VICh-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(4): 44-51. (in Russian)
 26. Bobkova M. Current status of HIV-1 diversity and drug resistance monitoring in the former USSR. *AIDS Rev*. 2015; 15(4): 204-12.

Поступила 01.12.16

Принята в печать 13.12.16

Климова Р.Р.¹, Момотюк Е.Д.^{1,2}, Демидова Н.А.², Чернорыж Я.Ю.¹, Коваль В.С.^{3,5}, Иванов А.А.⁴, Жузе А.Л.³, Куц А.А.¹

ДИМЕРНЫЕ БИСБЕНЗИМИДАЗОЛЫ ПОДАВЛЯЮТ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА И ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА, В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ

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

² ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства России, 109473, г. Москва;

³ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, 119991, г. Москва;

⁴ ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, подразделение НИИ канцерогенеза, 115478, г. Москва;

⁵ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва

Изучена противовирусная активность новой серии АТ-специфичных флуоресцентных симметричных димерных бисбензимидазолов DBA(n) в модельных клеточных системах инфекций, вызванных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ1) и цитомегаловирусом человека (ЦМВ). В молекулах DBA(n) бисбензимидазольные фрагменты связаны олигометиленовым линкером с разным числом метиленовых групп в линкере ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$). В отличие от синтезированной ранее серии димерных бисбензимидазолов DB(n) у серии DBA(n) концевые фрагменты молекул содержат вместо N-метилпиперазиновых групп N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы. Соединения DBA(n) продемонстрировали существенно лучшую растворимость в воде, способность проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. Данные, полученные при анализе противовирусной активности, показали, что соединения DBA(1) и DBA(7) обладают терапевтическими свойствами в отношении инфекции, вызванной ВПГ1 (ВПГ-инфекции) *in vitro*, причем DBA(7) полностью подавляет вирусную инфекцию. Соединение DBA(11) проявило лечебные свойства как в отношении ВПГ-инфекции, так и ЦМВ-инфекции *in vitro*. Кроме того, DBA(7) и DBA(1) проявили микробицидную активность. Таким образом, соединение DBA(11), проявляющее активность против двух широко распространенных вирусных инфекций, заслуживает дальнейших исследований. Высокая противовирусная активность DBA(7) во всех схемах воздействия указывает на перспективность этого соединения как основы для разработки новых препаратов против герпесвирусных инфекций.

Ключевые слова: димерные бисбензимидазолы, содержащие N-диметиламинопропилкарбоксамидные группы; вирус простого герпеса; цитомегаловирус человека; противовирусная активность; герпесвирусная инфекция *in vitro*.

Для цитирования: Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Чернорыж Я.Ю., Коваль В.С., Иванов А.А., Жузе А.Л., Куц А.А. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 162-168.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-162-168>

Klimova R.R.¹, Momotyuk E.D.^{1,2}, Demidova N.A.², Chernoryzh Ya.Yu.¹, Koval V.S.^{3,5}, Ivanov A.A.⁴, Zhuze A.L.³, Kushch A.A.¹

DIMERIC BISBENZIMIDAZOLES SUPPRESS THE HERPES SIMPLEX VIRUS AND HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS IN CELL CULTURES

¹ D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109473, Russian Federation;

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴ Blokhin Russian Cancer Research Center, Research Institute of Carcinogenesis, Moscow, 115478, Russian Federation;

⁵ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997, Russian Federation

Antiviral activity of new AT-specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles of DBA(n) series was assessed in the cell models of infections caused by type 1 herpes simplex virus (HSV1) and human cytomegalovirus (CMV). In DBA(n) molecules bisbenzimidazole fragments are bound to an oligomethylene linker with varied number of methylene groups in the linker ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$). In contrast to DB(n) dimeric bisbenzimidazoles, in DBA(n) series terminal fragments of macromolecules contain N-dimethylaminopropylcarboxamide groups instead of N-methylpiperazine groups. DBA(n) compounds better dissolve in water, pass across plasma and nuclear membrane, and stain DNA in living cells. DBA(1) and DBA(7) produced therapeutic effects in HSV1 infection; DBA(7) completely suppressed the infection. DBA(11) displayed *in vitro* therapeutic activity in HSV1 and CMV infections. In addition, DBA(7) and DBA(1) showed microbicidal activity. Thus, DBA(11), which is active

Для корреспонденции: Климова Регина Рафаиловна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: regi.k@mail.ru

against two viruses causing severe diseases with serious health consequences for immunodeficient individuals, should be further investigated. High antiviral activity of DBA(7) in all test models indicates that this compound is a promising active agent for innovative antiviral drugs.

Key words: *dimeric bisbenzimidazoles containing N-dimethylaminopropylcarboxamide groups; herpes simplex virus; human cytomegalovirus; antiviral activity; herpes virus infection in vitro.*

For citation: Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Chernoryzh Ya.Yu., Koval V.S., Ivanov A.A., Zhuze A.L., Kushch A.A. Dimeric bisbenzimidazoles suppress the herpes simplex virus and human cytomegalovirus infections in cell cultures. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 162-168. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-162-168>

For correspondence: Regina R. Klimova, PhD, leading researcher, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: regi.k@mail.ru

Information about authors:

Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>

Momotyuk E.D., <http://orcid.org/0000-0002-6217-5311>

Demidova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Chernoryzh Ya.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Koval V.S., <http://orcid.org/0000-0002-1181-104X>

Ivanov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-6007-8286>

Zhuze A.L., <http://orcid.org/0000-0001-6230-8711>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Acknowledgments. This work was partially supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 14-04-00388) and RAS Presidium Program for Molecular and Cell Biology.

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

Received 15 February 2017

Accepted 28 February 2017

Введение

Герпесвирусы ВПГ 1-го и 2-го типа и ЦМВ чрезвычайно широко распространены в человеческой популяции и могут поражать различные органы и ткани [1]. Герпесвирусные инфекции (ГВИ) представляют серьезную медико-социальную проблему, отрицательно воздействуя на течение беременности и являясь причиной перинатальной патологии [2]. Кроме того, они могут вызывать развитие вторичных иммунодефицитов, которые клинически проявляются хроническими рецидивирующими инфекционно-воспалительными процессами в различных органах. У лиц со сниженным иммунитетом ВПГ- и ЦМВ-инфекции часто приводят к тяжелым осложнениям, нередко со смертельным исходом. В терапии ГВИ применяется ряд патентованных препаратов — ацикловир и его производные. Основными недостатками этих препаратов являются их высокая токсичность, ограниченная биодоступность и при длительном использовании развитие лекарственной устойчивости. В связи с этим активно проводится разработка инновационных противовирусных препаратов с различной структурой и разными механизмами действия, позволяющими избежать побочных токсических эффектов при сохранении высокой противовирусной эффективности. Одним из актуальных подходов в этом направлении является создание низкомолекулярных соединений, которые образуют комплексы с АТ-парами нуклеотидов в двухцепочечной ДНК (дцДНК) и могут быть использованы в качестве ингибиторов ДНК-зависимых ферментов для изучения регуляции транскрипции генов. Наиболее перспективными в этом плане являются низкомолекулярные соединения, взаимодействующие нековалентно с азотистыми основаниями дцДНК по узкой бороздке. Узкобороздочные лиганды свободны от недостатков, присущих традиционным биологически активным препаратам на основе алкилирующих агентов и интеркаляторов. Они не повреждают ДНК, не вызывают значительного искажения ее пространственной структуры и свободны от побочного мутагенного эффекта [3, 4]. Создание соединений,

сайтспецифично узнающих нуклеотидные последовательности в дцДНК, открывает новые возможности для исследований в разных областях биологии и медицины. Такие мишень-направленные (target directed) соединения могут представлять особый интерес для фармакологии, однако их активность в отношении вирусных инфекций не изучена.

Цель настоящей работы состояла в оценке противовирусной активности новых димерных бисбензимидазолов **ДВА(n)** в отношении двух ГВИ — ВПГ- и ЦМВ-инфекции в клеточных системах *in vitro*.

Материал и методы

Культуры клеток. В работе использовали перевиваемую линию клеток Vero, а также культуру фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ). Клетки Vero культивировали в среде Игла MEM, клетки ФЭЧ — в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «ПанЭко», Россия), 2 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия).

Вирусы. Использовали референс-штаммы F ВПГ-1 и AD169 ЦМВ, полученные из коллекции вирусов при ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирусы размножали и определяли инфекционную активность на культуре клеток Vero (ВПГ-1) и ФЭЧ (ЦМВ). Инфекционный титр вирусов определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек. Для титрования готовили образцы вируса и вносили в 96-луночные панели с монослоем клеток. Панели с материалом инкубировали при 37 °С в течение 7 дней в присутствии 5% CO₂. Очаги инфицированных клеток (бляшки) выявляли и подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа PrimoVert («Zeiss», Германия). Титр вируса определяли по формуле: $A = ab/v$, где A — число бляшкообразующих единиц на 1 клетку (БОЕ/кл); a — среднее число бляшек на одну лунку; b — разведение вируса; v — объем вносимого вирусосодержащего материала.

Вещества. Изучены 6 новых АТ-специфичных симметричных димерных бисбензимидазолов **DBA(n)**, у которых бисбензимидазольные фрагменты молекулы связаны олигометиленовым линкером с разным числом метиленовых групп в линкере ($n = 1, 3, 5, 7, 9, 11$), а также синтезированные ранее 3 димерных бисбензимидазолов **DB(n)** при $n = 1, 7, 11$, структурная формула которых представлена на рис. 1. Растворы соединений, прежде чем использовать, фильтровали через стерильные нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм («SPL», Корея). В качестве положительного контроля использовали вирусспецифический лицензированный препарат ацикловир, АЦВ (Зовиракс®, «ГлаксосмитКляйн Вэллком», Великобритания).

Изучение проникновения и внутриклеточной локализации соединений. Клетки Vero высаживали в 24-луночные планшеты в концентрации $2 \cdot 10^5$ кл/мл. После достижения субконфлюентного монослоя вносили соединения в концентрации 50 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч клетки промывали, фиксировали охлажденным метанолом в течение 20 мин при -20°C и анализировали методом люминесцентной микроскопии с использованием инвертированного люминесцентного микроскопа AxioVert 1 («Zeiss», Германия).

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность **DBA(n)** определяли по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего через 24 ч (острая цитотоксичность) и 72 ч (хроническая цитотоксичность). Максимально переносимую дозу (МПД) определяли через 7 сут. Для определения 50% цитотоксической дозы (ЦД_{50}) вычисляли процентное отношение количества жизнеспособных (не окрашенных) клеток к общему количеству клеток в популяции. Значение ЦД_{50} рассчитывали графически методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel.

Определение противовирусной активности. Для определения противовирусной активности **DBA(n)** использовали 4 схемы воздействия: микробицидную, профилактическую, лечебную и вирулицидную. Во всех опытах использовали ВПГ-1 с инфекционной множественностью (ИМ) 0,01 БОЕ/кл и ЦМВ с ИМ 0,001 БОЕ/кл.

Профилактическая схема. На клеточный монослой вносили культуральную среду с добавлением 2% ЭТС (среда поддержки), содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях, и инкубировали в течение 48 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Затем соединения отбирали, клетки промывали средой без сыворотки и заражали клетки Vero ВПГ-1, клетки ФЭЧ — ЦМВ в течение 1 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Затем клетки дважды промывали средой и вносили среду поддержки.

Микробицидная схема, моделирующая экстренную профилактику. На клеточный монослой вносили среду без сыворотки, содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях, инкубировали в течение 1 ч в условиях, описанных выше. Затем в культуру, не отбирая вещества, вносили ВПГ-1 или ЦМВ и инкубировали

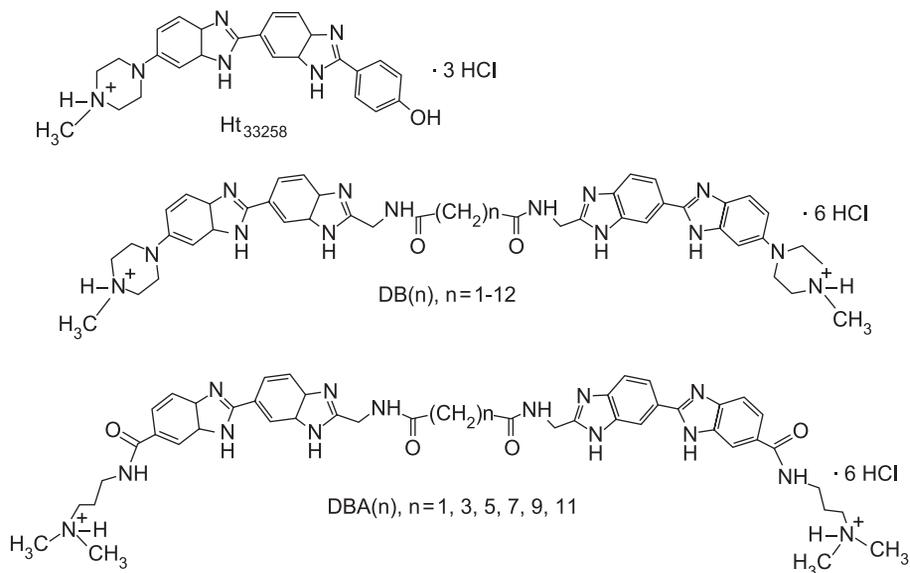


Рис. 1. Структурные формулы Хехста 33258 (**Ht**), **DB(n)** и **DBA(n)**.

1 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Монослой клеток промывали и вносили среду поддержки.

Лечебная схема. Монослой клеток заражали ВПГ-1 или ЦМВ и инкубировали в течение 1 ч в условиях, описанных выше. Затем после адсорбции вирусов клетки дважды промывали и вносили исследуемые соединения в различных концентрациях.

Вирулицидная схема. Вирусы инкубировали совместно с исследуемыми соединениями в различных концентрациях в течение 1 ч при 37°C . Затем инкубационную смесь (вирус + соединение) наносили на монослой клеток и выдерживали в течение 1 ч при 37°C в условиях, описанных выше. Монослой клеток промывали и вносили среду поддержки.

В качестве отрицательного контроля использовали зараженные клетки, не обработанные исследуемыми веществами. Для анализа противовирусной активности изученных соединений во всех схемах подсчитывали количество инфицированных клеток (бляшек) в опыте и контроле с использованием инвертированного микроскопа PrimoVert («Zeiss», Германия). Затем рассчитывали степень ингибирования цитопатогенного действия ВПГ и ЦМВ (бляшкообразования) в опыте по отношению к контролю по формуле Спирмена—Кербера [5]:

$$\text{Ингибирование вирусной активности (\%)} = \left(1 - \frac{\text{количество бляшек в опыте}}{\text{количество бляшек в контроле}}\right) \times 100\%$$

В качестве положительного контроля использовали АЦВ, в качестве отрицательного контроля — необработанные клетки Vero, зараженные ВПГ-1, и клетки ФЭЧ, зараженные ЦМВ.

Определение 50% ингибирующей дозы (ИД_{50}). Для вычисления концентрации веществ, вызывающих подавление вирусного цитопатического действия (бляшкообразования) на 50%, — ИД_{50} , строили графики зависимости степени ингибирования вирусной активности от концентраций соединения. Значения ИД_{50} рассчитывали методом линейной регрессии с использованием пакета документов Microsoft Excel. Химиотерапевтический индекс (ХТИ) рассчитывали как отношение ЦД_{50} к ИД_{50} .

Статистический анализ. Для статистической об-

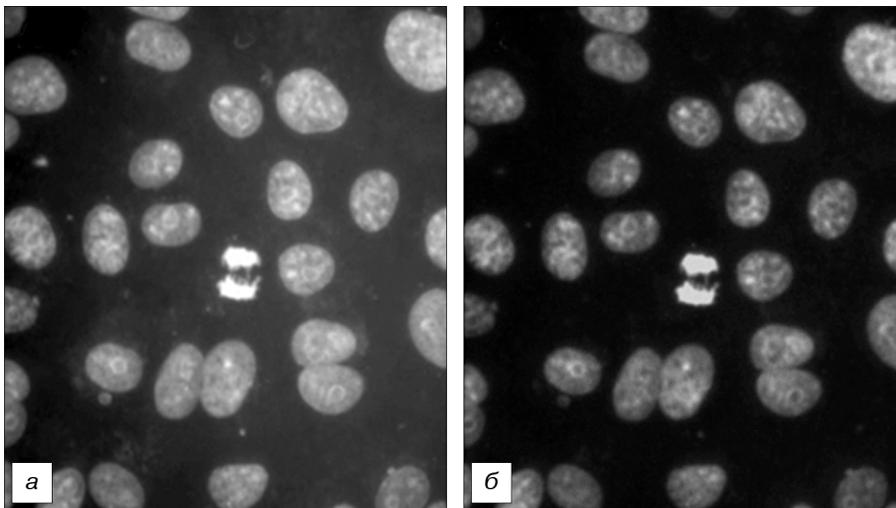


Рис. 2. Локализация **DBA(7)** в ядрах клеток Vero через 48 ч после внесения в культуральную среду.

a — **DBA(7)**; *б* — ядерный краситель DAPI; ок. 10 × об. 100.

работки результатов использовали пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0. Для вычисления и сравнения средних значений использовали критерий Стьюдента (*t*-критерий). Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе были проанализированы флуоресцентные и мембранотропные свойства **DBA(n)** и **DB(n)**, полученных на основе красителя Хехста 33258 (Ht), структурная формула которых представлена на рис. 1. Результаты показали, что все изученные соединения проникали в клетки Vero и ФЭЧ и флуоресцировали, но с разной интенсивностью. Максимальную интенсивность флуоресценции проявили соединения **DBA(1)**, **DBA(7)** и **DBA(9)**, минимальную — **DBA(3)**. Флуоресценция выявлена в интервале 465—475 нм. Было установлено, что через 24 ч **DBA** локализуется в цитоплазме, через 48 ч выявляются в ядрах клеток и Vero, и ФЭЧ и наблюдаются в клетках в течение 7 сут (время наблюдения) (рис. 2). Отметим, что флуоресценция соединений распределена в ядрах диффузно.

На следующем этапе были изучены цитотоксические и противовирусные свойства исследуемых соединений. При определении цитотоксичности использовали концентрации соединений от 100 до 2500 мкг/мл. 50% значения острой ($ОЦД_{50}$) и хронической цитотоксичности ($ЦД_{50}$), а также МПД для каждого соединения **DBA(n)** в отношении клеток Vero представлены в табл. 1. Анализ цитотоксических свойств показал, что в течение 72 ч воздействия наи-

более низкую цитотоксичность из 6 исследованных веществ проявляло **DBA(7)** ($ЦД_{50} > 1000$ мкг/мл), что сопоставимо с АЦВ. Наиболее токсичным оказалось **DBA(5)**, у остальных соединений данный показатель находился в диапазоне от 288 до 607 мкг/мл.

Анализ цитотоксичности соединений **DB** ($n = 1, 7, 11$) показал, что соединения с концентрацией 500, 250 и 125 мкг/мл выпадали в осадок через 24 ч после добавления на клеточный монослой и проявляли токсичность при концентрации менее 125 мкг/мл ($ЦД_{50} < 125$ мкг/мл).

Противовирусную активность соединений в отношении ВПГ- и ЦМВ-инфекции изучали в 4 схемах воздействия, используя концентрации 10, 1 и 0,1 мкг/мл. На рис. 3 представлены данные о противовирусных свойствах изученных соединений в микробицидной и терапевтической схемах воздействия ВПГ-1. Анализ количества инфицированных клеток (бляшек) показал, что соединения **DBA(1)**, **DBA(7)** и **DBA(9)** статистически значимо снижали количество инфицированных клеток по сравнению с контролем в обеих схемах воздействия, **DBA(11)** — в терапевтической схеме воздействия (см. рис. 3). Данные рис. 3 позволяют оценить степень ингибирования инфекционной активности ВПГ-1 под действием изученных соединений. Наиболее высокую микробицидную и терапевтическую противовирусную активность проявляло соединение **DBA(7)**. Кроме того, это соединение оказы-

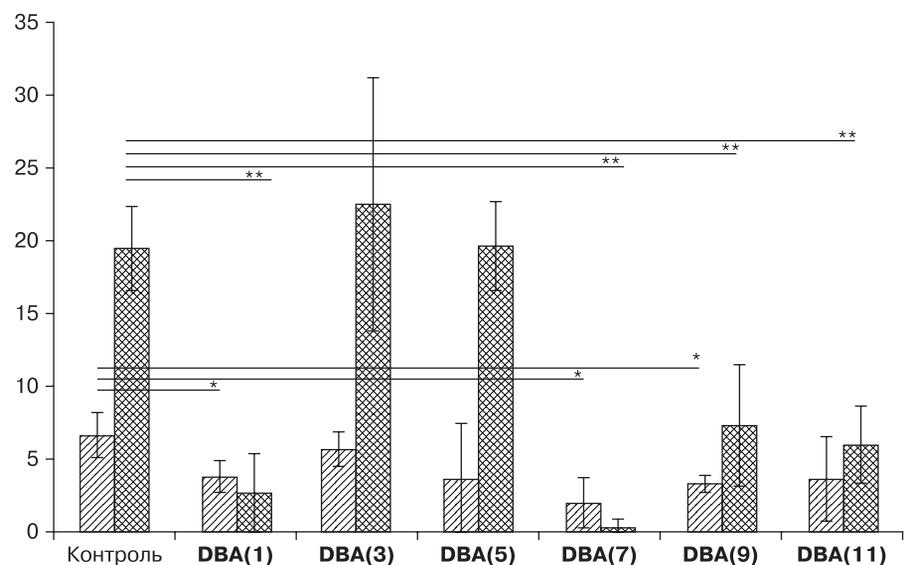


Рис. 3. Противовирусные свойства изученных соединений в микробицидной и лечебной схемах воздействия.

По оси ординат — количество вирусспецифических бляшек, содержащих инфицированные клетки Vero. Столбики с одной штриховкой — микробицидная схема воздействия: оценка через 24 ч после заражения; столбики с двойной штриховкой — лечебная схема воздействия: оценка через 48 ч после заражения; контроль — клетки, инфицированные ВПГ-1 и не обработанные соединениями **DBA(n)**; *, ** — различия, статистически значимые по сравнению с контролем при $p < 0,05$ (*t*-критерий).

Таблица 1

Цитотоксические свойства исследуемых соединений

Соединения	Цитотоксичность, мкг/мл		МПД***, мкг/мл
	ОЦД ₅₀ *	ЦД ₅₀ **	
DBA(1)	667	350	50
DBA(3)	670	375	50
DBA(5)	950	179	< 50
DBA(7)	> 2500	1083	500
DBA(9)	1759	288	100
DBA(11)	> 2500	607	250
АЦВ	2500	1100	250

Примечание. * — доза рассчитана через 24 ч после внесения соединения; ** — доза рассчитана через 72 ч после внесения соединения; *** — доза рассчитана через 7 сут после внесения соединения.

вало также профилактическое и вирулицидное действие: количество инфицированных клеток снижалось в 12 раз ($p < 0,002$) и в 18 раз ($p < 0,0001$) соответственно; инфекционная активность ВПГ-1 была подавлена в профилактической схеме на 91,7%, в вирулицидной — на 98,3% по сравнению с контролем — инфицированной культурой без соединений.

Соединения из серии **DB(n)** — **DB(1)**, **DB(7)** и **DB(11)**, изученные в тех же условиях, что и соединения серии **DBA(n)**, не проявили противовирусные свойства.

Наиболее информативным показателем противовирусного действия является ХТИ, характеризующий отношение цитотоксичности соединения к ингибирующей активности. В табл. 2 приведены рассчитанные значения ХТИ для каждого соединения.

Полученные данные показали, что наиболее активным является соединение **DBA(7)**, которое проявило противовирусную активность в отношении ВПГ-инфекции во всех изученных схемах с ХТИ > 100. Соединения **DBA(1)** и **DBA(11)** также обладали лечебными противовирусными свойствами, хотя и менее выраженными.

Цитотоксическое действие и противовирусная активность 3 соединений серии **DBA(n)** были изучены в отношении инфекции, вызванной ЦМВ человека. Для анализа цитотоксического действия на чувствительные к ЦМВ клетки ФЭЧ определяли значения ЦД₅₀. Они составили 184 мкг/мл для **DBA(3)**, 75 мкг/мл — для **DBA(7)** и 1696 мкг/мл — для **DBA(11)**. Противовирусную

активность показало только соединение **DBA(11)** и только в лечебной схеме. ИД₅₀ в лечебной схеме составила 30 мкг/мл, ХТИ = 56,5. Таким образом, соединение **DBA(11)** обладало умеренными лечебными свойствами против как ВПГ-инфекции, так и ЦМВ-инфекции.

