

**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*  
Тел.: +7-495-150-07-47 доб. 402  
E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел. +7-495-150-07-47 доб. 101  
E-mail: info@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

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

Редактор *Е.П. Мороз*  
Технический редактор  
*Л.В. Зюкина*  
Корректор *В.С. Смирнова*  
Верстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 03.10.2017.  
Подписано в печать 09.11.2017.  
Формат 60 × 88%.  
Печать офсетная.  
Печ. л. 6,00.  
Усл. печ. л. 5,88.  
Уч.-изд. л. 6,36.  
Заказ 170956.

Отпечатано в типографии ООО  
«Подольская Периодика»,  
142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15  
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2017.  
Т. 62. № 6. 241-288

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.

**6**

**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.б.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 А.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)

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
**VOPROSY VIROSOLOGII**

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

**Volume 62 • 6 • 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.** – Sc.D., 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)



Izdatel'stvo Meditsina

## СОДЕРЖАНИЕ

### ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

50 лет Научно-исследовательскому институту гриппа 245

### ОБЗОРЫ

**Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А., Цветков В.Б., Клотченко С.А.** Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека . . . . . 246

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В., Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А., Васин А.В.** Сравнение эффективности ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами . . . . . 259

**Сергеева М.В., Пулькина А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Комиссаров А.Б., Кучур О.А., Егоров А.Ю., Цыбалова Л.М., Стукова М.А.** Безопасность и иммуногенность холодоадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis* . . . . . 266

**Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Соминина А.А.** Генетическая и антигенная характеристика штаммов респираторно-синцитиального вируса, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. . . . . 273

**Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н.И.** Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих Северо-Западного региона. . . . . 283

### РЕЦЕНЗИИ

**Урываев Л.В.** Рецензия на книгу А.В. Кравченко, Г.А. Галегова, В.Г. Канестри «Фосфазид» . . . . . 287

**Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2017 г.** . . . . . 288

## CONTENTS

### ANNIVERSARIES

50 years the Research Institute of Influenza

### REVIEWS

**Vasin A.V., Petrova-Brodskaya A.V., Plotnikova M.A., Tsvetkov V.B., Klotchenko S.A.** Evolutionary dynamics of structural and functional domains of influenza A virus NS1 protein

### ORIGINAL RESEARCH

**Petrova-Brodskaya A.V., Bondarenko A.B., Timin A.S., Plotnikova M.A., Afanas'ev M.V., Semenova A.A., Lebedev K.I., Gorshkov A.N., Gorshkova M.Yu., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Vasin A.V.** Comparison of influenza A virus inhibition *in vitro* by siRNA complexes with chitosan derivatives, polyethyleneimine and hybrid polyarginine-inorganic microcapsules

**Sergeeva M.V., Pulkina A.A., Vasiliev K.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Komissarov A.B., Kuchur O.A., Egorov A.Yu., Tsybalova L.M., Stukova M.A.** Safety and immunogenicity of cold-adapted recombinant influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of *M. tuberculosis*

**Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A.** Genetic and antigenic characteristics of respiratory syncytial virus strains isolated in St. Petersburg in 2013-2016

**Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Egorova A.A., Musaeva T.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Lvov N.I.** Genetic diversity of adenoviruses circulating among the military in the North-West region

### BOOK REVIEWS

**Uryvaev L.V.** – Phosphazid. By A.V. Kravchenko, G.A. Galegov, V.G. Kanestri

**Index of articles published in 2017**

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

## Юбилейные даты

### 50 лет Научно-исследовательскому институту гриппа

Научно-исследовательский институт гриппа был создан в 1967 г. как головное научное учреждение Министерства здравоохранения СССР по проблеме «Грипп и гриппоподобные заболевания» для проведения исследований в области вирусологии, иммунологии, эпидемиологии гриппа и других острых вирусных инфекций, а также разработки средств их профилактики и лечения. Основателем и первым директором Института был академик АМН СССР А.А. Смородинцев, выдающийся учёный, один из основателей школы отечественных вирусологов. В дальнейшем Институтом руководили проф. М.П. Зыков (1973—1976) и проф. Г.И. Карпухин (1976—1988). С 1988 по 2015 г. директором Института был академик РАН О.И. Киселёв, ведущий специалист в области биохимии и молекулярной биологии вирусов. С 2016 г. Институт возглавляет ученик академика О.И. Киселёва Андрей Владимирович Васин.

За годы работы Института его сотрудники внесли существенный вклад в решение фундаментальных и прикладных задач в области эволюционной изменчивости вирусов гриппа (проф. Т.Я. Лузянина, проф. Д.Б. Голубев), противовирусного иммунитета (проф. Р.Я. Поляк, проф. Я.С. Шварцман), создания средств диагностики вирусных инфекций (проф. А.А. Сомнина, д-р мед. наук Э.П. Корнеева, канд. мед. наук Л.Е. Камфорин), изучения молекулярных основ аттенуации вирусов и получения первых реассортантных вакцин (проф. Г.И. Александрова). В клиниках Института были обоснованы новые подходы к этиотропной и патогенетической терапии тяжёлых и осложнённых форм гриппа и ОРВИ (проф. П.Д. Старшов, проф. Д.М. Злыдников). Серьёзные заслуги Институт имеет в создании и изучении механизмов действия лечебных и профилактических препаратов (проф. В.И. Ильенко, канд. мед. наук В.Г. Платонов). Противовирусные препараты, разработанные или прошедшие клиническую апробацию в НИИ гриппа, широко используются в клинической практике.

Интенсивно велись разработки и всестороннее изучение инактивированных и живых отечественных противогриппозных вакцин (проф. А.С. Шадрин, проф. Л.Г. Руденко, канд. мед. наук Р.И. Васильева, проф. В.П. Дринецкий).

В НИИ гриппа была научно обоснована система эпидемиологического и этиологического надзора за гриппом в СССР, позволяющая прогнозировать развитие эпидемий на территории страны и проводить своевременные профилактические и противоэпидемические мероприятия (проф. Ю.Г. Иванников, д-р мед. наук И.Г. Маринич). В конце 60-х годов XX века СССР вошел в систему глобального надзора за гриппом под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). Институт работает в этой системе с 1971 г., выполняя функции Национального центра ВОЗ (НЦГ) и Федерального центра по гриппу (ФЦГ). Система интегрирована в Европейскую систему наблюдения (EISS).

В Институте собрана богатейшая музейная коллекция вирусов гриппа и других ОРВИ. Коллекция представлена эталонными и эпидемическими вирусами гриппа А, В и С, выделенными с 30-х годов прошлого века по настоящее время, а также адено-, корона-, РС-вирусами, вирусами герпеса и парагриппа. Всего музей насчитывает более 50 000 единиц хранения и включает более 7 000 различных штаммов вируса гриппа и ОРВИ. В 2015 г. коллекция вирусов НИИ гриппа вошла в качестве полноправного члена в проект «Глобальный Европейский вирусный архив» (EVAg).

Большая работа была проведена сотрудниками Института в период угрозы распространения высокопатогенного вируса гриппа птиц А (H5N1) и в период развития пандемии, вызванной вирусом гриппа А (H1N1)pdm09. Изучены антигенные и биологические свойства этих вирусов, определена первичная нуклеотидная последовательность полноразмерных геномов, чувствительность к противовирусным препаратам, разработан ряд диагностических препаратов на их основе, в том числе олигонуклеотидные микрочипы. Были подготовлены кандидаты в вакцинные штаммы и проведены клинические испытания пандемических вакцин. Разработан Национальный план подготовки к пандемии гриппа.

Появление новых технологий и методов открывает перспективу развития фундаментальных и прикладных научных исследований. В настоящее время в Институте ведется конструирование новых химиопрепаратов, проводятся исследования молекулярных механизмов их действия, разрабатываются генно-инженерные вакцины, диагностические препараты нового поколения.

На базе Института работает Комиссия по гриппозным вакцинным и диагностическим штаммам Минздрава России, одной из задач которой является определение штаммового состава гриппозных вакцин и диагностических препаратов для России с учётом рекомендаций ВОЗ.

При НИИ гриппа работает Диссертационный совет по специальности «Вирусология» (03.02.02) — медицинские и биологические науки по защитам докторских и кандидатских диссертаций, а также объединённый Диссертационный совет по специальности «Эпидемиология» (14.02.02).

Институт сотрудничает со многими научными и учебными заведениями России и зарубежных стран и является одним из ведущих вирусологических центров нашей страны.

## ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1:578.1

*Васин А.В.<sup>1,2</sup>, Петрова-Бродская А.В.<sup>1,2</sup>, Плотникова М.А.<sup>1</sup>, Цветков В.Б.<sup>1,3,4</sup>, Клотченко С.А.<sup>1</sup>***ЭВОЛЮЦИОННАЯ ДИНАМИКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА NS1 ВИРУСОВ ГРИППА А ЧЕЛОВЕКА**<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;<sup>2</sup> ФГАО УВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;<sup>3</sup> ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева» РАН, 119991, г. Москва;<sup>4</sup> ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, 119435, г. Москва

Белок NS1 вируса гриппа А (ВГА) является одним из ключевых вирусных факторов, отвечающих за взаимодействие с клеткой-хозяином. NS1 противостоит системе клеточной противовирусной защиты, участвует в процессинге и экспорте клеточных мРНК, регулирует активность вирусной РНК-полимеразы и экспрессию вирусных генов, оказывает влияние на сигнальные системы клетки. Многочисленные функции NS1 осуществляются за счёт устоявшихся взаимодействий с клеточными факторами, число которых, по разным данным, превышает сотню. Примечательно, что только два сегмента генома ВГА человека — NS1 и NP — не подвергались реассортации и эволюционировали в процессе генетического дрейфа начиная с пандемии 1918 г. по настоящее время. Этот факт может свидетельствовать о важности NS1 и его многочисленных взаимодействий с клеточными факторами в межвидовой адаптации вируса. В обзоре представлены данные об эволюции белка NS1 ВГА человека и проведён анализ аминокислотных замен, произошедших в основных структурных и функциональных доменах белка NS1 в процессе эволюции.

Ключевые слова: *вирус гриппа А; неструктурный белок NS1; структурные и функциональные домены; взаимодействие вирус—хозяин; эволюционная динамика.*

*Для цитирования:* Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А., Цветков В.Б., Клотченко С.А. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(6): 246-258. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258>

**Vasin A.V.<sup>1,2</sup>, Petrova-Brodskaya A.V.<sup>1,2</sup>, Plotnikova M.A.<sup>1</sup>, Tsvetkov V.B.<sup>1,3,4</sup>, Klotchenko S.A.<sup>1</sup>  
EVOLUTIONARY DYNAMICS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL DOMAINS OF INFLUENZA A VIRUS NS1 PROTEIN**<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;<sup>3</sup> A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russian Federation;<sup>4</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435, Russian Federation

Influenza A virus (IAV) NS1 protein is one of the key viral factors responsible for virus-host interactions. NS1 counteracts host antiviral defense, participates in the processing and export of cellular mRNAs, regulates the activity of viral RNA polymerase and the expression of viral genes, and influences the cellular signaling systems. Multiple NS1 functions are carried out due to the interactions with cellular factors, the number of which exceeds one hundred. It is noteworthy that only two segments of IAV genome – NS and NP – did not undergo reassortment and evolved in the course of genetic drift, beginning with the pandemic of 1918 to the present. This fact may indicate the importance of NS1 and its numerous interactions with cellular factors in the interspecific adaptation of the virus. The review presents data on the evolution of the human IAV NS1 protein and analysis of the amino acid substitutions in the main structural and functional domains of NS1 protein during evolution.

Key words: *A virus; nonstructural protein NS1; structural and functional domains; virus-host interactions; evolutionary dynamics.*

*For citation:* Vasin A.V., Petrova-Brodskaya A.V., Plotnikova M.A., Tsvetkov V.B., Klotchenko S.A. Evolutionary dynamics of structural and functional domains of influenza A virus NS1 protein. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2017; 62(6): 246-258. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-246-258>

*For correspondence:* Andrey V. Vasin, Head of the Department of molecular biology of viruses, Director of the Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [influenza.spb@gmail.com](mailto:influenza.spb@gmail.com)

**Information about authors:**Vasin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-1391-7139>;Petrova-Brodskaya A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5130-3755>;Plotnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>;Tsvetkov V.B., <http://orcid.org/0000-0003-0494-3332>;Klotchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

**Acknowledgment.** This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00170) and the Russian Foundation for Basic Research (Grant No. 16-34-01110).

*Для корреспонденции:* Васин Андрей Владимирович, заведующий отделом молекулярной биологии вирусов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [influenza.spb@gmail.com](mailto:influenza.spb@gmail.com)

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

Received 18 August 2017  
Accepted 25 August 2017

**Введение**

Считается, что природным резервуаром вирусов гриппа А (ВГА) являются водоплавающие птицы, у которых встречаются вирусы, содержащие гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) большинства известных подтипов [1]. Несмотря на значительный прогресс в области молекулярной вирусологии, эпидемиологии и эволюции ВГА, фундаментальный вопрос о механизмах передачи вируса от птиц (или других хозяев) к человеку и их адаптации для циркуляции в популяции человека до сих пор остаётся без ответа. Наибольшее внимание с этой точки зрения уделяется поверхностному белку НА, определяющему вирусный подтип и отвечающему за связывание и вхождение вируса в клетку, а также субъединицам PB1, PB2 и PA полимеразного комплекса [2]. Вместе с тем в процессе адаптации к новому хозяину важную роль играют другие вирусные белки, в частности неструктурный белок NS1 [3]. Основная функция NS1 заключается в противостоянии интерферон-опосредованному механизму противовирусной защиты и взаимодействию со множеством клеточных факторов [4, 5]. В литературе имеются данные об аминокислотных заменах в NS1, которые усиливают патогенность штаммов ВГА разной видовой специфичности [6]. Например, усиление вирулентности вируса H1N1 человека, содержащего ген NS высокопатогенных ВГА птиц H5N1, связано с заменой E92D, обеспечивающей усиление устойчивости клеток к вирусу, индуцированной интерфероном [7]. Между тем значимость выявленных замен, связанных с увеличением вирулентности, для смены видовой специфичности вируса и адаптации к новому хозяину остается малопонятной [5, 6]. Несомненным является то, что при изучении роли NS1 как в патогенезе инфекции, так и в процессе межвидовой адаптации необходимо четко понимать молекулярно-генетические детерминанты патогенности и эволюционное происхождение NS1. В обзоре обобщены современные данные об эволюции белка NS1 ВГА человека, описаны его основные структурные и функциональные сайты и проведён анализ произошедших в них в процессе эволюции аминокислотных замен.

*Филогенетический анализ гена NS ВГА человека.*

На протяжении последнего столетия в популяции человека преимущественно циркулировали ВГА подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 [8, 9]. При этом появление вирусов каждого нового подтипа сопровождалось пандемиями в 1918, 1957, 1968, 1977 (псевдопандемия) и 2009 гг. [10]. Считается, что с 1510 г. произошло не менее 14 пандемий, вызванных ВГА [9]. При этом полные генетические последовательности известны только для ВГА, циркулировавших не ранее 1918 г., поэтому понимание вирусологической природы пандемий гриппа, происходящих до этого времени, сильно ограничено.

Общим предком для современных ВГА человека является вирус H1N1<sub>pdm1918</sub>, вызвавший пандемию «испанского гриппа», которая унесла жизни не менее 50 млн человек [8]. На рис. 1 представлена схема филогенетического дерева гена NS (области гена NS, соответствующей открытой рамке считывания белка NS1) ВГА человека и свиньи, отражающая современную модель его эволюции [11, 12]. Включение в анализ ВГА свиного происхождения связано с тем, что они филогенетически близки вирусам человека и вносят существенный вклад в появление новых вирусных подтипов в процессе реассортации генетических сегментов [13, 14].

Среди генов NS ВГА человека и свиньи выделяют две эволюционные линии. Первая, обозначенная как NS<sub>av\_ori</sub>, содержит вирусы, произошедшие от ВГА птиц. Вторая линия, обозначенная как NS<sub>pdm1918</sub>, соответствует ВГА

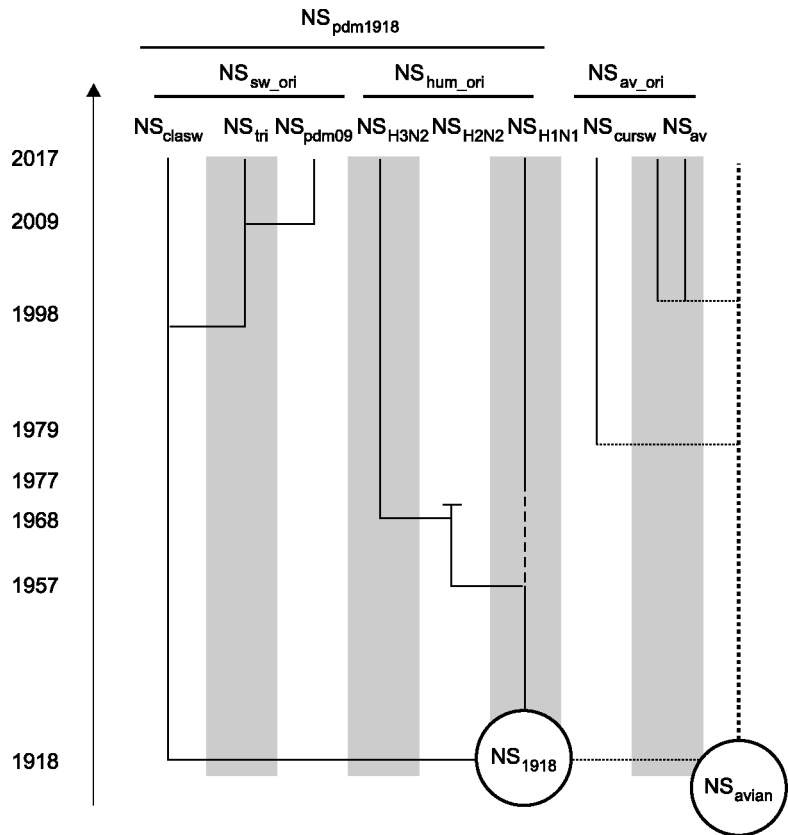


Рис. 1. Схема эволюции гена NS ВГА человека и свиньи с 1918 г. по настоящее время. NS<sub>av\_ori</sub> — NS1 пула ВГА птиц; NS<sub>1918</sub> — NS1 ВГА H1N1<sub>pdm1918</sub>; NS<sub>avian</sub> — NS1 ВГА H1N1 человека; NS<sub>H3N2</sub> — NS1 ВГА H2N2 человека; NS<sub>H2N2</sub> — NS1 ВГА H3N2 человека; NS<sub>H1N1</sub> — NS1 ВГА H1N1 человека; NS<sub>clasw</sub> — NS1 ВГА классической линии свиней; NS<sub>tri</sub> — NS1 тройного реассортантного ВГА свиней; NS<sub>pdm09</sub> — NS1 ВГА H1N1<sub>pdm09</sub> человека; NS<sub>sw\_ori</sub> — NS1 ВГА европейской линии свиней; NS<sub>hum\_ori</sub> — NS1 ВГА человека и свиньи подтипов H5, H7, H9 птичьего происхождения. Линии NSH1N1, NSH2N2 и NSH3N2 относятся к клейду NS<sub>hum\_ori</sub>; линии NS<sub>clasw</sub>, NS<sub>tri</sub> и NS<sub>pdm09</sub> — к клейду NS<sub>sw\_ori</sub>; линии NS<sub>cursw</sub> и NS<sub>av\_ori</sub> — к клейду NS<sub>av\_ori</sub>. Клейды NS<sub>sw\_ori</sub> и NS<sub>av\_ori</sub> объединены в общий клейд NS<sub>pdm1918</sub>, происходящий от гена NS<sub>1918</sub>. Чёрным цветом отмечены линии NS1 ВГА человека, серым — линии NS1 ВГА свиньи, линия NS1 ВГА птиц отмечена пунктиром.

человека и свиньи, ведущим свое эволюционное происхождение от гена NS<sub>1918</sub> вируса H1N1<sub>pdm1918</sub>. Этот вирус, с одной стороны, происходит из пула ВГА птиц (NS<sub>avian</sub>), с другой стороны, является предшественником подавляющего большинства современных ВГА человека [2, 8].

Внутри линии NS<sub>pdm1918</sub> наблюдается достоверное разделение на два клейда NS<sub>hum\_ori</sub> и NS<sub>sw\_ori</sub>, которые соответствуют сезонным ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2 (линии NS<sub>H1N1</sub>, NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> соответственно) и ВГА свиней классической линии, тройным реассортантным вирусам свиньи и пандемическим вирусам H1N1-<sub>pdm2009</sub> человека (линии NS<sub>clasw</sub>, NS<sub>tri</sub> и NS<sub>pdm09</sub> соответственно). Внутри линии NS<sub>av\_ori</sub> можно выделить ВГА свиней евразийской линии (NS<sub>eursw</sub>) и ВГА человека и свиней, происходящие от вирусов птиц подтипов H5, H7, H9 (NS<sub>av</sub>).

#### *Эволюционная динамика гена NS ВГА человека.*

Чтобы проследить эволюционную динамику гена NS ВГА человека, необходимо сопоставить данные его филогенетического анализа и эволюции самих вирусов [2]. Как было сказано ранее, вирусы H1N1<sub>pdm1918</sub> являются предшественниками всех современных линий ВГА, циркулирующих в популяции человека, а также ВГА свиней за исключением вирусов евразийской линии. Начиная с 1918 г. ген NS эволюционировал в вирусах H1N1 человека с примерно постоянной скоростью вплоть до пандемии «азиатского гриппа» 1957 г., вызванной появлением реассортантного вируса, в геноме которого появились 3 новых произошедших от ВГА птиц сегмента: HA (подтипа H2), NA (подтипа N2) и PB1 [2]. Остальные 5 геномных сегментов (в том числе NS) вирусов H2N2 сохранились от сезонного вируса H1N1. ВГА H2N2 в 1968 г. были вытеснены из циркуляции новым пандемическим вирусом H3N2, вызвавшим пандемию «гонконгского гриппа». Этот вирус появился в результате реассортации геномных сегментов ВГА человека H2N2 и ВГА птиц, приведшей к возникновению новых сегментов HA (подтипа H3) и PB1 [2]. Вирус быстро стал эндемическим и циркулирует как сезонный в популяции человека по настоящее время. Сегменты NS вирусов H3N2 первых лет циркуляции и вирусов H2N2 последних лет циркуляции были филогенетически близки. Это свидетельствует о том, что ген NS, не претерпев существенных изменений, продолжил эволюционировать в вирусах H3N2 человека [11, 12].

ВГА человека H1N1 вновь появился в популяции человека в 1977 г., вызвав техническую пандемию, или псевдопандемию. Молекулярно-генетический анализ подтвердил, что штаммы ВГА H1N1 1977 г. были практически идентичны штаммам 1957 г. по последовательностям всех восьми геномных сегментов [15]. Так как вирус не мог в течение 20 лет циркулировать в другом хозяине без накопления мутаций, считается, что он находился в «замороженном» состоянии, после чего произошла его реактивация. Линия, соответствующая гену NS вирусов H1N1, продолживших циркулировать наряду с вирусами H3N2, образует отдельную от них эволюционную ветвь.

В 2009 г. произошла пандемия, вызванная появлением нового ВГА подтипа H1N1<sub>pdm2009</sub>. В целом пандемия, вызванная вирусом H1N1<sub>pdm2009</sub>, носила умеренный, близкий к слабому характер [16]. Данный вирус является сложным реассортантом двух неродственных вирусов H1N1 свиней классической, произошедшей от вируса H1N1<sub>pdm1918</sub>, и евразийской, произошедшей от ВГА птиц, линий [2, 17]. Удалённость этих линий подтверждается и

данными филогенетического анализа гена NS, согласно которому кластеризуются две линии NS<sub>av\_ori</sub> и NS<sub>pdm1918</sub> [11, 12]. Сегменты NA и M вирусов H1N1<sub>pdm2009</sub> человека происходят от ВГА свиней H1N1 евразийской линии, в то время как остальные 6 сегментов — от тройного реассортантного вируса свиней H1N2, появившегося в конце 90-х годов прошлого века [10, 18]. В этом вирусе гены HA, NP и NS происходят от вирусов классической линии свиней, гены PB2 и PA — из пула ВГА птиц, а PB1 — от сезонных вирусов человека H3N2. Таким образом, ген NS вирусов H1N1<sub>pdm2009</sub>, как и ген NS ВГА человека подтипов H1N1, H2N2 и H3N2, происходит от общего предкового гена NS пандемического вируса 1918 г. Однако этот сегмент эволюционировал в пуле ВГА свиней.

Согласно данным филогенетического анализа ВГА свиней, содержащие ген NS линии NS<sub>sw\_ori</sub> можно разделить на 3 группы. Первая группа включает ВГА свиней классической линии, содержащие гены NS клейда NS<sub>clasw</sub>, произошедшие от NS<sub>1918</sub>. Вторая группа образована тройными реассортантными ВГА свиней, возникшими в результате реассортации ВГА свиней классической линии с ВГА H3N2 человека и ВГА птиц. Ген NS этих вирусов произошёл от гена NS ВГА свиней классической линии и дал начало генам NS вирусов гриппа H1N1<sub>pdm2009</sub>. При этом клейд генов NS этих пандемических вирусов содержит последовательности гена NS вирусов свиней тех же годов выделения, что свидетельствует об их эволюционной близости. Примечательно, что линия генов NS<sub>dm09</sub> содержит небольшую группу генов NS ВГА свиней подтипа H1N1 2003 г. выделения [12].