Соединения из серии **DB(n)** — **DB(1)**, **DB(7)** и **DB(11)**, изученные в тех же условиях, что и соединения **DBA(n)**, не проявили противовирусные свойства в отношении ЦМВ-инфекции.

Обсуждение

В работе исследована новая серия флуоресцентных **DBA(n)**, полученных на основе красителя Хехста 33258 (**Ht**), широко используемого в клеточной биологии в качестве ДНК-специфичной флуоресцентной метки [6]. Известно, что **Ht** нековалентно и АТ-специфично связывается с ДНК по узкой бороздке [7, 8]. Он ингибирует ТАТА-бокс-связывающий белок [9, 10], является эффективным ингибитором топо-I [11, 12], топо-II [13] и ДНК-хеликаз [14] и, кроме того, обладает радиопротекторным свойством [15, 16]. Молекула **Ht** состоит из двух ковалентно связанных бензимидазольных фрагментов. При взаимодействии с ДНК каждый бензимидазольный фрагмент образует бифуркационную (трехцентровую) водородную связь с О2-атомом тимина и/или N3-атомом аденина двух соседних АТ-пар, накрывая при этом участок приблизительно в 1,5 пары оснований [7, 8]. Связывание **Ht** с ДНК стабилизируется также за счет электростатических и интенсивных ван-дер-ваальсовых взаимодействий со стенками узкой бороздки ДНК.

В созданной нами ранее серии **DB(n)** бензимидазольные фрагменты соединены олигометиленовым линкером различной длины (см. рис. 1), обеспечивающим им структуру, изометричную узкой бороздке ДНК. Таким образом, были сконструированы бидентатные лиганды, способные узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга. **DB(n)** в низких молярных концентрациях оказались ингибиторами ряда ДНК-зависимых ферментов: эукариотической топо-I [17], ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a мыши [18], хеликазной активности белка NS3 вируса гепатита С человека [19]. Исследования **DB(n)** показали, что они являются новыми перспективными флуоресцентными красителями, способными как к проникновению через клеточную и ядерную

Таблица 2

Противовирусные свойства в отношении ВПГ-инфекции

Вещества	ЦД ₅₀	Схемы введения соединений							
		до заражения				после заражения, 1 ч, лечебная схема		Смесь ВПГ + соединение, вирулицидная схема	
		48 ч, профилактическая схема		1 ч, микробицидная схема		ИД ₅₀	ХТИ	ИД ₅₀	ХТИ
		ИД ₅₀ *	ХТИ**	ИД ₅₀	ХТИ				
DBA(1)	350	—	—	1,1	318	5,7	61	4,9	71
DBA(3)	375	—	—	33,9	11	—	—	23	16
DBA(5)	179	—	—	30	6	—	—	—	—
DBA(7)	1083	5,7	190	4	271	4,9	221	5,1	212
DBA(9)	288	5,3	54	9,8	30	8	36	7,2	40
DBA(11)	607	9,6	63	10,6	57	7,2	84	8,1	75
АЦВ	1100	н/и	н/и	1,2	916	0,9	1222	н/и	н/и

Примечание. * — концентрация соединения, ингибирующая бляшкообразующую способность вируса на 50%, мкг/мл; ** — ХТИ, рассчитанный как отношение 50% цитотоксической дозы к 50% ингибирующей дозе (ХТИ = ЦД₅₀/ИД₅₀); «—» — не обладает противовирусными свойствами (количество инфицированных клеток в опыте больше или равно таковому в контроле); жирным шрифтом выделены значения ХТИ > 100; н/и — не исследованы.

мембраны с эффективным окрашиванием ядер клеток, так и к дифференциальной окраске хромосом [20]. Однако из-за склонности к образованию агрегатов эти соединения имели низкую растворимость в воде, что очень существенно для проведения биологических, в том числе биохимических и особенно цитологических исследований.

Для улучшения растворимости в водных растворах и увеличения аффинности к ДНК в структуре молекулы **ДВ(n)** была произведена замена концевых групп и получена новая серия флуоресцентных хорошо растворимых в воде **ДВА(n)** (см. рис. 1). В настоящей работе было установлено (см. рис. 2), что молекулы **ДВА(n)**, как и молекулы **ДВ(n)**, способны проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. Таким образом, создана новая серия флуоресцентных ДНК-специфичных бидентатных лигандов **ДВА(n)**, способных узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга.

В настоящей работе впервые изучены противовирусные свойства вновь синтезированных **ДВА(n)** в отношении двух наиболее распространенных герпесвирусных инфекций *in vitro*. Инфекции, вызванные ВПГ 1-го и 2-го типа, а также ЦМВ, являются глобальной проблемой здравоохранения в мире. По данным ВОЗ, в мире распространенность клинических проявлений ВПГ-1-инфекции среди населения в возрасте до 49 лет составила 67%, распространенность рецидивирующего генитального герпеса, вызванного ВПГ-2, среди населения в возрасте 15–49 лет — 11,8% [1, 21]. ЦМВ только в одной группе риска — новорожденные дети — обнаружен у 1% всех живых новорожденных и особо опасен для недоношенных и маловесных младенцев, среди которых ЦМВ встречается значительно чаще [22].

Изученные соединения проявили противовирусные свойства с разной активностью и разными механизмами действия. Два соединения **ДВА(1)** и **ДВА(7)** обладали микробицидными свойствами (значения ХТИ превышали 100). Согласно существующим представлениям, ХТИ = 100/> 100 позволяет рекомендовать препарат к проведению доклинических и клинических испытаний. Создание микробицидов — доконтактных (pre-exposure prophylaxis) средств экстренной профилактики для интравагинального и/или интаректального использования признано ВОЗ как приоритетное направление в борьбе с ВИЧ-инфекцией и другими инфекциями, передающимися половым путем (ИППП). В последнее время стало очевидно, что недостаточно использовать микробициды узкого действия, направленного только на ВИЧ. Доказано, что генитальный герпес является одним из важнейших факторов риска приобретения ВИЧ-1 [23]. Необходимо, чтобы такие препараты также эффективно нейтрализовали ВПГ-1, так как установлено, что в настоящее время до 50% случаев генитального герпеса вызвано ВПГ-1 [1]. Можно предположить, что разработка микробицидов на основе **ДВА(1)** и **ДВА(7)** сможет предотвращать заражение ВПГ 1-го и 2-го типа, развитие генитального герпеса и будет способствовать также снижению распространения ВИЧ-инфекции.

Коинфекция ЦМВ/ВИЧ усиливает воспалительные процессы и иммунные расстройства, ускоряя развитие заболевания и часто являясь причиной смерти больных СПИДом. Активность **ДВА(11)** в лечебной схеме против ЦМВ-инфекции *in vitro* была относительно невысокой (ХТИ > 50 < 100). Однако с учетом негативной роли

ЦМВ при ВИЧ-инфекции детей [24] и взрослых [25], а также в связи с тяжелыми последствиями для новорожденных детей соединение **ДВА(11)** заслуживает дальнейших исследований как перспективный препарат для терапии ЦМВ-инфекции.

Заключение

Таким образом, создана новая серия флуоресцентных ДНК-специфичных бидентатных лигандов **ДВА(n)**, хорошо растворимых в воде, способных узнавать нуклеотидные последовательности, содержащие блоки из двух АТ-пар, находящихся на разных расстояниях друг от друга. Молекулы **ДВА(n)** могут проникать через клеточную и ядерную мембрану и окрашивать ДНК в живых клетках. В настоящей работе впервые изучены противовирусные свойства вновь синтезированных **ДВА(n)** в отношении двух наиболее распространенных герпесвирусных инфекций *in vitro*. Установлено, что соединение **ДВА(7)** проявило высокую противовирусную активность *in vitro* в отношении инфекции, вызванной ВПГ-1. Это соединение обладает не только лечебными и профилактическими свойствами в отношении клеток культуры, но также нейтрализует инфекционную активность вируса (вирулицидная схема) и может рассматриваться как микробицид — кандидатный препарат для экстренной профилактики. Следует отметить, что **ДВА(11)** проявило умеренную терапевтическую активность на модели как ВПГ-, так и ЦМВ-инфекции. Это позволяет надеяться, что данное соединение сможет стать основой для создания инновационного препарата для лечения двух широко распространенных вирусных инфекций человека.

Финансирование. Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 14-04-00388) и Программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 6–16, 18, 19, 21, 23–25 см. REFERENCES)

- Мейхи Б. *Вирусология*. Методы: Пер. с англ. М.: Мир; 1988.
- Сусова О.Ю., Иванов А.А., Моралес Руисс С.С., Лессовая Е.А., Громыко А.В., Стрельцов С.А. и др. Узкобороздочные димерные бисбензимидазолы ингибируют *in vitro* связывание с ДНК эукариотической ДНК топоизомеразы I. *Биохимия*. 2010; 75(6): 781–8.
- Попов К.В., Егорова Е.И., Иванов А.А., Громыко А.В., Жузе А.Л., Большева Н.Л. и др. Димерные бисбензимидазольные красители на основе Ноеchst 33258 новые ДНК-специфичные флюорохромы для цитогенетики человека и растений. *Биологические мембраны. Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2008; 25(3): 173–80.
- Климова Р.Р., Малиновская В.В., Гусева Т.С., Паршина О.В., Гетия Е.Г., Дегтярева М.В. и др. Влияние герпесвирусных инфекций на уровень провоспалительных цитокинов у недоношенных новорожденных детей. *Вопросы вирусологии*. 2011; (4): 23–6.

REFERENCES

- Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765.
- James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clin. Perinatol*. 2015; 42(1): 47–59.
- Barrett M.P., Gemmell C.G., Suckling C.J. Minor groove binders as anti-infective agents. *Pharmacol. Ther.* 2013; 139: 12–23.
- Wilson W. D., Nguyen B., Tanious F. A., Mathis A., Hal J.E., Stephens C.E. et al. Dications that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological

- cal activity. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents.* 2005; 5(4): 389-408.
5. Mahy B.W.J., ed. *Virology: A Practical Approach.* Oxford: IRL Press; 1985.
 6. Latt S.A. Optical studies of metaphase chromosome organization. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1976; (5): 1-37.
 7. Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). *Nucleic. Acids. Res.* 1988; (16): 2671.
 8. Vega M.C., Saez I.G., Aymami J., Eritja R., van der Marel G.A., van Boom J.H., et al. Three-dimensional crystal structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor-groove-binding drug Hoechst 33258. *Eur. J. Biochem.* 1994; 222: 721.
 9. Chiang S.Y., Welch J.J., Rauscher F.J., Beerman T.A. Effects of minor groove binding drugs on the interaction of TATA box binding protein and TFIIA with DNA. *Biochemistry.* 1994; (33): 7033-40.
 10. Chiang S.Y., Welch J.J., Rauscher F.J., Beerman T.A. Effect of DNA-binding drugs on early growth response factor-1 and TATA box-binding protein complex formation with the herpes simplex virus latency promoter. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 23999-4004.
 11. Chen A.Y., Yu C., Gatto B., Liu L.F. DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993; 90: 8131-5.
 12. Zhang X., Zhang S.C., Sun D., Hu J., Wali A., Pass H., et al. New insight into the molecular mechanisms of the biological effects of DNA minor groove binders. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25822.
 13. Woynarowski J.M., McHugh M., Sigmund R.D., Beerman T.A. Modulation of topoisomerase II catalytic activity by DNA minor groove binding agents distamycin, Hoechst 33258, and 4',6-diamidine-2-phenylindole. *Mol. Pharmacol.* 1989; 35: 177-82.
 14. Soderlind K.J., Gorodetsky B., Singh A.K., Bachur N.R., Miller G.G., Lown J.W. Bis-benzimidazole anticancer agents: targeting human tumour helicases. *Anticancer. Drug Design.* 1999; 14: 19-36.
 15. Martin R.F., Broadhurst S., D'Abrew S., Budd R., Sephton R., Reum M., et al. Radioprotection by DNA ligands. *Br. J. Cancer Suppl.* 1996; 74(27): 99-101.
 16. Lyubimova N.V., Coultas P.G., Yuen K., Martin R.F. In vivo radioprotection of mouse brain endothelial cells by Hoechst 33342. *Br. J. Radiol.* 2001; 74: 77-82.
 17. Susova O.Yu., Ivanov A.A., Morales Ruiss S.S., Lessovaya E.A., Gromyko A.V., Strel'tsov S.A., et al. Minor groove dimeric bisbenzimidazoles inhibit in vitro DNA binding to eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biokhimiya.* 2010; 75(6): 781-8. (in Russian)
 18. Cherepanova N.A., Ivanov A.A., Maltseva D.V., Minero A.S., Gromyko A.V., Strel'tsov S.A., et al. Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2011; 26(2): 295-300.
 19. Tunitskaya V.L., Mukovnya A.V., Ivanov A.A., Gromyko A.V., Ivanov A.V., Strel'tsov S.A., et al. Inhibition of the helicase activity of the HCV NS3 protein by symmetrical dimeric bis-benzimidazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21(18): 5331-5.
 20. Popov K.V., Egorova E.I., Ivanov A.A., Gromyko A.V., Zhuze A.L., Bol'sheva N.L., et al. Dimeric bisbenzimidazole Hoechst 33258-related dyes as novel AT-specific DNA-binding fluorochromes for human and plant cytogenetics. *Biologicheskie membrany. Zhurnal membrany i kletchnoy biologii.* 2008; 25(3): 173-80. (in Russian)
 21. Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10(1): e114989.
 22. Klimova R.R., Malinovskaya V.V., Guseva T.S., Parshina O.V., Getiya E.G., Degtyareva M.V., et al. Influence of herpesvirus infection on the levels of proinflammatory cytokines in preterm newborns. *Voprosy virusologii.* 2011; (4): 23-6. (in Russian)
 23. Moore M.D., Bunka D.H., Forzan M., Spear P.G., Stockley P.G., McGowan I., et al. Generation of neutralizing aptamers against herpes simplex virus type 2: potential components of multivalent microbicides. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(7): 1493-9.
 24. Slyker J.A. Cytomegalovirus and paediatric HIV infection. *J. Virus Erad.* 2016; 2(4): 208-14.
 25. Lichtner M., Cicconi P., Vita S., Cozzi-Lepri A., Galli M., Lo Caputo S., et al. Cytomegalovirus coinfection is associated with an increased risk of severe non-AIDS-defining events in a large cohort of HIV-infected patients. *J. Infect. Dis.* 2015; 211(Pt. 2): 178-86.

Поступила 15.02.17
Принята в печать 28.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:578.832.1].015.44

Санин А.В., Дерябин П.Г., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Кожевникова Т.Н.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ФОСПРЕНИЛ И ГАМАПРЕН В ОТНОШЕНИИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА А(H5N1) В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК

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

Изучали противовирусную активность фоспренила и гамапрена *in vitro* в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А(H5N1). Внесение вируса в культуру клеток почки эмбриона свиньи сопровождалось развитием интенсивного цитопатогенного эффекта. Предварительное внесение фоспренила и гамапрена за 1 ч до заражения клеток в дозе 10 ТЦД₅₀ полностью подавляло цитопатогенную активность вируса. При повышении дозы вируса до 100 ТЦД₅₀ также наблюдали выраженное угнетение инфекционной активности вируса: 70% инфицированных клеток выживало под действием фоспренила и 90% — под действием гамапрена. При введении препаратов одновременно с заражением клеток вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀ выживало фактически 100% зараженных клеток, в то время как в контрольных культурах наблюдалась гибель 100% клеток. После инфицирования вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀ фоспренил и гамапрен вызывали 50% защиту клеток. Противовирусный эффект препаратов фоспренил и гамапрен может быть связан не только с их вирулицидными, но и с противовирусными свойствами.

Ключевые слова: птичий грипп; вирус; культуры клеток; фоспренил; гамапрен; противовирусная активность.

Для цитирования: Санин А.В., Дерябин П.Г. Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Кожевникова Т.Н. Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H5N1) в культуре клеток. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 168-173.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-168-173>

Контактная информация: Кожевникова Татьяна Николаевна, канд. мед. наук, н.с. ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: tatiana@micro-plus.ru

Sanin A.V., Deryabin P.G., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Kozhevnikova T.N.
**ANTIVIRAL ACTIVITY OF PHOSPRENYL AND GAMAPREN AGAINST INFECTION CAUSED BY
 INFLUENZA A (H5N1) VIRUS IN CELL CULTURE**

Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation

The antiviral activity of Phosprenyl and Gamapren in vitro against highly pathogenic strain of avian influenza H5N1 virus was studied. Inoculation of the virus to the susceptible cell culture led to development of the cytopathogenic effect. Preliminary introduction of Phosprenyl and Gamapren an hour prior to infecting the cells with virus 100.0 TCID₅₀ dose completely inhibited the cytopathogenic activity of the virus. At higher doses of virus (100.0 TCID₅₀) significant inhibition of the infectious activity of the virus was observed: 70% of infected cells survived under the action of Phosprenyl, and 90% under the action of Gamapren. With the introduction of the preparations simultaneously with the infection of cells with virus at a dose of 10.0 TCID₅₀ virtually 100% of infected cells survived, while in control cultures death of 100% of the cells occurred. After infection with the virus at a dose of 100.0 TCID₅₀ Phosprenyl and Gamapren caused 50% protection of the cells. The antiviral effect of the drugs Phosprenyl and Gamapren may be associated not only with their virulicidal, but with anti-viral activity as well.

Key words: avian influenza; virus; cell cultures; Phosprenyl; Gamapren; antiviral activity.

For citation: Sanin A.V., Deryabin P.G., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Kozhevnikova T.N. Antiviral activity of Phosprenyl and Gamapren against infection caused by influenza A (H5N1) virus in cell culture. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 168-173. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-168-173>

For correspondence: Tat'yana N. Kozhevnikova, Cand. Med. Sci., researcher, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation.

E-mail: tatiana@micro-plus.ru

Information about authors:

Sanin A.V., <http://orcid.org/0000-0003-3091-5802>

Deryabin P.G., <http://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Narovlyansky A.N., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Pronin A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5266-9783>

Kozhevnikova T.N., <http://orcid.org/0000-0003-3345-3623>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 15 February 2017

Accepted 28 February 2017

Птичий грипп — острое вирусное заболевание домашних и диких птиц, которое характеризуется септицемией, отеками, поражением легких и органов пищеварения. Этиологическим агентом является вирус гриппа типа А, из множества подтипов которого наибольшую угрозу, по мнению специалистов, представляет высокопатогенный штамм H5N1. По данным ВОЗ, на январь 2017 г. в мире насчитывалось 856 инфицированных высоковирулентным вирусом гриппа А(H5N1) людей, из которых 452 человека погибли (около 53%). Сохраняется и опасность появления в природе смертельных для человека мутантов вируса гриппа А(H5N1), способных передаваться от человека к человеку.

В конце 2016 г. едва ли не наиболее актуальной проблемой мирового масштаба стала эпизоотия высокопатогенного птичьего гриппа, накрывшая в первую очередь Европу, а также многие другие страны, включая Россию. В декабре 2016 — январе 2017 г. сообщается о десятках случаев заражения птичьим гриппом людей, особенно в ряде стран Юго-Восточной Азии [1].

Если учесть крайний недостаток эффективных средств для лечения и профилактики птичьего гриппа, поиск и испытание подобных препаратов остается актуальной задачей практической ветеринарии.

Цель настоящей работы — изучение эффективности препаратов фоспренил и гамапрен, широко применяемых в ветеринарной практике [2], на модели культуры клеток, зараженной высокопатогенным штаммом вируса гриппа А(H5N1).

Материал и методы

Штамм вируса гриппа А(H5N1). В работе использовали штамм вируса гриппа А(H5N1), выделенный от

погибшей домашней курицы в Новосибирской области во время эпизоотии в июле 2005 г. [3]. Штамм вируса гриппа оказался высокопатогенным для культур клеток почки эмбриона свиньи (линия клеток СПЭВ), инфекция в которых сопровождалась развитием интенсивного цитопатогенного эффекта и накоплением инфекционного вируса до 7,5 lg ТЦИД₅₀ [4]. В работе использовали инфекционные дозы вирусосодержащего материала, равные 10, 100 и 1000 ТЦИД₅₀/0,2 мл.

Препараты фоспренил и гамапрен (производство соответственно ЗАО «Микро-плюс» и ООО «ГамаВет-Фарм») содержат в качестве действующего вещества 0,4% фосфорилированных полипептидов.

Цитотоксические свойства препаратов для культур клеток СПЭВ исследовали, используя их концентрации от 100 до 400 мкг/мл. Минимальную концентрацию препаратов, вызывающую токсическую гибель 50% монослоя клеток СПЭВ (ЦД₅₀), определяли после экспозиции их с клетками в течение 72 ч при 37 °С.

Противовирусную активность препаратов фоспренил и гамапрен в отношении инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H5N1), исследовали в культурах клеток СПЭВ, выращенных в виде однодневного монослоя в 48-луночных панелях на питательной среде 199 с добавлением 10% сыворотки эмбриона телят и антибиотиков. При этом учитывали, что цикл репликации патогенного варианта вируса гриппа А короткий (уже через 6 ч после заражения культур клеток СПЭВ можно было наблюдать явления цитодеструкции при внесении высоких концентраций вируса). Поэтому растворы препаратов в объеме 0,4 мл, содержащие 200 мкг/мл, вводили за 1 ч до и через 1 ч после заражения клеток, а также одновременно с внесением вируса.

Таблица 1

Цитотоксические свойства препаратов фоспренил и гамапрен для клеток СПЭВ

Препарат	Цитотоксические свойства препаратов в используемых концентрациях, мкг/мл			
	100,0	200,0	400,0	ЦД ₅₀
Фоспренил	0	0	н. д.	≥400,0
Гамапрен	0	0	0	>400,0

Примечание. н. д. — не делали

Использование вышеупомянутых доз вируса гриппа позволяло учитывать окончательный результат через 48 ч после инфицирования.

Результаты исследований учитывали по влиянию препаратов на жизнеспособность инфицированных гриппом клеток СПЭВ в сравнении с контрольными опытами, в которых использовали только зараженные вирусом птичьего гриппа А культуры клеток, культуры клеток интактные и культуры клеток, обработанные препаратами. Определяли минимальную концентрацию препаратов, способных защитить 50% монослоя клеток от цитопатогенного действия вируса гриппа А (ИД₅₀ — 50% ингибирующая доза).

Результаты

Изучение цитотоксического действия фоспренила и гамапрена показало, что препараты в концентрациях 100—400 мкг/мл на протяжении 3 сут (период наблюдения) не вызывали цитотоксического действия при добавлении в культуры клеток, ЦД₅₀ препаратов превышала 400 мкг/мл (табл. 1).

Результаты исследования противовирусной активности препаратов фоспренил и гамапрен представлены в табл. 2—4.

В частности, показано (см. табл. 2), что препараты фоспренил и гамапрен, введенные за 1 ч до заражения культур клеток СПЭВ вирусом гриппа А(Н5N1) в дозе 10 ТЦД₅₀, полностью подавляли цитопатогенную активность вируса (срок наблюдения — 48 ч после инфекции). В то же время в контрольных зараженных вирусом гриппа культурах клеток СПЭВ к этому времени регистрировали гибель 100% клеток монослоя. ИД₅₀ препаратов составляла меньше 200 мкг/мл. Действие препаратов в культурах клеток СПЭВ, зараженных вирусом гриппа А(Н5N1) в до-

Таблица 2

Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в инфицированных вирусом гриппа А(Н5N1) культурах клеток СПЭВ (обработка клеток за 1 ч до заражения)

Препарат	Доза вируса, ТЦД ₅₀ (lg ТЦД ₅₀)	Концентрации препаратов, мкг/мл		
		200,0	контроль вируса	ИД ₅₀
Фоспренил	10	0*	100*	<200,0
	100	30	100	<200,0
	1000	100	100	>200,0
Гамапрен	10	0	100	<200,0
	100	10	100	<200,0
	1000	60	100	≥200,0

Примечание. Здесь и в табл. 3 и 4: * — % погибших зараженных вирусом гриппа клеток в монослое.

Таблица 3

Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в инфицированных вирусом гриппа А(Н5N1) культурах клеток СПЭВ (обработка клеток в момент заражения вирусом гриппа птиц)

Препарат	Доза вируса, ТЦД ₅₀	Концентрации препаратов, мкг/мл		
		200	контроль вируса	ИД ₅₀
Фоспренил	10	0*	100*	>200,0
	100	50	100	200,0
	1000	100	100	<200,0
Гамапрен	10	0	100	>200,0
	100	50	100	200,0
	1000	85	100	<200,0

зе 100 ТЦД₅₀, также приводило к отчетливому угнетению инфекционной активности вируса в культурах клеток: 70% инфицированных клеток выживало в этих условиях после обработки препаратом фоспренил, а обработка клеток препаратом гамапрен приводила к выживаемости 90% зараженных клеток. Доза вируса Н5N1, равная 1000 ТЦД₅₀, вызывала гибель всех клеток СПЭВ к 48 ч после инфицирования, причем ингибирующего действия препарата фоспренил в этих условиях не проявлялось, а обработка гамапреном приводила к 40% выживаемости инфицированных клеток.

Определенные различия в действии фоспренила и гамапрена на инфекцию, вызванную вирусом гриппа А(Н5N1), были выявлены также в условиях, когда препараты вводили одновременно с заражением клеток (см. табл. 3). Регистрация результатов через 48 ч после заражения культур клеток СПЭВ свидетельствовала о высокой активности препаратов фоспренил и гамапрен при обработке клеток, зараженных вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀. Фактически 100% зараженных клеток выживало, в то время как в контрольных культурах наблюдалась гибель 100% клеток. Инфицированные вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀ культуры клеток СПЭВ частично выживали к этому сроку, причем фоспренил и гамапрен вызывали 50% защиту клеток от инфекции вирусом птичьего гриппа, ИД₅₀ препаратов в этом случае составила ровно 200 мкг/мл. Фоспренил не был эффективен в случае, когда культуры заражали вирусом в дозе 1000 ТЦД₅₀, в то же время гамапрен в этих условиях вызывал защиту 15% клеток.

Несколько иные результаты были получены в случае, когда препараты вносили в зараженные культуры клеток СПЭВ через 1 ч после инфицирования (см. табл. 4). В этих условиях было отмечено незначительное снижение активного противовирусного действия препаратов, особенно гамапрена. Показано, что фоспренил приводил к сохранению жизнеспособными 75% инфицированных клеток через 48 ч после заражения культур клеток вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀, и лишь 10% клеток выживало при обработке их гамапреном. Противовирусное действие фоспренила и гамапрена не было выявлено при обработке культур клеток СПЭВ, зараженных вирусом в дозе 100 и 1000 ТЦД₅₀.

Обсуждение

В конце 2016 — начале 2017 г. едва ли не наиболее актуальной проблемой мирового масштаба стала эпидемиология высокопатогенного птичьего гриппа. Случаи заболевания и массовой гибели птиц были выявлены в

Таблица 4

Противовирусная активность препаратов фоспренил и гамапрен в инфицированных вирусом гриппа А(Н5N1) культурах клеток СПЭВ (обработка клеток через 1 ч после заражения)

Препарат	Доза вируса, ТЦД ₅₀	Концентрации препаратов, мкг/мл	
		200	контроль вируса
Фоспренил	10	25*	100*
	100	100	100
	1000	100	100
Гамапрен	10	90	100
	100	100	100
	1000	100	100

Австрии, Болгарии, Великобритании, Венгрии, Германии, Греции, Дании, Нидерландах, Польше, Румынии, Сербии, Словакии, Украине, Финляндии, Франции, Хорватии, Черногории, Швейцарии, Швеции, а также в России [5]. Помимо Европы птичий грипп регистрировался в Израиле, Индии, Иране, Китае, Нигерии, Тайване, Тунисе, ЮАР, Южной Корее, Японии.

В России в ноябре—декабре 2016 г. болезнь регистрировали в Калмыкии, Краснодарском крае, Ростовской и Астраханской областях. В начале января 2017 г. грипп стал причиной гибели птиц в воронежском зоопарке. Также в январе выявлен еще один очаг болезни в Темрюкском районе Краснодарского края. Больше всего случаев связано с заражением вирусами H5N8 и H5N5.

В декабре 2016 г. ветеринарно-диагностическая лаборатория университета штата Висконсин (США) сообщила о том, что вирус гриппа птиц подтипа H7N2 впервые обнаружен у домашних кошек. Более того, от больных кошек, инфицированных штаммом H7N2 вируса птичьего гриппа, заразился один из ветеринарных врачей, обслуживавших данный приют, о чем сообщил департамент здравоохранения Нью-Йорка. Это первый случай заражения человека вирусом птичьего гриппа от кошки [6]. В декабре 2016 — январе 2017 г. сообщалось о десятках случаев заражения птичьим гриппом людей, особенно в Китае, Камбодже и других странах Юго-Восточной Азии [1]. Больше всего заболевших было выявлено в китайских провинциях Гуандун, Гуйчжоу, Хубэй, Хунань, Хэнань, Цзянси, Шаньдун, Ляонин, а также в Шанхае, Гонконге и Макао. Не менее 10 пациентов скончались. В основном эти случаи связаны с вирусом гриппа А(H7N9).

Все это указывает на особую актуальность поиска эффективных и безопасных средств для борьбы с возбудителем птичьего гриппа. В настоящей работе изучали противовирусную активность двух широко используемых в российской ветеринарной практике препаратов на основе фосфорилированных полипренолов, выделенных соответственно из зелени пихты и шелковицы, — фоспренила и гамапрена. Ранее было показано, что данные препараты в различных тест-системах проявляют высокую противовирусную активность в отношении вирусов чумы плотоядных [7], инфекционного ринотрахеита [7, 8], болезни Ауески [9] и других герпесвирусов [10—13], гепатита С [14], диареи крупного рогатого скота [15], энцефаломиелита Тейлера [16], папилломы [17], желтой лихорадки, клещевого энцефалита [18, 19] и других флавивирусов [20], парвовирусов [21], корона-

вирусов [22, 23], цитомегаловирусов [24], аденовирусов [25], парамиксовирусов [25] и ряда других [21, 26].

Продемонстрирована также эффективность фоспренила при инфекциях, вызванных вирусом гриппа [27].

В настоящем исследовании клетки СПЭВ заражали высокопатогенным штаммом вируса гриппа А(Н5N1), выделенным от домашней курицы, павшей во время эпизоотии 2005 г. Внесение вируса в данную культуру сопровождалось развитием интенсивного цитопатогенного эффекта. Предварительное введение фоспренила и гамапрена за 1 ч до заражения клеток вирусом гриппа А(Н5N1) в достаточно высокой дозе 10 ТЦД₅₀ полностью подавляло цитопатогенную активность вируса. При повышении дозы вируса до 100 ТЦД₅₀ также наблюдали выраженное угнетение инфекционной активности вируса: 70% инфицированных клеток выживало под действием фоспренила и 90% — под действием гамапрена. При введении препаратов одновременно с заражением клеток вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀ выживало фактически 100% зараженных клеток, в то время как в контрольных культурах наблюдалась гибель 100% клеток (см. табл. 3). После инфицирования вирусом в дозе 100 ТЦД₅₀ фоспренил и гамапрен вызвали 50% защиту клеток. Фоспренил не был эффективен в случае, когда культуры заражали вирусом в дозе 1000 ТЦД₅₀, в то же время гамапрен в этих условиях вызывал защиту 15% клеток. Внесение препаратов в зараженные культуры через 1 ч после инфицирования (см. табл. 4) сопровождалось незначительным снижением противовирусной активности препаратов, более выраженным для гамапрена. Если под действием фоспренила 75% инфицированных клеток сохраняли жизнеспособность через 48 ч после заражения культур клеток вирусом в дозе 10 ТЦД₅₀, то лишь 10% клеток выживало после обработки гамапремом.

Мы предполагаем, что эффективность препаратов в данном случае может быть связана со следующим механизмом. Как известно, сиаловые кислоты представляют собой N- или O-ацилпроизводные нейрамининовой кислоты, присоединение которой к белкам происходит только в присутствии фосфатов полипренолов, которые являются промежуточными акцепторами сахаров в процессе образования гликопротеинов. По-видимому, фосфаты полипренолов, являющиеся действующим веществом фоспренила и гамапрена, препятствуют десалированию гликопротеинов вируса и клетки-хозяина вирусной нейраминидазой и способствуют образованию конгломератов вирусных частиц [28], в составе которых жизненный цикл вирионов обрывается.

Выводы

1. Препараты фоспренил и гамапрен обладают способностью подавлять инфекционную активность вируса гриппа А(Н5N1) в культурах клеток СПЭВ, инфицированных вирусом в дозах 10 и 100 ТЦД₅₀/мл, в течение 48 ч после заражения клеток (срок наблюдения).

2. Максимальная противовирусная активность фоспренила и гамапрена проявлялась при обработке культур клеток СПЭВ за 1 ч до заражения и в момент заражения клеток вирусом гриппа А(Н5N1) в дозе 10 ТЦД₅₀.

3. Противовирусная активность фоспренила отсутствовала в культурах клеток СПЭВ, зараженных высокой дозой вируса гриппа А(Н5N1) 1000 ТЦД₅₀, а антивирусное действие гамапрена в этих условиях было несущественным.

4. Обнаруженный противовирусный эффект препара-

тов фоспренил и гамапрен, вероятно, может быть связан не только с их вирулицидными, но и противовирусными свойствами.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 7 см. REFERENCES)

1. Regnum. Информационное агентство. Власти КНР сообщили еще о двух случаях заражения вирусом H7N9. Available at: <https://regnum.ru/news/accidents/2232866.html>
2. Санин А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2005; (1): 38-42.
3. Львов Д.К., Онищенко Г.Г., Щелканов М.Ю., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А., Дерябин П.Г. и др. Изоляция штаммов вируса гриппа А/H5N1 от домашних и диких птиц в период эпизоотии в Западной Сибири (июль 2005 г.) и их депонирование в государственную коллекцию вирусов (08 августа 2005 г.). *Вопросы вирусологии.* 2006; (1): 11-4.
4. Львов Д.К., Подчерняева Р.Я., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Исаева Е.И., Данлыбаева Г.А. Спектр клеточных линий позвоночных, чувствительных к высокопатогенным вирусам гриппа А/крячка/Южная Африка/61 (H5N3) и А/крячка/Новосибирск/56/05 (H5N1). *Вопросы вирусологии.* 2007; 52(1): 45-7.
5. ЗООИНФОРМ-СИТИ. Панзоотия птичьего гриппа в Европе продолжается. Available at: http://zooinform.ru/vete/news/panzootiya_ptichego_grippa_v_evropе_prodljaetsya
6. Новости медицины от MEDIKFORUM.RU. Available at: http://www.medikforum.ru/news/medicine_news/55270
7. Наровлянский А.Н., Березина Л.К., Веткова Л.Г., Степанова Т.Н., Савойская С.Л., Зубашев И.К. и др. Лечение герпесвирусных инфекций с помощью препаратов полипренолов. *Ветеринарная клиника.* 2005; (2).
8. Санин А.В., Пронин А.В., Наровлянский А.Н., Степанова Т.Н., Савойская С.Л., Зубашев И.К. и др. Влияние полипренилфосфата натрия на вирусный ринотрахеит кошек. *Ветеринария.* 2015; (11): 17-21.
9. Измestьева А.В., Саличев А.В., Мезенцева М.В., Березина Л.К., Ольшанская А.А., Амченкова А.М. и др. Иммуномодулирующая и противовирусная активность морапренилфосфатов (МПФ). *Медицинская иммунология.* 2011; 13(4-5): 522-30.
10. Наровлянский А.Н., Ожерелков С.В., Санин А.В., Козлов В.В., Саличев А.В., Есьман А.С. и др. Противовирусная активность и возможные механизмы действия морапренилфосфатов при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 типа. *Журнал микробиологии.* 2014; (5): 54-60.
11. Наровлянский А.Н., Иванова А.М., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В., Боровая Т.Г., Измestьева А.В. и др. Эффективность применения полипренилфосфатов в экспериментальной модели генитального герпеса. *Вопросы вирусологии.* 2015; 60(4): 9-13.
12. Ожерелков С.В., Зварцев Р.В., Саличев А.В., Суслев А.П., Кожевникова Т.Н., Наровлянский А.Н. Исследование динамики стимуляции мРНК миграции ингибирующего фактора при экспериментальной герпетической инфекции и на фоне введения полипренолсодержащего иммуномодулятора у мышей. *Цитокины и воспаление.* 2010; 9 (3): 49.
13. Наровлянский А.Н., Дерябин П.Г., Седов А.М., Санин А.В., Пронин А.В. Противовирусная активность полипренилфосфатов при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гепатита С in vitro. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2012; (5): 80-4.
14. Ожерелков С.В., Белоусова Р.В., Данилов Л.Л., Деева А.В., Мальцев С.Д., Наровлянский А.Н. и др. Препарат фоспренил подавляет размножение вирусов диареи и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в чувствительных культурах клеток. *Вопросы вирусологии.* 2001; (5): 43-5.
15. Кожевникова Т.Н., Викторова Е.Г., Козлов В.Г., Наровлянский А.Н., Санин А.В., Пронин А.В. и др. Морапренилфосфаты подавляют размножение вируса энцефаломиелита Тейлера и накопление вирусного белка VP3 в чувствительных культурах клеток ВНК-21 и P388D1. *Журнал микробиологии.* 2007; (3): 26-30.

16. Руднева С.Ю., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Степанова Т.Н., Санин А.В. Лечение папилломатоза ротовой полости у собаки с использованием фоспренила. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2016; (3): 9-11.
17. Кожевникова Т.Н., Ожерелков С.В., Измestьева А.В., Санина В.Ю., Наровлянский А.Н., Пронин А.В. и др. Влияние препаратов Гамапрен и Фоспренил, созданных на основе полипренолов растительного происхождения, на продукцию некоторых регуляторных цитокинов в норме и при экспериментальном клещевом энцефалите у мышей. *Российский иммунологический журнал.* 2008; 2(11): 250.
18. Ожерелков С.В., Тимофеев А.В., Новикова Г.П., Деева А.В., Наровлянский А.Н., Санин А.В. и др. Защитное действие нового противовирусного препарата фоспренил при экспериментальном клещевом энцефалите. *Вопросы вирусологии.* 2000; 45(1): 33-7.
19. Санин А.В., Суслев А.П., Третьяков О.Ю., Зварцев Р.В., Саличев А.В., Кожевникова Т.Н. и др. Разнонаправленное влияние МПФ и полипренилфосфата на течение экспериментальной флавивирусной инфекции у мышей. *Журнал микробиологии.* 2011; (5): 56-61.
20. Васильев А.Н., Ожерелков С.В., Козлов В.В., Пронин А.В., Санин А.В., Парфенова Т.М. и др. Противовирусная и иммуномодулирующая активность полипренилфосфатов при вирусных инфекциях. *Антибиотики и химиотерапия.* 2008; 53(3-4): 3-8.
21. Переслегина И.О., Виденина А.А., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В. Новое в лечении кошачьего инфекционного перитонита. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2013; (1): 6-10.
22. Фурман И.М., Васильев И.К., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В. Применение препаратов на основе растительных полипренолов при различных формах кошачьего инфекционного перитонита. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2010; (3): 42-3.
23. Карал-оглы Д.Д., Мезенцева М.В., Агрба В.З., Пронин А.В., Санин А.В., Наровлянский А.Н. Эффективность применения новых отечественных препаратов Фоспренил и Гамавит у обезьян, инфицированных цитомегаловирусом. В кн: *Интерферону – 50 лет; Сборник трудов.* Москва; 2007: 204-13.
24. Савойская С.Л., Клицунова Н.В., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В. Эффективность препарата Гамапрен при лечении аденовируса и парагриппа собак. *Ветеринарный доктор.* 2008; (11): 15-6.
25. Ожерелков С.В., Аржаев А.М., Кожевникова Т.Н., Наровлянский А.Н., Пронин А.В., Санин А.В. Адьювантное действие фоспренила на иммуногенность антирабической вакцины. *Ветеринарная клиника.* (8); 2004; 9-10.
26. Пронин А.В., Наровлянский А.Н., Дерябин П.Г., Деева А.В., Орлова Н.Г., Григорьева Е.А. и др. Противовирусное действие фоспренила при гриппозной инфекции. *Ветеринария и кормление.* 2005; (6): 25.
27. Пронин А.В., Наровлянский А.Н., Дерябин П.Г., Деева А.В., Орлова Н.Г., Григорьева Е.А. и др. Птицы, свиньи, грипп и фоспренил. *Зооиндустрия.* 2006; (3): 18-9.

REFERENCES

1. Regnum. News Agency. Chinese authorities reported two cases of infection with H7N9 virus. Available at: <https://regnum.ru/news/accidents/2232866.html>
2. Sanin A.V. The use of immunomodulators in viral diseases of small domestic animals. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye.* 2005; (1): 38-42. (in Russian)
3. L'vov D.K., Onishchenko G.G., Shchelkanov M.Yu., Aliper T.I., Nepoklonov E.A., Deryabin P.G., et al. Isolation of influenza virus A/H5N1 strains from poultry and wild birds during the epizootic in Western Siberia (July 2005) and their deposit in the State collection of viruses (August 8, 2005, 2011). *Voprosy virusologii.* 2006; (1): 11-4. (in Russian)
4. L'vov D.K., Podchernyaeva R.Ya., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Isaeva E.I., Danlybaeva G.A. Spectrum of vertebrate cell lines sensitive to highly pathogenic influenza A virus /duck/South Africa/61 (H5N3) and A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). *Voprosy virusologii.* 2007; 52(1): 45-7. (in Russian)
5. ZOOINFORM CITY. Pansooti bird flu in Europe continues. Available

- at: http://zooinform.ru/vete/news/panzootiya_ptichego_grippa_v_evrope_prodljaetsya
6. Medicine news from MEDIKFORUM.RU. Available at: http://www.medikforum.ru/news/medicine_news/55270
 7. Danilov L.L., Maltsev S.D., Deyeva A.V., Narovlyansky A.N., Sanin A.V., Ozherelkov S.V., et al. Phosprenyl: A novel drug with antiviral and immunomodulatory activity; Mini-review. *Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis*. 1997; 45(5-6): 395-400.
 8. Narovlyanskiy A.N., Berezina L.K., Vetkova L.G., Stepanova T.N., Savoyskaya S.L., Zubashev I.K., et al. Treatment of infection caused by herpesvirus by using drugs of polyprenols. *Veterinarnaya klinika*. 2005; (2): 17-21. (in Russian)
 9. Sanin A.V., Pronin A.V., Narovlyanskiy A.N., Stepanova T.N., Savoyskaya S.L., Zubashev I.K., et al. Effect of sodium polyprenylphosphate on viral rhinotracheitis in cats. *Veterinariya*. 2015; (11): 17-21. (in Russian)
 10. Izmet'eva A.V., Salichev A.V., Mezentseva M.V., Berezina L.K., Ol'shanskaya A.A., Amchenkova A.M., et al. Immunomodulating and antiviral activity of moraprenylphosphate (MPF). *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(4-5): 522-30. (in Russian)
 11. Narovlyanskiy A.N., Ozherelkov S.V., Sanin A.V., Kozlov V.V., Salichev A.V., Es'man A.S., et al. Antiviral activity and possible mechanisms of action of moraprenylphosphates in experimental infection caused by herpes simplex virus type 1. *Zhurnal mikrobiologii*. 2014; (5): 54-60. (in Russian)
 12. Narovlyanskiy A.N., Ivanova A.M., Shevlyagina N.V., Didenko L.V., Borovaya T.G., Izmet'eva A.V., et al. Efficacy of polyprenylphosphates on experimental model of genital herpes. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(4): 9-13. (in Russian)
 13. Ozherelkov S.V., Zvartsev R.V., Salichev A.V., Suslov A.P., Kozhevnikova T.N., Narovlyanskiy A.N. Study of the dynamics of migration inhibitory factor mRNA stimulation in experimental herpes infection and on the background of introduction of polyprenol - containing immune modulator in mice. *Tsitokiny i vospalenie*. 2010; 9 (3): 49. (in Russian)
 14. Narovlyanskiy A.N., Deryabin P.G., Sedov A.M., Sanin A.V., Pronin A.V. Polyprenylphosphates antiviral activity in experimental infections caused by hepatitis c virus in vitro. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2012; (5): 80-4. (in Russian)
 15. Ozherelkov S.V., Belousova R.V., Danilov L.L., Deeva A.V., Mal'tsev S.D., Narovlyanskiy A.N., et al. In sensitive cell cultures Phosprenyl suppresses reproduction of viruses causing diarrhoea and infectious rhinotracheitis in cattle. *Voprosy virusologii*. 2001; (5): 43-5. (in Russian)
 16. Kozhevnikova T.N., Viktorova E.G., Kozlov V.G., Narovlyanskiy A.N., Sanin A.V., Pronin A.V., et al. Moraprenylphosphates suppress reproduction of Tayler encephalomyelitis virus and accumulation of protein VP3 in sensitive cell cultures BHK-21 and P388D1. *Zhurnal mikrobiologii*. 2007; (3): 26-30. (in Russian)
 17. Rudneva S.Yu., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Stepanova T.N., Sanin A.V. Treatment of oral papillomatosis in dogs using phosprenyl. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye*. 2016; (3): 9-11. (in Russian)
 18. Kozhevnikova T.N., Ozherelkov S.V., Izmet'eva A.V., Sanina V.Yu., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., et al. Influence of drugs Gamapren and Phosprenyl developed on the basis of plant polyprenols upon production of some regulatory cytokines in mice with experimental tick-borne encephalitis. *Rossiyskiy immunologicheskyy zhurnal*. 2008; 2(11): 250. (in Russian)
 19. Ozherelkov S.V., Timofeev A.V., Novikova G.P., Deeva A.V., Narovlyanskiy A.N., Sanin A.V., et al. Protective effect of a new antiviral drug phosprenyl in experimental tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*. 2000; 45(1): 33-7. (in Russian)
 20. Sanin A.V., Suslov A.P., Tret'yakov O.Yu., Zvartsev R.V., Salichev A.V., Kozhevnikova T.N., et al. Multidirectional influence of polyprenylphosphate on MIF and experimental flavivirus infection in mice. *Zhurnal mikrobiologii*. 2011; (5): 56-61. (in Russian)
 21. Vasil'ev A.N., Ozherelkov S.V., Kozlov V.V., Pronin A.V., Sanin A.V., Parfenova T.M., et al. Antiviral and immune modulating activities of polyprenylphosphate in viral infections. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2008; 53(3-4): 3-8. (in Russian)
 22. Pereslegina I.O., Videnina A.A., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. New approach to the treatment of feline infectious peritonitis. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye*. 2013; (1): 6-10. (in Russian)
 23. Furman I.M., Vasil'ev I.K., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. The use of drugs on the basis of plant polyprenols in various forms of feline infectious peritonitis. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye*. 2010; (3): 42-3. (in Russian)
 24. Karal-ogly D.D., Mezentseva M.V., Agrba V.Z., Pronin A.V., Sanin A.V., Narovlyanskiy A.N. Efficacy of new domestic drugs phosprenyl and gamavit in monkeys infected with Cytomegalovirus. In: *Interferonu – 50 let; Sbornik trudov [Interferonu – 50 let; Sbornik trudov]*. Moscow; 2007: 204-13. (in Russian)
 25. Savoyskaya S.L., Klitsunova N.V., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Efficacy of Gamapren in the treatment of adenovirus and canine parainfluenza. *Veterinarnyy doktor*. 2008; (11): 15-6. (in Russian)
 26. Ozherelkov S.V., Arzhaev A.M., Kozhevnikova T.N., Narovlyanskiy A.N., Pronin A.V., Sanin A.V. Adjuvant effect of phosprenyl on the immunogenicity of rabies vaccine. *Veterinarnaya klinika*. (8); 2004; 9-10. (in Russian)
 27. Pronin A.V., Narovlyanskiy A.N., Deryabin P.G., Deeva A.V., Orlova N.G., Grigor'eva E.A., et al. Phosprenyl antiviral effect at influenza infection. *Veterinariya i kormlenie*. 2005; (6): 25. (in Russian)
 28. Pronin A.V., Narovlyanskiy A.N., Deryabin P.G., Deeva A.V., Orlova N.G., Grigor'eva E.A., et al. Poultry, swine, flu and phosprenyl. *Zoindustriya*. 2006; (3): 18-9. (in Russian)

Поступила 15.02.17

Принята в печать 28.02.17

Манапова Э.Р.¹, Фазылов В.Х.¹, Гурьянова С.В.^{2,3}

ЦИТОПЕНИИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА С У ПАЦИЕНТОВ С ГЕНОТИПОМ 1

¹ ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань;

² ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997, г. Москва;

³ АО «Пептек», 117997, г. Москва

Среди основных причин неэффективности противовирусной терапии (ПВТ) хронического гепатита С (ХГС), препятствующей проведению адекватного и полного курса лечения ИФН- α и рибавирином, — развитие нейтропении (НП) и тромбоцитопении (ТП). В настоящее исследование были включены 63 пациента (59% мужчин и 41% женщин) с ХГС, ранее не получавших ПВТ, все с генотипом 1 вируса гепатита С (ВГС-1), из них с генотипом 1a — 15 пациентов, с 1b — 42, с генотипами 1a + 1b — 6. Возраст пациентов составил $33,8 \pm 0,7$ года, срок инфицирования — $6,1 \pm 0,8$ года, индекс массы тела (ИМТ) — $22,4 \pm 1,02$. Показано, что при назначении Пег-ИФН- α в комбинации с рибавирином достоверное снижение числа лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов преобладало у пациентов с ВГС-моноинфекцией генотипа 1b в стадиях F0 - F2 (2,8—8,6 кПа) по шкале METAVIR. При развитии среднетяжелой ранней (до 12-й недели ПВТ) и для профилактики поздней (после 12-й недели лечения) НП назначение иммуностропного препарата глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) в дозе 1 мг 2 раза в день в течение 20 дней у пациентов с ХГС (генотип 1b) с фиброзом менее F3 достоверно стимулировало лейкопоз, повышало число нейтрофилов и тромбоцитов, что позволяло не снижать дозы ИФН и повысить эффективность ПВТ. Таким образом, впервые представлены достоверные доказательства эффективности ГМДП в коррекции НП и ТП у больных ХГС (генотип 1b), что свидетельствует о целесообразности включения этого препарата в состав ПВТ.