Известно также, что существуют спорадические случаи межвидовой передачи ВГА, однако такие вирусы не закрепляются в популяции человека. Например, в 1976 г. в США зарегистрированы случаи инфицирования людей вирусами свиней H1N1 [19]. Наиболее известными являются случаи межвидовой передачи ВГА птиц человеку, таких как высокопатогенные ВГА птиц H5N1 [20] или умеренно патогенные ВГА птиц H7N9 [20]. В этом случае ген NS имел птичье происхождение. Однако такие случаи межвидовой передачи носили локальный характер, и вирусы не смогли зафиксироваться в популяции человека. Следует отметить, что межвидовая прямая передача вируса может происходить не только от птиц к млекопитающим, но и между различными видами млекопитающих, в частности между человеком, свиньями и лошадьми [13].

Таким образом, общая схема, иллюстрирующая эволюционную динамику гена NS ВГА человека, показывает, что сегмент NS начиная с 1918 г. не подвергался реассортации и оставался неизменным у всех подтипов ВГА, циркулировавших в популяции человека (см. рис. 1). Мутации в гене NS накапливались постепенно в процессе генетического дрейфа. Среди всех геномных сегментов ВГА помимо NS неизменным в процессе эволюции ВГА человека оставался только сегмент NP [2].

#### *Синтез и локализация NS1.*

Белок NS1 кодируется 8-м сегментом генома ВГА. В процессе транскрипции по механизму альтернативного сплайсинга образуется не менее двух мРНК, кодирующих белки NS1 и NS2 [21]. Обе мРНК имеют 56 общих нуклеотидов на 5'-конце, в результате чего NS1 и NS2 содержат 10 общих N-концевых аминокислот [22]. Имеющиеся данные литературы относительно накопления мРНК NS1 и белка ядерного экспорта (NEP) свидетельствуют о низком уровне сплайсинга мРНК NEP, в ре-



зультате чего она составляет около 10% от мРНК NS1 [23, 24]. Экспрессия NS1 в инфицированных клетках поддерживается на высоком уровне: уже через 2 ч после заражения наблюдается характерное увеличение транскриптов NS1 [23].

NS2, также известный как NEP, является структурным компонентом вириона, отвечающим за экспорт вирусных рибонуклеопротеинов из ядра в цитоплазму [25]. NS1 считался неструктурным компонентом вириона ВГА [26], однако, по последним данным, он также входит в состав вирусных частиц [27].

Внутриклеточная локализация NS1 может различаться в зависимости от штамма вируса, типа клеточной линии, времени после инфицирования, а также уровня экспрессии самого белка NS1. В инфицированных клетках NS1 преимущественно локализуется в ядре, однако на поздних стадиях инфекции значительное количество белка обнаруживается в цитоплазме [5]. В зависимости от штамма вируса NS1 имеет 1 или 2 сигнала ядерной локализации (NLS1 и NLS2). При взаимодействии с клеточным белком импортином- $\alpha$  NLS отвечают за активный транспорт NS1 в ядро. Сигнальная последовательность NLS1 высококонсервативна и включает R35, R38 и K413, также участвующие в связывании днРНК [28]. Напротив, С-концевая сигнальная последовательность NLS2 содержит K219, R220, R231 и R232, присутствующие не у всех белков NS1 [28]. Существует также конкурирующая с NLS2 последовательность сигнала ядрышковой локализации (NoLS), которая содержит дополнительные основные остатки R224 и R229 [29].

Цитоплазматическая локализация NS1 регулируется тремя механизмами. Во-первых, это секвестрирование новосинтезированного белка в цитоплазму при помощи клеточных или вирусных факторов, которые маскируют NLS [29]. Во-вторых, в цитоплазматическом транспорте участвует сигнал ядерного экспорта (NES), расположенный между 138-м и 147-м аминокислотным остатком (а. о.) и требующий наличия L144 и L146, которые обычно маскируются близлежащими остатками в положениях 148—161 [30]. Таким образом, возможно, что в течение инфекции для активации цитоплазматической локализации требуется «открытие» данных аминокислот. В-третьих, возможна конкуренция между NLS и NES, так как последовательность NES становится определяющей после того, как последовательности NLS перекрываются клеточным NS1-связывающим белком (NS1-BP). Молекулярные события, управляющие этими тремя возможными механизмами, до сих пор не установлены, но есть основания полагать, что специфические клеточные факторы играют ключевую роль в определении внутриклеточной локализации белка [31]. Например, возможна регуляция белка NS1 в процессе фосфорилирования, так как мутация в потенциальном сайте фосфорилирования S195 приводит к задержке NS1 в ядре [32].

В целом различное внутриклеточное распределение NS1 в течение всей инфекции необходимо для реализации его различных функций [5].

#### Структура NS1.

Белок NS1 имеет относительно малые размеры, и у

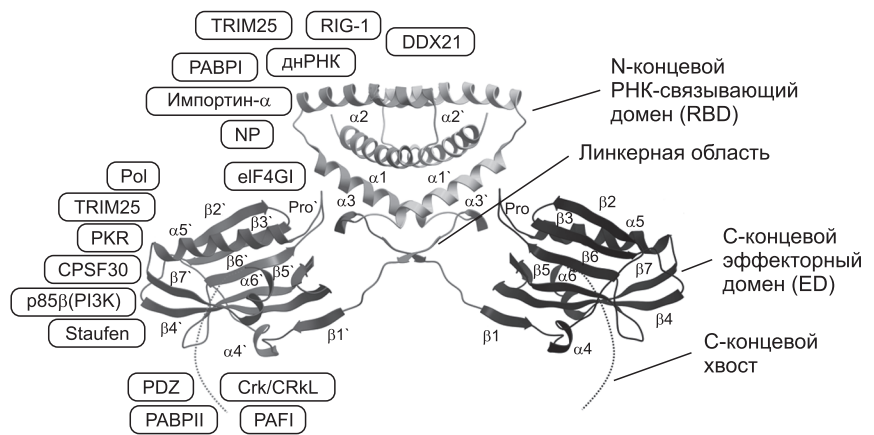


Рис. 2. Кристаллическая структура димера белка NS1 ВГА (PDB 4OPH). Мономер справа отмечен более светлым оттенком (РНК-связывающий домен), оттенком темнее (линкерная область), темно-серым цветом (С-концевой ED-домен). Аналогичные домены мономера слева симметричны и также выделены различными оттенками серого. Пунктирной линией обозначен С-концевой хвост.  $\alpha 1$ — $\alpha 5$  и  $\alpha' 1$ — $\alpha' 5$  —  $\alpha$ -спирали (имеют координаты 2—25, 29—50, 54—70, 94—100, 170—188, 195—202 а. о. соответственно).  $\beta 1$ — $\beta 7$  и  $\beta' 1$ — $\beta' 7$  —  $\beta$ -нити (имеют координаты 88—91, 107—112, 115—120, 127—137, 140—151, 156—162, 191—194 а. о. соответственно). Pro и Pro' — богатая пролином петля (координаты 162—170 а. о.). В прямоугольниках показаны клеточные и вирусные факторы, с которыми взаимодействует NS1.

большинства ВГА его длина составляет не более 237 а.о. В структуре NS1 выделяют 2 функционально различных домена: N-концевой РНК-связывающий (RBD) и С-концевой эффекторный (ED) домены, которые соединены между собой гибкой линкерной областью (рис. 2). Кроме того, в молекуле NS1 имеется короткий С-концевой хвост. NS1 преимущественно функционирует в виде димеров, которые образуются за счет формирования ионных связей [33]. NS1 также способен к олигомеризации в присутствии молекул днРНК [33, 34]. N-концевой RBD длиной 73 а. о., образованный тремя  $\alpha$ -спиральными участками, содержит NLS1 и сайт распознавания днРНК [34]. Антипараллельные  $\alpha$ -спирали  $\alpha 2$  и  $\alpha 2'$  в димере NS1 связываются с большой бороздкой днРНК посредством нескольких основных аминокислот, в частности R38 и K41 [34]. Следует отметить, что такая структура, состоящая из двух антипараллельных основных  $\alpha$ -спиралей, характерна для многих РНК-связывающих белков, действующих в форме димера.

С-концевой ED длиной около 164 а. о. осуществляет взаимодействие с ядерными белками клетки-хозяина и отвечает за ядерно-цитоплазматический транспорт зрелых мРНК в инфицированных клетках. ED состоит из трех  $\alpha$ -спиралей и семи  $\beta$ -нитей [32]. Последние формируют большой антипараллельный  $\beta$ -слой, окружающий одну сторону длинной  $\alpha$ -спирали  $\alpha 5$ . Пространственная структура ED содержит высококонсервативный набор заряженных экспонированных на поверхность аминокислот.

Длина С-конца NS1 широко варьирует у различных штаммов [5]. На С-конце NS1 имеются 2 SH-связывающих домена типов SH2 и SH3 [35]. Оба домена специфически взаимодействуют с регуляторной субъединицей p85 $\beta$  фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) [36]. Активация опосредованного ею сигнального пути играет ключевую роль в обеспечении вирусной репликации [37]. Особенно важной является антиапоптотическая функция активации PI3K, так как действие противовирусных интерферонов

(ИФН) направлено на индукцию программы апоптоза инфицированных клеток [38]. Большинство белков NS1 на С-конце имеют состоящий из четырех аминокислот PDZ-связывающий мотив [39]. PDZ-связывающие мотивы играют ключевую роль в активации сигнальных путей, обеспечивающих противостояние действию ИФН и приводящих к активации клеточных генов, поддерживающих репродукцию вируса [40, 41].

Показано, что молекулы NS1 обладают конформационным полиморфизмом, который заключается в различной ориентации ED относительно RBD, приводящей к трем возможным конформациям белка: открытой, полуоткрытой и закрытой [33]. Ключевую роль в образовании таких структур играет длина линкерной области и аминокислота в положении 71 [33]. Такая конформационная подвижность зависит от стадии инфекции, внутриклеточной локализации и посттрансляционных модификаций NS1 и может вносить вклад в мультифункциональность этого белка.

*Функциональные домены NS1 и роль NS1 в жизненном цикле ВГА.*

NS1 является одним из наиболее многофункциональных белков ВГА. Посредством взаимодействия со множеством клеточных факторов NS1 участвует в регуляции сплайсинга, экспорте и трансляции вирусных мРНК, антагонизме с системами клеточного противовирусного ответа [5]. Наибольший прогресс в понимании роли белка NS1 был достигнут с появлением методов системной биологии [42].

Одна из первых фундаментальных работ по комплексной оценке роли гена *NS1* в жизненном цикле ВГА была опубликована в 2002 г. [43]. Авторы с помощью кДНК микрочипа определили профили экспрессии генов эпителиальных клеток легкого A549, инфицированных вирусами A/PR/8/34, содержащими полноразмерный и укороченные гены NS (wtNS- и ΔNS-вирусы, соответственно). Использование дефектного по открытой рамке считывания NS1 вируса позволило оценить вклад этого гена в клеточный ответ на уровне мРНК. Было показано, что инфекция вирусом wtNS приводила к значительной индукции генов, вовлеченных в ИФН-путь. Делеция открытой рамки считывания NS1 в гене *NS* приводила к увеличению числа и степени экспрессии клеточных генов, вовлеченных в ИФН, NFκB и другие противовирусные пути. При этом разные индуцируемые ИФН-гены проявляли разную чувствительность к NS1-опосредованному ингибированию их экспрессии. Рекомбинантный вирус, содержащий С-концевую делецию в гене *NS*, индуцировал паттерн экспрессии клеточных мРНК, промежуточный между вирусом дикого типа и вирусом, полностью нокаутным по NS1. В дальнейшем было показано, что на клеточный ответ на ВГА-инфекцию значительное влияние оказывает последовательность гена *NS* [44].

В процессе подготовки к написанию обзора мы повторили вышеприведенный эксперимент на клетках A549, инфицированных wtNS- и ΔNS-вирусами [45], с использованием современных микрочипов SurePrint G3 Human Gene Expression 8×60K v2 («Agilent», США), позволяющих проводить анализ экспрессии более 32 000 аннотированных генов, псевдогенов и некодирующих РНК. При обработке результатов анализа оставили только гены, экспрессия которых изменилась более чем в 2 раза ( $\log_2$  FC больше +1 или меньше -1). Экспрессия 129 генов возрастала только в случае заражения вирусом ΔNS, 66 генов оказались специфичными для вируса

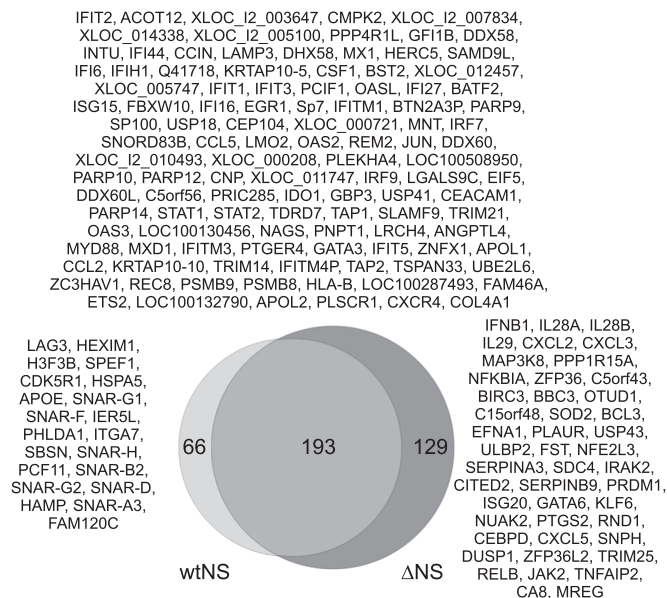


Рис. 3. Дифференциальная экспрессия генов клеток A549, инфицированных wtNS- и ΔNS-вирусами. Показаны гены, число транскриптов для которых увеличилось (значения  $\log_2$  FC больше +2) по сравнению с контрольными клетками.

wtNS, при этом экспрессия 193 генов увеличивалась в случае обоих вирусов (рис. 3).

Анализ генной онтологии (GO) генов, уровень мРНК которых увеличился в ответ на вирусное заражение, проведенный в программе PANTHER Reactome [46, 47], показал, что большая их часть ожидаемо принадлежала путям, задействованным в активации врожденного противовирусного ответа.

В случае заражения ΔNS-вирусом активировалась экспрессия 129 генов. Среди них следует отметить гены *ИФН-β1* и *ИФН-α*, *ИФН-λ1*, *ИФН-λ2*, *ИФН-λ3* (*ИЛ-29*, *ИЛ-28A* и *ИЛ-28B* соответственно), играющие ключевую роль в противовирусной защите в эпителиальных тканях [48]; иммунорегуляторных и воспалительных хемокинов и их рецепторов CXCL2, CXCL3; митоген-активируемой киназы MAP3K8, активирующей NFκB, ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-8; ингибитора NFκBα; регуляторной субъединицы 15 протеинфосфатазы 1 (PPP1R15A); участвующего в противовоспалительном ответе фактора ZFP36.

В случае wtNS-вируса большая часть генов не классифицировалась согласно GO-анализу. Можно было только выделить гены, участвующие в регуляции HSF1-опосредованного ответа на тепловой шок: *HSPA5*, *HSPA1B* и *HSPA1A* (семейство А белков теплового шока Hsp70), DNAJB1 (белок теплового шока семейства Hsp40) и BAG3 (ингибитор шапероновой активности Hsc70/Hsp70). В литературе была показана возможность взаимодействия вышеприведенных белков теплового шока с NS1 [49, 50]. Кроме того, в случае wtNS-вируса обнаружили увеличение уровня транскриптов некодирующих РНК SNAR: G1, H, F, B2, G2, D и A3. Эти РНК ассоциированы с ядерным белком ILF3/NF90, в частности активирующим экспрессию ИЛ-2 в Т-клетках. Недавно было показано, что NF90 является противовирусным фактором, регулирующим активацию PKR и образование стресс-гранул в ВГА-инфицированных клетках [51].



Штамм	РНК-связывающий домен (RBD) 1-73 нукл															Линкерный домен 74-87 нукл														
	3	4	6	18	21	22	23	25	26	27	41	44	48	53	55	56	59	60	63	67	70	74	76	77	80	81	82	84	86	87
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	N	V	V	R	F	A	Q	E	L	K	R	S	D	E	T	R	A	Q	R	K	D	A	L	T	I	A	V	A	S
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	P	.	.	.	Q	V	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	C	V	.	.	.	.	.	.	M	.	A	.	.	
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	H	.	.	Q	V	.	D	.	.	K	.	N	.	.	C	V	.	.	.	.	.	.	F	.	M	.	A	.	.
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	.	.	.	.	Q	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.	A	V	.	.	.	.	.	.	.	M	.	A	.	.	
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	.	.	.	.	Q	V	V	.	.	.	.	.	.	N	.	A	V	.	.	.	.	.	.	.	M	.	A	.	.	
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	I	Q	V	V	.	K	.	R	.	N	.	K	A	H	V	.	K	.	.	.	.	M	V	T	.	.	
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	.	N	.	.	L	.	W	.	N	T	.	.	.	.	.	S	.	
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	.	.	.	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	.	.	.	.	.	T	.	
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	.	.	M	I	.	.	.	N	G	.	.	K	N	.	.	L	V	.	W	.	S	T	.	.	.	.	.	T	.	
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	.	.	.	.	.	.	.	W	G	.	.	.	N	E	.	P	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

Штамм	Эффекторный домен (ED) 88-203 нукл																													
	91	95	98	103	106	108	111	112	114	117	119	123	125	127	129	135	139	143	145	164	166	171	172	178	179	180	189	196	197	198
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	T	L	M	F	M	K	V	A	S	I	M	I	D	N	I	S	D	T	I	P	L	D	E	V	G	V	D	E	T	L
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	.	I	.	.	.	.	.	P	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	I	.	.	.	K	.	.		
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	I	.	.	.	.	.	P	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	N	.	I	.	.	.	.	.		
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	.	M	.	.	.	.	.	I	.	I	.	.	.	K	.	.		
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	.	I	L	.	.	.	E	P	.	I	.	.	.	M	.	.	.	.	.	I	.	I	.	.	.	K	.	.		
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	T	L	.	.	.	E	P	.	.	.	E	S	M	N	.	.	V	.	F	I	.	I	.	.	K	N	.		
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	A	.	.	.	R	.	.	V	.	E	.	.	.	.	.	L	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	N	.		
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	A	.	.	.	R	I	T	.	V	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	N	.		
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	S	.	.	.	R	I	I	P	V	L	V	E	.	V	.	N	.	.	.	.	Y	.	.	.	G	.	N	I		
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	K	A	.	
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	G	.	I	.	.	.	.	.	.	.	I	

Штамм	С-концевой домен 204-237 нукл															
	205	206	207	209	211	212	213	214	215	217	221	224	226	227	228	229
A/Brevig_Mission/1/1918 (H1N1)	S	S	N	N	R	P	P	L	P	K	K	R	I	K	S	E
A/Memphis/10/1983 (H1N1)	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	R	.	.	
A/Malaysia/11641/1997 (H1N1)	.	.	.	G	.	F	T	T	.	G	.	R	.	.		
A/Taiwan/1/64 (H2N2)	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	R	.	K			
A/Hong_Kong/1_1/1968 (H3N2)	.	.	.	.	.	.	T	.	.	V	R	.	K			
A/Oregon/02/2016 (H3N2)	.	.	.	G	.	.	T	.	E	K	A	R	.			
A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical)	.	R	.	.	.	.	E	-	-	-	-	-				
A/swine/Iowa/8548_1/98 (Triple)	N	R	.	D	.	S	.	E	-	-	-	-				
A/California/14/2009 (H1N1pdm09)	N	C	D	.	.	S	.	E	-	-	-	-				
A/swine/England/195852/1992 (Eurasian)	.	I	.	D	.	.	F	.	.	.	G	P	.			
A/Vietnam/CL01/2004 (avian)	.	.	D	D	.	L	.	.	N	.	.	E	.			

Рис. 5. Аминокислотные замены в белке NS1 штаммов ВГА человека и свиньи, относящихся к различным филогенетическим линиям. Представленные штаммы относятся к следующим клейдам гена NS: A/Brevig\_Mission/1/1918 (H1N1) — NS<sub>1918</sub>; A/Memphis/10/1983 (H1N1), A/Malaysia/11641/1997 (H1N1) — NS<sub>11641</sub>; A/Taiwan/1/64 (H2N2) — NS<sub>H2N2</sub>; A/Hong\_Kong/1\_1/1968 (H3N2), A/Oregon/02/2016 (H3N2) — NS<sub>H3N2</sub>; A/swine/Minnesota/24/1975 (Classical) — NS<sub>classw</sub>; A/swine/Iowa/8548\_1/98 (Triple) — NS<sub>tri</sub>; A/California/14/2009 (H1N1pdm09) — NS<sub>pdm09</sub>; A/swine/England/195852/1992 (Eurasian) — NS<sub>eursw</sub>; A/Vietnam/CL01/2004 — NS<sub>av</sub>.

однако она сохранилась только для клейда NS<sub>H1N1</sub>, а в клейдах NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> произошла обратная замена K44R. Примечательно, что такая же замена R44K появилась в NS<sub>classw</sub> в 1971 г. и сохранилась в NS<sub>tri</sub> и NS<sub>pdm09</sub>. Остальные а.о., образующие РНК-связывающий сайт, в процессе эволюции не изменялись.

Область, отвечающая за димеризацию RBD, образована шестью аминокислотами в положениях 12, 19, 29, 32, 35 и 46 [64, 65]; эти аминокислоты являются абсолютно консервативными среди всех изучаемых последовательностей.

В области 21—23 а.о. мутации произошли только в NS<sub>hum\_ori</sub>. По сравнению с предковой последовательностью NS<sub>1918</sub> в NS<sub>hum\_ori</sub> присутствовали замены R21Q (с 1948 г.) и F22V. Кроме того, в NS<sub>H2N2</sub> с 1960 г. появилась замена A23V, которая сохранилась и для NS<sub>H3N2</sub>. Эта область соответствует С-концевому фрагменту α-спирали (2—25) RBD.

Для всех NS<sub>hum\_ori</sub> начиная с 1940 г. и NS<sub>sw\_ori</sub> начиная с 1978 г. наблюдается замена A60V. В NS<sub>eursw</sub> и NS<sub>av</sub> встречается спорадическая замена A60E. Замена в 60-м положении не соответствует ни одному из известных функциональных доменов NS1 и приходится на область α-спирали (54—70).

Для NS<sub>sw\_ori</sub> выявлены следующие замены: V18I, Q25N, R59L и R67W (все с 1957 г.), а также E26G (с 1966 г.) и R44K (с 1971 г.). Все эти замены сохранились и в NS<sub>pdm09</sub>. Кроме того, для NS<sub>pdm09</sub> были описаны замены V6M, D2E (с 2015 г.) и E55K (с 2013 г.). Все эти замены за исключением R44K расположены за пределами функциональных сайтов и приходятся на области α-спиралей.