Ключевые слова: хронический гепатит С; генотип 1; мурамилпептид; ликопид; глюкозаминилмурамилдипептид; пегилированный интерферон альфа; рибавирин.

Для цитирования: Манапова Э.Р., Фазылов В.Х., Гурьянова С.В. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 174-178.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-174-178>

Manapova E.R.¹, Fazyllov V.Ch.¹, Guryanova S.V.^{2,3}

CYTOPENIAS AND THEIR CORRECTION DURING ANTIVIRAL THERAPY OF CHRONIC HEPATITIS C IN PATIENTS WITH GENOTYPE 1

¹ Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation;

² Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, 117997, Russian Federation;

³ JSC Peptek, Moscow, 117997, Russian Federation

The main reason for the ineffectiveness of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C that impedes full and adequate treatment of IFN- α and ribavirin is the development of neutropenia and thrombocytopenia. The present study included 63 patients (59% men and 41% women) with chronic hepatitis C that did not previously receive antiviral therapy. All patients had HCV genotype-1 (15 patients with genotype 1a; 42 people, with genotype 1b; 6 patients, with genotypes (1a + 1b)). The patients' age was 33.8 ± 0.7 years, with term of infection 6.1 ± 0.8 years. It was shown that in the case of treatment with Peg-IFN-alpha in combination with ribavirin, a significant decrease in the number of white blood cells, neutrophils and platelets prevailed in patients with HCV-monoinfected genotype 1b in the F0-F2 stages (2,8-8,6 kPa) at METAVIR. With the development of moderate "early" (less than 12 weeks of antiviral therapy) and for the prevention of "late" (more than 12 weeks of treatment) neutropenia, appointment of immune medicine likopid (glucosaminylmuramyl dipeptide) at a dosage of 1 mg, 2 times a day for 20 days, in patients with chronic hepatitis C (genotype 1b) with <F3 fibrosis significantly stimulates leucopoiesis and increases the number of neutrophils and platelets, which makes it possible to avoid reduction of the dose of interferon and to increase the efficiency of the antiviral therapy. Thus, for the first time experimental evidence is presented for the effectiveness of medicinal likopid correction of neutropenia and thrombocytopenia in patients with chronic hepatitis C (genotype 1), which indicates the feasibility of introducing likopid into the antiviral therapy.

Key words: chronic hepatitis C; genotype 1; muramyl peptide; likopid; glucosaminylmuramyl dipeptide; pegylated interferon alpha; ribavirin.

For citation: Manapova E.R., Fazyllov V.Ch., Guryanova S.V. Cytopenias and their correction during antiviral therapy of chronic hepatitis C in patients with genotype 1. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 174-178. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-174-178>

For correspondence. Elvira R. Manapova, MD, Department of infectious diseases, Kazan State Medical University, Kazan, 420012, Russian Federation. E-mail: elveram@yandex.ru

Information about authors:

Manapova E.R., <http://orcid.org/0000-0003-4300-4602>

Fazyllov V.Ch., <http://orcid.org/0000-0003-4333-6316>

Guryanova S.V., <http://orcid.org/0000-0001-6186-2462>

Для корреспонденции: Манапова Эльвира Равиловна, д-р мед. наук, кафедра инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012, г. Казань. E-mail: elveram@yandex.ru

Acknowledgments. Independent research presented in this work received no basic funding.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 20 December 2016
Accepted 28 February 2017

Согласно последним европейским рекомендациям [1], все наивные и пролеченные пациенты с компенсированным и декомпенсированным заболеванием печени, вызванным вирусом гепатита С (ВГС), без противопоказаний должны рассматриваться как кандидаты на терапию. Несмотря на внедрение в международную практику безинтерфероновых схем лечения хронического гепатита С (ХГС) с их назначением на непродолжительный срок, меньшим количеством нежелательных явлений (НЯ) и высоким показателем достижения стойкого вирусологического ответа (СВО), их доступность на современном этапе для пациентов в России ограничена из-за высокой стоимости. В настоящее время в практической медицине комбинация пегилированного интерферона альфа (Пег-ИФН- α) и рибавирина по-прежнему широко используется [2—5], хотя и не является международным стандартом лечения. Усилия по сокращению заболеваемости и смертности от ХГС были исторически ограничены низким уровнем СВО при генотипе 1 у лиц, получавших Пег-ИФН- α и рибавирин [6]. Причиной неэффективности противовирусной терапии (ПВТ) ХГС, препятствующей проведению адекватного и полного курса лечения ИФН- α и рибавирином, также является развитие гематологических НЯ: при достижении определенной степени выраженности они могут снижать качество жизни, приверженность к ПВТ, что повышает вероятность снижения доз препаратов, перерывов и отмены лечения, а это крайне нежелательно, особенно если речь идет о генотипе 1 вируса, и как следствие приводит к низкой частоте достижения СВО [7, 8]. При этом именно с применением ИФН- α прежде всего связано развитие нейтропении (НП) и тромбоцитопении (ТП) во время проведения ПВТ [9]. НП послужила поводом для модификации доз у 18—21% больных при применении Пег-ИФН- α и рибавирина согласно критериям, рекомендованным к широкому клиническому применению [10, 11]. Данные исследований показали, что в период комбинированного лечения Пег-ИФН- α и рибавирином содержание тромбоцитов уменьшалось приблизительно у 20—30% пациентов; ТП с уровнем менее 50 000 кл/мкл встречалась в 5% случаев при терапии Пег-ИФН- α и рибавирином [12, 13]. Таким образом, поиск рациональных фармакологических методов коррекции НП и ТП как перед началом, так и в процессе ПВТ остается актуальным.

Глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) — препарат Ликопид® («ПЕПТЕК», Россия, регистрационный номер ЛС-001438) — представляет собой полусинтетический аналог мурамилпептидов с дополнительным сахарным остатком (N-ацетилглюкозамин) и обладает выраженной иммуномодулирующей [14—16] и гемопозитивной активностью [17], обусловленной его способностью индуцировать секрецию макрофагами гемостимулирующих цитокинов, в частности колониестимулирующих факторов и интерлейкина-1 (ИЛ-1). В условиях экспериментальной цитопении применение ГМДП положительно влияет на состояние кроветворения у мышей и позволяет получать статистически значимо более высокие показатели лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов [18].

Клинических работ, посвященных исследованию влияния ГМДП на показатель тромбоцитов, до настоящего времени не проводилось.

Цель исследования — оценить значение развития цитопений (лейкопении, НП, ТП) как НЯ при ПВТ Пег-ИФН- α -2а и рибавирином у пациентов с ВГС-инфекцией (генотип 1) и корректирующую эффективность ГМДП.

Материал и методы

В исследование были включены 63 пациента (59% мужчин и 41% женщин) с ХГС, ранее не получавших ПВТ, все с генотипом ВГС-1, из них с генотипом 1а — 15 пациентов, с 1b — 42, с генотипами 1а + 1b — 6. Возраст пациентов составил $33,8 \pm 0,7$ года, срок инфицирования — $6,1 \pm 0,8$ года, индекс массы тела (ИМТ) — $22,4 \pm 1,02$. Исходные показатели определялись высокой вирусной нагрузкой РНК ВГС (более 400 000 МЕ/мл) у 39 (62%) пациентов; уровнем аланинаминотрансферазы (АЛТ) $76,82 \pm 7,84$ ед/л, у мужчин $66,1 \pm 7,37$ ед/л и $45 \pm 4,26$ ед/л у женщин. Пациенты находились в стадиях F0—F2 (диапазон 2,8—8,6 кПа) по шкале METAVIR.

Основные критерии исключения из исследования: выраженная сопутствующая патология (сердечно-сосудистая, эндокринной системы, почек, легких и т. д.), аутоиммунные и другие хронические декомпенсированные системные заболевания, микст-гепатиты, цирроз печени, а также фиброз более F3 (по результатам фиброзластометрии или пункционной биопсии), алкоголизм или прием спиртных напитков, психоактивных веществ, НП < 1500 кл/мкл, ТП < 90 тыс. кл/мкл, низкая концентрация гемоглобина (для женщин менее 120 г/л, для мужчин менее 130 г/л).

Все пациенты получали Пег-ИФН- α -2а (180 мкг/нед) и рибавирин с учетом массы тела (800—1200 мг/сут). Исследование проводилось на базах консультативного гепатологического центра Республиканской инфекционной клинической больницы, Республиканского центра по профилактике и борьбе с ВИЧ/СПИДом г. Казани. Клинико-лабораторный мониторинг проводился до лечения, на 4, 24 и 48-й неделе терапии, а также через 24 нед после окончания лечения. ГМДП назначали в таблетках по 1 мг 2 раза в день сублингвально в течение 20 дней под контролем общего анализа крови (ОАК) с лейкоформулой 1 раз в неделю.

Математическую обработку статистических данных проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007. Использовали параметрические методы оценки результатов: вычисление средней арифметической (M) и ее средней ошибки (m). Различия между сопоставляемыми группами по избранным критериям оценивали по t -критерию Стьюдента. Достоверность изменений признавали при вероятности ошибки $p \leq 0,05$. Качественные величины описывали по частоте встречаемости (в %).

Результаты

В результате исследования СВО получен у 51 (81%) пациента, отсутствие ответа на ПВТ зафиксировано у 8 (13%), рецидив заболевания — у 4 (6%) пациентов.

Таблица 1

Показатели лейкоцитов у пациентов с ХГС до, в течение и через 24 нед после ПВТ Пег-ИФН-α-2а и рибавирином

Показатель	До лечения	4 нед лечения	24 нед лечения	48 нед лечения	24 нед наблюдения
Общее количество лейкоцитов, ×10 ⁹ /л	6,0 ± 0,19	3,0 ± 0,12***	3,0 ± 0,16***	3,0 ± 0,18***	5,94 ± 0,28
Количество лейкоцитов в зависимости от генотипа ВГС, ×10 ⁹ /л:					
1a	5,9 ± 0,27	3,6 ± 0,52*	3,15 ± 0,75*	3,0 ± 0,97*	5,8 ± 0,12
1b	5,8 ± 0,24	3,2 ± 0,16*	2,84 ± 0,18*	3,0 ± 0,21*	6,0 ± 0,9
1a + 1b	5,6 ± 0,29	3,3 ± 0,94*	2,44 ± 0,52*	3,0 ± 0,59*	5,7 ± 0,8

Примечание. * — $p < 0,001$ — показатели сравнительной достоверности по отношению к исходным данным до лечения.

Таблица 2

Показатели тромбоцитов у пациентов с ХГС до, в течение и через 24 нед после ПВТ Пег-ИФН-α-2а и рибавирином

Показатель	До лечения	4 нед лечения	24 нед лечения	48 нед лечения	24 нед наблюдения
Общее количество тромбоцитов, ×10 ⁹ /л	246,0 ± 8,2	181,1 ± 8,8**	171,5 ± 8,0**	159,0 ± 9,96**	234,0 ± 8,1
Количество тромбоцитов в зависимости от генотипа ВГС, ×10 ⁹ /л					
1a	249,5 ± 15,77	188,6 ± 11,7**	187,2 ± 15,20**	168,5 ± 15,99**	246,6 ± 12,12
1b	235,4 ± 12,71	164,9 ± 10,17**	146,0 ± 11,71**	151,1 ± 11,65**	246,0 ± 7,9*
1a + 1b	248,25 ± 8,50	214,0 ± 11,3**	158,0 ± 12,76**	174,6 ± 13,81**	247,67 ± 13,8

Примечание. * — $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ — показатели сравнительной достоверности по отношению к исходным данным до лечения.

Антинуклеарные аутоантитела в крови пациентов ($n = 63$) не обнаружены: уровни антимикросомальных ($n = 60$) и антимитохондриальных аутоантител ($n = 60$) не превышали значений у здоровых лиц — соответственно $3,78 \pm 1,4$ ед/л ($10,3 \pm 2,1$) и $5,69 \pm 1,02$ МЕ/мл ($8,2 \pm 1,2$) без статистических различий в показателях подтипов генотипа 1 ВГС.

У пациентов до начала лечения среднее количество лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов в периферической крови не отличалось ($p > 0,05$) от уровня у здоровых лиц (табл. 1, 2). Число лейкоцитов на 4, 24 и 48-й неделе снижалось на 50% ($p < 0,001$) по сравнению с данными до начала ПВТ. На фоне ПВТ лейкопения наблюдалась с ранних сроков (4 нед), показатели сохранялись достоверно ($p < 0,001$) сниженными в течение всего лечения с нормализацией к 6 мес ($p < 0,001$) после его окончания. При генотипах 1b и 1a + 1b по сравнению с данными при 1a уровни лейкоцитов были достоверно ($p < 0,01$) ниже на 24-й неделе ПВТ.

В нашем исследовании в процессе ПВТ легкая степень ($1-1,3 \cdot 10^3$ /мкл) НП определялась у 27% пациентов, средняя ($0,75-0,99 \cdot 10^3$ /мкл) и тяжелая ($0,5-0,75 \cdot 10^3$ /мкл) — у 35%, крайне тяжелая (менее $0,5 \cdot 10^3$ /мкл) — у 4,5% пациентов.

У пациентов, получавших Пег-ИФН-α-2а и рибави-

рин, исходные показатели тромбоцитов ($246 \pm 8,2 \cdot 10^9$ /л), которые достоверно не отличались от уровня у здоровых лиц ($245 \pm 7,7 \cdot 10^9$ /л), снижались с 4-й недели ПВТ и сохранялись достоверно низкими ($p < 0,001$) в течение всего лечения с нормализацией к 6 мес после его окончания. Во все сроки ПВТ наблюдалось достоверное ($p < 0,001$) снижение количества тромбоцитов от 26 до 35% по сравнению с данными до начала лечения.

При генотипе 1b ($p < 0,01$) и по сравнению со значениями других генотипов уровни тромбоцитов были достоверно ($p < 0,01$) ниже исходно и на протяжении комбинированного лечения (рис. 1).

В нашем исследовании основным критерием использования препарата Ликопид была среднетяжелая степень НП. ГМДП назначали в таблетках по 1 мг 2 раза в день сублингвально в течение 20 дней под контролем ОАК с лейкоформулой 1 раз в неделю. Следует отметить, что все пациенты, у которых было отмечена среднетяжелая степень НП, имели генотип 1b ВГС. Во время и после курса лечения НЯ, непереносимости и гипертермических реакций не наблюдалось. У пациентов с ХГС, находившихся на ПВТ после курса ГМДП (табл. 3), наблюдалось увеличение уровня лейкоцитов и повышение ($p < 0,001$) количества нейтрофилов.

У пациентов, получавших ГМДП для коррекции

Таблица 3

Динамика показателей периферической крови у пациентов с ХГС (генотип 1b) при ПВТ, до и после курса лечения ГМДП

Показатель, 10 ³ /мкл	Здоровые лица ($n = 52$)	Пациенты с ХГС на фоне ПВТ		p между группами
		до назначения ГМДП ($n = 22$)	после курса ГМДП ($n = 22$)	
	1	2	3	
Лейкоциты	5,55 ± 0,28	2,01 ± 0,23 *	2,37 ± 0,34 *	—
Нейтрофилы	3,21 ± 0,087	0,70 ± 0,08 *	1,74 ± 0,06 *	2—3 — $p < 0,001$

Примечание. * — $p < 0,001$ в сравнении с уровнем у здоровых лиц.

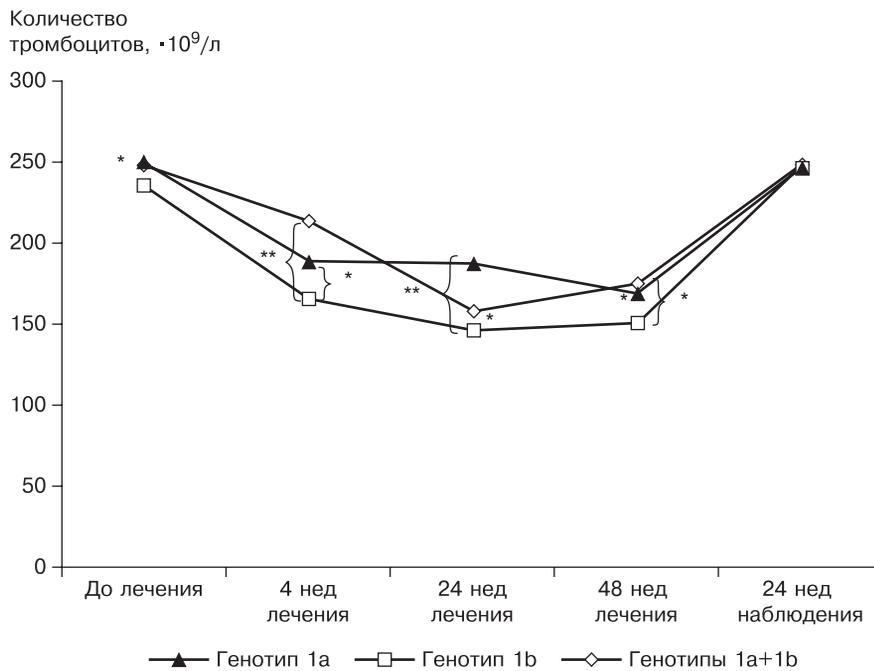


Рис. 1. Динамика показателей тромбоцитов у пациентов с ХГС до, в течение и через 24 нед после ПВТ Пег-ИФН- α -2а и рибавирином в зависимости от генотипа ВГС.

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ — при сравнении показателей тромбоцитов со значениями генотипов ВГС на фоне лечения и наблюдения.

НП, показатели тромбоцитов были достоверно ($p < 0,01$) выше количества тромбоцитов у пациентов, не получавших ГМДП (рис. 2).

Обсуждение

Успех лечения во многом определяется достижением быстрого вирусологического ответа (БВО) или снижением уровня РНК ВГС в крови в первые месяцы терапии.

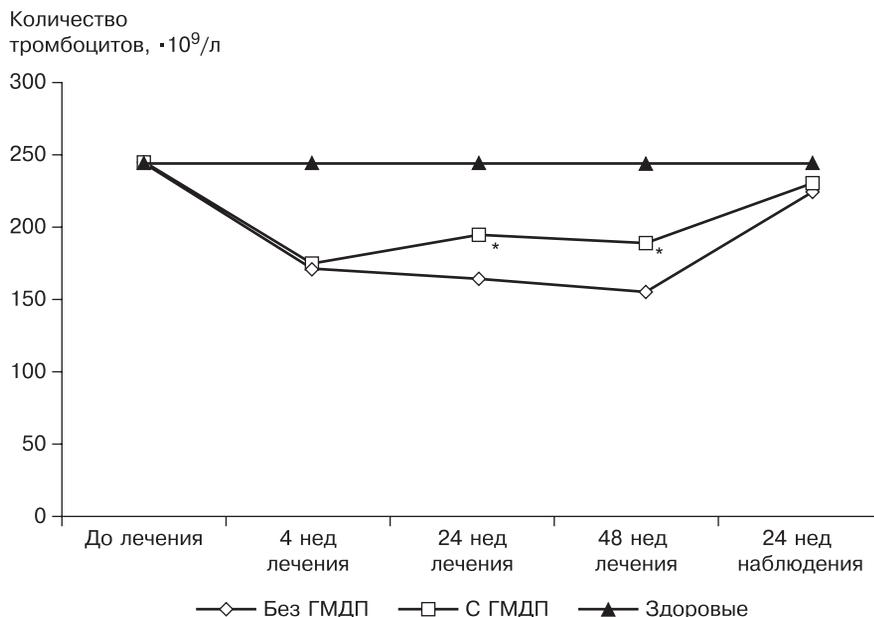


Рис. 2. Динамика уровня тромбоцитов под действием ликопида у пациентов с ХГС (генотип 1b), проходящих ПВТ (Пег-ИФН- α и рибавирин).

* — $p < 0,001$ — при сравнении групп пациентов, получавших и не получавших ГМДП.

Этому способствуют адекватно назначенные дозы и кратность приема препаратов для поддержания супрессии вирусной репликации, но возникающие в ранние сроки цитопении препятствуют сохранению запланированного режима. С целью коррекции НП пациентам в начале лечения (1—4-й месяцы ПВТ) назначали ГМДП, так как именно в ранние сроки наблюдалось развитие НП. ГМДП производится путем химического синтеза, что обуславливает его низкую стоимость в сравнении с препаратами цитокинового ряда. ГМДП имеет более длительный период полувыведения и позволяет таким образом уменьшать кратность приема, характеризуется низкой токсичностью, отсутствием выраженных НЯ при энтеральном пути введения (per os или сублингвально). Известен факт стимуляции активности моноцитов/макрофагов, в результате чего ГМДП воздействовал на все три основных звена иммунитета: фагоцитоз, клеточный и гуморальный иммунитет.

В патогенезе ТП выделяют 2 основных механизма: повышенное разрушение тромбоцитов и нарушение их образования. Повышенное разрушение тромбоцитов связано с синдромом гиперспленизма и аутоиммунными расстройствами. Нарушение образования тромбоцитов ассоциируется с подавлением костномозгового кроветворения, а также со снижением активности уровня тромбопоэтина. Подавление костномозгового кроветворения является одной из частых причин ТП при вирусных заболеваниях печени вследствие прямого действия вирусов или в результате противовирусного лечения [19]. По нашему мнению, положительное влияние ГМДП на число тромбоцитов обусловлено его гемопоэтической активностью: в работе И.Е. Андрияновой и соавт. [18] у животных в условиях экспериментальной цитопении также наблюдалось статистически значимо более высокое количество тромбоцитов уже после первого введения ГМДП в контрольной группе.

Таким образом, при назначении Пег-ИФН- α в комбинации с рибавирином достоверное снижение числа лейкоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов преобладает у пациентов с ВГС-моноинфекцией генотипа 1b в стадиях F0—F2 (2,8—8,6 кПа) по шкале METAVIR. При развитии среднетяжелой ранней (до 12-й недели ПВТ) и для профилактики поздней (после 12-й недели лечения) НП назначение ГМДП пациентам с ХГС (генотип 1b) с фиброзом менее F3 стимулирует лейкопоз, достоверно повышает число нейтрофилов и тромбоцитов, что позволяет не снижать дозы ИФН и повысить эффективность ПВТ.

Финансирование. Данное исследование являлось инициативным и было лишено базовой экономической поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—3, 6, 8, 10—13, 19
см. REFERENCES)

4. Еналеева Д.Ш., Фазылов В.Х., Созинов А.С. Хронические вирусные гепатиты В, С и D: руководство для врачей. М.: МЕДпресс-информ; 2011.
5. Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., Кареткина С.Л., Максимов И.В., Маев И.В. Вирусные гепатиты. Клиника, диагностика, лечение. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2014.
7. Бурневич Э.З. Коррекция и профилактика гематологических нежелательных явлений при противовирусной терапии хронического гепатита С. *Гепатологический форум*. 2006; (2): 15-22.
9. Шифф Ю.Р., Соррел М.Ф., Мэддрей У.С. *Вирусные гепатиты и холестатические заболевания*. Пер. с англ. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
14. Иванов В.Т., Хаитов Р.М., Андропова Т.М., Пинегин Б.В. Липид (глюкозаминилмурамилдипептид) - новый отечественный высокоэффективный иммуномодулятор для лечения и профилактики заболеваний, связанных со вторичной иммунологической недостаточностью. *Иммунология*. 1996; (2): 4-6.
15. Мещерякова Е.А., Гурьянова С.В., Макаров Е.А., Андропова Т.М., Иванов В.Т. Структурно-функциональное исследование глюкозаминилмурамоилпептидов. Влияние химической модификации N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамоилдипептида на его иммуномодулирующие свойства *in vivo* и *in vitro*. *Биоорганическая химия*. 1991; 17(9): 1157-65.
16. Попова Л.Л. *Клинико-патогенетическое обоснование стратегии и тактики иммунотерапии при хроническом вирусном гепатите С*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. Санкт-Петербург; 2009.
17. Фазылов В.Х., Манапова Э.Р., Мангушева Я.Р., Ткачева С.В. Коррекция нейтропении и нарушений функциональной активности нейтрофилов при проведении противовирусной терапии хронического гепатита С. *Инфекционные болезни*. 2012; 10(1): 80-3.
18. Андриянова И.Е., Филимонова Г.И., Андропова Т.М. Влияние иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида на кровяное содержание мышей с экспериментальной цитопенией. *Радиобиология*. 1992; 32(4): 566-70.
1. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. *Hepatology*. 2015; 62(3): 932-54.
2. Wang X., Gao F., Yuan G., Shi K., Huang Y., Chen Y., et al. Ten-year follow-up analysis of chronic hepatitis C patients after getting sustained virological response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy. *J. Viral. Hepat.* 2016; 23(12): 971-6.
3. Pafundi P.C., Parrella A., Iossa D., Molaro R., Battimelli C., Falco E., et al. Viability of pegIFN α -RBV for CHC in the direct acting antiviral era: a practical algorithm between efficacy and cost containment. *J. Chemother.* 2016; (8): 1-8.
4. Enaleeva D.Sh., Fazylov V.Kh., Sozinov A.S. *Chronic Viral Hepatitis B, C and D: a Guide for Physicians [Khronicheskie virusnye gepatity B, C i D: rukovodstvo dlya vrachev]*. Moscow: MEDpress-Inform; 2011. (in Russian)
5. Yushchuk N.D., Klimova E.A., Znoyko O.O., Karetkina S.L., Maksimov I.V., Maev I.V. *Viral Hepatitis. Clinic, Diagnostics, Treatment [Virusnye gepatity. Klinika, diagnostika, lechenie]*. Moscow: GEOTAR-MED; 2014. (in Russian).
6. McHutchison J.G., Everson G.T., Gordon S.C., Jacobson I.M., Sulkowski M., Kauffman R., et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(18): 1827-38.
7. Burnevich E.Z. Correction and prevention of hematological adverse events during antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Gepatologicheskii forum*. 2006; (2): 15-22. (in Russian)
8. Sulkowski MS. Management of the hematologic complications of hepatitis C therapy. *Clin. Liver. Dis.* 2005; 9(4): 601-16.
9. Schiff E.R., Sorrell M.F., Maddrey W.C. *Schiff's Diseases of the Liver*. Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
10. Hadziyannis S.J., Koskinas J.S. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. *Hepatology Res.* 2004; 29(3): 129-35.
11. Pockros P.J., Carithers R., Desmond P., Dhumeaux D., Fried M.W., Marcellin P., et al. Efficacy and safety of two-dose regimens of peginterferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in chronic hepatitis C: a multicenter, randomized controlled trial. *Am. J. Gastroenterol.* 2004; 99(7): 1298-305.
12. Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Gonçales F.L., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347(13): 975-82.
13. Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., Rustgi V.K., Shiffman M., Reindollar R., et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001; 358(9286): 958-65.
14. Ivanov V.T., Khaitov R.M., Andronova T.M., Pinegin B.V. Lipid (glucosaminylmuramyl dipeptide) - a new domestic highly effective immunomodulator for the treatment and prevention of diseases associated with secondary immune deficiency. *Immunologiya*. 1996; (2): 4-6. (in Russian)
15. Meshcheryakova E.A., Gur'yanova S.V., Makarov E.A., Andronova T.M., Ivanov V.T. Structure- function investigation of glucosaminylmuramylpeptides. Influence of chemical modification of the N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) on its immunomodulatory properties *in vivo* and *in vitro*. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1991; 17(9): 1157-65. (in Russian)
16. Popova L.L. *Clinical-pathogenetic substantiation of the strategy and tactics of immunotherapy for chronic viral hepatitis C*: Diss. St. Petersburg; 2009. (in Russian)
17. Fazylov V.Kh., Manapova E.R., Mangusheva Ya.R., Tkacheva S.V. Correction of neutropenia and disorders of neutrophil functional activity during antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Infektsionnye bolezni*. 2012; 10(1): 80-3. (in Russian)
18. Andriyanova I.E., Filimonova G.I., Andronova T.M. Effect of immunomodulator glyukozaminilmuramildipeptida on the blood of mice with experimental cytopenia. *Radiobiologiya*. 1992; 32(4): 566-70. (in Russian)
19. Weksler B.B. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007; 26(Suppl. 1): 13-9.

Поступила 20.12.16

Принята в печать 28.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 615.371:578.891.074

Коноплева М.В.¹, Борисова В.Н.², Соколова М.В.¹, Фельдшерова А.А.¹, Крымский М.А.²,
Семенов Т.А.¹, Сулов А.П.¹

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНЫХ И НАТИВНЫХ HBs-АНТИГЕНОВ С МУТАЦИЕЙ G145R И ОЦЕНКА ИХ ИММУНОГЕННОСТИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;
²ЗАО НПК «Комбиотех», 117997, г. Москва

Введение. Одной из важных причин распространения вируса гепатита В (ВГВ) в условиях вакцинального прессинга является возникновение мутаций ускользания (эскейп-мутаций). К наиболее выраженным изменениям серологических свойств ВГВ приводит широко распространенная мутация G145R в S-гене. В результате HBsAg модифицируется столь значительно, что практически не распознается большинством анти-HBs. По иммуногенным свойствам мутант G145R также отличается от HBsAg дикого типа. В настоящее время признана актуальность совершенствования вакцины против гепатита В с учетом мутантных вариантов вируса.

Цель работы — сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природных и рекомбинантных мутантов G145R и оценка перспективы создания антигенного компонента вакцины против гепатита В с мутацией G145R в HBsAg.

Методы. Антигенные свойства рекомбинантных HBsAg с мутацией G145R сравнивали между собой и с нативными мутантами методом серологического портретирования. Отобранным рекомбинантным антигеном иммунизировали мышей BALB/c и овец по различным схемам. В сыворотке крови иммунизированных животных определяли титры антител, специфичных к HBsAg дикого или мутантного G145R типа.

Результаты. Обнаружено, что не все рекомбинантные варианты HBsAg с заменой G145R обладают теми же антигенными свойствами, как нативный HBsAg с аналогичной мутацией. Отобранный по принципу антигенного сходства рекомбинантный HBsAg обладал иммуногенностью у мышей и овец, вызывая образование антител, реагирующих с нативным HBsAg дикого и мутантного типа. Показано, что мутантный антиген менее иммуногенен, требует больших доз и времени для развития иммунного ответа, однако он способен вызывать образование антител на уровне, сопоставимом с таковым для антигена дикого типа.

Заключение. Предварительная селекция рекомбинантных HBsAg, содержащих мутацию G145R, по антигенным и иммуногенным свойствам близких нативному аналогу, дает основу для создания специфического компонента вакцины против гепатита В с эскейп-мутацией G145R в HBsAg.

Ключевые слова: мутация; S-ген; G145R; вирус гепатита В; рекомбинантный и нативный HBsAg; иммунизация.

Для цитирования: Коноплева М.В., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семенов Т.А., Сулов А.П. Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 179-186.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>

Konopleva M.V.¹, Borisova V.N.², Sokolova M.V.¹, Feldsherova A.A.¹, Krymskij M.A.², Semenenko T.A.¹,
Suslov A.P.¹

A COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF ANTIGENIC PROPERTIES OF RECOMBINANT AND NATIVE HBs-ANTIGENS WITH G145R MUTATION AND EVALUATION OF THEIR IMMUNOGENICITY

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

²ZAO NPK Combiotech, Moscow, 117997, Russian Federation

Background: One of the important reasons for spreading of hepatitis B virus (HBV) under conditions of vaccine pressure is emergence of escape mutations. Prevalent G145R mutation in S-gene leads to the most expressed changes of serological properties of HBV. Consequently, HBsAg is modified so thoroughly that it cannot be recognized by the majority of anti-HBs. Mutant G145R also differs from a wild type HBsAg by its immunogenic properties. At present, the relevance of enhancement of hepatitis B vaccine in view of mutant virus variants has been recognized.

Objectives: a comparative study of antigenic and immunogenic properties of native and recombinant G145R mutants and an estimation of possibility for developing antigenic component of hepatitis B vaccine with G145R mutation in HBsAg.

Methods: antigenic properties of recombinant HBsAg with G145R mutation were compared with each other and with native mutants by serological fingerprinting method. Then, BALB/c mice and sheep were immunized with selected recombinant antigen under different protocols. Titers of antibodies specific to wild type or mutant G145R type of HBsAg in sera of immunized animals were measured.

Results: it was found that not all the recombinant HBsAg variants with G145R substitution have the same antigenic properties as native HBsAg with similar mutation. Recombinant HBsAg selected according to the principle of

Для корреспонденции: Коноплева Мария Вениаминовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва.
E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

antigenic similarity possesses immunogenicity in mice and sheep causing the production of antibodies reacting with native wild and mutant type HBsAg. It was shown that mutant antigen is less immunogenic, requires larger doses and more time for the development of immune response; however, it is capable of causing an antibody level comparable with wild type antigen.

Conclusion: preliminary selection of recombinant HBsAg containing G145R mutation with antigenic and immunogenic properties similar to the native analogue creates the basis for development of a specific component of hepatitis B vaccine with escape mutation G145R in HBsAg.

Key words: *mutation; S-gene; G145R; S143L; HBV; recombinant and native HBsAg; immunization.*

For citation: Konopleva M.V., Borisova V.N., Sokolova M.V., Feldsherova A.A., Krymskij M.A., Semenenko T.A., Suslov A.P. A comparative characteristic of antigenic properties of recombinant and native HBs-antigens with G145R mutation and evaluation of their immunogenicity. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 179-186. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>

For correspondence: Maria V. Konopleva, Cand. Biol. Sci., senior researcher, Laboratory of immunity mediators and effectors, Department of immunology, Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

Information about authors:

Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>

Borisova V.N., <http://orcid.org/0000-0001-7571-150X>

Sokolova M.V., <http://orcid.org/0000-0002-2836-8232>

Fel'dsherova A.A., <http://orcid.org/0000-0001-7216-4301>

Krymskij M.A., <http://orcid.org/0000-0003-4603-7354>

Semenenko T.A., <http://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Suslov A.P., <http://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

Acknowledgements. The authors are grateful to A.I. Bazhenov, Head of the laboratory of clinical immunology of SBHI «N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department» for fruitful collaboration in obtaining and characterization of native isolates of HBV with escape G145R mutation.

This work was funded by the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation (Grant No. 13411.1008799.13.184) and ZAO NPK Combiotech, Moscow, Russian Federation.

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

Received 18 February 2017

Accepted 27 February 2017

Введение

Проблема гепатита В остается актуальной во всем мире, несмотря на наличие эффективных вакцин. Поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg) индуцирует естественный или поствакцинальный гуморальный иммунный ответ, направленный главным образом против «а»-детерминанты HBsAg. Эта детерминанта является частью большого гидрофильного региона HBsAg, располагается между 124-м и 147-м аминокислотными остатками (а. о.), образуемыми 3 петли, которые удерживаются дисульфидными мостиками, образованными С124 и С137 а. о., а также С139 и С147 а. о. [1]. Данная детерминанта имеет высококонформационную природу и является универсальной, обеспечивая защиту от всех вариантов вируса гепатита В (ВГВ), поэтому коммерческие вакцины против гепатита В включают в качестве иммуногена именно рекомбинантную «а»-детерминанту HBsAg [1].

Массовая вакцинация против гепатита В способствует селекции и распространению мутантных форм ВГВ, ускользящих от вакцинального контроля (эскейп-мутантов). Аминокислотные замены внутри «а»-детерминанты приводят к конформационным изменениям и влияют на антигенность и иммуногенность в различной степени. Например, замена G145R приводит к столь радикальным изменениям, что HBsAg-специфичные протективные антитела практически полностью теряют способность взаимодействовать с мутантным вариантом HBsAg [2—5]. Однако такие структурные изменения не полностью нарушают иммуногенность HBsAg [6]. Инфицирование шимпанзе мутантным изолятом вируса, несущим мутацию G145R, приводит к индукции антительного ответа (анти-HBs) [7].

Антигенные свойства нативного мутанта G145R HBsAg, обнаруженного впервые в 1990 г. [8], были проанализированы с помощью 4 моноклональных антител, связывающихся с синтетическими циклическими пептидами, состоящими из 124—137 и 139—147 а. о. «а»-детерминанты. Эксперименты проводили на 3 рекомбинантных HBsAg (*ay* и *ad* дикого типа и G145R *ay* типа), экспрессированных в дрожжах *S. cerevisiae*,

а также на нативном мутанте. Рекомбинантные HBs-антигены были получены таким образом, чтобы исключить возможные изменения антигенной структуры в процессе очистки [5]. На основании снижения связывающей способности моноклональных антител с HBsAg дикого типа был сделан вывод, что мутация G145R приводит к изменению, нарушающему ряд эпитопов данного района, позволяя, таким образом, мутанту ВГВ ускользать от гуморального иммунного ответа [5].

Изучение взаимодействия анти-HBs из сывороток крови переболевших или вакцинированных людей с мутантным G145R-антигеном показало, что связывание анти-HBs с HBsAg дикого типа полностью ингибировалось рекомбинантными *ay* и *ad*. Напротив, при использовании мутантного G145R HBsAg в сыворотке вакцинированных лиц ингибирования не наблюдалось, а в сыворотке переболевших пациентов наблюдалось незначительное ингибирование [5]. Другие мутации в регионе 145-го а. о. не оказывали такого выраженного воздействия. Показано, что вакцинация людей препаратами, содержащими HBsAg дикого типа, с одинаковой эффективностью индуцировала образование антител как к HBsAg дикого типа, так и к мутанту S143L, но практически не вызывала образования антител к HBsAg, несущему мутацию G145R [9, 10].

Исследование гуморального ответа у мышей BALB/c после иммунизации антигенами вируса, относящимися к субтипам *ay* и *ad* дикого или мутантного G145R *ay*-типа, показало, что варианты HBsAg существенно различаются по иммуногенности и специфичности детерминант [5]. У мышей, иммунизированных антигенами дикого типа, анти-HBs-ответ был более чем в 100 раз выше, чем иммунный ответ, развившийся в случае мутантного антигена после второй иммунизации. При иммунизации субтипом *ay* антител анти-*ay* было в 4 раза больше, чем анти-G145R. Напротив, иммунизация мутантным антигеном вызывала образование почти в 5 раз больше антител, распознающих этот мутантный антиген, чем антител, распознающих *ay* дикого типа [5].

В качестве инструмента для изучения иммуногенности

дикого и мутантного G145R-типа HBsAg (субтипа *adw2*) применяли также генетическую иммунизацию [6]. Было показано, что мутантный HBsAg G145R иммуногенен у мышей BALB/cj (H-2d), так как вызывал нормальный ответ цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ-ответ) по отношению к узкому эпитопу H-2Ld, соответствующему 29—38 а. о. HBsAg, и индуцировал у мышей образование специфичных антител. При этом специфичные к G145R-мутанту моноклональные антитела были получены путем комбинирования плазмидной и белковой иммунизации. [6]. В то же время конформационное изменение, вызванное заменой G145R, не просто приводило к снижению иммуногенности, но и создавало новую специфичность. У мутантного HBsAg G145R частично сохранялась способность индуцировать антитела к дикому типу HBsAg. Несколько мышей, иммунизированных плазмидами, экспрессирующими мутантный HBsAg G145R, выработали детектируемые титры анти-HBs. В дополнение к этому одно из полученных моноклональных антител показало кросс-реактивность по отношению к HBsAg дикого и мутантного типа G145R [6].

Замена G145R является одной из наиболее распространенных мутаций ВГВ [11]. Ряд авторов рекомендуют включение в состав вакцин против гепатита В антигенных компонент, дающих защиту от инфекции, вызванной доминирующими мутантами [9, 11, 12]. Кроме того, предлагалось создание мультивалентной вакцины против гепатита В [13]. В мире предпринимались попытки осуществить идею разработки вакцины, защищающей от мутанта G145R [11, 14], однако до сих пор они не были реализованы в полной мере. Одним из возможных препятствий для этого могла быть сложность определения правильности фолдинга рекомбинантного белка и степени его соответствия мутанту G145R, встречающемуся в природных условиях.

Целью данной работы было сравнительное исследование антигенных и иммуногенных свойств природных и рекомбинантных мутантов G145R, экспрессированных штаммами-продуцентами различной природы, и оценка перспективы создания антигенного компонента поливалентной вакцины против гепатита В при наличии мутации G145R.

Материал и методы

Рекомбинантные HBsAg. В исследованиях использовали рекомбинантные субтипы *adw* и *ayw* HBsAg дикого типа (ЗАО НПК «Комбиотех», Россия) и ряд HBsAg с мутацией G145R: АНВ203, экспрессированный в *E. coli* (субтип *adw2*, НПО «Диагностические системы», Россия), НBS-878 (субтип *ayw*, «Prospec», Израиль), экспрессированный в дрожжах *P. pastoris*, а также серию антигенов ESC [15] (субтип *ayw2*, ЗАО НПК «Комбиотех», Россия), экспрессированных в дрожжах *H. polymorpha* и очищенных в различных условиях. Чистота антигенных препаратов, определенная методом электрофореза SDS-PAGE с красителем кумасси, составляла более 85%.

Нативные HBsAg. В качестве нативного HBsAg дикого типа использовали препарат очищенного HBsAg субтипа *ay* («ИмБио»). Исходный препарат HBsAg обессоливали на колонке (Pierce, кат. № 89892) методом центрифугирования, стерилизовали фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, концентрацию белка определяли спектрофотометрически, а активность проверяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в тест-системе «Гепастрип В» (ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Россия), используя в качестве стандарта отраслевой стандарт HBsAg (ОСО HBsAg) (42-28-31-00, НПО «Диагностические системы»).

Источником нативного ВГВ с мутацией G145R являлись ранее охарактеризованные нами [16] сыворотки № 1537 (генотип D, субтип *ayw2*), № 111 (генотип D, субтип *adw3*, ENA ERZ377006) и № 2043 (генотип D, субтип *ayw2*, ENA ERZ377011) с вирусной нагрузкой $2,6 \cdot 10^6$, $9 \cdot 10^5$ и $1 \cdot 10^8$ копий/мл соответственно. По данным полногеномного секвенирования

в мутантных вирусах из изолятов № 111 и 2043 таргетная мутация представлена в 99% молекул, гетерогенности нуклеотидов в соответствующих кодонах обнаружено не было (данные не приведены).

Конъюгаты. Поликлональные кроличьи и моноклональные мышинные (11F3, H10, HB4, 10D10, 5H7, 4F5, H2) антитела к HBsAg, а также их конъюгаты с пероксидазой хрена, приготовленные по методу, представленному в работе [17], были получены ранее [16]. Также использовали коммерческие моноклональные конъюгаты NF5 и NE2 («Сорбент», Россия), X7 («Фармакс», Россия).

Кроме того, в работе применяли конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG и IgM мыши с пероксидазой хрена, полученный в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», и конъюгат кроличьих антител, специфичных к IgG, IgA, IgM овцы с пероксидазой хрена («ИМТЕК», кат. № P-RAS Iss).

Метод серологического портретирования. Реактивность антигенных образцов с 11 пероксидазными конъюгатами антител, из которых 10 содержали индивидуальные моноклональные антитела к HBsAg, а одно — кроличьи поликлональные антитела к HBsAg (КАТ), оценивали методом ИФА, используя компоненты тест-системы «Гепастрип» (ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», Россия) с заменой конъюгата, содержащегося в этой тест-системе, на исследуемые конъюгаты [16]. Анализ проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе. Оптимальные концентрации для каждого конъюгата подбирали в предварительных опытах с помощью внутрилабораторного стандарта (ВЛС), ститированного с отраслевым стандартным образцом (ОСО HBsAg, НПО «Диагностические системы»). Оптимальной считалась концентрация конъюгата, при которой оптическая плотность (ОП) в лунках с ВЛС в концентрации 2 нг/мл составляла 0,5—2,5.

Относительную реактивность образцов оценивали по сравнению с соответствующей реактивностью ВЛС. Для этого ввели коэффициент C , равный отношению значения OP_{abc} (OP_{abc} равняется значению ОП в данной лунке за вычетом фона, т. е. значения ОП в лунке с буфером, использованным для разведения образцов), полученного для данного образца с данным конъюгатом ($OP_{abc-КГ}$), к соответствующему значению, полученному для того же образца с конъюгатом, показавшим максимальную реактивность с этим образцом ($OP_{abc-макс}$) ($C = OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс}$).

За относительную реактивность каждого образца с исследованными конъюгатами принимали отношение $C_{обр} / C_{ВЛС}$, обозначаемое $\phi_{КГ}$ при тестировании каждой «вариантной» сыворотки. Таким образом, реактивность образца вычисляли по формуле:

$$\phi_{КГ} = C_{обр} / C_{ВЛС} = ((OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс})_{образца} / ((OP_{abc-КГ} / OP_{abc-макс})_{ВЛС})) \cdot 10^{-3}$$

Реактивность образца с данным конъюгатом считали дефектной, если отношение $\phi_{КГ}$ для этого конъюгата не превышало 100, т. е. активность конъюгата снижалась более чем на два порядка.

Иммунизация мышей. Мышей линии BALB/c иммунизировали внутривенно 1 мл раствора антигена (или смеси антигенов) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с адьювантом, в качестве которого использовали либо $Al(OH)_3$ («SPI Pharma», Aluminum hydroxide gel VAC-20) в концентрации 0,5 мг/мл, либо Poly(I:C) («Sigma», кат. № P-9582-50MG) в концентрации 50 мкг/мл.

В каждой экспериментальной группе было по 5 животных. Мышей 1-й группы иммунизировали смесью рекомбинантных HBsAg *ayw* и *adw* по 1 мкг/мл каждого. Мышей 2-й и 6-й групп иммунизировали смесью антигенов *ayw*, *adw* и ESC, взятых в концентрации по 1 мкг/мл каждого антигена, при этом во 2-й группе в качестве адьюванта использовался $Al(OH)_3$, а в 6-й группе — Poly(I:C). Мышам 3-й группы также вводили смесь антигенов *ayw*, *adw* и ESC с $Al(OH)_3$ в

качестве адьюванта, однако концентрации белков были другими: *aww* и *adw* в дозе 1 мкг/мл, ESC — в дозе 5 мкг/мл. Мышам 4-й и 5-й групп вводили только ESC-антиген в дозах 1 и 5 мкг/мл соответственно с $Al(OH)_3$ в качестве адьюванта. Контрольная группа (7-я) включала 5 интактных мышей.

Через 33 дня после первичной иммунизации животных проводили реиммунизацию, используя для каждой группы мышей те же самые антигены и адьюванты в тех же концентрациях. На 9-й день после реиммунизации у мышей брали кровь, получали сыворотку, разводили ее в 100 раз ФСБ и замораживали до начала тестирования.

Иммунизация овец. Для иммунизации овец использовали животных романовской породы (валухи и ярки) в возрасте 10 мес, клинически здоровых, содержащихся в изолированном стаде.

Иммунизацию проводили отдельно мутантным ESC HBsAg (22 мкг/мл), комбинированной смесью антигенов *aww* + *adw* + ESC (суммарно 30 мкг/мл, в соотношении антигенов 1:1:1), а также контрольной смесью антигенов *aww* + *adw* (суммарно 20 мкг/мл, соотношение антигенов 1:1). Каждым антигеном иммунизировали по два животных.