*Междоменная линкерная область.*

За RBD следует подвижная междоменная линкерная область длиной 13 а. о., соединяющая RBD и ED NS1 [32]. Для вирусов H5N1 в линкерной области описана делеция

## Структурные и функциональные домены и сайты в белке NS1 ВГА

Домен	Длина, а.о.	А.о.	Описание	Ссылка
РНК-связывающий домен (RBD)	73	1—73	N-концевой RBD отвечает за связывание с молекулами РНК и взаимодействие с RIG-I (через днРНК, РABPI и импортин- $\alpha$ )	[5, 61, 62]
РНК-связывающий сайт	13	5, 29, 31, 34, 35, 37, 38, 41, 42, 44, 45, 46, 49	Несколько а.о. вносят вклад в эффективное связывание днРНК белком NS1, но только R38 является абсолютно необходимой	[62, 65, 92]
Интерфейс с димеризацией RBD	6	12, 19, 29, 32, 35, 46	Димеризация RBD необходима для реализации РНК-связывающей активности	[64, 65]
Сигнал ядерной локализации 1 (NLS1)	3	35, 38, 41	А.о. в положениях 35, 38 и 41 играют ключевую роль в функционировании NLS1 и необходимы для связывания импортин- $\alpha$	[28, 63]
Детерминанта вирулентности; тканевой тропизм	1	42	Введение замены Р42S из вируса A/Duck/Guangxi/27/03 в A/Duck/Guangxi/12/03 увеличивало вирулентность по показателям летальности у мышей и системному распространению инфекции. Эта замена также влияет на ИФН-путь	[93]
Междоменный линкер	13	74—86	Подвижный линкер между RBD и ED. Может варьироваться по длине. Делеция 5 а.о. часто встречается в современных изолятах вирусов H5N1	[32]
Детерминанта вирулентности	5	80—84	Введение искусственной делеции из 15 нуклеотидов в рекомбинантном вирусе A/WSN/33/(H1N1) x A/Duck/Shangdong/093/2004 (H5N1) (HA,NA) привело к увеличению вирулентности у мышей	[7, 66]
Сайт взаимодействия с eIF4GI	33	81—113	Взаимодействие NS1 с eIF4GI может приводить к предпочтительной трансляции вирусных мРНК	[94]
Эффекторный домен (ED)	117	87—203	ED опосредует взаимодействия с несколькими клеточными белками и может стабилизировать RBD	[5, 32, 75, 81]
Сайт связывания p85b-PI3K	20	87, 89, 91, 95, 96, 98, 99, 101, 118, 133, 135, 142, 143, 145, 146, 148, 159, 161, 162, 164	Связывание NS1 с p85b-PI3K приводит к активации PI3K-сигналинга, необходимой для эффективной вирусной репликации, вероятно, по механизму предотвращения апоптоза клеток хозяина или повышения активности натриевых каналов	[35, 38, 68—70]
Детерминанты патогенности; детерминанты вирулентности	5	90—94	Делеция 5 аминокислот, расположенных внутри области eIF4GI-связывающего домена NS1, увеличивает вирулентность и патогенность вирусов H5N1	[67]
Детерминанты вирулентности	10	90—99	Укорочение eIF4GI-связывающего домена аттенуирует вирусную репликацию <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[67]
Детерминанта патогенности	1	92	Внесение замены E92D в вирусе A/HK/156/97 усилило устойчивость к цитокинам	[7]
Сайт взаимодействия с TRIM-25	2	96, 97	Сайт необходим для взаимодействия с TRIM-25 и ингибирования RIG-I; важен для активации PI3K (вероятно, осуществляя прямой контакт с петлей активации p110 [70])	[71]
Детерминанта вирулентности	1	101	Вирулентность штаммов НК156 у мышей определяется аминокислотными заменами в HA (211), PB1 (456 and 712), PA (631), NP (127) и NS1 (101)	[71]
Тканевой тропизм; детерминанты вирулентности	2	103, 106	Введение замен L103F и I106M в вирусе A/HK/483/1997 усилило вирулентность по сравнению с вирусом дикого типа по показателю летальности у мышей	[72, 73]
Сайт связывания CPSF30	28	103, 105—110, 117, 119—126, 151, 153, 155—157, 180, 181, 183, 184, 187—189	Необходим для связывания CPSF30 и ингибирования посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК	[74—78]
Сайт димеризации ED	17	106, 108—110, 117, 119, 121, 124, 179—181, 183, 184, 186—189	Структура двух петель ED консервативна во всех кристаллических моделях апо-ED, хотя ее физиологическая значимость неизвестна. W187 существенен для ED-димеризации <i>in vitro</i>	[70, 81]
Сайт связывания PKR	4	123, 124, 126, 127	Необходим для взаимодействия с PKR, приводящего к ингибированию фосфорилирования eIF2 $\alpha$	[79]
Детерминанта патогенности	1	125	Мутация D125G вызывает высокую патогенность у мышей на последнем пассаже I0 и также вызывает усиленную способность к связыванию $\alpha$ 2,3- и $\alpha$ 2,6-сиаловых рецепторов	[80]
Сигнал ядерного экспорта (NES)	11	137—147	L144 и L146 существенны для активности NES	[30]
Сайт маскирования NES	14	148—161	Последовательность сайта ингибирует активность NES. R148, E152 и E153 критичны для функционирования данного сайта	[30]
Детерминанта патогенности	1	171	Мутация A171Y приводит к снижению экспрессии ИФН и ИФН-стимулируемых генов в клетках A549	[95]

Продолжение табл. см. на стр. 254

## REVIEWS

Подвижный хвостовой домен	27	204—230	Подвижный хвост, вероятно, является неструктурированным и варибельным по длине. Он содержит ряд мотивов, в том числе CDK/ERK фосфорилирования, Crk/CrkL-SH3 связывания, PDZ-лиганд и NoLS/NLS2	[81]
Детерминанты патогенности	2	200, 205	А.о. в положениях 200 и 205 NS1 вносят вклад в повышенную ИФН типа I антагонистическую активность. Аминокислотные отличия в положениях 134 HA, 200 и 205 NS1, 47 и 51 NS2 вызывают разницу в вирулентности между высоко- и низкопатогенными вирусами H5N1	[82]
Сайт связывания Crk/CrkL-SH3	4	212, 214, 215, 217	Необходим для связывания с Crk/CrkL. Мотив связывания Crk/CrkL-SH3 часто встречается в штаммах ВГА птиц, а также в пандемическом вирусе человека 1918 г.	[83]
Сайт фосфорилирования	6	213—217, 219	Thr215 фосфорилируется киназами CDKs/ERKs. Необходим для эффективной вирусной репликации в культуре тканей	[84]
Сигнал ядерной локализации 2 (NLS2)	6	219, 220, 224, 229, 231, 232	Эти основные а.о. существенны для функционирования NLS2 и требуются для связывания импортина- $\alpha$ . Эти же а.о. формируют сигнал нуклеолярной локализации (NoLS) у некоторых штаммов	[28, 63]
Сайт связывания PABPII	15	223—237	Соответствует PABPII-связывающей области NS1. Может быть вовлечен в ингибирование посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК	[85, 86]
Тканевой тропизм; клинические симптомы заболевания	5	226—230	Встраивание этого мотива в С-концевую область NS1 вируса A/WSN/33 приводило к существенному снижению массы животных по сравнению с вирусом дикого типа. Вирус вызывал тяжелый альвеолит и геморрагию в тканях легких мышей	[39]
Мотив PDZ-лиганда	4	227—230	Связывает PDZ-домен-содержащие белки. С-концевой PDZ-связывающий мотив обнаруживается преимущественно в птичьих изолятах (обычные варианты включают ESEV/EPEV/KSEV у ВГА птиц)	[39, 87—90]
С-концевое расширение	7	231—237	Функция неизвестна, но оно может вносить вклад в NoLS/NLS2. Мотив превалировал среди вирусов, выделенных с 1950 по 1987 г.	[63]

участка 80—84 а.о., которая, вероятно, нарушает ориентацию и/или стабильность RBD, что приводит к увеличению устойчивости к цитокинам и усилению вирулентности [66]. В этой области в NS<sub>hum ori</sub> присутствует замена I81M. Кроме того, с 1940 г. выявлена замена V84A, которая сохранилась в NS<sub>H1N1</sub> и NS<sub>H2N2</sub>, однако в NS<sub>H3N2</sub> с 1971 г. произошла замена A84T. Для NS<sub>sw ori</sub> характерны замены в двух сайтах: A76T и A86S (NS<sub>classw</sub>) и A86T (NS<sub>ori</sub> и NS<sub>pdm09</sub>). Кроме того, для NS<sub>pdm09</sub> была описана замена K78R.

#### Эффекторный домен.

За линкерной областью следует протяженный ED, который осуществляет взаимодействие с ядерными белками клетки-хозяина и отвечает за ядерно-цитоплазматический транспорт зрелых мРНК в инфицированных клетках [5].

С 81-го по 113-й а.о. NS1 локализован сайт взаимодействия с фактором трансляции eIF4G1, связывание с которым приводит к преимущественной трансляции с вирусными мРНК [67]. Вышеописанные замены в 81, 84 и 86-м положениях линкерной области NS1, как и замены в положениях 90, 91, 95, 98, 108, 111 и 112 (см. далее), приходятся именно на сайт взаимодействия с eIF4G1. Мотив, отвечающий за связывание с фактором eIF4G1, перекрывается с рядом сайтов.

К ним относится сайт, отвечающий за связывание с белком и активацию PI3K сигнального пути, которые обеспечивают эффективную репликацию, вероятно, по механизму задержки апоптоза инфицированных клеток или увеличение активности натриевых каналов. В состав P85 $\beta$ -PI3K-связывающего сайта входят а.о. в положениях 87, 89, 91, 95, 96, 98, 99, 101, 118, 133, 135, 142, 143, 145, 146, 148, 159, 161, 162, 164 [35, 38, 68—70]. В области сайта взаимодействия с eIF4G1 и P85 $\beta$  в NS<sub>sw ori</sub> появилась мутация в 91-м положении — T91A,

при этом в NS<sub>pdm09</sub> произошла замена A91S. В NS<sub>hum ori</sub> с 1940 г. наблюдалась замена L95I. Однако в NS<sub>H1N1</sub> с 2001 г. появилась замена I95V, в NS<sub>H3N2</sub> — I95T с 1975 г. В NS<sub>H2N2</sub> после 1961 г. произошла замена M98L, которая далее сохранилась в последовательностях клейда NS<sub>H3N2</sub>.

Ключевую роль в патогенности вирусов играет участок 90—94 а.о. домена связывания с eIF4G1. Показано, что делеция этих 5 а.о. приводит к увеличению вирулентности и патогенности вирусов H5N1 [67]. Для NS<sub>H3N2</sub> с 1971 г. в этом участке присутствует замена L90I. В NS<sub>ori</sub> также встречается замена L90I примерно в половине штаммов, при этом замена L90I коррелирует с заменой K70R. Для NS<sub>pdm09</sub> замена L90I присутствует с 2012 г.

В 92-м положении NS1 описана мутация D92E, определяющая устойчивость к цитокинам и снижающая эффективность фосфорилирования NS1 [7]. Такую мутацию обнаружили только для последовательностей NS<sub>av</sub> вирусов птичьего происхождения.

В положениях 96 и 97 NS1 находятся а.о., отвечающие за взаимодействие с белком TRIM-25, которое обеспечивает ингибирование RIG-I [71]. Эти же а.о. существенны для активации PI3K, вероятно, осуществляемой за счет прямого контакта с петлей активации p110 [70]. Замен в этих положениях среди анализируемых последовательностей не обнаружено.

В 101-м положении NS1 находится а.о., замена которого в совокупности с заменами в HA (211), PB1 (456 и 712), PA (631), NP (127) может приводить к усилению вирулентности [71]. Замена D101N присутствует в NS<sub>H3N2</sub> с 1980 г.

В 103-м и 106-м положениях NS1 расположены аминокислоты, замены которых (F103L и M106I) также могут приводить к увеличению вирулентности [72, 73].

При анализе данных а.о. отличия были обнаружены только для последовательностей NS<sub>av</sub> и штамма A/Puerto Rico/8/34 (F103S и M106I).

Далее по последовательности NS1 расположен мотив связывания фактора CPSF30, связывание с которым приводит к ингибированию посттранскрипционного 3'-концевого процессинга клеточных пре-мРНК [74–78]. Он включает а.о. в положениях 103, 105–110, 117, 119–126, 151, 153, 155–157, 180, 181, 183, 184, 187–189.

Много замен приходится на область 108–119 а.о., часть из них затрагивает сайт связывания с CPSF30. В NS<sub>sw\_ori</sub> с 1971 г. одновременно появились замены K108R и I117V. Замена I117V произошла и в последовательностях клейда NS<sub>H1N1</sub> в 1980 г. В NS<sub>H2N2</sub> с 1960 г. закрепились замена M119I, которая передалась последовательностям NS<sub>H3N2</sub>, но с 1977 г. в них произошла обратная замена I119M.

Область 123–127 а.о. отвечает за взаимодействие с PKR, приводящее к ингибированию фосфорилирования eIF2 $\alpha$  [79]. В NS<sub>H3N2</sub> (после 1977 г.) и NS<sub>sw\_ori</sub> в этой области присутствует замена D125E, в NS<sub>pdm09</sub> с 2013 г. произошла обратная замена E125D. По данным работы [80] замена G125D приводит к высокой патогенности у мышей и усиливает сродство к  $\alpha$ 2,3- и  $\alpha$ 2,6-сиаловым рецепторам.

В последовательностях NS1 всех изучаемых вирусов, кроме вирусов птичьего происхождения, присутствует замена S114P. В NS<sub>H2N2</sub> после 1960 г. появилась замена A112E, которая сохранилась в клейде NS<sub>H3N2</sub>. Эти замены не соответствуют никаким функциональным сайтам и находятся на стыке двух  $\beta$ -нитей (107–112 и 115–120). Однако сопоставление пространственной структуры соответствующих участков NS1 вирусов H1N1 и H5N1 показало отсутствие каких-либо изменений пространственной структуры прилегающих  $\beta$ -нитей. В NS<sub>H2N2</sub> появилась замена I129M, сохранившаяся и в NS<sub>H3N2</sub>. Кроме того, в этом же положении появилась замена I129V в NS<sub>pdm09</sub>.

Далее по последовательности NS1 следует NES, расположенный между 137-м и 147-м а.о. [30]. Ключевая роль в NES принадлежит L144 и L146, которые обычно маскируются близлежащим участком 148–161 а.о., в котором критически важны R148, E152 и E153. В 144-м положении в NS<sub>H3N2</sub> в 1995 г. появилась замена L144I, в остальных NS<sub>hum\_ori</sub> других значимых замен в 144-м и 146-м положениях нет. В NS<sub>sw\_ori</sub> с 1977–1979 г. присутствует замена D139N, характерная и для NS<sub>av</sub>, однако она не затрагивает ключевые аминокислоты NES.

Кроме того, в области NES есть замена I145T, появившаяся с 1985 г. в NS<sub>H1N1</sub>, и I145V, появившаяся с 1979 г. в NS<sub>H3N2</sub>. А.о. в 145-м положении соответствуют одному из а.о., образующих сайт связывания P85 $\beta$ , который перекрывается с NES. Далее по последовательности NS1 нет значимых замен в сайте связывания P85 $\beta$ .

Область маскирования NEP перекрывается с аминокислотами в 151, 153, 155–157-м положениях, входящими в состав сайта связывания CPSF30, однако в этой области замен нет. Оставшаяся часть сайта связывания CPSF30 расположена в области 180–189 а.о., в которой есть одна замена D189G в NS<sub>sw\_ori</sub>.

В NS<sub>H1N1</sub> присутствует замена D171N, а в NS<sub>H2N2</sub> с 1960 г. и в NS<sub>H3N2</sub> — N171I. Этот сайт является варибельным, так как в нём есть замены и в остальных клейдах. Для всех NS<sub>hum\_ori</sub> после 1935 г. имеется замена V178I. Такая

же замена V178I обнаружена у всех последовательностей NS<sub>av</sub> и NS<sub>eursw</sub>, но не NS<sub>sw\_ori</sub>. Эти замены приходится на область  $\alpha$ -спирали (170–188).

В клейде NS<sub>hum\_ori</sub> присутствует замена E196K с 1940 г., однако в NS<sub>H1N1</sub> с 1987 г. произошла обратная замена K196E. В NS<sub>sw\_ori</sub> и NS<sub>H3N2</sub> после 1985 г. появилась замена T197N. А.о. в этих двух положениях находятся рядом с потенциальным сайтом фосфорилирования S195, замена которого приводит к задержке NS1 в ядре. У всех изученных вирусов замены в 195-м положении нет.

*Неструктурированный С-концевой домен.*

Далее с 204-го по 230-й а.о. следует подвижный С-концевой домен переменной длины. Он содержит ряд мотивов, таких как сайты CDK/ERK фосфорилирования, Crk/CrkL-SH3 связывания, PDZ-лиганд и NoLS/NLS2 [81].

Аминокислоты в 200-м и 205-м положениях NS1 вместе с 134-м а.о. HA и 47-м и 51-м а.о. NEP вносят вклад в повышенную активность антагониста ИНФ I типа, обеспечивая разницу в вирулентности между низко- и высокопатогенными вирусами H5N1 [82]. В NS<sub>tri</sub> и NS<sub>pdm09</sub> присутствует замена S205N, однако в NS<sub>pdm09</sub> в 2012 г. произошла обратная замена. В 206-м положении выявлены замены S206R среди NS<sub>sw\_ori</sub> и NS<sub>tri</sub> и S206C в NS<sub>pdm09</sub>. Кроме того, в 207-м (у NS<sub>sw\_ori</sub>) и 209-м (кроме NS<sub>pdm09</sub>) положениях выявлены замены N на D. В NS<sub>avi</sub> и NS<sub>sw\_ori</sub> таких замен нет.

Далее следует сайт связывания Crk/CrkL-SH3 (212, 214, 215 и 217-й а.о.), характерный для ВГА птиц и вируса 1918 г. [83]. В 215-м положении у всех NS<sub>hum\_ori</sub> присутствует замена P215T. Кроме того, в NS<sub>sw\_ori</sub> появилась замена K217E (с 1957 г.), а в NS<sub>av</sub> — P212S или P212L. Треонин в 215-м положении фосфорилируется пролинспецифическими киназами, такими как CDK/ERK, узнающими определённый мотив 213–217 и 219-й а.о. [84]. Этот сайт фосфорилирования отсутствует в NS<sub>sw\_ori</sub> (включая NS<sub>pdm09</sub>) и NS<sub>av</sub>.

Участок 219–232 а.о. соответствует области NLS2 [28, 63]. В нём ключевую роль играют а.о. в 219, 220, 224, 229, 231 и 232-м положениях. Эти же аминокислоты формируют в некоторых штаммах ВГА NoLS. Участок 219–232 а.о. частично перекрывается с PABPII-связывающим сайтом (223–237 а.о.), который вовлечён в ингибирование посттранскрипционного процессинга 3'-концов клеточных пре-мРНК [85, 86].

Участок 227–230 а.о. является PDZ-лигандом, который связывает белки, содержащие PDZ-домен [39, 87–90]. У всех сезонных штаммов в области PDZ-лиганда присутствует замена K227R, которая приводит к появлению мотива RSEV. Кроме того, для клейдов NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> в 229-м положении произошла замена E229K (мотив RSKV). Примечательно, что единственным исключением является относящийся к подтипу H3N2 штамм A/Hong\_Kong/1\_1/1968 (H3N2), содержащий мотив RSEV. Таким образом, для клейдов NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub> характерен мотив RSKV. Однако в NS<sub>H3N2</sub> с 2011–2012 гг. наблюдалась спорадическая замена K229E, которая окончательно зафиксировалась с 2013 г. В клейде NS<sub>H1N1</sub> присутствует мотив RSEV. В частности, у вируса подтипа H1N1 USSR77 1977 г. присутствует мотив RSEV, как и у последнего вируса H1N1 1957 г. При этом варианты ESEV/EPEV/KSEV являются мотивами для связывания PDZ-домена, а RSKV/RSEV не являются. В NS<sub>av</sub> имеются мотивы EPEV и ESEV. В NS<sub>sw\_ori</sub> после 1966 г. наблюдается делеция области 220–230 а.о. Такая же делеция спорадически встре-

чается в NS<sub>tri</sub> и NS<sub>class</sub>, но не в NS<sub>pdm09</sub>. В NS<sub>eursw</sub> также иногда встречается делеция этой области, а также замена K227G в случае, если эта область не удалена.

В сезонных штаммах с 1940 г. стал появляться мотив RRNKMVD, расположенный в области 231—237 а. о. Его функция точно неизвестна, но он предположительно может вносить вклад в NoLS/NLS2 [63]. В этом мотиве периодически возникала замена V236A, которая окончательно зафиксировалась в клейде NS<sub>H2N2</sub> с 1957 г. Далее в 1960 г. появилась замена N233D, которая сохранилась в клейдах NS<sub>H2N2</sub> и NS<sub>H3N2</sub>. Далее мотив RR(N/D)KMAD присутствовал в сезонных вирусах до 1990 г., после чего произошла его делеция.

### Заключение

Проведённый анализ аминокислотных замен в структурных и функциональных доменах белка NS1 ВГА человека показывает, что большинство из них оставались консервативными в процессе эволюции в течение последнего столетия. Наблюдаемая консервативность NS1 наряду с данными о том, что делеция открытой рамки считывания NS1 (а также некоторые замены в гене NS) существенно снижает уровень репликации и степень патогенности ВГА, делают этот белок перспективной мишенью для терапии гриппа. При дизайне лекарственных препаратов, направленных на NS1, может быть использовано несколько стратегий. Во-первых, можно блокировать синтез самого белка, например, с помощью малых интерферирующих РНК, направленных на консервативные области гена NS. Во-вторых, можно подбирать соединения (низкомолекулярные соединения, пептиды, ДНК-аптамеры), специфически блокирующие сайты взаимодействия NS1 с ключевыми клеточными и вирусными факторами. В-третьих, в качестве мишеней для терапии гриппа можно рассматривать не сам NS1, а его клеточные белки-партнёры, взаимодействие с которыми необходимо для вирусной репликации. В настоящее время имеется несколько соединений, направленных на белок NS1, для которых показана противовирусная активность *in vitro* и даже *in vivo* [91]. Несмотря на то что большинство таких разработок находится в ранних стадиях, не вызывает сомнения, что данное направление будет активно развиваться в ближайшее время.

**Финансирование.** Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФ грант № 15-15-00170, а также при финансовой поддержке РФФИ грант № 16-34-01110.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—15, 17—44, 46—101 см. REFERENCES)

16. Киселёв О.И. *Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v—2009*. СПб.-М.: Димитрейд График Групп; 2011.
45. Плотникова М.А., Васин А.В., Клотченко С.А., Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Егоров В.В. и др. Сравнение паттерна экспрессии мРНК цитокинов в эпителиальных клетках A-549, инфицированных вирусами гриппа A/H1N1pdm09, A/H3N2 и A/H5N1. *Цитокины и воспаление*. 2013; (12): 57—65.

### REFERENCES

1. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol.* 1992; (56): 152—79.
2. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell. Host. Microbe*. 2010; (7): 440—51.

3. Noronha J.M., Liu M., Squires R.B., Pickett B.E., Hale B.G., Air G.M., et al. Influenza virus sequence feature variant type analysis: evidence of a role for NS1 in influenza virus host range restriction. *J. Virol.* 2012; (86): 5857—66.
4. Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; (72): 6437—41.
5. Hale B.G., Randall R.E., Ortin J., Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 2008; (89): 2359—76.
6. Marc D. Influenza virus non-structural protein NS1: Interferon antagonism and beyond. *J. Gen. Virol.* 2014; (95): 2594—611.
7. Seo S.H., Hoffmann E., Webster R.G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat. Med.* 2002; (8): 950—4.
8. Taubenberger J.K., Morens D.M. 1918 Influenza: The mother of all pandemics. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; (12): 15—22.
9. Morens D.M., Taubenberger J.K., Harvey H.A., Memoli M.J. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit. Care Med.* 2010; (38): e10—e20.
10. Smith G.J.D., Bahl J., Vijaykrishna D., Zhang J., Poon L.L.M., Chen H., et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; (106): 11709—12.
11. Xu J., Zhong H.A., Madrahimov A., Helikar T., Lu G. Molecular phylogeny and evolutionary dynamics of influenza A nonstructural (NS) gene. *Infect. Genet. Evol.* 2014; (22): 192—200.
12. Vasin A.V., Petrova A.V., Egorov V.V., Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Karpenko M.N., et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. *BMC Res. Notes*. 2016; (9): 279.
13. Vincent A., Awada L., Brown L., Chen H., Claes F., Dauphin G., et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses Public Health*. 2014; (61): 4—17.
14. Trifonov V., Khiabani H., Rabadan R. Geographic dependence, surveillance, and origins of the 2009 influenza A (H1N1) virus. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361: 115—9.
15. Nakajima K., Desselberger U., Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature*. 1978; 274: 334—9.
16. Kiselev O.I. *Genome of Pandemic Influenza A / H1N1v virus—2009 [Genom pandemicheskogo virusa grippa A/H1N1v—2009]*. St. Petersburg-Moscow: Dimitreyd Grafik Grupp; 2011. (in Russian)
17. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325: 197—201.
18. Komadina N., McVernon J., Hall R., Leder K. A Historical Perspective of Influenza A(H1N2) Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; (20): 6—12.
19. Gaydos J.C., Top F.H., Hodder R.A., Russell P.K. Swine influenza A outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; (12): 23—8.
20. de Wit E., Munster V.J., van Riel D., Beyer W.E.P., Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., et al. Molecular determinants of adaptation of highly pathogenic avian influenza H7N7 viruses to efficient replication in the human host. *J. Virol.* 2010; (84): 1597—606.
21. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 2014; 185: 53—63.
22. Garcia-Sastre A., Egorov A., Matassov D., Brandt S., Levy D.E., Durbin J.E., et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology*. 1998; 252: 324—30.
23. Robb N.C., Jackson D., Vreede F.T., Fodor E. Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 2010; 91: 2331—40.
24. Chua M.A., Schmid S., Perez J.T., Langlois R.A., and Tenover B.R. Influenza A virus utilizes suboptimal splicing to coordinate the timing of infection. *Cell Rep.* 2013; (3): 23—9.
25. Paterson D., Fodor E. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLoS Pathog.* 2012; 8(12): e1003019.
26. Shaw M.L., Stone K.L., Colangelo C.M., Gulcicek E.E., Palese P. Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS Pathog.* 2008; (4): 1—13.
27. Hutchinson E.C., Charles P.D., Hester S.S., Thomas B., Trudgian D.,



- Martinez-Alonso M., et al. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat. Commun.* 2014; (5): 4816.
28. Greenspan D., Palese P., Krystal M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J. Virol.* 1988; 62: 3020—6.
  29. Schneider J., Wolff T. Nuclear functions of the influenza A and B viruses NS1 proteins: Do they play a role in viral mRNA export? *Vaccine.* 2009; 27: 6312—6.
  30. Li Y., Yamakita Y., Krug R.M. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 4864—9.
  31. Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W.H., Baudin F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 2007; 124: 12—21.
  32. Bornholdt Z.A., Prasad B.V.V. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; (13): 559—60.
  33. Carrillo B., Choi J.-M., Bornholdt Z.A., Sankaran B., Rice A.P., Prasad B.V.V. The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism. *J. Virol.* 2014; 88: 4113—22.
  34. Hale B.G. Conformational plasticity of the influenza A virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 10): 2099—105.
  35. Shin Y.K., Li Y., Liu Q., Anderson D.H., Babiuk L.A., Zhou Y. SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J. Virol.* 2007; 81: 12730—9.
  36. Li Y., Anderson D.H., Liu Q., and Zhou Y. Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85 $\beta$ , but not the p85 $\alpha$ , subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 23397—409.
  37. Ehrhardt C., Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell. Microbiol.* 2009; (11): 863—71.
  38. Ehrhardt C., Wolff T., Pleschka S., Planz O., Beermann W., Bode J.G., et al. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J. Virol.* 2007; 81: 3058—67.
  39. Jackson D., Hossain M.J., Hickman D., Perez D.R., Lamb R.A. A new influenza virus virulence determinant: the NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105: 4381—6.
  40. Golebiewski L., Liu H., Javier R.T., Rice A.P. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions. *J. Virol.* 2011; 85: 10639—48.
  41. Bavagnoli L., Dundon W.G., Garbelli A., Zecchin B., Milani A., Parakkal G., et al. The PDZ-ligand and Src-homology type 3 domains of epidemic avian influenza virus NS1 protein modulate human Src kinase activity during viral infection. *PLoS One.* 2011; (6): 1—12.
  42. Peng X., Chan E.Y., Li Y., Diamond D.L., Korth M.J., Katze M.G. Virus-host interactions: from systems biology to translational research. *Curr. Opin. Microbiol.* 2009; (12): 432—8.
  43. Geiss G.K., Salvatore M., Tumpey T.M., Carter V.S., Wang X., Basler C.F., et al. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 10736—41.
  44. Kash J.C., Tumpey T.M., Proll S.C., Carter V., Perwitasari O., Thomas M.J., et al. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. *Nature.* 2006; 443: 578—81.
  45. Plotnikova M.A., Vasin A.V., Klotchenko S.A., Smirnova T.D., Danilenko D.M., Egorov V.V., et al. Comparison of the cytokine mRNA expression pattern in epithelial cells A-549 infected with the influenza viruses A / H1N1pdm09, A / H3N2 and A / H5N1. *Tsitokiny i vospalenie.* 2013; (12): 57—65. (in Russian)
  46. Mi H., Huang X., Muruganujan A., Tang H., Mills C., Kang D., et al. PANTHER version 11: Expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: D183—9.
  47. Fabregat A., Sidiropoulos K., Garapati P., Gillespie M., Hausmann K., Haw R., et al. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: D481—7.
  48. Davidson S., McCabe T.M., Crotta S., Gad H.H., Hessel E.M., Beinke S., et al. IFN $\lambda$  is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN $\alpha$  treatment. *EMBO Mol. Med.* 2016; (8): 1099—112.
  49. Shimizu K., Iguchi A., Gomyou R., Ono Y. Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology.* 1999; 88: 14078—9.
  50. Cao M., Wei C., Zhao L., Wang J., Jia Q., Wang X., et al. DnaJA1/Hsp40 Is Co-Opted by Influenza A Virus To Enhance Its Viral RNA Polymerase Activity. *J. Virol.* 2014; 254: 213—9.
  51. Li T., Li X., Zhu W.F., Wang H.Y., Mei L., Wu S.Q., et al. NF90 is a novel influenza A virus NS1-interacting protein that antagonizes the inhibitory role of NS1 on PKR phosphorylation. *FEBS Lett.* 2016; 590(16): 2797—810.
  52. Downey J., Pernet E., Coulombe F., Allard B., Meunier I., Jaworska J., et al. RIPK3 interacts with MAVS to regulate type I IFN-mediated immunity to Influenza A virus infection. *PLoS Pathog.* 2017; (13): e1006326.
  53. Thulasi Raman S.N., Zhou Y. Networks of Host Factors that Interact with NS1 Protein of Influenza A Virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 654.
  54. Zhang C., Yang Y., Zhou X., Yang Z., Liu X., Cao Z., et al. The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: Implication for virus-induced apoptosis. *Virology.* 2011; (8): 181.
  55. Wang L., Fu B., Li W., Patil G., Liu L., Dorf M.E., et al. Comparative influenza protein interactomes identify the role of plakophilin 2 in virus restriction. *Nat. Commun.* 2017; (8): 13876.
  56. de Chasse B., Aublin-Gex A., Ruggieri A., Meyniel-Schicklin L., Pradezynski F., Davoust N., et al. The Interactomes of Influenza Virus NS1 and NS2 Proteins Identify New Host Factors and Provide Insights for ADAR1 Playing a Supportive Role in Virus Replication. *PLoS Pathog.* 2013. (9): e1003440.
  57. Shapira S.D., Gat-Viks I., Shum B.O.V., Dricot A., de Grace M.M., et al. A Physical and Regulatory Map of Host-Influenza Interactions Reveals Pathways in H1N1 Infection. *Cell.* 2009; 139: 1255—67.
  58. Ayllon J., Garcia-Sastre A. The ns1 protein: A multitasking virulence factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 386: 73—107.
  59. Calderone A., Licata L., Cesareni G. VirusMentha: A new resource for virus-host protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D588—92.
  60. Marc D., Barbachou S., Soubieux D. The RNA-binding domain of influenza virus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 434—49.
  61. Cheng A., Wong S.M., Yuan Y.A. Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus. *Cell Res.* 2009; 19: 187—95.
  62. Yin C., Khan J.A., Swapna G.V.T., Ertekin A., Krug R.M., Tong L., et al. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20584—92.
  63. Melén K., Kinnunen L., Fagerlund R., Ikonen N., Twu K.Y., Krug R.M., et al. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J. Virol.* 2007; 81: 5995—6006.
  64. Liu J., Lynch P.A., Chien C.Y., Montelione G.T., Krug R.M., Berman H.M. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat. Struct. Biol.* 1997; (4): 896—9.
  65. Wang W., Riedel K., Lynch P., Chien C.Y., Montelione G.T., Krug R.M. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA.* 1999; 5: 195—205.
  66. Long J.X., Peng D.X., Liu Y.L., Wu Y.T., Liu X.F. Virulence of H5N1 avian influenza virus enhanced by a 15-nucleotide deletion in the viral nonstructural gene. *Virus Genes.* 2008; 36: 471—8.
  67. Zhou H., Zhu J., Tu J., Zou W., Hu Y., Yu Z., et al. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4GI binding domain. *J. Infect. Dis.* 2010; 202: 1338—46.
  68. Gallacher M., Brown S.G., Hale B.G., Fearn R., Olver R.E., Randall R.E., et al. Cation currents in human airway epithelial cells induced by infection with influenza A virus. *J. Physiol.* 2009; 587: 3159—73.
  69. Hale B.G., Jackson D., Chen Y.-H., Lamb R.A., Randall R.E. Influenza A virus NS1 protein binds p85beta and activates phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103:14194—9.
  70. Hale B.G., Kerry P.S., Jackson D., Precious B.L., Gray A., Killip

- M.J., et al. E., and Russell R.J. Structural insights into phosphoinositide 3-kinase activation by the influenza A virus NS1 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107: 1954—9.
71. Gack M.U., Albrecht R.A., Urano T., Inn K.-S., Huang I.-C., Carnero E., et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*. 2009; (5): 439—49.
  72. Spesock A., Malur M., Hossain M.J., Chen L.-M., Njaa B.L., Davis C.T., et al. The virulence of 1997 H5N1 influenza viruses in the mouse model is increased by correcting a defect in their NS1 proteins. *J. Virol.* 2011; 85: 7048—58.
  73. Kuo R.-L., Krug R.M. Influenza A virus polymerase is an integral component of the CPSF30-NS1A protein complex in infected cells. *J. Virol.* 2009; 83: 1611—6.
  74. Kochs G., García-Sastre A., Martínez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2007; 81: 7011—21.
  75. Das K., Ma L.-C., Xiao R., Radvansky B., Aramini J., Zhao L., et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 13093—8.
  76. Hale B.G., Steel J., Medina R.A., Manicassamy B., Ye J., Hickman D., et al. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84: 6909—22.
  77. Noah D.L., Twu K.Y., Krug R.M. Cellular antiviral responses against influenza A virus are countered at the posttranscriptional level by the viral NS1A protein via its binding to a cellular protein required for the 3' end processing of cellular pre-mRNAs. *Virology*. 2003; 307: 386—95.
  78. Twu K.Y., Kuo R.-L., Marklund J., Krug R.M. The H5N1 influenza virus NS genes selected after 1998 enhance virus replication in mammalian cells. *J. Virol.* 2007; 81: 8112—21.
  79. Min J.-Y., Li S., Sen G.C., Krug R.M. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology*. 2007; 363: 236—43.
  80. Narasaraju T., Sim M.K., Ng H.H., Phoon M.C., Shanker N., Lal S.K., et al. Adaptation of human influenza H3N2 virus in a mouse pneumonitis model: insights into viral virulence, tissue tropism and host pathogenesis. *Microbes Infect.* 2009; (11): 2—11.
  81. Hale B.G., Barclay W.S., Randall R.E., Russell R.J. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. *Virology*. 2008; 378: 1—5.
  82. Imai H., Shinya K., Takano R., Kiso M., Muramoto Y., Sakabe S., et al. The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog.* 2010; (6): e1001106.
  83. Heikkinen L.S., Kazlauskas A., Melén K., Wagner R., Ziegler T., Julkunen I., et al. Avian and 1918 Spanish influenza A virus NS1 proteins bind to Crk/CrkL Src homology 3 domains to activate host cell signaling. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 5719—27.
  84. Hale B.G., Knebel A., Botting C.H., Galloway C.S., Precious B.L., Jackson D., et al. CDK/ERK-mediated phosphorylation of the human influenza A virus NS1 protein at threonine-215. *Virology*. 2009; 383: 6—11.
  85. Li Y., Chen Z.Y., Wang W., Baker C.C., Krug R.M. The 3'-end-processing factor CPSF is required for the splicing of single-intron pre-mRNAs in vivo. *RNA*. 2001; (7): 920—31.
  86. Chen Z., Li Y., Krug R.M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* 1999; (18): 2273—83.
  87. Ziebecki F., Semmler I., Kalthoff D., Voss D., Mauel S., Gruber A.D., et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 2010; (84): 10708—18.
  88. Soubies S.M., Volmer C., Croville G., Loupias J., Peralta B., Costes P., et al. Species-specific contribution of the four C-terminal amino acids of influenza A virus NS1 protein to virulence. *J. Virol.* 2010; (84): 6733—47.
  89. Liu H., Golebiewski L., Dow E.C., Krug R.M., Javier R.T., Rice A.P. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 2010; 84: 11164—74.
  90. Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., Finkelstein D.B., et al. Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 2006; 311: 1576—80.
  91. Engel D.A. The influenza virus NS1 protein as a therapeutic target. *Antiviral Res.* 2013; 99: 409—16.
  92. Chien C., Xu Y., Xiao R., Aramini J.M., Sahasrabudhe P.V., Krug R.M., et al. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. *Biochemistry*. 2004; 43: 1950—62.
  93. Jiao P., Tian G., Li Y., Deng G., Jiang Y., Liu C., et al. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. *J. Virol.* 2008; 82: 1146—54.
  94. Aragón T., de la Luna S., Novoa I., Carrasco L., Ortín J., Nieto A. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* 2000; (20): 6259—68.
  95. Plant E.P., Ilyushina N.A., Sheikh F., Donnelly R.P., Ye Z. Influenza Virus NS1 Protein Mutations at Position 171 Impact Innate Interferon Responses by Respiratory Epithelial Cells. *Virus Res.* 2017; 240: 81—6.
  96. Han X., Li Z., Chen H., Wang H., Mei L., Wu S., et al. Influenza virus A/Beijing/501/2009(H1N1) NS1 interacts with  $\beta$ -tubulin and induces disruption of the microtubule network and apoptosis on A549 cells. *PLoS One*. 2012; (7): e48340.
  97. Murayama R., Harada Y., Shibata T., Kuroda K., Hayakawa S., Shimizu K., et al. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 362: 880—5.
  98. Melén K., Tynell J., Fagerlund R., Roussel P., Hernandez-Verdun D., Julkunen I. Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. *Viol. J.* 2012; (9): 167.
  99. Kumar M., Liu H., Rice A.P., Noury C., Grant S., Borg J., et al. Regulation of Interferon- $\beta$  by MAGI-1 and Its Interaction with Influenza A Virus NS1 Protein with ESEV PBM. *PLoS One*. 2012; (7): e41251.
  100. Yu J., Li X., Wang Y., Li B., Li H., Li Y., et al. PDLim2 selectively interacts with the PDZ binding motif of highly pathogenic avian H5N1 influenza A virus NS1. *PLoS One*. 2011; (6): e19511.
  101. Zhao L., Xu L., Zhou X., Zhu Q., Yang Z., Zhang C., et al. Interaction of influenza virus NS1 protein with growth arrest-specific protein 8. *Viol. J.* 2009; (6): 218.

Поступила 18.08.17

Принята в печать 25.08.17

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1.083.2

*Петрова-Бродская А.В.<sup>1,2</sup>, Бондаренко А.Б.<sup>1,3</sup>, Тимин А.С.<sup>2,4</sup>, Плотникова М.А.<sup>1</sup>, Афанасьев М.В.<sup>3</sup>, Семенова А.А.<sup>5</sup>, Лебедев К.И.<sup>1</sup>, Горшков А.Н.<sup>1,7</sup>, Горшкова М.Ю.<sup>6</sup>, Егоров В.В.<sup>1</sup>, Клотченко С.А.<sup>1</sup>, Васин А.В.<sup>1,2</sup>*

## СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТЕЙ ИНГИБИРОВАНИЯ ВИРУСА ГРИППА А *IN VITRO* КОМПЛЕКСАМИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК С ПРОИЗВОДНЫМИ ХИТОЗАНА, ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ И ГИБРИДНЫМИ МИКРОКАПСУЛАМИ НА ОСНОВЕ ПОЛИАРГИНИНА С НЕОРГАНИЧЕСКИМИ КОМПОНЕНТАМИ

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГАО УВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;

<sup>3</sup> ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург;

<sup>4</sup> ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», 634050, г. Томск;

<sup>5</sup> ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

<sup>6</sup> ФГБУН «Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева» РАН, 119991, г. Москва

<sup>7</sup> ФГБУН «Институт цитологии» РАН, 194064, г. Санкт-Петербург

Механизм РНК-интерференции открывает широкие возможности при создании новых препаратов для лечения гриппа. Он позволяет точно воздействовать на консервативные участки вирусных генов и блокировать их экспрессию. Проведена сравнительная оценка различных носителей для внутриклеточной доставки малых интерферирующих РНК: метилгликольхитозана, кватернизованного хитозана, полиэтиленимина и гибридных микрокапсул на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. Кроме того, оценивали противовирусную активность трех малых интерферирующих РНК, направленных на гены NP (NP-717, NP-1496) и PA (PA-1630) вирусов гриппа А, в зависимости от выбранного носителя. По результатам исследования наиболее эффективные внутриклеточная доставка и противовирусная активность были показаны для гибридных микрокапсул.

Ключевые слова: вирус гриппа; противовирусная активность; малые интерферирующие РНК; системы доставки; хитозан; полиэтиленимин; гибридные микрокапсулы.

*Для цитирования:* Петрова-Бродская А.В., Бондаренко А.Б., Тимин А.С., Плотникова М.А., Афанасьев М.В., Семенова А.А., Лебедев К.И., Горшков А.Н., Горшкова М.Ю., Егоров В.В., Клотченко С.А., Васин А.В. Сравнение эффективностей ингибирования вируса гриппа А *in vitro* комплексами малых интерферирующих РНК с производными хитозана, полиэтиленимином и гибридными микрокапсулами на основе полиаргинина с неорганическими компонентами. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(6): 259-265. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-259-265>

*Petrova-Brodskaya A.V.<sup>1,2</sup>, Bondarenko A.B.<sup>1,3</sup>, Timin A.S.<sup>2,4</sup>, Plotnikova M.A.<sup>1</sup>, Afanas'ev M.V.<sup>3</sup>, Semenova A.A.<sup>5</sup>, Lebedev K.I.<sup>1</sup>, Gorshkov A.N.<sup>1,7</sup>, Gorshkova M.Yu.<sup>6</sup>, Egorov V.V.<sup>1</sup>, Klotchenko S.A.<sup>1</sup>, Vasin A.V.<sup>1,2</sup>*

## COMPARISON OF INFLUENZA A VIRUS INHIBITION *IN VITRO* BY siRNA COMPLEXES WITH CHITOSAN DERIVATIVES, POLYETHYLENIMINE AND HYBRID POLYARGININE-INORGANIC MICROCAPSULES

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russian Federation;

<sup>4</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, 634050, Tomsk, Russian Federation;

<sup>5</sup> St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

<sup>6</sup> A.V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Moscow, 119991, Russian Federation

<sup>7</sup> Institute of Cytology, St. Petersburg, 194064, Russian Federation

Anti-influenza drugs and vaccines have a limited effect due to the high mutation rate of virus genome. The direct impact on the conservative virus genome regions should significantly improve therapeutic effectiveness. The RNA interference mechanism (RNAi) is one of the modern approaches used to solve this problem. In this work, we have investigated the antiviral activity of small interfering RNA (siRNA) against the influenza A/PR/8/34 (H1N1), targeting conserved regions of NP and PA. Polycations were used for intracellular siRNA delivery: chitosan's derivatives (methylglycol and quaternized chitosan), polyethyleneimine, lipofectamine, and hybrid organic/non-organic microcapsules. A comparative study of these delivery systems with fluorescent labeled

*Для корреспонденции:* Петрова-Бродская Александра Валерьевна, мл. науч. сотр. лаб. внутриклеточного сигналинга и транспорта «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [alexandra.b\\_05@mail.ru](mailto:alexandra.b_05@mail.ru)

**siRNA was conducted. The antiviral activity of three small interfering RNAs targeting the NP (NP-717, NP-1496) and PA (PA-1630) influenza A viruses genes was demonstrated, depending on the chosen carrier. The most effective intracellular delivery and antiviral activity were observed for hybrid microcapsules.**

**Key words:** *antiviral activity; NP, PA, small interfering RNA (siRNA); delivery systems; lipofectamine; chitosan; polyethyleneimine; microcapsules.*

**For citation:** Petrova-Brodskaya A.V., Bondarenko A.B., Timin A.S., Plotnikova M.A., Afanas'ev M.V., Semenova A.A., Lebedev K.I., Gorshkov A.N., Gorshkova M.Yu., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Vasin A.V. Comparison of influenza A virus inhibition in vitro by siRNA complexes with chitosan derivatives, polyethyleneimine and hybrid polyarginine-inorganic microcapsules. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 259-265. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-259-265>

**For correspondence:** Alexandra V. Petrova-Brodskaya, Research assistant in the Laboratory of intracellular signaling and transport, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [alexandra.b\\_05@mail.ru](mailto:alexandra.b_05@mail.ru)

**Information about authors:**

Petrova-Brodskaya A.V., <http://orcid.org/0000-0001-5130-3755>;

Plotnikova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>;

Gorshkova M.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-6249-1031>;

Klotchenko S.A., <http://orcid.org/0000-0003-0289-6560>;

**Acknowledgment.** This work was supported by the Russian Science Foundation (Grants No. 15-15-00170, No. 17-73-10023).

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

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

## Введение

Грипп — острая респираторная инфекция, вызывающая сезонные эпидемии и периодические пандемии. Этиологическим агентом заболевания являются одноименные (–)РНК-содержащие вирусы семейства Orthomyxoviridae. Для вирусов гриппа характерна чрезвычайно высокая степень генетической изменчивости, приводящая к быстрому развитию устойчивости к противовирусным препаратам и вакцинам [1, 2]. Для решения этой проблемы необходимы новые подходы к разработке средств лечения гриппа, к которым относится, например, применение малых интерферирующих РНК (siРНК) [3].

РНК-интерференция — это осуществляемый малыми РНК высокоспецифичный механизм подавления экспрессии генов на уровне мРНК, приводящий к блокированию трансляции. РНК-интерференция может использоваться для выключения определенных генов в экспериментальной биологии и биотехнологии, а также в медицине для лечения инфекционных, наследственных и онкологических заболеваний [4–6]. В ряде исследований была продемонстрирована эффективность siРНК для ингибирования вируса гриппа и других респираторных вирусов [7, 8]. Однако практическое применение терапевтических siРНК осложнено их низкой стабильностью, необходимостью использования эффективных и безопасных средств доставки в клетки-мишени, а также возможной иммуногенностью [9, 10]. Для преодоления подобных барьеров активно ведутся поиски новых систем доставки малых РНК, отвечающих таким параметрам, как способность связывать нуклеиновые кислоты, биосовместимость, биодеградация, низкая токсичность и высокая эффективность трансфекции клеток.

В работе приведены сравнительные исследования эффективности различных носителей (Lipofectamine® 2000, полиэтиленимин (ПЭИ), производные хитозана, гибридные микроконтейнеры на основе полиаргинина с неорганическими компонентами) для доставки противовирусных siРНК, направленных на гены вирусов гриппа А, кодирующие субединицу полимеразы PA и нуклеопротеин NP. При обработке клеток исследуемыми препаратами (siРНК в составе комплексов с трансфецирующим агентом) и их последующем заражении вирусом гриппа было показано существенное снижение

репродукции вирусных частиц как в самих клетках, так и во внеклеточной среде. Наименьшая токсичность, наибольшая эффективность трансфекции клеток и противовирусный эффект среди всех изученных систем доставки были показаны для гибридных микрокапсул. Полученные в работе данные могут быть использованы для последующего исследования противовирусной активности siРНК на животной модели инфекции.

## Материал и методы

**Материал.** Трансфекционные агенты: ПЭИ (P3143, «Sigma-Aldrich»), Lipofectamine® 2000 (11668019, «Invitrogen»), метилгликольхитозан (МГХ) (M3150, «Sigma-Aldrich»); модифицированный полимер деацетирированного хитина –кватернизованный хитозан (КХ) Mw > 200 000 (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва) [11]. Этилендиаминтетрауксусная кислота, фосфатно-солевой буфер, диметилсульфоксид (все производства «Sigma-Aldrich») были использованы без дополнительной очистки.

Гибридные микрокапсулы, пустые и с упакованной siРНК, были синтезированы и охарактеризованы по описанной ранее методике [12] в лаборатории микрокапсулирования и управляемой доставки биологически активных соединений RASA-центра (Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург).

**siРНК.** При подборе siРНК выбирали наиболее консервативные участки генов-мишеней и руководствовались «правилом Тушля» [13, 14]. Все РНК-нуклеотиды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез» (Москва), последовательности приведены далее; в РНК-олигонуклеотиде NP-1496-1/2(dTdT) 2-гидроксильная группа была заменена на 2-О-метильную группу в каждом нуклеотидном остатке, РНК-олигонуклеотид PA-1630-FAM содержит карбоксифлюоресцеин (FAM) на 3'-конце. Олигонуклеотиды были растворены в  $depcH_2O$  (100 мкМ). Двухцепочечные siРНК получали в процессе термического отжига и гибридизации по ранее описанному протоколу [12]. Полученные РНК-дуплексы были проанализированы методом электрофоретического разделения в 15% полиакриламидном геле.

**Культуры клеток.** В работе использовали монослойные клеточные культуры Мадин-Дарби почек собак

Таблица 1

Концентрации поликатионов в комплексе с siРНК

Концентрация	ПЭИ	МГХ	КХ
Mn <sub>pol</sub> , г/моль	43	375	298
x <sub>pol</sub> , мг/мл, N/P = 1 на 1•10 <sup>-6</sup> моль siРНК	0,94	8,2	6,52
Конечная концентрация полимера в добавляемом растворе полиплексов (N/P = 1), мкг/мл	0,48	4,1	3,8

(Madine-Darby canine kidney, MDCK) и эпителия лёгких человека (A549), полученные из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM («Биолот», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Biowest», Франция). Все опыты проводили на суточном монослое с плотностью 10<sup>5</sup> клеток на 1 см<sup>2</sup>.

**Вирусы.** Использовали вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1) с титром 2,69•10<sup>6</sup> (50% тканевая цитопатическая доза, ТЦИД<sub>50</sub>) из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа». Культивирование вируса проводили на 10-дневных куриных эмбрионах по методике, приведенной в работе [15]. Инфекционный титр вируса определяли на клеточной культуре MDCK в соответствии с данными в работе [15]; титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [16] с использованием ТЦИД<sub>50</sub>.

**Антитела.** Для выявления вирусного белка NP использовали моноклональные мышинные антитела 6D11, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP), полученные в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа».

**Приготовление комплексов с siРНК.** Комплексы на основе катионных полимеров полиплексов получали в процессе смешивания эквивалентных объемов водных растворов нуклеиновых кислот и растворов поликатионов с различной концентрацией, чтобы достичь соотношения азотных групп полимера (N) к фосфатным группам РНК (P) (соотношение N/P) в расчёте на один нуклеотид и одно мономерное звено в промежутке от 1/128 до 128/1. Готовые смеси интенсивно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Концентрации рассчитывали по приведённой ниже формуле, для всех экспериментов определяли массовую концентрацию поликатиона, необходимого для создания комплекса с 1 мкмоль siРНК согласно табл. 1.

$$N/P = \frac{Mn_{pol} / x_{pol}}{Mn_{RNA} / y_{RNA}}$$

где Mn<sub>pol</sub> — молекулярная масса мономерного звена поликатиона (в г/моль); Mn<sub>RNA</sub> = 320 г/моль; x<sub>pol</sub> — концентрация поликатиона (в г/мл); y<sub>RNA</sub> — концентрация siРНК (≈0,7 мг/мл).