В качестве примиривания каждому животному вводили 0,5 мл раствора антигена трехкратно (в 0, 7 и 14-й день). Инъекции делали многоточечно внутримышечно. Кровапускание производили перед третьей примиривающей инъекцией и через 7—10 и 21 день после нее. Через 28—30 дней после завершения цикла примиривания проводили реиммунизацию. Для этого каждому животному вводили по 3,5 мл антигена внутримышечно в несколько точек. Кровапускание после реиммунизации производили на 7, 10 и 14-й день. Кровь брали из яремной вены с соблюдением правил асептики. После образования сгустка отделяли сыворотку, центрифугировали, расфасовывали в пробирки по 2—3 мл и хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Сэндвич-ИФА для выявления HBsAg-специфичных мышинных и овечьих антител. Для выявления мышинных и овечьих антител, специфичных к различным вариантам HBsAg, полученные антисыворотки исследовали индивидуально от каждого животного скрининговым вариантом сэндвич-ИФА. Данный вариант ИФА дает возможность различать антитела, реагирующие с HBsAg дикого типа, или с HBsAg, несущим мутацию G145R [18].

Разведения HBsAg-антигенов для сорбции готовили на ФСБ-Т с азидом натрия. В качестве нативного HBsAg (субтип *aww*) использовали раствор HBsAg «ИмБио» в концентрации 2 мкг/мл, в качестве источника нативного HBsAg с мутацией G145R использовали два образца: сыворотки № 111 (субтип *adw3*) и № 2043 (субтип *aww2*) в разведении 1/100.

В случае выявления специфичных антимышиных антител положительным контролем являлись моноклональные антитела с различной специфичностью по отношению к вариантам HBsAg: антитела 11F3, наиболее активно реагирующие с HBsAg дикого типа, но практически не распознающие HBsAg, несущий мутацию G145R, а также антитела H2, наиболее эффективно реагирующие с HBsAg, несущим мутацию G145R. Растворы контрольных антител готовили на ФСБ-Т с азидом натрия: концентрация антител H2 составляла 200 нг/мл, антител 11F3 — 100 нг/мл. В качестве отрицательного контрольного образца при тестировании мышинных и овечьих антител использовали фон индивидуальных сывороток при применении ФСБ-Т вместо HBsAg.

Постановка реакции состояла из следующих этапов. В лунки планшета с иммобилизованными поликлональными антителами к HBsAg вносили по 100 мкл раствора природного HBsAg («ИмБио», 111 или 2043) либо ФСБ-Т. Инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной камере, после чего отмывали ФСБ-Т 5 раз. Затем вносили тестируемые образцы мышинных или овечьих антисывороток в разведении 1/300 по 100 мкл и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной камере, после чего 5-кратно отмывали ФСБ-Т. Далее в лунки отмывали

того тест-планшета вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора конъюгата и инкубировали 1 ч при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. В случае тестирования мышинных антисывороток использовали конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG и IgM мыши с пероксидазой хрена, в концентрации 0,4 мкг/мл в ФСБ-Т с 20% нормальной кроличьей сывороткой. При тестировании овечьих антисывороток использовали конъюгат кроличьих антител, специфичных к суммарным IgG, IgA и IgM овец с пероксидазой хрена, в концентрации 0,8 мкг/мл в ФСБ-Т, содержащем 20% нормальной козьей сыворотки и 1,7% бычьего сывороточного альбумина (БСА). После инкубации с конъюгатом планшеты отмывали с помощью ФСБ-Т 8 раз, затем в лунки вносили по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора тетраметилбензидина (ТМБ) и инкубировали 30 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ во влажной камере. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2М H_2SO_4 и считывали результаты при длине волны 450 нм и дифференцирующей волне 620 нм.

При обработке результатов для получения величины специфической реакции из величины сигнала в лунках с соответствующим HBs-антигеном вычитали «собственный фон» данной конкретной сыворотки в лунках с ФСБ-Т-контролем.

Обработку экспериментальных результатов и построение графиков проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.01.

Результаты

Серологическое портретирование различных вариантов HBsAg. Результаты исследования различных рекомбинантных и природных вариантов HBsAg методом серологического портретирования показали, что рекомбинантные антигены дикого типа *aw* и *ad* распознаются всей панелью конъюгатов (см. таблицу). Это согласуется с понятием об универсальности «а»-детерминанты HBsAg в ВГВ дикого типа.

Серологическое портретирование антигенов с эскейп-мутацией G145R дало неоднородные результаты. Рекомбинантные образцы ANBV203 и HBs-878 не имели ни одного дефекта распознавания моноклональными конъюгатами, что означает подобие конформации этих рекомбинантных молекул HBsAg дикого типа. Однако все исследованные рекомбинантные антигены серии ESC (субтип HBsAg *aww2*), также содержащие мутацию G145R, имели многочисленные глубокие «провалы» в реактивности с большинством конъюгатов, причем их реакционная способность была почти идентичной таковой нативных HBsAg с той же мутацией (субтипов *aww2* и *adw3*) (см. таблицу).

Тем не менее глубина дефектов распознавания была неодинакова для разных вариантов ESC-антигенов, полученных в разных экспериментальных условиях. Например, нарушения распознавания антигенов ESC-1 и ESC-2 по конъюгату HB4 почти в 100 раз, по конъюгату X7 — в 20 раз меньше, чем у всех трех природных изолятов с мутацией G145R. У этих антигенов нарушения по конъюгатам 11F3 и 10D10 также меньше, чем у нативных мутантных антигенов и других рекомбинантных вариантов из серии ESC. Это позволяет сделать вывод о некотором нарушении правильного фолдинга антигенов ESC-01 и ESC-02, не позволяющем им полностью соответствовать природной конформации мутантного эпитопа G145R. Поэтому такие варианты антигенов нельзя применять при разработке специфических компонентов вакцины. Напротив, серологический портрет антигена ESC-03 наиболее приближен к природному G145R HBsAg из сывороток 1537 и 2043, имеющих тот же субтип (*aww2*), и такой вариант получения специфического антигена, по-видимому, предпочтителен.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при получении рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R условия его экспрессии и очистки играют не менее важную роль, чем замена нуклеотидов в таргетном кодоне, от них зависит правильный фолдинг мутантного антигена.

Другим определяющим фактором для оценки адекватности рекомбинантного антигена природному аналогу и его пригодности для включения в вакцину является исследование иммуногенных свойств.

Определение иммуногенности рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R in vivo на мышах. Иммунизация мышей смесью рекомбинантных HBsAg, относящихся к субтипам *ayw* и *adw* дикого типа (1-я группа), приводила преимущественно к развитию иммунного ответа против нативного HBsAg дикого типа, однако при этом развивался также очень слабый кросс-реактивный ответ на природный мутант G145R (рис. 1).

Добавление к смеси *ayw* + *adw* рекомбинантного ESC-антигена (соотношение антигенов 1:1:1, 2-я группа) способствовало увеличению титра антител, перекрестно реагирующих с природным мутантом G145R, но одновременно снижало титр антител к HBsAg дикого типа. Увеличение в антигенной смеси пропорции ESC-антигена в 5 раз (*ayw*:*adw*:ESC = 1:1:5, 3-я группа) повышало выработку антител к мутанту G145R и при этом еще сильнее снижало уровень антител к дикому типу вируса. Анализ антисывороток мышей 6-й группы, аналогичной 2-й группе, но с использованием в качестве адъюванта Poly(I:C) вместо Al(OH)₃ показал большой разброс среди иммунизированных животных. При этом в целом уровень антител к HBsAg дикого типа в этой группе был несколько ниже, чем во 2-й группе, а уровень антител к природному G145R-мутанту — выше.

Иммунизация мышей только ESC-антигеном в дозе 1 мкг/мл (4-я группа) была самой неэффективной: уровень антител, перекрестно реагирующих с нативным G145R-мутантом, был ниже по сравнению с той же дозой ESC-антигена, но в комбинации с белками *ay* и *ad*. При этом антитела, перекрестно реагирующие с HBsAg дикого типа, у мышей вырабатывались крайне слабо. Однако у мышей 5-й группы, которых иммунизировали только рекомбинантным ESC-антигеном в дозе 5 мкг/мл, были обнаружены антитела, приблизительно одинаково реагирующие как с природным G145R-мутантом,

так и с природным HBsAg дикого типа. В принципе аналогичные данные были получены и в 4-й группе, но в 5-й группе уровень специфического сигнала был значительно выше и поэтому достовернее.

Полученные результаты показали, что ESC-антиген, имеющий серологический портрет, идентичный природному HBsAg с мутацией G145R, имел и сходные с ним иммуногенные свойства, что соответствует данным литературы, согласно которым мутация G145R снижает способность ВГВ к выработке антител против «а»-детерминанты, причем вырабатываемые антитела направлены преимущественно против мутантного HBsAg, сохраняя невысокий уровень перекрестных реакций против вируса дикого типа.

Определение иммуногенности рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R in vivo на овцах. ESC-антиген обладал иммуногенностью не только на мышинной модели, вызывая образование у иммунизированных овец специфических антител, реагирующих с нативным HBsAg дикого и мутантного типа (рис. 2). При этом итоговый иммунный ответ на нативные мутантные G145R-варианты (*ayw* и *adw*), развившийся после реиммунизации антигеном ESC, был намного сильнее, чем при реиммунизации бивалентной антигенной композицией *ayw* + *adw*, а также трехвалентной антигенной композицией *ayw* + *ad* + ESC.

По профилям тестирования специфичности антисывороток в ходе иммунизации овец установлено, что первичный ответ на изолированный ESC-антиген развивался медленнее, чем на другие антигенные варианты, и давал существенно меньший уровень анти-HBsAg-антител. Особенно заметно это проявилось в случае анализа кросс-реакций сывороточных антител с нативным эскейп-антигеном субтипа *adw3* (антиген 111). Несколько меньшую интенсивность взаимодействия мутантспецифических антител с антигеном 111 по сравнению с антигеном 2043 (субтип *ayw2*) можно объяснить не только разницей субтипов, но и тем, что содержание HBsAg в случае изолята 111 было ниже, что можно пред-

Относительная реактивность $\phi_{кт}$ природных и рекомбинантных HBsAg*

Вид HBsAg	Антиген	Относительная реактивность анти-HBsAg-конъюгатов, $\phi_{кт}$										
		11F3	NF5	X7	10D10	H2	H10	4F5	NE2	HB4	5H7	KAT
Рекомбинантный HBsAg, дикий тип	<i>adw</i>	1000	1320	500	930	11960	890	350	890	790	1230	730
	<i>ayw</i>	1230	340	260	400	1590	1210	280	600	600	700	660
Нативный HBsAg с мутацией G145R	111	0,3	714	0,05	0,2	2600	4,7	2,3	0,3	0,4	0,4	200
	1537	0,3	56	0,37	0,5	500	16	56	0,6	0,7	0,9	500
	2043	0,1	143	0,08	0,1	250	33	53	0,3	0,4	0,2	500
Рекомбинантный HBsAg с мутацией G145R	АНВВ 203	333	333	101	167	143	250	167	250	200	2000	2000
	HBS-878	1000	2000	250	250	1000	333	250	1000	1000	3000	1000
	ESC-01	2,3	250	20	7,6	3000	9,1	5,6	0,6	91	1,3	250
	ESC-02	2,3	125	20	7,6	3000	8,8	8,1	0,0	91	0,0	143
	ESC-03	0,0	278	0,0	0,0	3200	16,1	5,3	0,6	0,0	1,3	1000
	ESC-10	0,0	400	0,0	0,0	3200	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	357
	ESC-11	0,0	217	0,0	0,0	3200	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	119
	ESC-12	0,0	164	0,0	0,0	2650	5,9	0,0	0,0	0,0	0,0	164
	ESC-13	0,0	1434	0,0	0,0	1300	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1300
	ESC-15	0,0	358	0,0	0,0	3100	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	351
ESC-16	0,0	423	0,0	0,0	3000	9,8	0,0	0,0	0,0	0,0	434	
ESC-17	0,0	525	0,0	0,0	3300	8,1	0,0	0,0	0,0	0,0	458	

Примечание. * — дефектом распознавания считаются значения менее 100: темно-серым цветом и жирным шрифтом выделены глубокие дефекты распознавания (диапазон 0—1), менее интенсивным серым цветом и обычным шрифтом выделены дефекты распознавания «средней силы» (диапазон 1—10), светло-серым цветом выделены наименее выраженные дефекты распознавания (диапазон 10—100).

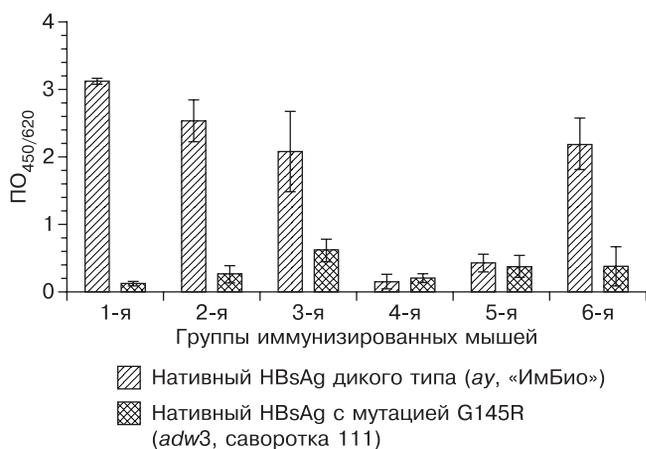


Рис. 1. Определение методом ИФА уровня антител, реагирующих с нативными HBsAg дикого типа (ay, «ИмБио») и мутантного (adw3, сыворотка № 111) G145R-типа, у мышей BALB/c, иммунизированных различными рекомбинантными антигенами. Результаты ИФА представлены за вычетом фона и реакции от контрольной группы интактных мышей.

положить исходя из уровня вирусной нагрузки в образцах. В целом удалось показать, что иммунизация овец смесью HBsAg дикого типа (ayw + adw) стимулирует образование преимущественно антител против дикого типа, а мутантным рекомбинантным — против нативного мутантного G145R-варианта вируса. Полученные данные в целом согласуются с результатами по иммунизации мышей.

Обсуждение

В ряде исследований описаны особые свойства HBsAg с мутацией G145R. В работе J. Waters и соавт. [5] связывание моноклональных антител, специфичных к циклическим пептидам, воспроизводящим две составные части «а»-детерминанты, полностью ингибировалось рекомбинантными антигенами дикого типа ay и ad, но не мутантным G145R HBsAg. Два моноклональных антитела, распознающие пептид 139—147, содержащий 145 а. о., не связывались с мутантным G145R-антигеном. Одно из антител, распознающее циклический пептидный аналог 124—137, также не связывалось с мутантным G145R-антигеном. Другое моноклональное антитело из этой группы связывалось с мутантным антигеном, но в 10 раз большей концентрации. Таким образом, было показано, что моноклональные антитела, использованные в работе J. Waters и соавт., выявляют 4 разных эпитопа и 2 перекрывающихся эпитопа общей «а»-детерминанты, причем все они были изменены у природного и рекомбинантного мутантного антигена [5]. В работе X. Zheng и соавт. [6] одно из моноклональных антител распознавало мутантный HBsAg с заменой G145R, но не с другими, что указывает на особую специфичность мутантного G145R-эпитопа. Это подтверждалось тем, что большинство мутантных HBsAg с единичными аминокислотными заменами распознавалось анти-HBs [6].

Наши исследования подтверждают наличие особой конформации мутантного G145R-эпитопа. Установлено, что с помощью метода серологического портретирования можно определить точный профиль серологических реакций, характерный для этой мутации. Однако не все рекомбинантные антигены, с помощью которых можно воспроизвести природный мутантный вариант эпитопа вирусного антигена, обладали такой способностью. На это прежде всего оказывали влияние условия экспрессии и очистки антигена.

Важность экспериментальных условий для правильного фолдинга рекомбинантных HBsAg была показана ранее и для

дикого типа HBsAg. Так, известно несколько неудачных попыток экспрессировать иммунологически активные HBsAg-частицы в *E. coli*, однако дрожжи *S. cerevisiae* проявили большую способность к экспрессии этого белка [12]. В работе J. Waters и соавт. также учитывали условия очистки целевых белков, обработка рекомбинантных HBsAg мочевиной была исключена [5], поскольку имелись данные, что это соединение и другие хаотропные соли могут нарушить структуру белка HBsAg [19].

Метод серологического портретирования дает возможность дифференцировать мутантные рекомбинантные анти-

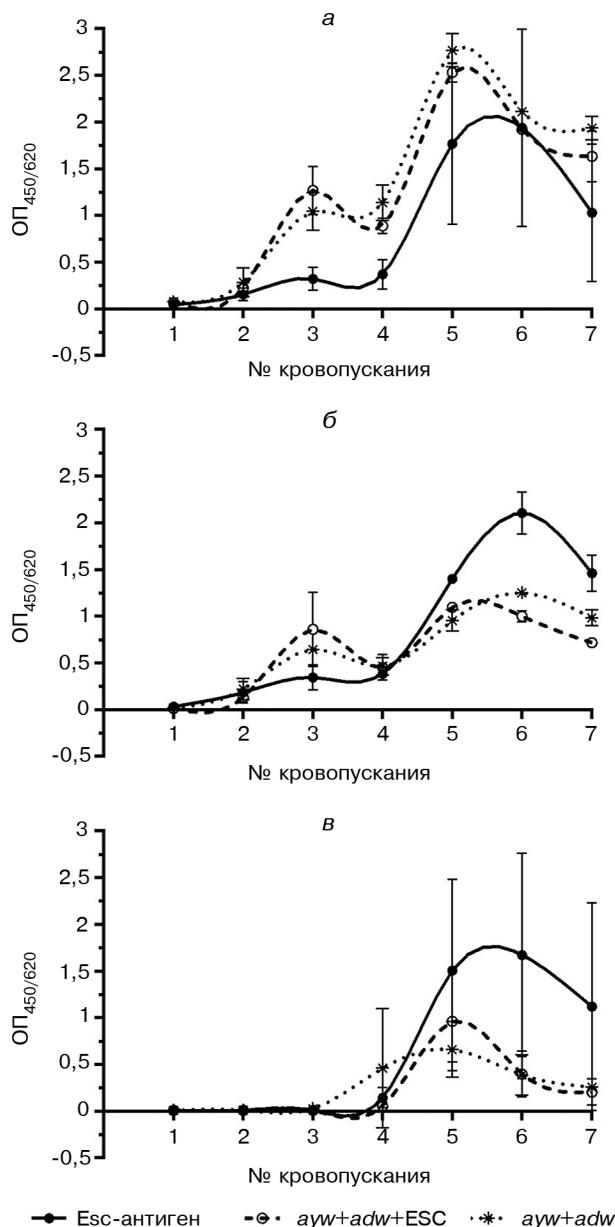


Рис. 2. Определение методом ИФА уровня специфического гуморального ответа у овец, иммунизированных тремя антигенными композициями (ESC-антиген или смесь adw + ayw + ESC или смесь adw + ayw): а — ответ на нативный HBsAg дикого типа субтипа ay («ИмБио»); б — ответ на нативный HBsAg субтипа ayw2 с эскейп-мутацией G145R (сыворотка № 2043); в — ответ на нативный HBsAg субтипа adw3 с эскейп-мутацией G145R (сыворотка № 111).

гены и выбрать из них наиболее близкий природному аналогу, однако для окончательных выводов, кроме него, требуются дополнительные методы, например оценка селектированных антигенов по перекрестным реакциям с использованием сывроток от переболевших и вакцинированных людей, а также оценка их иммуногенности.

Наши результаты, касающиеся оценки иммуногенных свойств ESC-антигена (рекомбинантного HBsAg с эскейп-мутацией G145R), выбранного нами из-за наибольшего сходства с нативным мутантом, согласуются с данными, полученными J. Waters и соавт. [5]. Они показали, что при иммунизации мышей мутант G145R и дикий тип вируса существенно различаются по иммуногенности и специфичности детерминант, причем иммунизация диким вариантом вируса приводит к выработке преимущественно антител против дикого типа, а мутантным — против мутантного типа [5]. Возможность получения кросс-реагирующих антител как при белковой, так и при генетической иммунизации мышей мутантным вариантом HBsAg [5, 6] также подтверждена нашими результатами. Впервые была установлена иммуногенность рекомбинантного HBsAg с мутацией G145R для овец. При оценке гуморального ответа, развивающегося у овец в ходе нескольких раундов иммунизации, обнаружено, что первичный ответ на изолированный ESC-антиген развивался несколько медленнее, чем на другие антигенные композиции, и приводил к существенно меньшей выработке анти-HBsAg. Особенно заметно это проявилось в случае анализа кросс-реакций сывроточных антител с нативным эскейп-антигеном субтипа *ad*. Однако итоговый иммунный ответ на нативные мутантные G145R-варианты (*ayw* и *adw*) после реиммунизации моноантигеном ESC был намного сильнее, чем при реиммунизации бивалентной антигенной композицией *ayw* + *adw*, а также трехвалентной антигенной композицией *ayw* + *ad* + ESC. Истинность реакций мышиных и овечьих антисывороток с нативными мутантами G145R подтверждается тем, что, по данным полногеномного секвенирования, эти изоляты ВГВ отличались 100% гомогенностью в 145-м кодоне S-HBsAg.

Возможно, в данной серии экспериментов доза ESC-антигена в антигенной композиции и ее соотношение с другими антигенами была не вполне оптимальной. Однако полученные результаты позволяют предположить, что развитие иммунного ответа на HBsAg с мутацией G145R происходит по несколько иному механизму, чем в случае с HBsAg дикого типа. Это требует дополнительных исследований.

Заключение

Создание эффективной вакцины против гепатита В, способной защищать не только от вируса дикого типа, но и от его доминирующего и значимого мутанта G145R, может пойти по пути разработки мультивалентной вакцины, в которой рекомбинантные антигены HBsAg дикого типа, например субтипов *ad* и *ay*, будут сочетаться с мутантным вариантом, адекватно отражающим антигенные и иммуногенные свойства природного ВГВ с мутацией G145R. При этом большую роль будут играть правильно подобранные дозы всех компонентов и, вполне вероятно, особый график иммунизации и/или использования адьюванта.

Благодарности. Авторы статьи выражают благодарность заведующему лабораторией клинической иммунологии ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ А.И. Баженову за плодотворное сотрудничество при получении и охарактеризовании нативных изолятов ВГВ с HBsAg с эскейп-мутацией G145R.

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке гранта Минпромторга России (№ 13411.1008799.13.184), а также ЗАО НПК «Комбиотех», г. Москва.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1—8, 11—14, 17, 19 см. REFERENCES)

- Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Г.И., Хац Ю.С. и др. Выявление антител к мутантным формам HBsAg у лиц иммунизированных против гепатита В вакцинами разных субтипов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2011; (5): 49-53.
- Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., Хац Ю.С. и др. Сравнительная оценка активности анти-HBs, индуцированных естественным путём или вакцинацией, в отношении различных вариантов HBsAg. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2012; (2): 76-81.
- Крымский М.А., Борисов И.А., Яковлев М.С., Агафонов М.О., Тер-Аванесян М.Д., Суслов А.П. и др. Рекомбинантный штамм дрожжей *Hansenula polymorpha* - продуцент мутантного поверхностного антигена вируса гепатита В (варианты). Патент РФ № 2586513 С1; 2016.
- Баженов А.И., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Хац Ю.С., Годков М.А. и др. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у хронических носителей вируса гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; (6): 30-7.
- Крымский М.А., Борисов И.А., Яковлев М.С., Мельников В.А., Суслов А.П., Семенов Т.А. и др. Способ оценки уровня антител, специфичных к различным вариантам HBsAg вируса гепатита В. Патент РФ № 2616236С1; 2017.