Комплексы siРНК с липофектаминоном были получены путём смешивания реагента Lipofectamine® 2000 и siРНК в соотношениях, указанных в протоколе производителя. Комплексы siРНК с поликатионами в различных соотношениях разбавляли не содержащей сыворотку средой и вносили в лунки планшета. siРНК с Lipofectamine® 2000 вносили согласно протоколу производителя. Микрокапсулы в водном растворе добавляли в среду, доводя до нужной концентрации по siРНК, и вносили к клеткам в соотношении приблизительно 2—5 микрокапсул на клетку.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Комплексы с siРНК с поликатионами

получали смешиванием разведений полимеров с 0,1 мкмоль siРНК. Комплексы добавляли к монослою клеток A549 с последующей инкубацией в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали при помощи микротетразоливого теста (МТТ, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил) 2,5-дифенилтетразолия бромид на PBS). Раствор МТТ в концентрации 2,5 мг/мл вносили на предварительно отмые PBS клетки в лунках 96-луночных планшетов и инкубировали 4 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, затем раствор сбрасывали и использовали 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (100 мкл) для разрушения клеточных мембран и растворения осадка. Оптическую плотность измеряли на план-

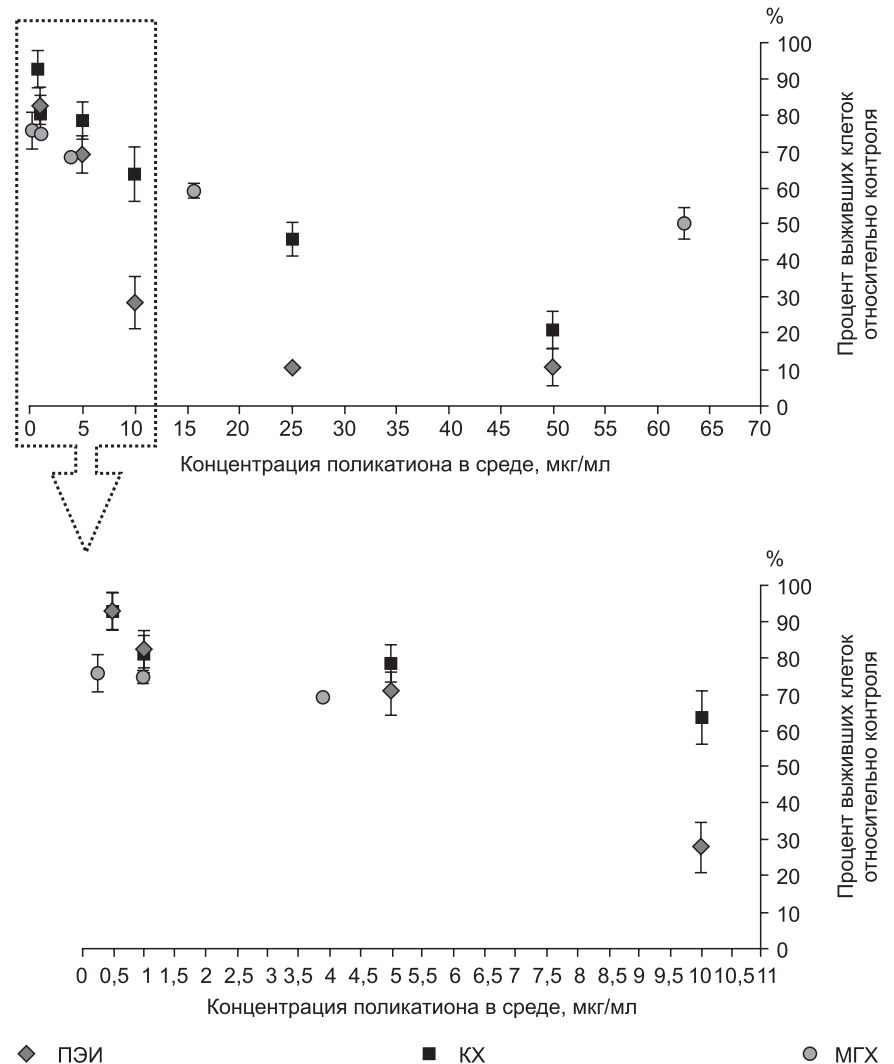


Рис. 1. Токсическое действие комплексов поликатионов ПЭИ, МГХ и КХ с siРНК (1 µM) с различными концентрациями по поликатиону на клеточный монослой A549 (50 000 клеток).

шетном ридере CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) в режиме снятия тотального поглощения с лунки на длине волны 570 нм.

**Определение эффективности внутриклеточной доставки siРНК.** Для оценки эффективности проникновения siРНК в клетки была использована FAM-меченая siРНК. Исследовали комплексы поликатионов в следующих соотношениях N/P: 32:1; 16:1; 8:1; 4:1; 2:1; 1:1. Полиплексы, siРНК с липофектаминам, а также микрокапсулы с FAM-меченой siРНК, растворённые в не содержащей сыворотки среде, вносили в лунки 96-луночного планшета в трех повторах (концентрация siРНК в лунке 1 мкМ). Через 24 ч клетки отмывали PBS, чтобы избавиться от не вошедших в клетку комплексов, фиксировали ацетоном, окрашивали DAPI. Изображения, качественно подтверждающие наличие FAM-меченой siРНК в цитоплазме клеток, а также полуколичественный расчет эффективности доставки siРНК с учётом отрицательного контроля (сигнал фона) и нормировки на количество клеток были получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE», США) (настраиваемое приложение MyBioApp).

**Определение противовирусной активности siРНК.** Противовирусную активность препаратов siРНК оценивали по профилактической схеме на клеточной культуре A549.

Препараты siРНК добавляли к клеткам в лунки планшетов, инкубировали 24 ч (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), отмывали PBS и заражали вирусом в разведениях на поддерживающей среде (DMEM + L-глутамин, 0,1 мкг/мл трипсина и 0,1 мг/мл стрептомицина). Через 30 мин инкубации (8°C) сменяли среду на поддерживающую.

Клетки инкубировали 24 и 72 ч (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), после чего оценивали вирусную репродукцию в клетках и вирус-содержащей культуральной жидкости (ВКЖ), полученной от них.

Быстрый скрининг действия siРНК, доставляемой в клетки с помощью липофектамина, проводили на двух клеточных культурах A549 и MDCK по профилактической схеме. Препараты siРНК (50 пмоль/10<sup>5</sup> клеток) вносили за 1 ч до заражения вирусом в множественности инфекции (MOI) 0,1, выбранной в соответствии с данными в работе [17]. Противовирусную активность оценивали по реакции гемагглютинации (РГА) через сутки.

**РГА.** Репродукцию вируса в ВКЖ оценивали методом РГА с 0,5% куриными эритроцитами для двукратно раститрованных ВКЖ, полученных от клеток через 24 и 73 ч после заражения, согласно данным в работе [15]. Титр вируса выражали в единицах ГА, обратных максимальному

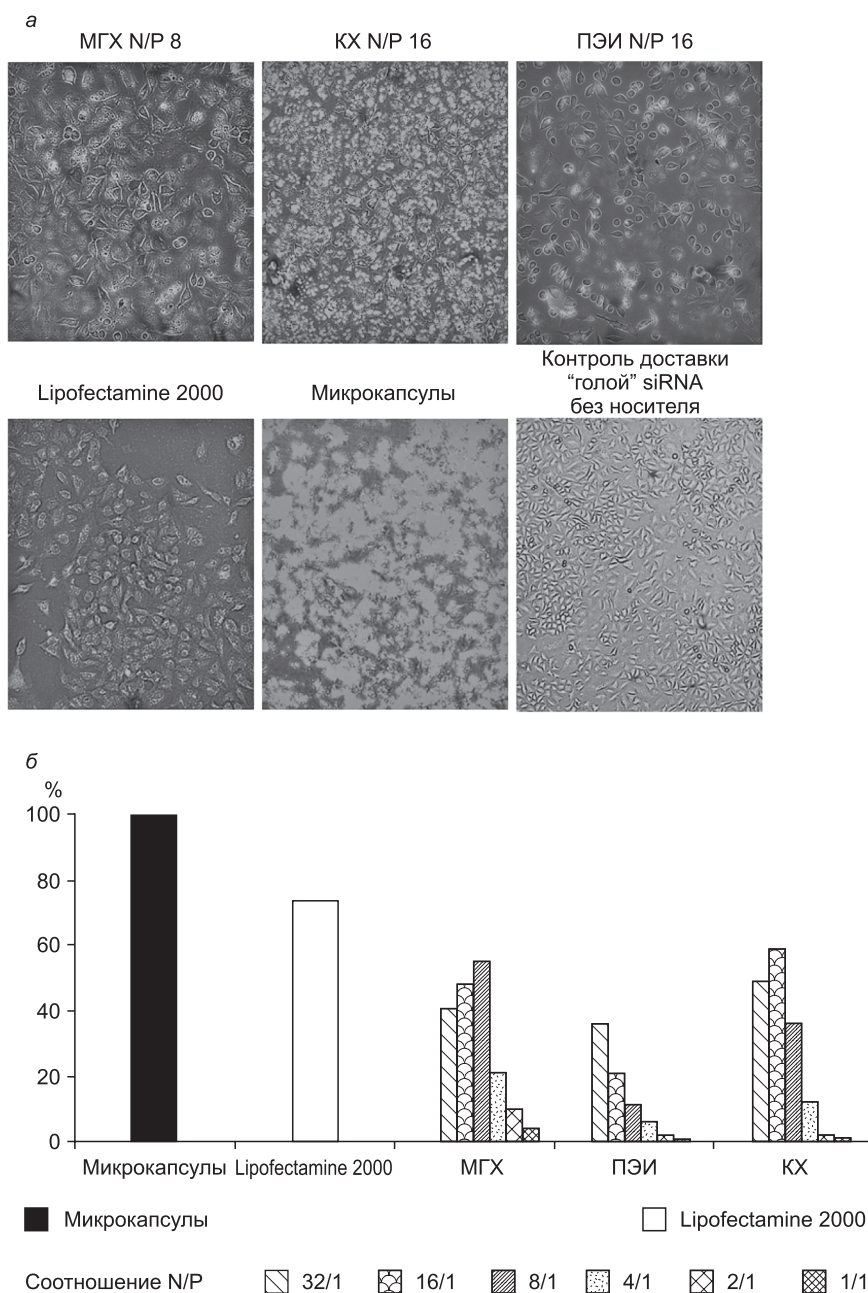


Рис. 2. Эффективность внутриклеточной доставки siРНК.

*а* — визуальное сравнение поликатионной доставки FAM-PA-1630 для наиболее эффективных и наименее токсичных соотношений N/P. Изображения получены с помощью системы формирования изображений Cytell Cell Imaging System («GE», США); *б* — относительная эффективность (по оси ординат) доставки FAM-PA-1630 различными системами, нормированная на количество клеток.

разведению вызывающих агглютинацию эритроцитов.

**Иммуноферментный анализ (ИФА).** Накопление вирусного белка NP в инфицированных клетках и ВКЖ, полученных от них, определяли методом прямого ИФА с использованием антител 6D11-HRP по методике, описанной в [12].

## Результаты

Эффективность доставки в клетки siРНК, обладающих противовирусной активностью в отношении вируса гриппа А, оценивали с использованием следующих

Таблица 2

Последовательности siРНК-олигонуклеотидов

Название siРНК	5' ->3' 3p-seq	5' ->3' 5p-seq
РА-1630	UgAgCCACACAAAUgggAA	UCCCAUUUgUgUggCUCgU
NP-717*	UUAUgAgAgAAUgCAACAU	gUUgCACAUUCUCUCAUAAgC
NP-1496**	ggAUCUUUUUCUUCggAg(dTdT)	CUCCgAAgAAAUAAGAUCC(dTdT)
Negative siРНК	CAUgACCAACAAGAUgAAgAg	CUUCUgCUUgUgUggUCAUgCg

Примечание. \* — siРНК, описанная в работе [12]; \*\* — siРНК, описанная в работе [17].

носителей: МГХ, КХ, ПЭИ и гибридных микрокапсул. Характеристика носителей и источники их получения приведены в разделе «Материал и методы». На первом этапе определяли минимальные соотношения N/P, необходимые для полного связывания siРНК с поликатионами. Для этого использовали метод электрофоретического разделения комплексов siРНК с носителями в агарозном геле с детекцией нуклеиновых кислот бромистым этидием. Для МГХ комплексы приобретают положительный заряд и экранируют siРНК при значениях N/P свыше 1:2, для КХ — при N/P свыше 2, для ПЭИ — при N/P свыше 1:4. Емкость микрокапсул и предельные значения концентрации образующих их полимеров и органических компонентов для длительной защиты siРНК от эндонуклеаз и их эффективной доставки внутрь клетки описаны ранее в работах [12, 18].

Далее определяли максимально допустимые дозы препаратов, образованных поликатионами и siРНК в соотношениях N/P > 1, которые вызывают гибель 50% клеток *in vitro*. Они составили 6,5 мкг/мл для ПЭИ, 60 мкг/мл для МГХ и 24,5 мкг/мл для КХ (рис. 1).

Ранее было показано, что доставка siРНК, находящихся в комплексах с поликатионами МГХ, КХ и ПЭИ при N/P больше или равном 2, внутрь клетки начинается уже через 5 мин инкубации [19]. Согласно протоколу использования Lipofectamine® 2000, являющегося «золотым стандартом» внутриклеточной доставки нуклеиновых кислот, рекомендуемое время экспозиции siРНК составляет не менее 4 ч. При использовании системы доставки на основе микрокапсул показано, что их захват эндосомами происходит в течение первых 15 мин после введения, начало высвобождения siРНК в клетке в процессе разрушения капсул начинается через 4 ч и полностью завершается через 24 ч [12].

Учитывая различающиеся данные о времени доставки siРНК для разных носителей, провели их сравнительное исследование с использованием флюоресцентно-меченой дунитевой РНК РА-1630, содержащей карбоксифлюоресцеин (FAM) на 3'-конце (FAM-РА-1630). В случае исследуемых поликатионов подготовили несколько вариантов комплексов с FAM-РА-1630 с соотношениями N/P 16, 8, 4, 2 и 1, которые находятся в диапазоне концентраций, вызывающих менее 30% гибели клеток в монослое. Помимо поликатионов для доставки FAM-РА-1630 в клетки использовали гибридные микрокапсулы, а также Lipofectamine® 2000. Через 24 ч после внесения препаратов максимально эффективную доставку FAM-РА-1630 наблюдали для микрокапсул. При использовании поликатионов МГХ, КХ и ПЭИ наблюдали прямую зависимость интенсивности флюоресценции в клетках от соотношения N/P (рис. 2).

На следующем этапе работы определяли функ-

циональную эффективность комплексов исследуемых носителей с siРНК относительно ингибирования вирусной инфекции на культивируемых клетках А549. Для этого использовали siРНК, направленные на гены PA и NP вирусов гриппа А (табл. 2). Применяли как ранее охарактеризованные siРНК NP-1496 [17] и NP-717 [12], для которых была показана противовирусная активность, так

и новую siРНК РА-1630, противовирусная активность которой была обнаружена в процессе выполнения работы. В качестве отрицательного контроля использовали siРНК, последовательность которой была случайным образом подобрана так, чтобы не иметь комплементарных участков в генах человека и вирусов гриппа А. В качестве препарата положительного контроля противовирусной активности использовали озельтамивир.

В лунки 24-луночного планшета к монослою клеток А549 вносили в бессывороточную среду препараты siРНК, находящиеся в комплексах с изучаемыми поликатионами (в соотношении N/P 16), микрокапсулами и Lipofectamine® 2000. После инкубации в течение 24 ч отмывали клетки от не вошедших внутрь препаратов siРНК, затем проводили оценку противовирусной активности методом РГА (табл. 3). Установили, что метод РГА не может быть использован для оценки противовирусной активности препаратов, содержащих МГХ и КХ. Причиной этого, вероятно, является способность хитозана связываться с гемагглютинином вируса гриппа за счет наличия большого количества активных положительно заряженных NH<sub>2</sub>-групп. При этом для исследуемых проб наблюдали цитопатическое действие вируса и определяли вирусный белок NP методом ИФА (рис. 3). В случае ПЭИ и Lipofectamine® 2000 методом РГА продемонстрировали снижение вирусной репродукции с помощью siРНК, однако такой же эффект наблюдали и для неспецифической siРНК. При использовании микрокапсул с вирусспецифическими siРНК наблюдалось достоверное снижение вирусной репродукции, в то время как контрольные препараты такого снижения не вызывали.

Помимо метода РГА для определения вирусной нагрузки использовали метод ИФА с моноклональными антителами 6D11 к NP вирусов гриппа А (рис. 4). В этом случае для заражения клеток А549 использовали мень-

Таблица 3

Результаты РГА ВКЖ, полученных от клеток А549, зараженных А/PR/8/34 1 МОИ, через 72 ч после заражения; внесение препаратов siРНК (0,125 мкМ/лунка)

Показатель	Lipofectamine® 2000	ПЭИ	Микрокапсулы	МГХ	КХ
Контроль заражения		16			
Носитель без siРНК	16	16	16	н/о	н/о
Неспецифическая siРНК	8	8	16	н/о	н/о
РА-1630	8	4	4	н/о	н/о
NP-717	4	8	2	н/о	н/о
NP-1496	8	8	8	н/о	н/о
Озельтамивир		2			

Примечание. н/о — невозможно определить.

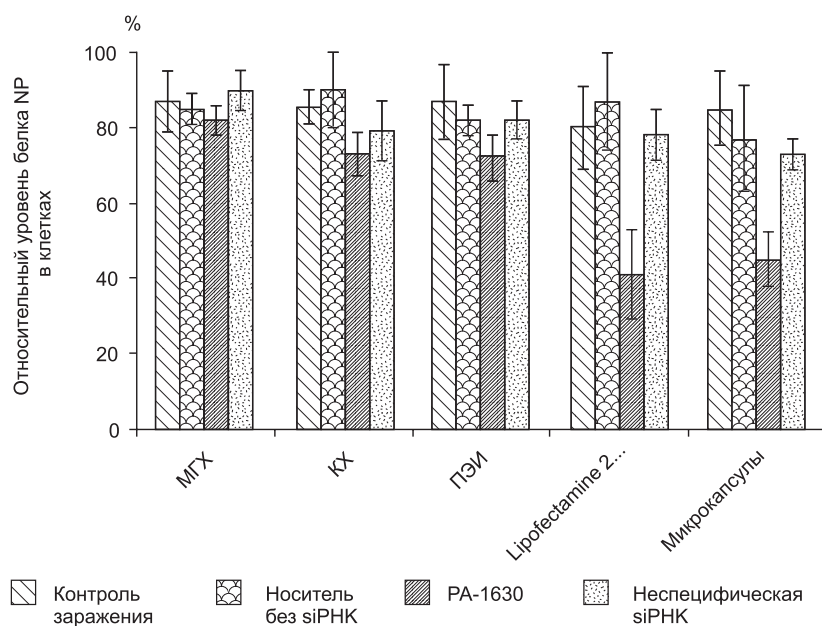


Рис. 3. Уровень белка NP в клетках A549, заражённых A/PR/8/34 1 MOI, через 72 ч после заражения. Внесение препаратов siРНК (0,125 мкМ/лунка) с поликатионами N/P 16 по профилактической схеме.

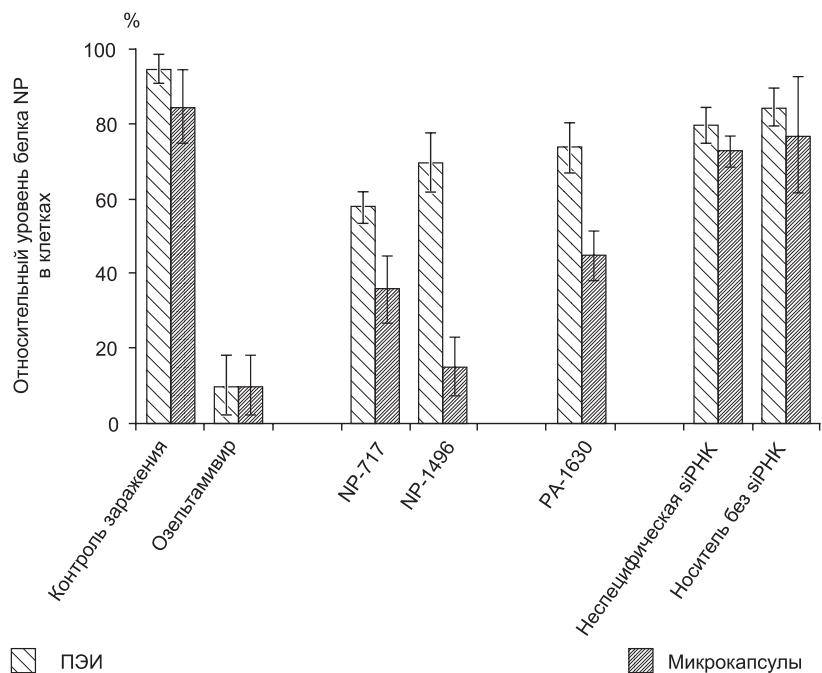


Рис. 4. Результаты ИФА определения уровня белка NP в клетках A549, заражённых A/PR/8/34 0,1 MOI, через 24 ч после заражения. Внесение препаратов siРНК (0,5 мкМ/лунка) с ПЭИ (N/P 16) и в виде микрокапсул по профилактической схеме.

шую дозу вируса (0,01 MOI). В качестве препарата сравнения вновь использовали озельтамивир (10 мкг/мл). В случае комплексов siРНК с МГХ и КХ наблюдали лишь незначительное снижение уровня NP, сопоставимое с эффектом действия как контрольной неспецифической siРНК, так и самого хитозана. Для ПЭИ достоверное снижение уровня NP произошло только в случае

siРНК NP-717. В остальных пробах снижение относительного уровня NP в клетках было сопоставимо с контрольным. В клетках, в которые siРНК доставляли с помощью микрокапсул, наблюдали достоверное снижение уровня NP методом ИФА для всех трех исследуемых препаратов. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными для препаратов NP-717 и NP-1496 [12, 17].

### Обсуждение

В работе изучали противовирусную активность *in vitro* в отношении вируса гриппа А трех препаратов siРНК (PA-1630, NP-717, NP-1496), доставляемых в клетки различными системами невирусной доставки. Носители сравнивали по трансфекционной способности, токсическому эффекту и противовирусной активности доставляемых в клетки siРНК. Использовали поликатионные носители МГХ, КХ и ПЭИ, а также гибридные микрокапсулы на основе полиаргинина с неорганическими компонентами [11, 12, 19, 20].

Поликатионная доставка лекарственных средств считается наиболее перспективным подходом к терапии инфекционных заболеваний, развивающихся в верхних дыхательных путях [21, 22]. В частности, в литературе уделялось большое внимание хитозану как потенциальному агенту для доставки терапевтических siРНК в клетки легких [23]. Однако сложность в использовании хитозана состоит в том, что он является природным полимером, и препараты, получаемые из разного природного сырья (хитиновые панцири креветок и другие), различаются по степени деацетилирования, содержанию аминогрупп и молекулярной массе, в то время как синтезированные в лаборатории производные хитозана обладают различными физико-химическими свойствами. В связи с этим невозможно однозначно допустить, что разные препараты хитозанов характеризуются одинаковой доставляющей способностью, поэтому различные синтезированные модификации требуют сравнительного изучения.

На предварительном этапе работы определяли условия комплексообразования и пороги токсичности для двух модифицированных хитозанов МГХ, КХ, а также ПЭИ. Концентрации МГХ, КХ и ПЭИ в комплексах с siРНК (для соотношений N/P > 1), которые не вызывают явного токсического действия и вызывают гибель не более 30% клеток, составили 7,5, 4,5 и 5 мкг/мл соответственно (см. рис. 1). В предыдущих исследованиях оценивали эффективность трансфекции siРНК внутрь

клеток хитозанами МГХ и КХ [20], а также микрокапсулами [12]. В представленной работе провели сравнение этих систем доставки, которое показало, что микрокапсулы позволяют осуществлять наиболее эффективную трансфекцию клеток максимально возможным количеством siРНК, не вызывая их гибели. Исследованные поликатионы, а также препарат сравнения Lipofectamine®



2000 имеют ограничения по количеству доставляемой siРНК, так как с ее увеличением возрастает и количество носителя, что приводит к повышению токсичности препарата и возможному превышению концентрации «полулетальной дозы». Токсичность препарата в микрокапсулах в свою очередь определяется только большим количеством (больше 25) капсул, входящих на одну клетку, при этом в одну капсулу может быть заключено гораздо больше siРНК, чем можно доставить в клетку с помощью Lipofectamine® 2000 по стандартному протоколу. Таким образом, если эффективность трансфекции с помощью микрокапсул принять за 100%, доставка с помощью Lipofectamine® 2000 обладает эффективностью на уровне 80%, а доставка поликатионами не превышает 60% в пределах нетоксичных концентраций.

Мы использовали все системы доставки, чтобы изучить ингибирующее действие siРНК на вирус гриппа А (ВГА) на клетках А549 методами РГА и ИФА. Наибольший противовирусный эффект исследуемые siРНК показали в случае доставки с помощью микрокапсул.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности использования микрокапсул для безопасной и эффективной доставки терапевтических siРНК против ВГА *in vitro* и, возможно, *in vivo*. Преимуществом такого подхода может также являться возможность упаковки в одну капсулу большого количества сразу нескольких специфичных siРНК, имеющих мишени в разных генах ВГА и/или одновременно для клеточных генов. Также капсулы можно модифицировать, добавляя в них компоненты для оптимизации транспорта и снижения токсичности на уровне организма, без потери их основных свойств и функциональности.

**Финансирование.** Данная работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант № 15-15-00170; грант № 17-73-10023.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3—6, 8—18, 20—23 см. REFERENCES)

1. Всемирная организация здравоохранения. Информационный бюллетень о гриппе № 211. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru>
2. Киселёв О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И., ред. *Групп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика*. М.: Медицинское информационное агентство; 2012.
7. Горшков А.Н., Петрова А.В., Васин А.В. РНК-интерференция и патогенез вируса гриппа А. *Цитология*. 2017; 59(8): 517—33.
19. Петрова А.В., Горшков А.Н., Егоров В.В., Бондаренко А.Б., Шурьгина А.П.С., Грудинина Н.А. и др. Оценка трансфекционной способности производных хитозана в качестве носителей для доставки коротких интерферирующих РНК. *Естественные и математические науки в современном мире*. 2015; (36-37): 142—8.

#### REFERENCES

1. World Health Organization. Influenza bulletin № 211. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
2. Kiselev O.I., Tsybalova L.M., Pokrovskiy V.I., eds. *Influenza: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Prevention [Gripp: epidemiologiya,*

- diagnostika, lechenie, profilaktika]*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2012. (in Russian)
3. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009; 48(8): 1378—98.
4. Castel S.E., Martienssen R.A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2013; 14(2): 100—12.
5. Ballarin-González B., Thomsen T.B., Howard K.A. Clinical translation of RNAi-based treatments for respiratory diseases. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2013; 3(1): 84—99.
6. Haussecker D. Current issues of RNAi therapeutics delivery and development. *J. Control. Release.* 2014; 195: 49—54.
7. Gorshkov A.N., Petrova A.V., Vasin A.V. RNA-interference and Influenza A pathogenesis. *Tsitologiya*. 2017; 59(8): 517—33. (in Russian)
8. Maillard P.V., Ciaudo C., Marchais A., Li Y., Jay F., Ding S.W., et al. Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*. 2013; 342(6155): 235—8.
9. Wang J., Lu Z., Wientjes M.G., Au J.L. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J.* 2010; 12(4): 492—503.
10. Whitehead K.A., Langer R., Anderson D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2009; 8(2): 129—38.
11. Faizuloev E., Marova A., Nikonova A., Volkova I., Gorshkova M., Izumrudov V. Water-soluble N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride as a nucleic acids vector for cell transfection. *Carbohydr. Polym.* 2012; 89(4): 1088—94.
12. Timin A.S., Muslimov A.R., Petrova A.V., Lepik K.V., Okilova M.V., Vasin A.V., et al. Hybrid inorganic-organic capsules for efficient intracellular delivery of novel siRNAs against influenza A (H1N1) virus infection. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 102.
13. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes. Dev.* 2001; 15(2): 188—200.
14. Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W.S., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(3): 326—30.
15. WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/)
16. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493—7.
17. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(5): 2718—23.
18. Ganas C., Weiß A., Nazarens M., Rösler S., Kissel T., Rivera Gil P., et al. Biodegradable capsules as non-viral vectors for in vitro delivery of PEI/siRNA polyplexes for efficient gene silencing. *J. Control. Release.* 2014; 196: 132—8.
19. Petrova A.V., Gorshkov A.N., Egorov V.V., Bondarenko A.B., Shurygina A.P.S., Grudinina N.A., et al. Evaluation of the chitosan derivatives transfection capacity as carriers for the delivery of small interfering RNAs. *Estestvennye i matematicheskie nauki v sovremennoy mire*. 2015; (36-37): 142—8. (in Russian)
20. Pack D.W., Hoffman A.S., Pun S., Stayton P.S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4(7): 581—93.
21. Höbel S., Aigner A. Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2013; 5(5): 484—501.
22. Kumar M. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* 2000; 46(1): 1—27.
23. Ramsey J.M., Hibbitts A., Barlow J., Kelly C., Sivadas N., Cryan S.A. 'Smart' non-viral delivery systems for targeted delivery of RNAi to the lungs. *Ther. Deliv.* 2013; 4(1): 59—76.

Поступила 17.08.17

Принята в печать 25.08.17

Сергеева М.В.<sup>1,2</sup>, Пулькина А.А.<sup>1,2</sup>, Васильев К.А.<sup>1</sup>, Романовская-Романько Е.А.<sup>1</sup>, Комиссаров А.Б.<sup>1,3</sup>, Кучур О.А.<sup>3</sup>, Егоров А.Ю.<sup>1</sup>, Цыбалова Л.М.<sup>1</sup>, Стукова М.А.<sup>1</sup>

## БЕЗОПАСНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ХОЛОДОАДАПТИРОВАННОГО ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО АНТИГЕНА ESAT-6 И Ag85A *M. TUBERCULOSIS*

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», 195251, г. Санкт-Петербург;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», 199034, г. Санкт-Петербург

Использование рекомбинантных вирусных векторов является одним из наиболее перспективных подходов к созданию вакцин нового поколения против туберкулеза. Нами получен вакцинный кандидат на основе холодоадаптированного гриппозного вектора с укороченным белком NS1, содержащий вставку микобактериальных антигенов ESAT-6 и Ag85A. Рекомбинантный гриппозный вектор обладал холодоадаптированным и температурочувствительным фенотипом и был аттенуирован для мышей при интраназальном введении. Методами иммунофлюоресцентного окрашивания и Вестерн-блот показана экспрессия белка ESAT-6 при заражении клеток MDCK. При интраназальном введении мышам рекомбинантный вирус стимулировал специфический противотуберкулезный CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th1-типа с образованием полифункциональных антигенспецифических Т-клеток.

Ключевые слова: векторная вакцина; антигены *M. tuberculosis*; белок NS1 вируса гриппа; холодоадаптированный гриппозный вектор; рекомбинантный штамм.

**Для цитирования:** Сергеева М.В., Пулькина А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Комиссаров А.Б., Кучур О.А., Егоров А.Ю., Цыбалова Л.М., Стукова М.А. Безопасность и иммуногенность холодоадаптированного гриппозного вектора, экспрессирующего антигены ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 266-272. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>

Sergeeva M.V.<sup>1</sup>, Pulkina A.A.<sup>1,2</sup>, Vasiliev K.A.<sup>1</sup>, Romanovskaya-Romanko E.A.<sup>1</sup>, Komissarov A.B.<sup>1,3</sup>, Kuchur O.A.<sup>3</sup>, Egorov A.Yu.<sup>1</sup>, Tsybalova L.M.<sup>1</sup>, Stukova M.A.<sup>1</sup>

## SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF COLD-ADAPTED RECOMBINANT INFLUENZA VECTOR EXPRESSING ESAT-6 AND Ag85A ANTIGENS OF *M. TUBERCULOSIS*

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, Russian Federation;

<sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russian Federation

Recombinant viral vectors represent one of the most promising platforms for creating a new generation of vaccines against tuberculosis. We constructed a vaccine candidate based on a cold-adapted influenza vector with a truncated NS1 protein containing an insert of tuberculosis ESAT-6 and Ag85A antigens. The recombinant virus possessed a cold-adapted and temperature-sensitive phenotype and was attenuated for mice when administered intranasally. Immunofluorescent staining and Western blot showed the expression of ESAT-6 protein in MDCK cells infected by recombinant virus. After intranasal administration to mice, the recombinant virus stimulated a specific anti-tuberculosis CD4 + Th1-type response with the formation of polyfunctional antigen-specific T cells.

Key words: vectored vaccine; *M. tuberculosis* antigen; influenza NS1 protein; cold-adapted influenza vector; recombinant virus.

**For citation:** Sergeeva M.V., Pulkina A.A., Vasiliev K.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Komissarov A.B., Kuchur O.A., Egorov A.Yu., Tsybalova L.M., Stukova M.A. Safety and immunogenicity of cold-adapted recombinant influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of *M. tuberculosis*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 266-272. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-266-272>

**For correspondence:** Mariya V. Sergeeva, PhD, Leading researcher, Laboratory of vectored vaccines, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [mari.v.sergeeva@gmail.com](mailto:mari.v.sergeeva@gmail.com), [maria.sergeeva@influenza.spb.ru](mailto:maria.sergeeva@influenza.spb.ru)

### Information about authors:

Sergeeva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-0411-9896>; Komissarov A.B., <http://orcid.org/0000-0003-1733-1255>;  
Tsybalova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-1193-5907>; Stukova M.A., <http://orcid.org/0000-0002-2127-3820>

**Acknowledgements.** The authors are grateful to E.A. Sorokin, Head of the Laboratory for biotechnology of diagnostic products, Research Institute of Influenza, for 1H7 antibodies.

This work was supported by the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (UMNIK Grant No. 7934GU/2015) and St. Petersburg Government Award to grant winning students in 2016.

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

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

**Для корреспонденции:** Сергеева Мария Валерьевна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаб. векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [mari.v.sergeeva@gmail.com](mailto:mari.v.sergeeva@gmail.com), [maria.sergeeva@influenza.spb.ru](mailto:maria.sergeeva@influenza.spb.ru)

## Введение

Несмотря на достигнутые успехи в борьбе с туберкулезом, проблема распространения инфекции остается актуальной. По данным ВОЗ, на 2015 г. было зарегистрировано 10,4 млн новых случаев туберкулеза, из них 1,8 млн с летальным исходом [1].

Эффективность единственной противотуберкулезной вакцины БЦЖ (BCG, *Bacillus Calmette—Guerin*), являющейся живым аттенуированным штаммом *Mycobacterium bovis*, преимущественно ограничена ранним детским возрастом. В дальнейшем поствакцинальный иммунитет снижается, и даже повторно вакцинированные лица находятся под угрозой реактивации латентных очагов эндогенной инфекции и экзогенной реинфекции [2]. В исследованиях последних лет обосновано применение буст-вакцинации, направленной на поддержание и усиление БЦЖ-опосредованного специфического иммунитета на адекватном уровне [3].

К наиболее перспективным современным средствам борьбы с инфекционными заболеваниями относятся векторные вакцины на основе аттенуированных рекомбинантных вирусов, которые при введении человеку или животным способны синтезировать не только собственные белки, но и протективные антигены других патогенных вирусов или бактерий. Среди разрабатываемых векторных вакцин для защиты от туберкулеза наиболее широко используют модифицированный вирус осповакцины и репликативно-дефектные аденовирусы различных серотипов, несущих протективные антигены возбудителя туберкулеза. В последние годы ведутся работы по использованию в качестве вектора аттенуированного вируса гриппа [1].

Гриппозный вектор имеет ряд преимуществ перед другими вирусными векторами, среди которых отсутствие ДНК-стадии в репликативном цикле вируса, что исключает хромосомную интеграцию вирусного генома; возможность интраназального введения и формирования иммунного ответа в месте внедрения микобактериального патогена — на уровне слизистых оболочек; доказанная безопасность живых гриппозных вакцин; внутриклеточная выработка достаточного количества белка-вставки для получения защитного эффекта вакцинации [4]. Сконструированные к настоящему времени гриппозные векторы включают как полноразмерные антигены *M. tuberculosis*, такие как ESAT-6, Ag85A [5—7], так и их отдельные участки, содержащие Т-клеточные эпитопы Ag85B<sub>240-254</sub> и TB10.4<sub>3-11</sub> [8].

Аттенуация гриппозного вектора может быть достигнута путем удаления части (укорочения) NS1-белка [9, 10], являющегося антагонистом системы интерферонов (ИФН) I типа [11]. Эффективным подходом к повышению безопасности гриппозного вектора может быть использование в качестве основы для создания вакцинного штамма холодадаптированного штамма-донора аттенуации A/Hong Kong/1/68/162/35 [HK/162/35], который обладает полигенным признаком аттенуации, обеспеченным мутациями во всех генах внутренних и неструктурных белков [12, 13].

В рамках данной работы нами был сконструирован холодадаптированный гриппозный вектор с укороченным белком NS1, содержащий вставку туберкулезных антигенов ESAT-6 и Ag85A, проведено исследование его аттенуации и иммуногенности на животных.

## Материал и методы

**Плазмиды.** Последовательность генного сегмента NS вируса гриппа HK/162/35, кодирующая укороченный до 80 аминокислот белок NS1 и вставку туберкулезных белков Ag85A и ESAT-6 с сайтом расщепления 2A между ними, была синтезирована *de novo* и клонирована в вектор pHW2006 в компании «Евроген» (Россия). Плазмиды, кодирующие остальные сегменты вирусов гриппа HK/162/35 и A/PR/8/34 (H1N1) [PR8], были получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа».

**Вирусы.** Рекомбинантный штамм A/PR8/HK-NS80-E85A, содержащий поверхностные антигены HA и NA вируса гриппа PR8, внутренние гены штамма-донора HK/162/35, в том числе ген NS со вставкой туберкулезных антигенов Ag85A и ESAT-6, был получен методом обратной генетики, как описано ранее [13]. Вирус A/PR8/HK-NS80 — делеционный вариант штамма A/PR8/HK-NS80-E85A, утратившего гетерологичную вставку, был получен в процессе пассажей в развивающихся куриных эмбрионах (ПКЭ). Рекомбинантный вирус A/PR8-NS124-ESAT6 (H1N1) на основе штамма PR8, содержащий укороченный до 124 аминокислот NS1 и вставку ESAT-6, был получен ранее [5]. Вирус PR8 с полноразмерным NS1 и реассортант A/PR8/HK 6:2/RG (гены HA, NA штамма PR8, остальные гены штамма HK/162/35), также были получены методом обратной генетики.

**Лабораторные животные.** В работе были использованы мыши линий BALB/c и C57/black, полученные из питомника «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России. При исследованиях руководствовались правилами работы с лабораторными животными<sup>1,2</sup>.

**Культивирование вирусов и определение фенотипа.** Вирусы культивировали в 10-дневных ПКЭ при оптимальной температуре инкубации 34°C. Наличие температурочувствительного (ts-) и холодадаптированного (са-) фенотипа определяли по показателям инфекционной активности при повышенной (39°C) и пониженной (26°C) температуре инкубации, как описано ранее [13], и выражали в логарифмах 50% эмбриональной инфекционной дозы ( $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ ).

**Постановка ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и секвенирование.** Вирусную РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit («Qiagen»). Амплификацию фрагментов гена NS проводили методом ОТ-ПЦР с использованием специально подобранных праймеров HK-NS1-226F (5'-ggattctgaaggaatccg) и PR8-NS1-523R (5'-tgacatcctcagcagtatgtcc) («Syntol», Россия) и набора реагентов AmbionAgPath-ID One Step RT-PCR Kit («Thermo»). Длину ПЦР-фрагментов определяли методом электрофореза (ЭФ) в 1% агарозном геле при окрашивании бромистым этидием, детекцию проводили с помощью системы ChemiDoc («BioRad»). Секвенирование ПЦР-продуктов выполняли с помощью набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems») на капиллярном секвенаторе ABI GA3130 («Applied Biosystems»). Полученные последова-

<sup>1</sup> Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 N 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

<sup>2</sup> European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. ETSNo.123. Strasbourg, 18/03/1986.

тельности анализировали с использованием программы Vector NTI («Invitrogen»).

*Оценка экспрессии антигенов в зараженной культуре клеток MDCK.* Культуру клеток MDCK (#FR-58, получены из коллекции IRR) выращивали в среде DMEM («Биолот») с 5% эмбриональной сывороткой Sus («Биолот») и 1% GlutaMAX («Gibco») при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Суточный монослой клеток заражали вирусами в дозе 1—5 ТИД<sub>50</sub>/клетку и инкубировали при 34°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 6 ч.

Для постановки Вестерн-блот клетки (10<sup>6</sup>) снимали трипсином-ЭДТА («Sigma») и ресуспендировали в буфере Лэммли с β-меркаптоэтанолом («BioRad»). Затем проводили денатурирующий ЭФ образцов в 8—16% градиентном полиакриламидном геле (ПААГ), после чего белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («BioRad»). Мембрану блокировали 3% BSA («Amresco») в фосфатно-солевом буфере (PBS, «Amresco»), затем окрашивали антителами, разведенными 1:5000 в блокирующем буфере с добавлением 0,1% Tween-20 («Ferak Berlin»). Использовали мышиные моноклональные антитела 1H7 к NS1 (ФГБУ «НИИ гриппа») и ab26246 («Abcam») к ESAT-6. В качестве вторичных антител были использованы меченные пероксидазой хрена Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (G21040, «Invitrogen») в разведении 1:2000. Детекцию осуществляли с использованием Opti-4CN Substrate Kit («Bio Rad»).

Для иммунофлюоресцентного окрашивания клетки фиксировали 4% параформальдегидом («Sigma») и пермеабилizировали 0,2% Triton X-100 («Amresco») в PBS, затем блокировали 3% BSA в PBS в течение ночи. Антитела разводили в блокирующем буфере с добавлением 0,1% Tween-20. Окрашивание первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C, вторичными флюоресцентно-мечеными антителами — в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали моноклональные мышиные антитела 1H7 к NS1 (1:200) и поликлональные кроличьи антитела ab45073 («Abcam») к ESAT-6 (1:1000), в качестве вторичных антител использовали флюоресцентно-меченные Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488 (ab150077, «Abcam», 1:1000) и Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488 (ab150113, «Abcam», 1:1000). Клетки фотографировали с использованием Cytell Cell Imaging System («GE Healthcare») с цифровым увеличением и увеличением объекта 10.

*Безопасность рекомбинантного штамма* изучали на мышах линии BALB/c. Мышей заражали интраназально в дозе 5,0 Ig ЭИД<sub>50</sub> по 30 мкл под легким эфирным наркозом (8 мышей на группу). Через 3 сут после заражения был осуществлен забор легких и носовых ходов у мышей (по 3 мыши на группу). Мониторинг массы тела и смертности животных (по 5 мышей на группу) был проведен в течение 14 дней после заражения. Органы гомогенизировали в 1 мл PBS с использованием TissueLyser («Qiagen») при 30 000 об/мин в течение 2 мин. Вирусную нагрузку определяли по результатам титрования суспензии органов в культуре клеток MDCK в присутствии ТРСК-трипсина (2,5 мкг/мл) и амфотерицина В (2,5 мкг/мл). Зараженные клетки инкубировали при 34°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 сут, результат оценивали в реакции гемагглютинации с 0,5% куриными эритроцитами, титр подсчитывали по методу Рида и Менча [14].

*Иммуногенность рекомбинантного штамма* изучали на мышах C57/black. Мышей (по 5 на группу) иммунизировали, как описано выше. Через 10 сут у мышей

выделяли спленоциты, отбирали 10<sup>6</sup> клеток в 100 мкл и стимулировали белком Ag85A («Novus Biologicals») в конечной концентрации 5 мкг/мл в присутствии костимулирующих антител к рецептору CD28 («BioLegend»). Планшеты с клетками инкубировали в течение 12 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, после чего в лунки добавляли брефельдин А («BD Biosciences»). Для детекции живых клеток проводили окрашивание с помощью Zombie Red Fixable Viability Kit («BioLegend»). Для выделения популяции иммунных клеток использовали TruStainFcX CD16/32 («BioLegend»). Популяции лимфоцитов дифференцировали, используя антитела к поверхностным маркерам CD8 — PE/Cy7, CD4—PerCp/Cy5.5 («BD Pharmingen»), CD45 — APC/Cy7 («BD Biosciences», США). Затем клетки фиксировали и пермеабилizировали с использованием набора реагентов Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit with BD GoldgiStop («BD Biosciences»), после чего окрашивали на внутриклеточные цитокины с использованием антител ИФН-γ — FITS, ФНО-α — Brilliant Violet 421, ИЛ-2 — PE («BD Pharmingen»). Результаты окрашивания детектировали на проточном цитометре BD FACSCanto II («BD Biosciences») и анализировали в программе Kaluza Analiziz 1.05a.

*Статистический анализ данных* выполняли с помощью GraphPad Prizm 6.07, Microsoft Excel 2016 и RStudio Desktop 1.0.153. При выборе критерия руководствовались предположением о нормальности распределения случайной ошибки при работе с линейными животными.

## Результаты

### *Получение рекомбинантного штамма PR8/НК-NS80-E85A и его генетическая стабильность.*

На первом этапе была смоделирована последовательность гена NS холодоадаптированного вируса гриппа НК/162/35, кодирующая укороченный до 80 аминокислот белок NS1 с последующей вставкой антигенов ESAT-6 и Ag85A *M. tuberculosis*, разделённых сайтом протеолитического расщепления 2A. Последовательность модифицированного гена NS была синтезирована *de novo* и клонирована в двунаправленный вектор pHW2006. Затем методом обратной генетики был получен рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A, содержащий *HA* и *NA* штамма PR8, гены внутренних и неструктурных белков вируса НК/162/35 и модифицированный ген NS со вставкой. Полученный вектор стабилизировали методом клонирования в предельных разведениях в РКЭ под контролем ОТ-ПЦР для определения размера гетерологичной вставки в различных вирусных клонах. Все полученные клоны характеризовались укороченной вставкой по сравнению с исходной. Нуклеотидные последовательности рекомбинантного гена NS клонов были определены методом секвенирования. Для дальнейшей работы был выбран клон, сохранивший наибольшую по размеру вставку без сдвига рамки считывания (рис. 1, а). Данный клон содержал антиген ESAT-6 и участок 199—261 антигена Ag85A и сохранял эту вставку при дальнейших пассажах в РКЭ (рис. 1, б).

*Рекомбинантный штамм A/PR8/НК-NS80-E85A характеризуется ts- и са-фенотипом и аттенуирован для мышей BALB/c.*

Маркерами аттенуации вирусов гриппа, используемых в качестве живых вакцин, являются ts- и са-фенотипы. Для определения фенотипа рекомбинантного вируса A/PR8/НК-NS80-E85A мы сравнили показатели его инфек-

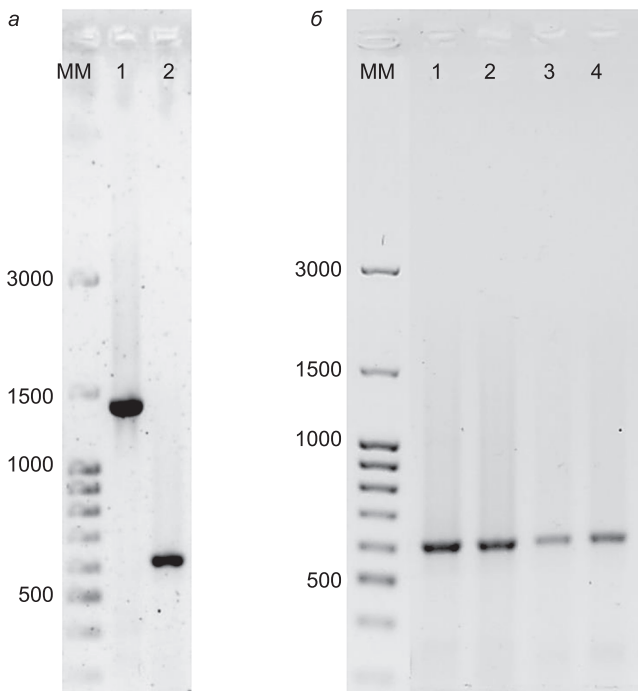


Рис. 1. Генетическая стабильность штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А.

*a* — ПЦР-фрагменты гетерологичной вставки в гене *NS* в исходной плазмиде (дорожка 1) и гене *NS* штамма PR8/НК-NS80-Е85А (дорожка 2); *б* — ПЦР-фрагменты гетерологичной вставки в гене *NS* пассажных вариантов Е1—Е4 штамма PR8/НК-NS80-Е85А (дорожки 1—4 соответственно). MM — маркер молекулярной массы (п.н.)

ционной активности в РКЭ при различных температурах инкубации (см. таблицу). Разница в репродуктивной активности штамма при повышенной и оптимальной температурах  $RCT_{39}$  составила более 5 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, разница в репродукции при пониженной и оптимальной температурах  $RCT_{26}$  была менее 3 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл, из чего можно заключить, что штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А обладает ts- и са-фенотипом.

Аттенуацию штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А оценивали при интраназальном заражении мышей BALB/c в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь. В качестве контрольных вирусов использовали патогенный для мышей штамм PR8 и частично аттенуированный для мышей штамм А/PR8-NS124-ESAT6. Судя по динамике массы мышей (рис. 2, *a*), штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А был полностью аттенуирован — мыши практически не теряли в массе после заражения в отличие от мышей, которым ввели вирус А/PR8-NS124-ESAT6, при этом мыши, зараженные патогенным штаммом PR8 в той же дозе, погибли к 8-м суткам после заражения.

Репродукцию вирусов в респираторном тракте мышей оценивали на 3-и сутки после заражения (рис. 2, *б*). Титр неаттенуированного штамма PR8 в лёгких мышей составлял  $5,42 \pm 0,38$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл, что существенно превышало ( $p < 0,001$ ) вирусную нагрузку в лёгких мышей, заражённых частично аттенуированным вирусом А/PR8-NS124-ESAT6 ( $2,83 \pm 0,14$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл) и полностью

аттенуированным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А ( $1,67 \pm 0,29$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл). При этом штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А лучше размножался в носовых ходах мышей ( $0,58 \pm 0,14$  lg ТИД<sub>50</sub>/мл), чем в легких ( $p < 0,05$ ), что согласуется с его са-фенотипом.

При заражении культуры клеток MDCK рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А происходит экспрессия туберкулёзного антигена ESAT-6.

Экспрессия гетерологичного антигена рекомбинантным векторным вакцинным штаммом обеспечивает его презентацию иммунной системе и выработку иммунного ответа нужного типа. Экспрессию антигена ESAT-6 и белка NS1 в цитоплазме клеток MDCK оценивали через 6 ч после их заражения рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А и контрольными вирусами А/PR8/НК-6:2 RG и А/PR8-NS124-ESAT6. Иммунофлюоресцентное окрашивание клеток (рис. 3) демонстрировало активную экспрессию белка NS1 и антигена ESAT-6 в цитоплазме клеток, заражённых штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А и контрольным вирусом А/PR8-NS124-ESAT6. Результаты Вестер-блот-анализа (рис. 4) подтверждали экспрессию ESAT-6 и NS1, причём молекулярная масса белков совпадала с теоретически рассчитанной с использованием сервера ExPASy-ProtParam [15]. Расчетная масса белка NS1 (80 аминокислот) с двойной вставкой ESAT6-Ag85A<sub>199-261</sub> составляла 24 кДа, масса белка NS1 дикого типа — 25,9 кДа, масса белка NS1 (124 аминокислоты) со вставкой ESAT6 — 24,2 кДа.

Рекомбинантный штамм А/PR8/НК-NS80-Е85А стимулирует противотуберкулёзный Т-клеточный ответ при интраназальной иммунизации мышей C57/black.

Для оценки способности рекомбинантного штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А индуцировать Th-1-Т-клеточный иммунный ответ мышей C57/black интраназально иммунизировали в дозе 5,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мышь. Через 10 дней оценивали внутриклеточную продукцию цитокинов лимфоцитами селезёнки, стимулированными рекомбинантным антигеном Ag85А. В качестве контрольной группы использовали мышей, иммунизированных вирусом А/PR8/НК-NS80 без соответствующей вставки.

После однократной иммунизации рекомбинантным штаммом А/PR8/НК-NS80-Е85А доля цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в спленоцитах мышей при специфической стимуляции была достоверно выше, чем в контрольной группе животных ( $3,16 \pm 1,25$  против  $1,43 \pm 0,40$ ;  $p = 0,016$ , *t*-критерий Стьюдента; рис. 5, *a*).