REFERENCES

- Blum H.E. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J. Gastroenterol*. 2005; 11(47): 7391-400.
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol*. 2005; 32: 102-12.
- Ben-Porath E., Wands J.R., Marciniak R.A., Wong M.A., Hornstein L., Ryder R., et al. Structural analysis of hepatitis B surface antigen by monoclonal antibodies. *J. Clin. Invest*. 1985; 76(4): 1338-47.
- Roohi A., Khoshnoodi J., Zarnani A.H., Shokri F. Epitope mapping of recombinant hepatitis B surface antigen by murine monoclonal antibodies. *Hybridoma (Larchmt)*. 2005; 24(2): 71-7.
- Waters J.A., Kennedy M., Voet P., Hauser P., Petre J., Carman W., et al. Loss of the Common "A" Determinant of Hepatitis B Surface Antigen by a Vaccine-induced Escape Mutant. *J. Clin. Invest*. 1992; 90: 2543-7.
- Zheng X., Weinberg K.M., Gehrke R., Isogawa M., Hilkene G., Kemper T., et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology*. 2004; 329: 454-64.
- Ogata N., Zanetti A.R., Yu M., Miller R.H., Purcell R.H. Infectivity and Pathogenicity in Chimpanzees of a Surface Gene Mutant of Hepatitis B Virus that Emerged in a Vaccinated Infant. *J. Infect. Dis*. 1997; 175(3): 511-23.
- Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*. 1990; 336: 325-9.
- Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsheroва A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina G.I., Khats Yu.S., et al. Detection of Antibodies to HBsAg Mutant Forms in Individuals Immunized of Different Subtypes Hepatitis B Vaccines. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2011; (5): 49-53. (in Russian)
- Bazhenov A.I., El'gort D.A., Fel'dsheroва A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., Khats Yu.S., et al. The comparative estimation of anti-HBs activity against native and recombinant type HBsAg. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2012; (2): 76-81. (in Russian)
- Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutant. *J. Med. Virol*. 1999; 58: 193-5.
- Kniskern P.J. HBsAg escape mutant vaccine. Patent EP № 0 511 855 A1; 1992.
- Kniskern P.J. A multivalent hepatitis B virus vaccine. Patent EP № 0 533 263 A2; 1992.
- Thomas H.C., Carman W.F. Hepatitis B vaccine. Patent US 5.639.637; 1997.
- Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Agafonov M.O., Ter-Avanesyan M.D., Suslov A.P., et al. Recombinant *Hansenula*

- polymorpha yeast strain - producer of mutant hepatitis B virus surface antigen (versions). Patent RU № 2586513 C1.; 2016. (in Russian)
16. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., El'gort D.A., Fel'dsherova A.A., Khats Yu.S., Godkov M.A., et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2007; (6): 30-7. (in Russian)
 17. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem*. 1984; 136(2): 451-7.
 18. Krymskiy M.A., Borisov I.A., Yakovlev M.S., Mel'nikov V.A., Suslov A.P., Semenenko T.A., et al. A method of assessing the level of antibodies specific to various HBsAg of HBV. Patent RF № 2616236C1; 2017. (in Russian)
 19. Bellecave P., Gouttenoire J., Gajer M., Brass V., Koutsoudakis G., Blum H.E., et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology*. 2009; 50(1): 46-55.

Поступила 18.02.17
Принята в печать 27.02.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 616.98:578.833.26]-078.33-092.9

Бахвалова В.Н.¹, Панов В.В.¹, Потапова О.Ф.¹, Морозова О.В.^{2,3}

ЦИТОКИНЫ И АНТИТЕЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАРАЖЕНИИ ДИКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ (RODENTIA) ВИРУСОМ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» Сибирского отделения РАН, 630091, г. Новосибирск;

² 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;

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

Моделирование персистенции проводили посредством заражения диких грызунов красной полевки *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) и полевой мыши *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), а также лабораторных мышей вирусом клещевого энцефалита (ВКЭ) в составе клещевых суспензий с последующей детекцией вируса, антигемагглютининов и вируснейтрализующих антител к ВКЭ, а также экспрессии генов цитокинов в течение 4 мес. При высоких частотах детекции РНК и антигена Е ВКЭ на протяжении всего периода наблюдений патогенный для лабораторных мышей-сосунков вирус выделяли преимущественно до 8 сут после заражения. На поздних стадиях персistentной инфекции (1—4 мес) частота детекции вирусной РНК у красных полевок и лабораторных мышей оставалась высокой, а у полевых мышей значительно снижалась ($p < 0,001$). Вирусные нагрузки у диких грызунов достоверно превышали ($p < 0,001$) значения у лабораторных мышей. Средние частоты экспрессии генов Th2-цитокинов были сходными у *M. rutilus* (50 ± 8,5%) и *A. agrarius* (50 ± 9,6%) на протяжении всего периода, но частоты детекции мРНК цитокинов Th1-пути после активации транскрипции через 2 сут инфекции и последующего возвращения к исходному уровню различались ($p > 0,05$) у двух видов диких грызунов, составляя 22,2 ± 5 и 38,1 ± 7,6% соответственно. При этом доля особей с мРНК интерлейкина-1β была значимо ($p < 0,05$) больше у *A. agrarius*, чем у *M. rutilus*, что, возможно, обуславливало пониженные частоты вирусносительства среди полевых мышей по сравнению с красными полемками. Антигемагглютинины и вируснейтрализующие антитела у диких грызунов были выявлены через 30 сут после заражения и оставались в детектируемых количествах до 4 мес. Таким образом, персистенция ВКЭ у мелких грызунов сопровождалась детекцией патогенного вируса в ранний период, вирусной РНК и антигена Е в течение 4 мес с большими вирусными нагрузками у диких грызунов, превышающими значения у лабораторных мышей. Изменения экспрессии генов провоспалительных цитокинов и наличие вирусспецифических антител свидетельствовали об иммуномодулировании как возможном механизме персистенции.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; красная полевка *Myodes rutilus* (Pallas, 1779); полевая мышь *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771); цитокины; вируснейтрализующие антитела и антигемагглютинины.

Для цитирования: Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Морозова О.В. Цитокины и антитела при экспериментальном заражении диких и лабораторных мелких грызунов (Rodentia) вирусом клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 186-192.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-186-192>

Bakhvalova V.N.¹, Panov V.V.¹, Potapova O.F.¹, Morozova O.V.^{2,3}

CYTOKINES AND ANTIBODIES IN EXPERIMENTAL INFECTION OF WILD AND LABORATORY RODENTS (RODENTIA) WITH TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

¹ Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation;

² D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

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

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии отдела арбовирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва.
E-mail: omorozova2010@gmail.com

Persistence modeling was performed by means of infection of the wild rodents: northern red-backed vole *Myodes rutilus* (Pallas, 1779) and striped field mouse *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771), as well as of laboratory mice with the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in tick suspensions with subsequent detection of the TBEV, hemagglutination inhibition and virus-neutralizing antibodies, as well as expression of cytokine genes during 4 months. Detection rate of the TBEV RNA and antigen E remained high during the whole period of observations; however, virus pathogenic for laboratory suckling mice was isolated mainly during a period of 8 days post infection. At the late stages of the persistent infection (1-4 months) the TBEV RNA detection rate in northern red-backed voles and laboratory mice remained high, whereas in striped field mice it significantly declined ($p < 0.001$). The viral loads were significantly higher ($p < 0.001$) in the wild rodents compared to the laboratory mice. Average frequencies of Th2 cytokine gene expression were similar for *M. rutilus* ($50.0 \pm 8.5\%$) and *A. agrarius* ($50.0 \pm 9.6\%$) during the whole period, but Th1 cytokine mRNA detection rate after transcription activation in 2 days post infection and subsequent return to the original values were different ($22.2 \pm 5.0\%$ and $38.1 \pm 7.6\%$, respectively ($p > 0.05$)). Meanwhile, a part of animals with interleukin 1β mRNA was significantly higher among *A. agrarius* than among *M. rutilus* ($p < 0.05$), which might cause low levels of spontaneous TBEV infection of field mice compared to red voles. Hemagglutination inhibition and virus-neutralizing antibodies were revealed in wild rodents in 30 days post infection and remained at detectable levels during 4 months.

Thus, the TBEV persistence in small rodents was accompanied by the detection of the pathogenic virus in the early period, the viral RNA and antigen E during 4 months with high viral loads in wild animals exceeding the values in laboratory mice. Changes in the proinflammatory cytokine gene expression frequencies and the TBEV-specific antibodies pointed at immunomodulation as the possible mechanism of the TBEV persistence.

Key words: tick-borne encephalitis virus; Northern red-backed vole *Myodes rutilus* (Pallas, 1779); striped field mouse *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771); cytokines; virus-neutralizing and hemagglutination inhibition antibodies.

For citation: Bakhvalova V.N., Panov V.V., Potapova O.F., Morozova O.V. Cytokines and antibodies in experimental infection of wild and laboratory rodents (Rodentia) with tick-borne encephalitis virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(4): 186-192. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-186-192>

For correspondence: Olga V. Morozova, D. Sci., leading researcher, Laboratory of immunology, Department of Arboviruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: omorozova2010@gmail.com

Information about authors:

Bakhvalova V. N., <http://orcid.org/0000-0002-3441-1751>

Panov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-9728-2985>

Potapova O.F., <http://orcid.org/0000-0002-8435-7482>

Acknowledgments. This work was financially supported by the Integration programs of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences and Federal programs for Basic Scientific Research 2013-2020 (VI.51.1.5).

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

Received 19 January 2017
Accepted 28 February 2017

Введение

Известны 3 способа персистенции вирусов: снижение уровня репликации вирусных геномов и экспрессии вирусных генов с формированием нелитической инфекции; конформационные изменения вирусных белков, экспонированных на поверхности вирионов или зараженных клеток; вирусопосредованное модулирование иммунного ответа [1].

Персистенция ВКЭ среди многочисленных и разнообразных эволюционно удаленных позвоночных и беспозвоночных хозяев обеспечивает стабильность всей паразитарной системы. Совпадение сезонных циклов активности и биотопов иксодовых клещей и их прокормителей, врожденная резистентность и специфический иммунитет определяют роли разных видов мелких млекопитающих как прокормителей личинок и нимф клещей, а также резервуарных, индикаторных и случайных хозяев ВКЭ [2, 3]. В отличие от резервуарных хозяев с пожизненным вирусоносительством и доказанной передачей ВКЭ клещам для индикаторных хозяев характерны короткий период виремии с низкими уровнями вирусной репродукции и неспособностью передавать ВКЭ переносчикам [2]. Случайные хозяева не могут поддерживать ни репликацию геномной вирусной РНК из-за отсутствия клеточных факторов, ни передачу ВКЭ [2].

Персистенция ВКЭ в инфицированных клетках происходит в присутствии в организме специфических антител, в том числе вируснейтрализующих и ингибирующих геммаглотинацию [4–6]. Такие антитела не могут быть утрачены у млекопитающих через несколько месяцев, как полагают Коренберг и соавт. [3], после клональной селекции В-клеток,

секретирующих специфические антитела, возможно лишь снижение титров ниже пределов чувствительности серологических методов. Поэтому в исследованиях персистентной инфекции необходимо использование комплексного подхода, включая молекулярно-биологические методы, так как их специфичность и чувствительность превосходят пределы иммунологических подходов, на которых были основаны прежние выводы, в частности Коренберга и соавт. [3].

Цель данной работы состояла в сравнительном анализе врожденной резистентности и адаптивного иммунитета у массовых видов диких грызунов: красной полевки *Myodes rutilus* Pallas и полевой мыши *Apodemus agrarius* Pallas, а также у лабораторных мышей ICR после их экспериментального заражения ВКЭ в составе клещевых суспензий.

Материал и методы

Мелкие млекопитающие и клещи. Голодных имаго иксодовых клещей и диких мелких млекопитающих отлавливали на территории антропоургического очага клещевого энцефалита (КЭ) г. Новосибирска ($54^{\circ}49' N$, $83^{\circ}05' E$). Имаго голодных иксодовых клещей собирали на флаг с растительности в период их максимальной активности в мае—июне 2010 г. с определением видов по морфологическим признакам [7]. Диких животных для опытов отлавливали в октябре с использованием живоловок, определение вида, пола и возраста проводили, как описано ранее [8]. Молодых неразмножавшихся зверьков (возраст 3–4 нед) помещали на неделю в индивидуальные клетки после обработки 1% водной эмульсией циперметрина для уничтожения эктопаразитов. Через 1 мес

после содержания в индивидуальных клетках у животных прижизненно брали кровь для определения РНК ВКЭ, антигеммагглютининов и вируснейтрализующих антител к ВКЭ, после чего для опытов отбирали неинфицированных особей. Всего в опытах использовали 65 особей красной полевки и 54 особи полевой мыши, а также 57 лабораторных мышей ICR аналогичного с дикими зверьками возраста.

Детекцию ВКЭ проводили с использованием комплекса методов: обратной транскрипции с последующей ПЦР с генотипспецифичными флуоресцентными зондами в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ), иммуноферментного анализа (ИФА) для определения антигена Е ВКЭ с использованием набора ВектоВКЭ-антиген-стрип (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск) и биопробы на 1—3- или 10—12-суточных лабораторных мышях ICR [9—11]. Патогенность изолятов оценивали для 1—3-суточных лабораторных мышей ICR в соответствии с описанием в работе [10].

Вирусную нагрузку определяли с использованием количественной ОТ-ПЦР-РВ с калибровочным графиком зависимости пороговых циклов (Ct) флуоресценции от количества геном-эквивалентов рекомбинантной плазмиды, содержащей клонированную полноразмерную ДНК-копию генома ВКЭ, и уравнения Лукьянова—Матца [11].

Для заражения животных готовили смесь равных аликвот (по 0,4 мл) супернатантов суспензий 27 вирусосодержащих пулов клещей (по 10 экземпляров в каждом пуле), затем приготовленную смесь развели в 5 раз физиологическим раствором (0,9% NaCl) с добавлением 3% сыворотки новорожденных телят. Молекулярное типирование посредством ОТ-ПЦР-РВ с генотипспецифичными зондами и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов *E* и *NS1* выявили в смеси РНК ВКЭ дальневосточного и сибирского (подтипы Заусаев и Васильченко в соотношении 4:1) генетических типов, доминирующих на территории Сибири [10]. По данным количественной ОТ-ПЦР-РВ, смесь клещевых суспензий содержала приблизительно 2520 геном-эквивалентов в 1 мл каждого типа ВКЭ, а в сумме — 5040 геном-эквивалентов ВКЭ в 1 мл. Внутримозговое титрование на 14-суточных лабораторных мышях ICR показало, что инфекционный титр ВКЭ в смеси составлял 3,5 lg LD₅₀/мл.

Равные аликвоты (по 0,4 мл) супернатантов суспензий 27 неинфицированных пулов клещей без дополнительного разведения физиологическим раствором объединяли в безвирусную смесь клещевых суспензий.

Заражение красных полевок, полевых и лабораторных мышей проводили посредством подкожного введения 0,25 мл смеси клещевых суспензий, содержащих 2,9 lg LD₅₀ ВКЭ и 1260 геном-эквивалентов ВКЭ. Контрольным группам лабораторных мышей вводили подкожно по 0,25 мл физиологического раствора (0,9% NaCl) с добавлением 3% сыворотки новорожденных телят или по 0,25 мл безвирусной смеси клещевых суспензий.

Образцы крови для детекции ВКЭ и антител к ВКЭ брали прижизненно из ретроорбитального венозного сплетения до заражения и через 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90 и 120 сут после заражения животных. Образцы крови для детекции ВКЭ хранили аликвотами по 50 мкл при -70 °С. В пробирки с кровью для выделения РНК добавляли 3 объема лизирующего раствора, содержащего 5,5 М гуанидин-изотиоцианат. Гомогенаты крови исследовали индивидуально. Пробы крови для тестирования антител к ВКЭ центрифугировали для отделения сыворотки, которую хранили в холодильнике при 4 °С не более недели.

Анализ экспрессии генов цитокинов у мышей и диких грызунов. Экспрессию генов цитокинов у инфицированных ВКЭ мелких грызунов исследовали посредством ОТ-ПЦР с праймерами, соответствующими мРНК интерферона γ (ИФН- γ), фактора некроза опухоли α (ФНО α), интерлейкинов (ИЛ) 4, 6, 10, 12 и 1 β для суммарных РНК, выделенных из клеток по-

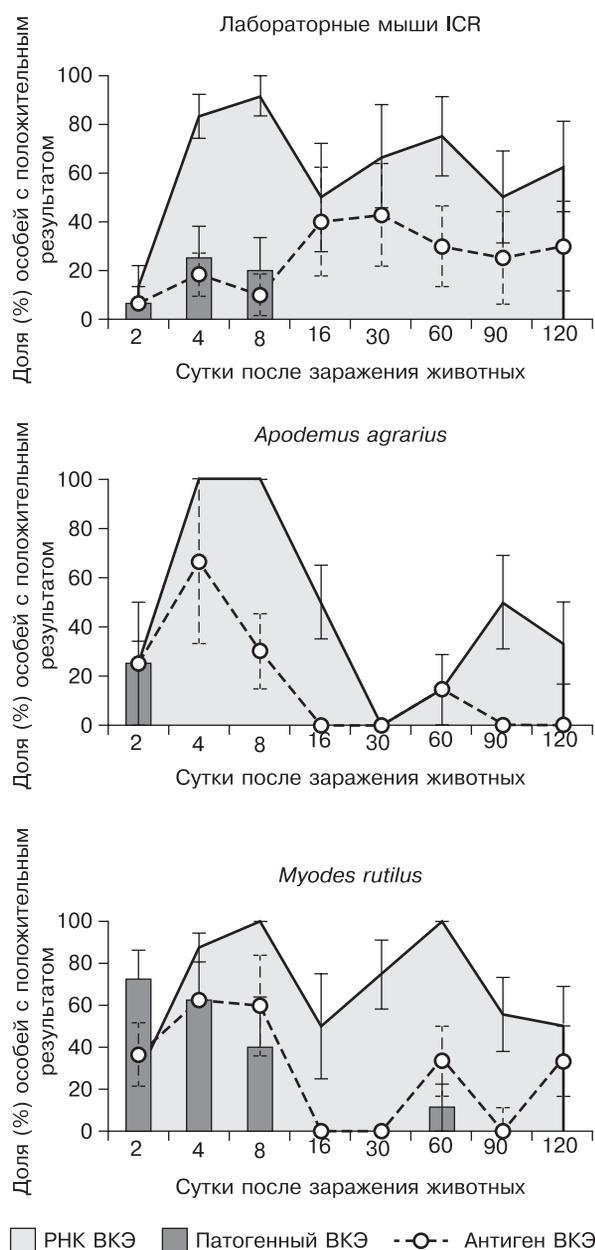


Рис. 1. Частоты детекции РНК, белка Е и патогенного ВКЭ в крови диких и лабораторных мелких грызунов после заражения вирусосодержащей клещевой суспензией.

сле свертывания 100 мкл крови мышей, с электрофоретической детекцией продуктов реакций, как описано ранее [12].

Вирусспецифичные антитела в крови животных определяли с помощью реакции торможения геммагглютинации (РТГА) с гусиными эритроцитами [13] и реакции биологической нейтрализации (РН) [14] с использованием мышей ICR массой 8—10 г, разведения сывороток 1:10 и 100 LD₅₀ штамма ВКЭ 2689 (номер доступа в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) JQ693478).

Статистическое сравнение выборочных долей и абсолютных количеств проводили с использованием критерия Стьюдента, принят уровень значимости различий $p < 0,05$. В тексте и таблицах для выборочных долей приведены ошибки репрезентативности [15].

Работу с инфекционным ВКЭ и потенциально опасным материалом выполняли в лаборатории, аттестован-

Таблица 1

Усредненные частоты детекции РНК ВКЭ в пробах крови мелких грызунов в ранний и поздний периоды инфекции после дозированного заражения вирусофорной клещевой суспензией

Вид животных	Частоты детекции РНК ВКЭ в крови, %	
	ранний период (2—16 сут)	поздний период (1—4 мес)
Лабораторные мыши ICR	52,4 ± 6,3	56,7 ± 9,2
Красная полевка	61,8 ± 5,6	70,6 ± 7,9
Полевая мышь	70,0 ± 6,0*	26,7 ± 8,2*

Примечание. * — статистически значимые различия ($p < 0,001$) между частотами детекции РНК ВКЭ у полевой мыши в ранний и поздний периоды.

ной для работы с патогенами II группы опасности для человека Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Лицензия № 77.99.18.001.Л.000032.03.08 от 05.03.08).

Содержание, кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Результаты

Подкожное дозированное заражение красной полевки *M. rutilus* и полевой мыши *A. agrarius* смесью суспензий клещей, спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным типами ВКЭ, проводили для моделирования персистенции ВКЭ у адаптированных резервуарных хозяев [10]. Контрольная группа включала неадаптированных к вирусу лабораторных мышей ICR. После заражения у животных не отмечали клинических проявлений КЭ в течение всего периода наблюдений. Однако в крови большинства инфицированных грызунов были выявлены вирусная РНК посредством ОТ-ПЦР-РВ и антиген ВКЭ (титры до 1:20 в ИФА) (рис. 1).

При этом у лабораторных мышей ICR и красных полевок частоты детекции вирусной РНК оставались высокими в ранний и поздний периоды инфекции, составляя в среднем у мышей ICR $52,4 \pm 6,3$ и $56,7 \pm 9,2\%$ соответственно, у красной полевки — $61,8 \pm 5,6$ и $70,6 \pm 7,9\%$ особой соответственно. У полевой мыши в отличие от красной полевки и мышей ICR в поздний период отмечено значимое ($p < 0,001$) снижение доли образцов, содержащих РНК ВКЭ, — от $70 \pm 6,0\%$ в ранний период до $26,7 \pm 9,2\%$ — в поздний (табл. 1).

Количественные оценки вирусных нагрузок на основании величин пороговых циклов в ОТ-ПЦР-РВ показали, что у лабораторных мышей ICR максимальные значения достигали $2,5 \cdot 10^5$ геномов ВКЭ в 1 мл крови через 2—4 сут после заражения и постепенно снижались до 100 копий РНК в 1 мл к 16-му дню инфекции. Вирусные нагрузки в крови диких грызунов до $5,7 \cdot 10^9$ геном-эквивалентов в 1 мл через 2 сут и от 100 до $3,1 \cdot 10^7$ геном-эквивалентов в 1 мл на протяжении 4 мес экспериментальной инфекции без признаков заболевания значительно превышали ($p < 0,001$) значения для лабораторных животных, что может быть следствием взаимной адаптации ВКЭ и диких мелких грызунов.

Патогенный для лабораторных мышей-сосунков вирус выделяли из крови всех видов грызунов преимущественно в ранней стадии инфекции до 8 сут после заражения (см. рис. 1): у красной полевки — в $66,6 \pm 5,6\%$ проб (на 2, 8 и 60-е сутки), у полевой мыши — в $15 \pm 7,4\%$ проб и только на 2-е сутки, у ICR — в $16,2 \pm 6,1\%$. При этом инфекционные титры вируса (для мышей ICR массой 8—10 г при внутримозговом заражении) достигали в образцах красной полевки $5,5 \lg LD_{50}$, а у полевой мыши — менее $2 \lg LD_{50}$.

Частота экспрессии генов Th1-цитокинов до заражения составляла у полевой мыши $33,3 \pm 11,4\%$, у красной полевки значимо ($p < 0,05$) меньше — $6,3 \pm 6,3\%$ (рис. 2, а). Через 2 сут после заражения суммарная частота детекции мРНК ИФН- γ , ФНО α и ИЛ-12, обеспечивающих развитие преимущественно клеточного иммунного ответа, у полевой мыши возрастала до $50 \pm 15,1\%$ ($p > 0,05$), у красной полевки — до $56,3 \pm 12,8\%$ ($p < 0,05$). В поздней стадии (через 2 мес после заражения) частота экспрессии генов Th1-цитокинов снизилась у красной полевки до $22,2 \pm 5,0\%$ ($p < 0,05$), у полевой мыши — до $38,1 \pm 7,6\%$ ($p > 0,05$) (см. рис. 2, а). При этом у последней выявлено статистически значимое

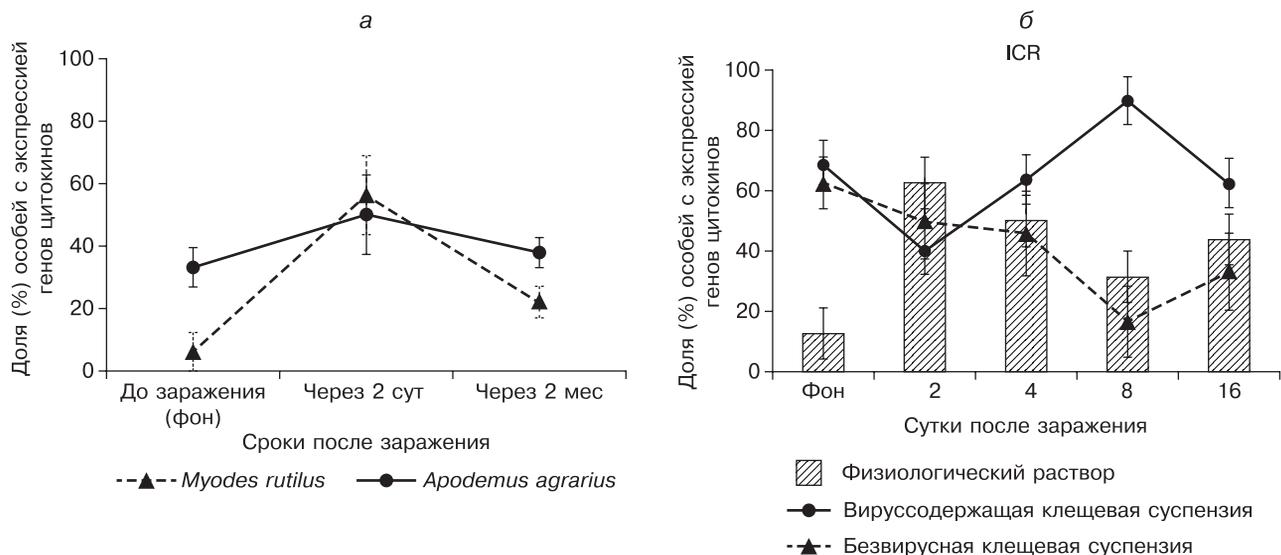


Рис. 2. Динамика частот экспрессии генов цитокинов Th1-пути: у двух видов диких грызунов после введения смеси клещевых суспензий, содержащих ВКЭ (а); у лабораторных мышей ICR после введения физиологического раствора или клещевых суспензий, содержащих и не содержащих ВКЭ (б).