Далее была изучена функциональная активность CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, способных под действием специфической стимуляции синтезировать ИФН-γ, ФНО-α и ИЛ-2 или различные комбинации данных цитокинов. Среди популяции антигенспецифических CD4<sup>+</sup>-Т-клеток селезёнки преобладали Т-клетки, секретирующие один цитокин (ИФН-γ (36,85% от общего числа цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов), ФНО-α (31,77%) или ИЛ-2 (4,12%)). В то же время были обнаружены и полифункциональные антиген-

Инфекционная активность штамма А/PR8/НК-NS80-Е85А в куриных эмбрионах при различной температуре

Вирус	Инфекционная активность, lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2 мл			RCT <sub>26</sub>	RCT <sub>39</sub>
	26°C	34°C	39°C		
А/PR8/НК-NS80-Е85А	3,48 ± 0,82	5,35 ± 0,84	0,06 ± 0,18	1,96 ± 0,52	5,32 ± 0,65

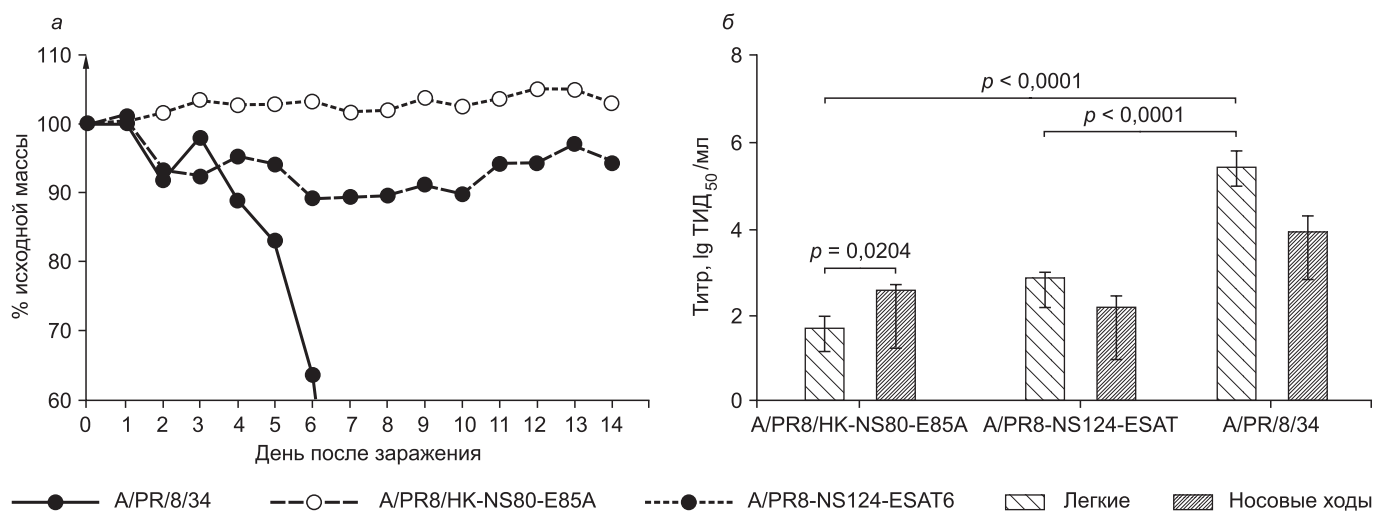


Рис. 2. Безопасность штамма A/PR8/HK-NS80-E85A для мышей.

*а* — график динамики массы мышей после заражения соответствующими вирусами. Потерю массы для каждого животного (в %) относительно исходного уровня (0-й день) определяли индивидуально, затем рассчитывали среднее по группе; *б* — вирусная нагрузка в респираторном тракте мышей после заражения соответствующими вирусами. Значение *p* определено по результатам многофакторного дисперсионного анализа с последующими попарными сравнениями по методу Тьюкки с поправкой на множественность сравнений.

специфические Т-клетки, продуцирующие 2 цитокина (ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 (2,77%); ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  (2,06%); ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 (16,32%)), а также минорная популяция тройных продуцентов, секретирующих ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  и ИЛ-2 (6,10%)) (рис. 5, б).

### Обсуждение

В данном исследовании был сконструирован рекомбинантный штамм A/PR8/HK-NS80-E85A, содержащий поверхностные антигены HA и NA от вируса гриппа PR8, а внутренние белки, в том числе модифицированный белок

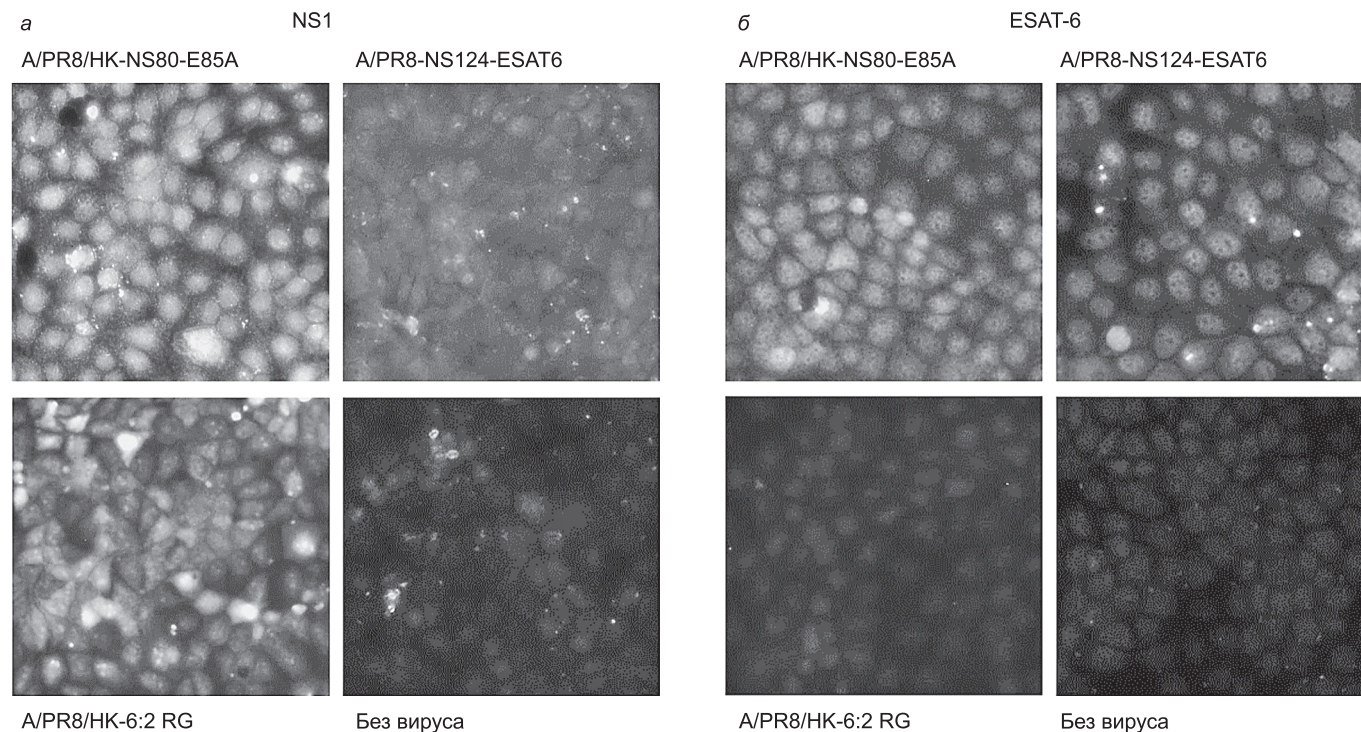


Рис. 3. Экспрессия белков ESAT6 и NS1 в клетках MDCK, заражённых вирусом A/PR8/HK-NS80-E85A.

Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток MDCK через 6 ч после заражения соответствующими вирусами. Для визуализации белка NS1 (*а*) и антигена ESAT-6 (*б*) использованы антитела, меченные зелёным флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488, изображение получено с использованием Cytell Cell Imaging System (GE).

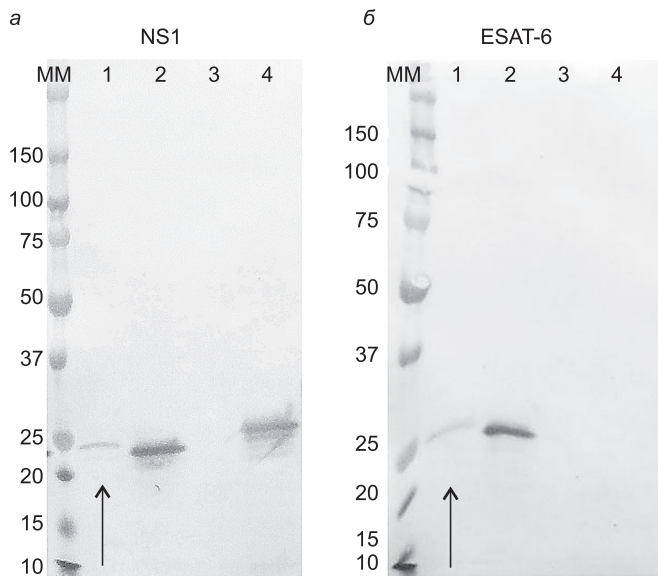


Рис. 4. Экспрессия белков ESAT6 и NS1 в клетках MDCK, заражённых вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

Результаты ЭФ в ПААГ и Вестерн-блот-окрашивания антителами к NS1 (а) и ESAT-6 (б) лизатов клеток MDCK через 6 ч после заражения соответствующими вирусами. Дорожка 1 — клетки, заражённые вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A, дорожка 2 — клетки, заражённые вирусом A/PR8-NS124-ESAT6, дорожка 3 — незаражённые клетки, дорожка 4 — клетки, заражённые вирусом A/PR8/НК-6:2 RG. MM — маркер молекулярной массы, кДа. Красная стрелка отмечает лизат клеток, заражённых вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

NS1, — от са-штамма-донора НК/162/35. Белок NS1 рекомбинантного вируса был укорочен до 80 аминокислот, после которых содержал вставку туберкулёзных антигенов ESAT-6 и участка аминокислот 199—261 Ag85A в единой рамке считывания. Подобная конструкция возникла в результате делеции в модифицированном гене NS1, который изначально содержал полно-размерный Ag85A и сайт расщепления 2A после ESAT-6. Причиной возникновения делеции могли стать нарушения консервативной вторичной структуры в участке 495—564 генного сегмента NS, которая, вероятно, играет определенную роль в адаптации вируса гриппа к организму хозяина [16, 17]. Полученный делеционный вариант вируса при этом был генетически стабилен и сохранял вставку ESAT-6\_Ag85A<sup>[199-261]</sup> при пассировании в куриных эмбрионах.

Несмотря на модификацию гена NS и вставку гетерологичных антигенов, штамм A/PR8/НК-NS80-E85A унаследовал са- и ts-фенотип штамма-донора НК/162/35, на основе которого он был сконструирован. Эти данные дополняют уже опубликованные результаты относительно сохранения са-фенотипа гриппозного вектора при вставке гетерологичных антигенов в ген HA [18, 19].

Вирус A/PR8/НК-NS80-E85A был полностью аттенуирован для мышей,

поскольку не вызывал достоверных изменений их массы и не размножался в лёгких животных. При этом размножение вируса было отмечено в носовых ходах мышей, что характерно для са-реассортантных штаммов [20—22].

Нами была продемонстрирована способность гриппозного вектора A/PR8/НК-NS80-E85A индуцировать CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th-1-типа к антигену Ag85A у иммунизированных мышей линии C57/black при однократном интраназальном введении. При этом наибольшее число специфически стимулированных лимфоцитов вырабатывали ИФН-γ. Полученные результаты коррелируют с ранее опубликованными данными, где была также обнаружена большая доля CD4<sup>+</sup>-Т-клеток, секретирующих ИФН-γ в ответ на интраназальное введение рекомбинантного гриппозного вектора [5]. Таким образом, несмотря на частичную делецию в рекомбинантном (химерном) гене NS, вектор A/PR8/НК-NS80-E85A содержит достаточное количество функциональных Т-клеточных эпитопов антигена Ag85A [23], необходимых для стимуляции иммунного ответа. Кроме того, обнаруженные полифункциональные Т-лимфоциты благодаря более выраженной эффекторной функции по сравнению с Т-клетками, секретирующими только один цитокин, могут рассматриваться в качестве потенциального иммунологического маркера протективного иммунитета при туберкулезе [24, 25].

**Заключение**

В результате работы сконструирован рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A на основе са-гриппозного вектора с укороченным белком NS1, содержащий вставку туберкулёзных антигенов ESAT-6 и Ag85A. Рекомбинантный штамм PR8/НК-NS80-E85A обладал са- и ts-фенотипом и был аттенуирован для мышей. Методами иммунофлюоресцентного окрашивания и Вестерн-блот показана экспрессия белка ESAT-6 при заражении реком-

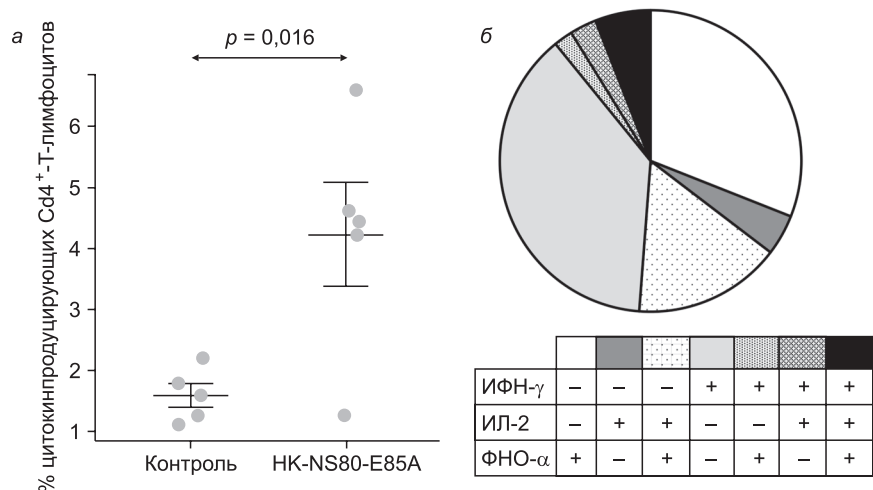


Рис. 5. Индукция Т-клеточного ответа при иммунизации мышей штаммом A/PR8/НК-NS80-E85A.

а — относительное содержание цитокинпродуцирующих CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (в %) в спленотах мышей после интраназальной иммунизации рекомбинантным вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A и контрольным вирусом без вставки A/PR8-NS124-ESAT6 (контроль). Значение *p* критерия дано по результатам *t*-теста Стьюдента (б) Доля антиген-специфических CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН-γ, ИЛ-2 и ФНО-α в различных сочетаниях после интраназальной иммунизации рекомбинантным вирусом A/PR8/НК-NS80-E85A.

бинантным вирусом PR8/НК-NS80-E85A клеток MDCK. При интраназальном введении мышам рекомбинантный вирус PR8/НК-NS80-E85A стимулировал специфический противотуберкулезный CD4<sup>+</sup>-Т-клеточный ответ Th1- типа с образованием полифункциональных антигенспецифических Т-клеток.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность ведущему лаборатории биотехнологий диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Е.А. Сорокину за предоставленные антитела 1Н7.

**Финансирование.** Работа поддержана грантом «УМНИК» Фонда содействия развитию № 7934ГУ/2015 и премией Правительства Санкт-Петербурга победителя конкурса грантов 2016 г. для студентов вузов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1—3, 5, 6, 8—11, 14—16, 18, 20, 21, 23—25 см. REFERENCES)

- Стукова М.А., Зabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S. и др. Профилактика туберкулеза: современные подходы к разработке противотуберкулезных вакцин. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012; (11): 45—52.
- Заболотных Н.В., Шурыгина А.-П.С., Виноградова Т.И., Витовская М.Л., Хайруллин Б.М., Сандыбаев Н.Т. и др. Усиление протективного эффекта вакцины БЦЖ при мукозальной бустиммунизации гриппозным вектором, экспрессирующим микобактериальные белки ESAT-6 и Ag85A. *Биофармацевтический журнал*. 2016; 8(6): 25—31.
- Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потапчук М.В., Репко И.А., Коротков А.В., Сергеева М.В. и др. Характеристика холодоадаптированного штамма вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 (H3N2) как потенциального донора аттенуации и высокой репродуктивности. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(6): 13—7.
- Пулькина А.А., Сергеева М.В., Петров С.В., Фадеев А.В., Комиссаров А.Б., Романовская-Романько Е.А. и др. Влияние мутаций в нуклеопротеине на репликацию реассортантов вируса гриппа А/Гонконг/1/68/162/35 при различных температурах. *Молекулярная биология*. 2017; 51(2): 378—83.
- Пулькина А.А., Сергеева М.В., Синцова К.С., Комиссаров А.Б. Влияние особенностей структуры РНК на генетическую стабильность вставки туберкулезных антигенов в гриппозном векторе. В кн.: *Неделя науки СПбГУ. Материалы научной конференции с международным участием*. СПб.; 2016: 492—5.
- Третьак Т.С., Исакова-Сивак И.Н., Кореньков Д.А., Смолоногина Т.А., Руденко Л.Г. Анализ ростовых характеристик векторных вакцин против респираторно-синцитиального вируса. *Медицинский академический журнал*. 2016; 16(4): 171—2.
- Дешева Ю.А., Лу Х., Рекстин А.Р., Кац М.Д., Руденко Л.Г., Климов А.И. Прививочные свойства реассортантного холодоадаптированного штамма вируса гриппа А(H5N2) при интраназальном введении мышам. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(4): 27—30.
- Zabolotnykh N.V., Shurygina A.-P.S., Vinogradova T.I., Vitovskaya M.L., Khayrullin B.M., Sandybaev N.T., et al. Mucosal immunization with influenza vector expressing ESAT-6 and Ag85A antigens of *M. tuberculosis* enhances protective effect of BCG vaccine. *Biofarmatsevticheskiy zhurnal*. 2016; 8(6): 25—31. (in Russian)
- Flórido M., Pillay R., Gillis C.M., Xia Y., Turner S.J., Triccas J.A., et al. Epitope-specific CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T-cell responses induced by recombinant influenza A viruses protect against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur. J. Immunol.* 2015; 45(3): 780—93.
- Ferko B., Stasakova J., Sereinig S., Romanova J., Katinger D., Niebler B., et al. Hyperattenuated recombinant influenza A virus nonstructural-protein-encoding vectors induce human immunodeficiency virus type 1 Nef-specific systemic and mucosal immune responses in mice. *J. Virol.* 2001; 75(19): 8899—908.
- Kittel C., Ferko B., Kurz M., Voglauer R., Sereinig S., Romanova J., et al. Generation of an influenza A virus vector expressing biologically active human interleukin-2 from the NS gene segment. *J. Virol.* 2005; 79(16): 10672—7.
- Egorov A., Brandt S., Sereinig S., Romanova J., Ferko B., Katinger D., et al. Transfectant influenza A viruses with long deletions in the NS1 protein grow efficiently in Vero cells. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6437—41.
- Tsybalova L.M., Gorev N.E., Potapchuk M.V., Repko I.A., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., et al. Characterization of Cold-adapted Influenza Strain A/Hong Kong/1/68/162/35 as a Potential Donor of Attenuation and High Reproduction. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(6): 13—7. (in Russian)
- Pul'kina A.A., Sergeeva M.V., Petrov S.V., Fadeev A.V., Komissarov A.B., Romanovskaya-Roman'ko E.A., et al. Impact of mutations in nucleoprotein on replication of influenza virus A/Hong Kong/1/68/162/35 reassortants at different temperatures. *Molekul'yarnaya biologiya*. 2017; 51(2): 378—83. (in Russian)
- Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27: 493—7.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J.M., ed. *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005: 571—607.
- Vasin A.V., Petrova A.V., Egorov V.V., Plotnikova M.A., Klotchenko S.A., Karpenko M.N., et al. The influenza A virus NS genome segment displays lineage-specific patterns in predicted RNA secondary structure. *BMC Res. Notes*. 2016; (9): 279.
- Pul'kina A.A., Sergeeva M.V., Sintsova K.S., Komissarov A.B. Influence of RNA structure peculiarities on genetic stability of insertion of tuberculosis antigens in the influenza vector. In: *SPbSTU Week of Science. Proceedings of the Scientific Conference with International Participation [Nedelya nauki SPbPU. Materialy nauchnoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem]*. St. Petersburg; 2016: 492—5. (in Russian)
- Isakova-Sivak I., Tretiak T., Rudenko L. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2016; 15(10): 1241—3.
- Tretiak T.S., Isakova-Sivak I.N., Koren'kov D.A., Smolonogina T.A., Rudenko L.G. Analysis of the growth characteristics of vector vaccines against the respiratory syncytial virus. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal*. 2016; 16(4): 171—2. (in Russian)
- Romanov J.R., Ermachenko T.A., Alexandrova G.I., Tannock G.A. Interference between cold-adapted (ca) influenza A and B vaccine reassortants or between ca reassortants and wild-type strains in eggs and mice. *Vaccine*. 1994; 12(1): 23—7.
- Chen H., Matsuoka Y., Swayne D., Chen Q., Cox N.J., Murphy B.R., et al. Generation and characterization of a cold-adapted influenza A H9N2 reassortant as a live pandemic influenza virus vaccine candidate. *Vaccine*. 2003; 21(27-30): 4430—6.
- Desheva Yu.A., Lu Kh., Rekstin A.R., Kats M.D., Rudenko L.G., Klimov A.I. The inoculative properties of cold-adapted reassortant A(H5N2) influenza strain during intranasal administration to mice. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(4): 27—30. (in Russian)
- Huygen K. The Immunodominant T-Cell Epitopes of the Mycolyl-Transferases of the Antigen 85 Complex of *M. tuberculosis*. *Front. Immunol.* 2014; (5): 321.
- Thakur A., Pedersen L.E., Jungersen G. Immune markers and correlates of protection for vaccine induced immune responses. *Vaccine*. 2012; 30(33): 4907—20.
- Dietrich J., Aagaard C., Leah R., Olsen A.W., Stryhn A., Doherty T.M., et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J. Immunol.* 2005; 174(10): 6332—9.

#### REFERENCES

- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/)
- World Health Organization. BCG vaccine. WHO position paper. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2004; 79(4): 27—38.
- Ottenhoff T.H., Kaufmann S.H. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? *PLoS Pathog.* 2012; 8(5): e1002607.
- Stukova M.A., Zabolotnykh N.V., Vinogradova T.I., Gergert V.Ya., Apt A.S., Kaprel'yants A.S. Prevention of tuberculosis: current approaches to development of vaccines. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2012; (11): 45—52. (in Russian)
- Stukova M.A., Sereinig S., Zabolotnykh N.V., Ferko B., Kittel C., Romanova J., et al. Vaccine potential of influenza vectors expressing *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein. *Tuberculosis*. 2006; 86(3-4): 236—46.
- Kuznetsova I., Shurygina A.P., Wolf B., Wolschek M., Enzmann F., Sansybay A., et al. Adaptive mutation in nuclear export protein allows stable transgene expression in a chimeric influenza A virus vector. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 2): 337—497.



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017  
УДК 578.831.31:578.53

*Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Соминина А.А.*

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА, ВЫДЕЛЕННЫХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В 2013—2016 гг.

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Впервые представлена антигенная и генетическая характеристика российских изолятов респираторно-синцициального вируса (РСВ). Из 69 штаммов, выделенных в Санкт-Петербурге, 93% принадлежали к антигенной группе РСВ-А. Антигенные вариации в F-белке РСВ оценивали с помощью панели из 6 моноклональных антител методом микрокультурального иммуноферментного анализа (ИФА). В зависимости от снижения (по отношению к референс-штамму Long) эффективности взаимодействия с моноклональными антителами изоляты РСВ-А были разделены на 4 антигенные подгруппы. Результаты секвенирования 24 изолятов показали, что более 60% из них имели замены в значимых сайтах F-белка по сравнению с референс-вирусом ON67-1210A современного генотипа РСВ ON1/GA2. Наиболее вариабельными были сигнальный пептид и антигенный сайт II. При сравнении результатов ИФА и секвенирования не удалось выявить какие-либо определённые ключевые замены в аминокислотной последовательности F-белка, влияющие на взаимодействие вируса с антителами. Нуклеотидная последовательность F-гена 19 из 24 охарактеризованных изолятов была близка к таковой референс-вируса ON67-1210A и значительно отличалась от РСВ-А Long и A2. Отдельную группу составили 5 штаммов, у которых структура F-белка была приближена к РСВ Long.

**Ключевые слова:** респираторно-синцициальный вирус; клинические изоляты; F-белок; моноклональные антитела; антигенные сайты; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Кривицкая В.З., Синцова К.С., Петрова Е.Р., Сверлова М.В., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Комиссаров А.Б., Фадеев А.В., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Суховецкая В.Ф., Соминина А.А. Генетическая и антигенная характеристика штаммов респираторно-синцициального вируса, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 273-282. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282>

*Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A.*

## GENETIC AND ANTIGENIC CHARACTERISTICS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS STRAINS ISOLATED IN ST. PETERSBURG IN 2013-2016

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Antigenic and genetic characteristics of Russian RSV isolates are presented for the first time. Of the 69 strains isolated in St. Petersburg, 93% belonged to the RSV-A antigenic group. The antigenic variations in the F-protein RSV were analyzed using a panel from 6 monoclonal antibodies by the method of micro-cultural ELISA. Depending on the decrease in the effectiveness of interaction with monoclonal antibodies (relative to the reference strain Long), RSV-A isolates were divided into 4 antigenic subgroups. The results of 24 isolates sequencing showed that more than 60% of them had substitutions in significant F-protein sites compared to the ON67-1210A reference strain of the current RSV genotype ON1/GA2. The most variable were the signal peptide and antigenic site II. When comparing the results of ELISA and sequencing, it was not possible to identify any specific key substitutions in the amino acid sequence of the F-protein that affect the interaction of the virus with antibodies. The nucleotide sequence of the F-gene from 19 of the 24 characterized isolates was close to that of ON67-1210A reference virus and was significantly different from RSV-A Long and A2 viruses. A separate group consisted of 5 strains, in which the F-protein structure was approximated to RSV Long.