Таблица 2

Экспрессия генов цитокинов у диких грызунов через 60 сут после дозированного заражения клещевой суспензией, содержащей ВКЭ

Вид животных	Частоты детекции РНК цитокинов в крови, %						
	Th1-путь — цитокины преимущественно клеточного иммунного ответа				Th2-путь — цитокины преимущественно гуморального иммунного ответа		
	ИЛ-1β	ИЛ-12	ИФН-γ	всего**	ИЛ-4	ИЛ-10	всего**
<i>Myodes rutilus</i>	22,2 ± 10,1*	22,2 ± 10,1	22,2 ± 10,1	22,2 ± 5,0	22,2 ± 10,1	77,8 ± 10,1	50,0 ± 8,5
<i>Apodemus agrarius</i>	57,1 ± 13,7*	28,6 ± 12,5	28,6 ± 12,5	38,1 ± 7,6	28,6 ± 12,5	71,4 ± 12,5	50,0 ± 9,6

Примечание. * — статистически значимые ($p < 0,05$) различия между частотой детекции ИЛ-1β у красной полевки и полевой мыши; ** — усредненное количество положительных результатов для цитокинов клеточного или гуморального иммунного ответа.

($p < 0,05$) превалирование доли особей с экспрессией гена ИЛ-1β (табл. 2).

Частоты экспрессии генов Th2-цитокинов, обеспечивающих развитие преимущественно гуморального иммунного ответа, были статистически сходными у разных видов диких мелких грызунов на протяжении всего периода наблюдений, составляя до заражения у полевой мыши $62,5 \pm 12,5\%$ особей, у красной полевки — $40,9 \pm 10,7\%$, через 2 мес после заражения у красной полевки — $50 \pm 8,5\%$, у полевой мыши — $50 \pm 9,6\%$ (см. табл. 2).

Экспрессию генов цитокинов у лабораторных мышей ICR исследовали в ранний период после подкожного введения вирусосодержащей и безвирусной клещевых суспензий спонтанно инфицированных клещей, а также физиологического раствора (рис. 2, б). Различия частот определения РНК цитокинов преимущественно клеточного иммунитета у лабораторных и диких грызунов после введения вирусосодержащей суспензии состояли в их активации у диких грызунов через 2 сут инфекции и, напротив, относительном ингибировании у мышей ICR (см. рис. 2, а, б). Показана супрессия генов цитокинов клещевыми суспензиями без ВКЭ в ранних стадиях инфекции до 8 сут после заражения с возможным подавлением специфического клеточного иммунитета, что необходимо для формирования последующей персистенции ВКЭ. При этом снижение частот детекции цитокинов после введения вирусосодержащей суспензии было более кратковременным — до 2 сут. Необходимо отметить сходное увеличение частот детекции цитокинов Th1-пути через 2 сут у лабораторных мышей после введения физиологического раствора и у диких грызунов после заражения вирусосодержащими клещевыми суспензиями с последующим снижением до фоновых значений (см. рис. 2, а, б), что могло быть обусловлено адаптированностью резервуарных хозяев к ВКЭ. Для противовоспалительных регуляторных интерлейкинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) отмечена одновременная активация без иммуносупрессии с максимумом через 4 дня после заражения и последующим снижением до фоновых значений через 16 сут инфекции, что, возможно, обеспечивало последующую индукцию гуморального иммунитета [16—18]. Таким образом, в ранней стадии инфекции лабораторных мышей клещевыми суспензиями, содержащими ВКЭ, происходила индукция транскрипции РНК цитокинов преимущественно гуморального иммунитета

с подавлением экспрессии генов цитокинов Th1.

Вируснейтрализующие антитела у всех видов мелких грызунов, антигемагглютинины к ВКЭ у диких животных были обнаружены через 30 сут и оставались в детектируемых количествах до 4 мес инфекции (рис. 3). В отличие от диких зверьков у мышей ICR антигемагглютинины появились раньше — на 8-е сутки. Средняя геометрическая титров антигемагглютининов для серопозитивных особей за весь период составляла у красной полевки 54, у полевой мыши — 23,8, у мышей ICR через 8—16 сут — 61.

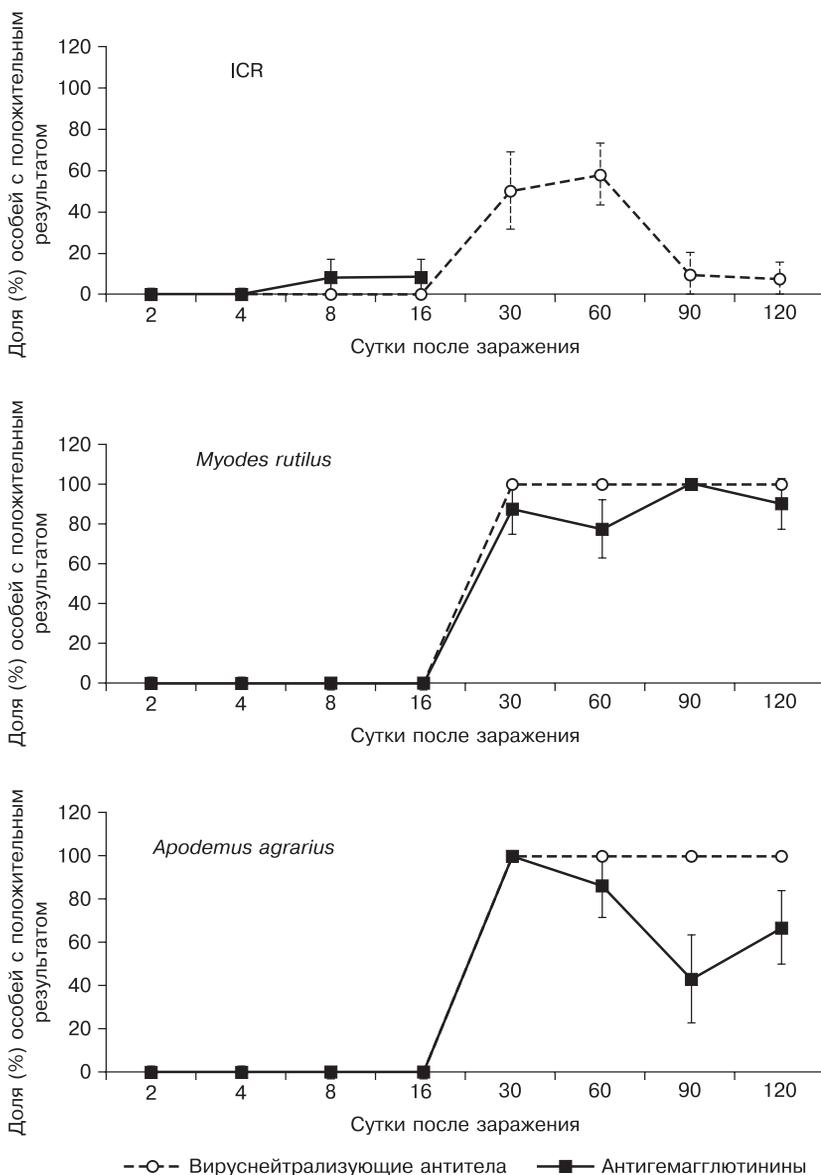


Рис. 3. Частоты выявления вируснейтрализующих и подавляющих гемагглютинацию антител к ВКЭ у мелких грызунов после заражения вирусосодержащими клещевыми суспензиями.

Антигемагглютинины у мышей ICR в период 30—120 сут после заражения не исследовали.

Обсуждение

Моделирование персистентной инфекции у лабораторных мышей и массовых видов диких грызунов — основных прокормителей преимагинальных фаз иксодовых клещей — красной полевки *M. rutilus* и полевой мыши *A. agrarius* [8—10] осуществляли посредством дозированного подкожного заражения смесью суспензий спонтанно инфицированных клещей двух видов, доминирующих на исследуемой территории, — *Ixodes persulcatus* P. Schulze, 1930, и *Ixodes pavlovskyi* Pomerantsev, 1946 (со значительным превалярованием ($p < 0,001$) доли последнего — в среднем $70,8 \pm 0,7\%$) [10], спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным генетическими типами ВКЭ.

Заражение животных смесью генетических типов ВКЭ обусловлено высокими частотами смешанных инфекций у клещей и млекопитающих на территории Новосибирской области [10, 19]. Доза заражения $2,9 \lg LD_{50}$ ВКЭ соответствовала инфекционным титрам ВКЭ у имаго иксодовых клещей при спонтанном инфицировании в природной популяции [10]. Применение комплекса высокочувствительных и специфичных молекулярно-биологических и вирусологических методов позволило выявить РНК и белок Е ВКЭ у большинства инфицированных диких и лабораторных грызунов в течение 4 мес при отсутствии признаков КЭ (учащенное дыхание, тремор конечностей, спазмы, парезы и параличи с летальными исходами через несколько часов), а патогенный для лабораторных мышей-сосунков ВКЭ — преимущественно на ранних стадиях инфекции до 8 сут после заражения. Вирусные нагрузки у диких грызунов через 2 сут после экспериментального заражения превышали средние количества ВКЭ при спонтанном вирусносительстве у диких грызунов [10] и экспериментальной инфекции лабораторных мышей. Ранее [20] у большинства особей красной полевки и полевой мыши через 2—3 сут после экспериментального подкожного заражения ВКЭ определяли эпизоотически значимую вирусемию с титрами $3 \lg LD_{50,0,03}$ и более [21] для лабораторных мышей. При этом у красной полевки такой уровень вирусемии развивался при инфекции высоко- и умеренновирulentными штаммами (титры при подкожном заражении мышей 7 и $5,2 \lg LD_{50}$ соответственно), у полевой мыши — умеренно- и слабовирulentными штаммами (титры 5,2 и $3,5 \lg LD_{50}$ соответственно). В совокупности данные подтверждают роль красной полевки и полевой мыши как резервуарных, а не индикаторных хозяев ВКЭ, несмотря на существенные различия в частотах вирусносительства, вызванные, возможно, их приуроченностью к разным биотопам [8—10, 19], — в природных популяциях красная полевка, как и иксодовые клещи, обитает в лесных биотопах, а полевая мышь — на более открытых пространствах [8] с меньшей численностью таежного клеща, для развития которого необходима влажность лесной подстилки. Пониженные частоты вирусносительства у полевой мыши по сравнению с красной полевкой как в эксперименте на поздних стадиях персистенции (см. табл. 1 и рис. 1), так и в естественных условиях в природных популяциях [9, 10, 19] могут быть обусловлены различиями врожденной резистентности. Иммуная реактивность *A. agrarius* также была выше по сравнению с *M. rutilus* [22, 23].

До заражения и после 2 мес персистенции ВКЭ частоты детекции мРНК цитокинов Т-хелперного ответа 1-го типа у полевой мыши превышали таковые у красной полевки при сходных уровнях экспрессии генов цитокинов Th2-пути. Статистически значимое ($p < 0,05$) превалярование доли особей с экспрессией гена ИЛ-1 β , возможно, обусловило пониженные частоты вирусносительства у полевой мыши по сравнению с красной полевкой в период персистенции как в эксперименте (см. табл. 1 и рис. 1), так и в естественных условиях у спонтанно инфицированных зверьков [9, 10, 19]. Подавление экспрессии генов цитокинов смесью безвирус-

ных клещевых суспензий (см. рис. 2, б), возможно, обусловлено иммуносупрессивными свойствами слюны клещей [24]. Различия в динамике изменения частот детекции РНК цитокинов при введении смеси клещевых суспензий, содержащих и не содержащих ВКЭ, могли быть вызваны разведением вирусосодержащей смеси в 5 раз физиологическим раствором для достижения наиболее распространенных в природных популяциях титров вируса.

Персистенция ВКЭ у мелких грызунов происходила после индукции экспрессии генов ИЛ-4 и ИЛ-10 Th2-пути преимущественно гуморального иммунного ответа в присутствии вируснейтрализующих и ингибирующих гемагглютинацию антител, возможно, вследствие внутриклеточной локализации адаптированного к грызунам вируса, а также внеклеточной секреции и циркуляции антител.

Заключение

При экспериментальном моделировании персистенции ВКЭ посредством подкожного заражения диких мелких грызунов смесью суспензий клещей, спонтанно инфицированных сибирским и дальневосточным типами вируса, количественные оценки показали высокие вирусные нагрузки до 1000 вирусных частиц на ядерную клетку крови в присутствии специфических антител, что исключает ингибирование репликации геномных РНК или экспрессии генов ВКЭ. Поверхностный антиген Е ВКЭ и вирусспецифические антитела способны к перекрестным иммунологическим реакциям в тест-системах с моноклональными антителами и эталонными штаммами вируса соответственно [9], что может свидетельствовать о конформационной стабильности вирусных антигенов. Следовательно, в качестве возможного механизма персистенции ВКЭ у диких и лабораторных грызунов остается принять третий из вышеперечисленных способов [1] — вирусопосредованное модулирование иммунного ответа, о чем свидетельствовал дисбаланс провоспалительных цитокинов и, следовательно, возможные нарушения клеточного иммунитета.

Финансирование. Исследования выполнены при финансовой поддержке грантов № 83, 135, интеграционных программ Сибирского отделения РАН и Федеральных программ фундаментальных научных исследований 2013-2020 (VI.51.1.5).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 9, 13, 18 см. REFERENCES)

- Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. *Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами*. М.: Наука; 2013.
- Верета Л.А. *Иммунология клещевого энцефалита по материалам экспериментальных и клинико-эпидемиологических исследований в очагах Приамурья*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. М.: 1969.
- Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. *Хронический клещевой энцефалит*. Новосибирск: Наука; 1986.
- Бахвалова В.Н., Панов В.В., Потапова О.Ф., Матвеева В.А., Матвеев Л.Э., Морозова О.В. Персистенция вируса клещевого энцефалита в организме диких мелких млекопитающих и в культурах перmissiveклеток. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2007; (11): 79-86.
- Филиппова Н.А. Систематика и эволюция. В кн. Филиппова Н.А., ред. *Таежный клещ Ixodes persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): морфология, систематика, экология, медицинское значение*. Ленинград: Наука; 1985: 97-187.
- Панов В.В. Мелкие млекопитающие лесопарковой зоны ННЦ — прокормители преимагинальных фаз таежного клеща. В кн: Власов В.В., Репин В.Е., ред. *Инфекции, передаваемые клещами в сибирском регионе*. Новосибирск: Сибирское отделение Российской академии наук; 2011: 35-50.
- Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Панов В.В., Глухов В.В., Морозова О.В. Биоразнообразие вируса клещевого энцефалита в иксодовых клещах и мелких млекопитающих на территории Новосибирской обл. *Инфекционные болезни*. 2015; 13(4): 15-21.

11. Морозова О.В., Гришечкин А.Е., Бахвалова В.Н., Исаева Е.И., Подчерняева Р.Я. Динамика репродукции вируса клещевого энцефалита в культурах клеток. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(2): 40-3.
12. Морозова О.В., Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Потапова О.Ф., Исаева Е.И. Сравнение экспрессии генов цитокинов у мышей, иммунизированных или зараженных вирусом клещевого энцефалита. В кн. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Интерферон – 2011. Сборник научных статей к 80-летию академика РАНН Ф.И. Ершова*. М.: 2012: 461-5.
14. Дерябин П.Г., Лебедева Г.А., Логинова Н.В. Реакция нейтрализации тогавирусов на мышцах и культурах клеток. В кн.: Гайдамович С.Я., ред. *Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований)*. М.: Наука; 1986: 120-6.
15. Лакин Г.Ф. *Биометрия*. М.: Высшая школа; 1980.
16. Сартакова М.Л., Коненков В.И. Структурные основы межклеточных взаимодействий в процессе представления антигена Т-лимфоцитам: молекулы главного комплекса гистосовместимости, как одна из составляющих частей тримолекулярного комплекса. *Успехи современной биологии*. 1997; 117(5): 568-83.
17. Игнат'ев Г.М., Отрашевская Е.В., Воробьева М.С. Активность цитокинов при иммунизации вакциной против клещевого энцефалита в эксперименте. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(2): 22-5.
19. Бахвалова В.Н., Чичерина Г.С., Панов В.В., Глупов В.В., Морозова О.В. Распределение генетических типов вируса клещевого энцефалита среди спонтанно инфицированных иксодовых клещей и мелких млекопитающих на территории Новосибирской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2015; 20(4): 26-34.
20. Бахвалова В.Н. *Эпизоотическое состояние природного очага клещевого энцефалита и особенности вирусной популяции в лесостепном Приобье (Западная Сибирь)*. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Кольцово; 1995.
21. Чунихин С.П. Экспериментальные исследования по экологии вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35(3): 183-8.
22. Мак В.В., Панов В.В., Добротворский А.К., Мошкин М.П. Соприженная изменчивость иммунореактивности и агрессивности у самцов красной полевки (*Clethrionomys rutilus*) и полевой мыши (*Apodemus agrarius*). *Зоологический журнал*. 2002; 81(10): 1260-4.
23. Москвитина Н.С., Кравченко Л.Б., Мак В.В., Добротворский А.К., Панов В.В., Андреевских А.В. и др. Иммунореактивность разных демографических групп в городских популяциях полевой мыши *Apodemus agrarius* (Rodentia, Muridae). *Зоологический журнал*. 2004; 83(4): 480-6.
24. Балашов Ю.С. Роль слюнных желез иксодовых клещей (Ixodidae) в регуляции процесса питания. *Паразитология*. 1994; 28(6): 437-44.
- систематика, экология, медицинское значение*]. Leningrad: Nauka; 1985: 97-187. (in Russian)
8. Panov V.V. Small mammals of forest-park zone of Novosibirsk Scientific center – hosts of immature taiga. In: Vlasov V.V., Repin V.E., eds. *Tick-Borne Infections in Siberian Region [Infektsii, peredavayemye kleshchami v sibirskom regione]*. Novosibirsk: Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 2011: 35-50. (in Russian)
9. Bakhvalova V.N., Dobrotvorsky A.K., Panov V.V., Matveeva V.A., Tkachev S.E., Morozova O.V. Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the South-Eastern part of Western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006; 6(1): 32-41.
10. Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Panov V.V., Glupov V.V., Morozova O.V. Biodiversity of tick-borne encephalitis virus in ixodid ticks and small mammals in Novosibirsk region. *Infektsionnyye bolezni*. 2015; 13(4): 15-21. (in Russian)
11. Morozova O.V., Grishechkin A.E., Bakhvalova V.N., Isaeva E.I., Podchernyaeva R.Ya. Dynamics of reproduction of tick-borne encephalitis virus in tissue cultures. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(2): 40-3. (in Russian)
12. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Potapova O.F., Isaeva E.I. Comparison of cytokine gene expression in mice immunized or infected with tick-borne encephalitis virus. In: Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Interferon – 2011. Digest of scientific articles for 80th anniversary of Academician of the Russian Academy of Medical Sciences F.I. Ershov [Interferon – 2011. Sbornik nauchnykh statey k 80-letiyu akademika RAMN F.I. Ershova]*. Moscow; 2012: 461-5. (in Russian)
13. Clarke D.H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1958; 7(5): 561-73.
14. Deryabin P.G., Lebedeva G.A., Loginova N.V. Neutralization reaction of togaviruses in mice and tissue cultures. In: Gaydamovich S.Ya., ed. *Arboviruses (methods of laboratory and field research)*. Moscow: Nauka; 1986: 120-6. (in Russian)
15. Lakin G.F. *Biometria [Biometriya]*. Moscow: Vysshaya shkola; 1980. (in Russian)
16. Sartakova M.L., Konenkov V.I. Structural bases of intercellular interactions in the process of presentation of antigens to T-lymphocytes: molecules of major histocompatibility complex as one from constituting parts of trimolecular complex. *Uspokhi sovremennoy biologii*. 1997; 117(5): 568-83. (in Russian)
17. Ignat'ev G.M., Otrashvskaya E.V., Vorob'eva M.S. Activity of cytokines during immunization with the vaccine against tick-borne encephalitis in experiment. *Voprosy virusologii*. 2003; 48(2): 22-5. (in Russian)
18. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 8): 1781-94.
19. Bakhvalova V.N., Chicherina G.S., Panov V.V., Glupov V.V., Morozova O.V. Distribution of tick-borne encephalitis virus genetic subtypes among spontaneously infected ixodid ticks and small mammals in Novosibirsk region. *Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni*. 2015; 20(4): 26-34. (in Russian)
20. Bakhvalova V.N. *Epizootic status of natural focus of tick-borne encephalitis and features of the viral population in forest-steppe Ob region (Western Siberia)*: Diss. Kol'tsovo; 1995. (in Russian)
21. Chunikhin S.P. Experimental studies of tick-borne encephalitis virus ecology. *Voprosy virusologii*. 1990; 35(3): 183-8. (in Russian)
22. Mak V.V., Panov V.V., Dobrotvorskiy A.K., Moshkin M.P. Correlated variability of immunoreactivity and aggression of red vole (*Clethrionomys rutilus*) males and field mice (*Apodemus agrarius*). *Zoologicheskii zhurnal*. 2002; 81(10): 1260-4. (in Russian)
23. Moskvitina N.S., Kravchenko L.B., Mak V.V., Dobrotvorskiy A.K., Panov V.V., Andreevskikh A.V., et al. Immunoreactivity of different demographic groups in urban populations of field mice, *Apodemus agrarius* (Rodentia, Muridae). *Zoologicheskii zhurnal*. 2004; 83(4): 480-6. (in Russian)
24. Balashov Yu.S. The role of salivary glands of ixodid ticks (Ixodidae) in the regulation of feeding process. *Parazitologiya*. 1994; 28(6): 437-44. (in Russian)

REFERENCES

1. Brian T.D. *Viruses and the Cellular Immune Response*. New York: Marcel Dekker; 1993.
2. Donoso Mantke O., Karan L.S., Růžek D. Tick-borne encephalitis viruses: a general overview. In: Růžek D., ed. *Flavivirus Encephalitis*. Rijeka: InTech; 2011: 133-56.
3. Korenberg E.I., Pomelova V.G., Osin N.S. *Natural-focus Tick-borne Infections [Prirodnoochagovye infektsii, peredayushchiesya iksodovymi kleshchami]*. Moscow: Nauka; 2013. (in Russian)
4. Vereta L.A. *Immunology of tick-borne encephalitis based on data of experimental and clinic-epidemiological research in natural foci of Amur region*: Diss. Moscow: 1969. (in Russian)
5. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. *Chronic Tick-borne Encephalitis [Khronicheskiy kleshchevoy entsefalit]*. Novosibirsk: Nauka; 1986 (in Russian)
6. Bakhvalova V.N., Panov V.V., Potapova O.F., Matveeva V.A., Matveev L.E., Morozova O.V. Persistence of tick-borne encephalitis virus in organisms of wild small mammals and in permissive tissue cultures. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2007; (11): 79-86. (in Russian)
7. Filippova N.A. Systematics and evolution. In: Filippova N.A., ed. *Taiga Tick Ixodes Persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): Morphology, Systematics, Ecology, Medical Importance [Taezhnyy kleshch Ixodes persulcatus Schulze (Acarina, Ixodidae): morfologiya,*