**Key words:** respiratory syncytial virus; clinical isolates; F-protein; monoclonal antibodies; antigenic sites; phylogenetic analysis.

**For citation:** Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova E.R., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Komissarov A.B., Fadeev A.V., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Afanaseva V.S., Sukhovetskaya V.F., Sominina A.A. Genetic and antigenic characteristics of respiratory syncytial virus strains isolated in St. Petersburg in 2013-2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 273-282. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-273-282>

**For correspondence:** Vera Z. Krivitskaya, PhD, Leading researcher, Laboratory of Influenza and ARVI risk factors, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [vera.kriv@influenza.spb.ru](mailto:vera.kriv@influenza.spb.ru)

### Information about authors:

Krivitskaya V.Z., <http://orcid.org/0000-0002-9146-0816>;

Tsareva T.R., <http://orcid.org/0000-0003-4757-0521>;

Pisareva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-9545-7649>;

Sominina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-1015-595X>

Sorokin E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1732-1727>;

Komissarov A.B., <http://orcid.org/0000-0003-1733-1255>;

Buzitskaya Zh.V., <http://orcid.org/0000-0002-8394-102X>;

**Для корреспонденции:** Кривицкая Вера Зорьевна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории изучения факторов риска при гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [vera.kriv@influenza.spb.ru](mailto:vera.kriv@influenza.spb.ru)

**Acknowledgments.** This work was partially supported by the Foundation «Scientific research of the role of influenza viruses in development of severe forms of acute viral respiratory infections in hospitalized patients» in the framework of the International Project «Global Influenza Hospital-based Surveillance Network», Branch: Russian Federation, St. Petersburg, instituted by the Foundation for Influenza Epidemiology (France).

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

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

## Введение

Актуальность проведенного исследования определяется значимостью респираторно-синцитиальной вирусной (РСВ) инфекции (РСВИ) в структуре инфекционной патологии дыхательных путей, особенно среди детей первых двух лет жизни и престарелых людей. В России надзор за распространением РСВИ осуществляется в рамках традиционного и сигнального надзора. В период эпидемии 2012—2013 гг. доля РСВИ среди госпитализированных детей первого года жизни в Санкт-Петербурге составила 13,5% (частота, сравнимая с данными по диагностированию гриппа), а среди людей старше 75 лет — 5,9% [1]. В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов изменчивости РСВ. Характеристику антигенной вариабельности вирусных белков с последующим сопоставлением с результатами секвенирования проводят с использованием РСВ-специфичных моноклональных антител (МКА) [2, 3]. В зависимости от особенностей взаимодействия с МКА циркулирующие РСВ относят к двум антигенным группам (РСВ-А и РСВ-В), которые подразделяются на множество генетических вариантов. В один и тот же эпидемический сезон в одном регионе могут социркулировать вирусы, принадлежащие к нескольким генотипам (до 12) с постепенной селекцией 1—2 вариантов к концу сезона под действием иммунологического пресса. РСВ-А и РСВ-В социркулируют в различных пропорциях практически во время всех эпидемий. В большинстве случаев превалирует РСВ-А [4]. Филогенетические отношения циркулирующих РСВ строят по результатам секвенирования *F*- и *G*-генов, кодирующих 2 основных поверхностных гликопротеина вируса. Структура более вариабельного *G*-гена лежит в основе наиболее распространенной классификации. Система генотипирования РСВ по *F*-гену разработана слабо. Наиболее полная филогенетическая характеристика РСВ по *F*-гену дана в работах Н. Кимуры и соавт. [5, 6], в которых авторы приходят к выводу о независимой эволюции *F*- и *G*-генов РСВ. С учетом того, что *F*-белок является основным индуктором синтеза вируснейтрализующих протективных антител (АТ) [7], становится понятной необходимость дальнейшего изучения изменчивости не только *G*-, но и *F*-гена, а также антигенной вариабельности *F*-белка современных циркулирующих РСВ. Антигенные особенности функционально значимых вирусных детерминант необходимо учитывать при создании вакцин и противовирусных препаратов.

Антигенные и генетические свойства РСВ, циркулирующих на территории России, практически не изучены, что обуславливает актуальность характеристики отечественных изолятов. Целью настоящей работы являлась оценка антигенной вариабельности *F*-белка современных РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге, с использованием полученных МКА, а также характеристика *F*-гена этих вирусов.

## Методы

*Выделение РСВ из клинических материалов в культуре клеток.*

РСВ выделяли в клеточной культуре МА-104 (получены из коллекции Музея вирусов ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа») из назофарингеальных мазков, взятых на 2—4-й день ОРВИ у детей в возрасте от 9 дней до 14 лет, госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга в 2013—2016 гг. Наличие РНК РСВ в исходном клиническом материале определяли при помощи ПЦР в реальном времени. В качестве референс-вирусов использовали эталонные штаммы РСВ: Long (РСВ-А), полученный из National Institute for Medical Research (Лондон), A2 (РСВ-А) и 9320 (РСВ-В), полученные из коллекции Influenza Reagent Resource (IRR) (Университет Амстердама, Нидерланды).

*Микрокультуральный ИФА (мк-ИФА).*

Для оценки антигенных свойств изолятов РСВ был разработан вариант мк-ИФА. Монослойные культуры клеток МА-104, выращенные в 96-луночных планшетах («Thermo Scientific Nunc», Дания), инфицировали вирусами (100 ТЦД<sub>50</sub>). Через 7—10 дней клетки в лунках фиксировали ацетоном, после чего в них вносили *F*-специфичные МКА в различных разведениях. Для последующей детекции МКА, связавшихся с внутриклеточным *F*-белком, добавляли пероксидазный конъюгат козьих АТ к IgG мыши («Sigma», США). После добавления субстратной смеси оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм (OD<sub>450</sub>). Подробно метод мк-ИФА был описан нами ранее [8]. В целях стандартизации результатов метода эффективность взаимодействия каждого штамма с МКА (в выбранном рабочем разведении 1—2 мкг/мл) выражали в процентах от уровня связывания (OD<sub>450</sub>) данного типа МКА с вирусом-иммуногеном РСВ Long. Полученные параметры были приняты за положительные контроли связывания (K<sup>+</sup>), равные 100%.

*Генетические исследования.*

Для генетического анализа использовали новые изоляты РСВ (1—2-й пассажи, проведенные в культуре клеток МА-104). Вирусную РНК выделяли с помощью коммерческого набора QIAamp Viral RNA Mini Kit («QIAGEN», Германия). ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени для определения РСВ-А или РСВ-В проводили по технологии TaqMan с использованием набора реагентов QIAGEN One-Step RT-PCR Kit («QIAGEN», Германия). Детекцию выполняли по двум каналам: FAM ( $\lambda = 520$  нм), Cy5.5 ( $\lambda = 703$  нм), использовали термоциклер CFX96 Real-Time System C100 Thermal Cycler («BioRad», США). Программа амплификации: 95°C 10 мин; 45 циклов — 95°C 3 с; 55°C 10 с; 65°C 60 с.

Для ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени использовали авторские праймеры:

hRSVA-F AGA TCA ACT TCT GTC ATC CAG CAA  
hRSVA-R TTC TGC ACA TCA TAA TTA GGA GTA  
TCA AT



Рис. 1. Дендрограмма F-гена, характеризующая филогенетические отношения изолятов РСВ, выделенных в 2013—2016 гг.

Указаны референсные штаммы-прародители (Long, A2), вирус ON67-1210A, определяющий группу ON1/GA2 по G-гену.

hRSVA-P (FAM)CAC CAT CCA ACG GAG CAC AGG  
AGA T(RTQ1)  
hRSVB-F GGC TGA ATC ATT TCC TCA CAT CAT G  
hRSVB-R CTTCTACCATTCAAGCAATGACCTCTAAT  
hRSVB-P (Cy5.5)TTACATAAAAACCTCAAGTATCA  
CAATCAAACACTAAATCGACA(BHQ2).

ОТ-ПЦР для амплификации F-гена РСВ-А проводили с использованием праймеров, предложенных E. Agenbach и соавт. [9] в собственной модификации. Для амплификации G-гена РСВ использовали авторские праймеры:

M 1 3 F - h R S V A - F 1  
T G T A A A A C G A C G G C C A G T  
GGGGCAAATAACAATGGAGTT  
h R S V A - F 2  
CAGCAAAGTGTTAGACCTCAA  
h R S V A - R 3  
GTTACCTTTTACATAGAGACT  
M13R-hRSVA-R4 CAGGAAACAGCTATG  
CATTGTAAGAACATGATTAGGTGCT  
M13F-hRSVAB-G (F)  
T G T A A A A C G A C G G C C A G T  
GCAAATGCAAACATGTCCAAA  
M 1 3 R - h R S V A - G ( R )  
C A G G A A A C A G C T A T G C A  
ACYATACGCTTTTAAATGACTA.

Для ОТ-ПЦР применяли комплект реагентов QIAGEN One-Step PCR Kit («QIAGEN», Германия). Программа ОТ-ПЦР: 50°C 45 мин; 95°C 15 мин; 94°C 1 мин; 52°C 30 с; 72°C 3 мин (40 циклов); 72°C 10 мин. Молекулярную массу ДНК после гель-электрофореза в агарозе определяли при помощи маркера (1 kb, «Thermo Scientific», США). Секвенирование осуществляли методом Сэнгера с использованием коммерческого набора реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Программа секвенирующей реакции: 96°C 10 с, 50°C 5 с, 60°C 4 мин (25 циклов). Праймеры для секвенирования использовали те же, что и для ОТ-ПЦР. Нуклеотидные последовательности определяли 4-канальной автоматизированной системой капиллярного электрофореза и флуоресцентной детекции ДНК-фрагментов ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Капиллярный электрофорез проводили в полимере ABI PRISM 3130 POP-7 («Applied Biosystems», США). Сборку нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе ContigExpress пакета Vector NTI 10 Advance («Invitrogen», США). Для выравнивания последовательностей и филогенетического анализа (построения филогенетических деревьев методом максимального правдоподобия, модель Тамура-3 с гамма-распределением, бутстрэп 1000) использовали программу MEGA 7.

### Результаты

*Генетическая характеристика изолятов РСВ.*

Проведен сравнительный анализ результатов секвенирования F-гена 24 изолятов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. По данным ОТ-ПЦР, все вирусы принадлежали к РСВ-А, референс-штаммами которого являются Long (изолирован в 1956 г. в США) и A2 (выделен в Австралии в 1961 г.). В соответствии с критериями, предложенными Кимурой [5], по структу-

ре *F*-гена большинство изолятов (за исключением пяти) можно отнести к генотипу GA2, для которого характерны аминокислотные (АК) замены (по отношению к штамму Long) V384I и N276S. Два вируса из этой группы (RSV/St Petersburg/5904/2014 и RSV/St Petersburg/5577/2014) имели другую мутацию в 276-м положении (N276H), которая не рассматривалась Кимурой. Тем не менее данные вирусы лучше всего вписались в схему, определяющую генотип GA2. Особый кластер составили 5 вирусов (RSV/St Petersburg/479/2014, RSV/St Petersburg/4734/2014, RSV/St Petersburg/16063/2014, RSV/St Petersburg/14597/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014), у которых была выявлена замена V384I, но АК-остаток (АО) в положении 276 остался неизменённым по сравнению с РСВ Long. Поскольку замена V384I характерна для всех генотипов РСВ-А, описанных Кимурой, а другие установленные нами мутации не укладывались в предложенную им схему, на данный момент классифицировать эту группу изолятов по структуре *F*-гена не представляется возможным. Это свидетельствует о недостатке данных о генетических особенностях современных циркулирующих РСВ и необходимости дальнейшего изучения структуры *F*-гена.

Следует отметить, что помимо *F*-гена у 20 из 24 рассмотренных изолятов, в том числе у 5 штаммов без замены в 276-м положении, было проведено секвенирование *G*-гена. По структуре *G*-гена все эти вирусы относились к генотипу ON1/GA2 [3]. Референс-штамм РСВ-А ON67-1210А, отнесенный по результатам секвенирования *G*-гена к этому генотипу, был выделен в 2010 г. в Онтарио (Канада). Для вирусов данного генотипа характерна инсерция 72 нуклеотидов в *G*-гене, которая отсутствовала у РСВ, циркулировавших ранее [10]. В последние годы практически во всех странах в циркуляции преобладают вирусы РСВ-А генотипа ON1/GA2 (согласно классификации по *G*-гену) [3, 11].

Для оценки филогенетических отношений между вирусами, выделенными в Санкт-Петербурге, и РСВ, циркулировавшими в это же время (2013—2016) в других регионах мира, был проведен сравнительный анализ структуры *F*-гена с учетом информации, имеющейся в базе данных GenBank (рис. 1). Большая часть проанализированных вирусов оказалась близка к референс-штамму ON1/GA2 и далеко отошла от вирусов-прародителей. В эту же группу вошли 17 из 22 изолятов из Санкт-Петербурга, включённых в построение дендрограммы. Отдельную группу составили 5 штаммов: RSV/St Petersburg/479/2014, RSV/St Petersburg/4734/2014, RSV/St Petersburg/16063/2014, RSV/St Petersburg/14597/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014. По сравнению с другими РСВ у них отсутствовали замены R213S и N276S, которые показаны для всех штаммов РСВ-А 2013—2016 годов выделения (согласно данным GenBank). Такая особенность структуры *F*-белка приближает эти вирусы к РСВ Long, у которого в этих положениях также находятся аргинин и аспарагин. В дополнение к этому у штамма RSV/St Petersburg/479/2014 в положении 124 выявлен лизин (К), как у Long и А2, а не аспарагин (N), как у всех остальных проанализированных РСВ (рис. 2).

#### Антигенная характеристика *F*-белка изолятов РСВ.

Для локализации АК-замен и оценки их значимости для функционирования вируса по результатам литературного поиска была составлена антигенная карта *F*-белка РСВ (табл. 1).

С учётом этих данных и результатов секвенирования оценивали вариабельность *F*-белка у 24 штаммов РСВ,

выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг. Межштаммовые вариации были незначительны. Изменения в аминокислотной последовательности (АП) между изолятами наблюдали лишь по 29 позициям, что соответствовало 95% идентичности. При этом 3 переменных позиции приходились на сигнальный пептид. При сравнении с РСВ Long у всех 24 изолятов была выявлена достаточно высокая частота замен во многих функционально значимых регионах *F*-белка, включая антигенные сайты (АГ-сайты) с АП 205—221, АГ-сайты I и II, ответственные за индукцию синтеза вируснейтрализующих АТ, а также в области HR2, участвующей в конформационных перестройках *F*-белка при его созревании (рис. 3, а). Сравнение с современным референс-вирусом ON67-1210А показало, что 46% (11/24) полученных нами изолятов имели замены в нескольких сайтах и еще 17% (4/24) — лишь одну мутацию. Наиболее вариабельным являлся сигнальный пептид: 59% штаммов имели замены в этом регионе. Изменения в области АГ-сайта с АП 205—221 и АГ-сайта II (АП 255—278) выявлены в 21 и 29% случаев соответственно (рис. 3, б).

У 69 штаммов РСВ 2013/2014 годов выделения антигенные особенности были оценены в мк-ИФА с использованием 6 полученных нами МКА, направленных к конформационно-зависимым сайтам *F*-белка. Ранее было показано, что МКА RS-25, 9С5 и 4F2 направлены к эпитопам *F*-белка, перекрывающимся на 65—70%, но не имеющих общих сайтов реагирования с МКА 5F3, 5Н8 и 1Н3, которые также не конкурировали друг с другом за связь с вирусом. МКА 5F3 и 5Н8 обладали вируснейтрализующей активностью по отношению к РСВ-А [8]. Изоляты были предварительно типированы как РСВ-А или РСВ-В методом ОТ-ПЦР в реальном времени. К РСВ-А было отнесено 93% штаммов (64/69). Все МКА были получены к РСВ Long и обладали по отношению к нему одинаково высокой активностью в мк-ИФА. В зависимости от снижения эффективности взаимодействия с различными *F*-специфичными МКА изоляты были разделены на 5 подгрупп, 4 из которых составили РСВ-А.

Изоляты из подгруппы 1 слабее, чем РСВ Long, реагировали только с нейтрализующими МКА 5Н8, вирусы из подгруппы 2 в дополнение к этому — еще и с МКА 1Н3. РСВ-А из подгруппы 3, как и РСВ-В, характеризовались более слабым взаимодействием с тремя МКА — 5Н8, 1Н3 и 5F3. С РСВ из малочисленной группы 4 слабее реагировали 4 МКА — 5Н8, 1Н3, 5F3 и 4F2. Нейтрализующие МКА RS-25, 9С5 и 4F2 взаимодействовали с изолятами РСВ-А и РСВ-В практически так же интенсивно, как и с Long, что свидетельствует о консервативности их эпитопов-мишеней (табл. 2).

Была предпринята попытка выявить ключевые АК-замены в АП *F*-белка, влияющие на связь антиген/анти-тело. С этой целью для 18 изолятов 2013/2014 годов трех подгрупп (1, 2 и 3 согласно табл. 2) было проведено сопоставление уровня снижения активности МКА в мк-ИФА с характерными (по отношению к Long) АК-заменами в *F*-белке. Большая часть охарактеризованных штаммов ( $n = 13$ ) из подгрупп 2 и 3 имели одинаковые мутации в *F*-белке, отличающие их от РСВ Long и других изолятов: R213S в АГ-сайте с АП 205—221 и N276H/S в АГ-сайте II. При этом не было выявлено каких-либо определённых мутаций, позволивших дифференцировать штаммы из подгрупп 2 и 3. У остальных 5 вирусов, характеристики которых представлены в табл. 3, АО в этих двух положениях не отличались от таковых у РСВ Long. У вируса RSV/St Petersburg/14597/2014 в отличие от других штаммов, в





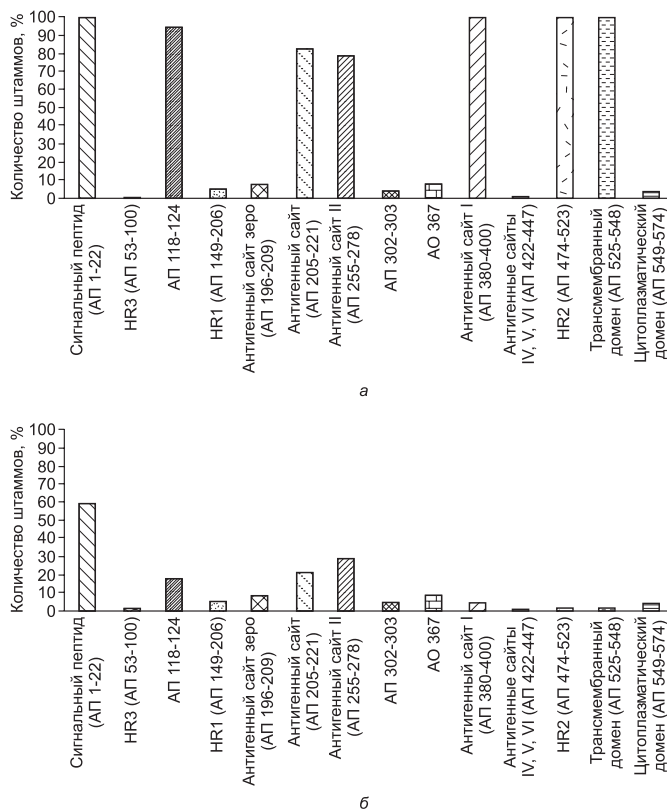


Рис. 3. Частота аминокислотных замен в различных сайтах F-белка изолятов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2014—2016 гг., в сравнении с РСВ Long (а) и РСВ ON67-1210А (б).

том числе из той же подгруппы 3, была выявлена уникальная замена Q302P. У вирусов RSV/St Petersburg/479/2014 и RSV/St Petersburg/14959/2014 из подгруппы 1 значительное снижение эффективности реагирования с нейтрализующими МКА 5Н8 ассоциировано с характерной заменой С367G/W, не встречающейся ни у одного из РСВ 2013—2016 годов выделения, представленных в базе данных GenBank. У RSV/St Petersburg/16063/2014 (антигенная подгруппа 2) и RSV/St Petersburg/4734/2014 (подгруппа 3) в F-белке отсутствовали замены, характерные для других изолятов. Однако секвенирование G-белка показало наличие множественных замен, характерных именно для этих двух вирусов, в консервативном рецепторном сайте РСВ с АП 164—198 (см. табл. 3, рис. 2).

Таким образом, у изолятов РСВ-А, принадлежащих согласно нашей классификации к разным антигенным подгруппам, снижение уровня реагирования с одними и теми же МКА могло быть вызвано различными мутациями в разных АГ-сайтах F-белка. С другой стороны, некоторые филогенетически близкие вирусы (в том числе 5 штаммов из отдельного кластера) были отнесены к разным антигенным подгруппам.

### Обсуждение

Впервые была получена антигенная и генетическая характеристика российских изолятов РСВ. Показано, что 93% вирусов, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013—2016 гг., относились к РСВ-А. Нуклеотидная последовательность F-гена 19 из 24 охарактеризованных

изолятов была близка к таковой референс-штамма ON67-1210А современного генотипа ON1/GA2 и значительно отличалась от вирусов-прародителей Long и А2. Пять штаммов, выделенных в 2014 г., составили отдельную группу, не укладывающуюся в рамки классификации Кимуры [5]. Следует отметить, что по данным секвенирования G-гена эти 5 штаммов подобно остальным изолятам из Санкт-Петербурга относились к современному генотипу ON1/GA2. При этом АП их F-белка была более архаичной и приближенной к РСВ Long, чем у других РСВ, циркулировавших в последние годы как в Санкт-Петербурге, так и в других регионах мира. Примечательно, что еще одну обособленную группу составили вирусы RSV-A/US/BID-V/2013 (GenBank: KJ643534.1, KJ643548.1, J643565.1, KJ643577.1, KJ643588.1), циркулировавшие в 2013 г. в Теннесси, США. Их особенностью, общей с полученными нами изолятами из отдельного кластера, являлось отсутствие (по сравнению с РСВ Long) замены N276S в F-белке, которая характерна практически для всех штаммов РСВ-А 2013—2016 годов выделения независимо от места их циркуляции (по данным GenBank). При этом по структуре G-белка американские вирусы принципиально отличались от всех изолятов из Санкт-Петербурга. Они не имели нуклеотидной вставки, т. е. относились к другому генотипу. Эти данные подтверждают концепцию о независимой эволюции F- и G-генов РСВ [5].

Последовательность F-белка современных изолятов из Санкт-Петербурга в достаточной мере отличалась не только от таковой РСВ Long, но и от референсного вируса того же генотипа. Сравнение с современным референсным штаммом ON67-1210А показало, что более 60% отечественных вирусов имели замены в значимых сайтах F-белка. Наиболее варибельным оказался сигнальный пептид, что согласуется с данными других исследователей [11]. Треть РСВ из Санкт-Петербурга имели также замену в АГ-сайте II (АП 255—278), с которым взаимодействует основная масса эффективных вируснейтрализующих АГ [7, 14].

Наличие антигенных вариаций в F-белке циркулирующих вирусов оценивают с помощью F-специфичных МКА [27, 28]. Панель полученных нами разнонаправленных МКА к F-белку позволила оценить антигенную вариативность изолятов РСВ из Санкт-Петербурга в разработанном варианте мк-ИФА. В результате проведенного исследования не удалось связать изменения антигенных свойств вирусов, следствием чего являлось снижение (по сравнению с РСВ Long) эффективности взаимодействия с МКА, в том числе вируснейтрализующими, с какими-либо определенными единичными АК-заменами в F-белке. Эти данные согласуются с наблюдениями других исследователей. Так, антигенное картирование G-белка некоторых изолятов РСВ из Германии, проведенное с использованием G-специфичных МКА известной эпитопной направленности, не выявило корреляции между изменениями активности МКА и какими-либо определенными АК-заменами в сайтах связывания АГ [2]. У изолятов из Санкт-Петербурга сходные изменения антигенных свойств могли быть вызваны совершенно разными, характерными для них заменами в F-белке, такими как R213S, N276S/H, Q302P, C367G/W. Согласно данным литературы, эти АО играют важную роль в функционировании РСВ, а замены в этих положениях могут значительно изменить его антигенные свойства. Так, АО 213 входит в состав рецепторного сайта F-белка, а также АГ-сайта,

Антигенная карта F-белка РСВ

Сайт F-белка (аминокислотная последовательность)	Функция сайта F-белка при РСВИ	Источник
NH2 — 1—22	Сигнальный пептид (NH2-конец цепи F-белка)	[12]
23—52	Сайт с неизвестной функцией	[11]
51—66	CD4+ T-клеточный эпитоп (преимущественно для Th1)	[13]
62—69	Антигенный сайт Ø (zero). Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[14]
53—100	Heptad repeat domain 3(F2) *	[15]
95—106	CD8+ T-клеточный эпитоп	[16]
106—109	Первый сайт разрезания предшественника F-белка (F0)	[17]
131—136	Второй сайт разрезания предшественника F-белка (F0)	[17]
131—147	Рецепторная функция. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
137—154	Пептид слияния. Взаимодействие с клеточной мембраной	[19]
146—160	CD4+ T-клеточный эпитоп	[20]
149—206	Heptad repeat domain 1	[15]
183—199	CD4+ T-клеточный эпитоп. Активация вирусспецифичных Th1 и Th2	[20]
196—209	Антигенный сайт Ø (zero)	[14]
201—217	Рецепторная функция. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
205—221	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[21]
222—237	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[21]
249—258	CD8+ T-клеточный эпитоп	[16]
255—278	Антигенный сайт II. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[14]
262—276	Сайт связывания с паливизумабом (F-специфичные гуманизированные нейтрализующие антитела)	[22, 23]
276—379	Сайт с неизвестной функцией	[11]
380—400	Антигенный сайт I. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[11]
404—420	Гепаринсвязывающий сайт. Взаимодействие с гепарансульфатами клеточных мембран	[18]
412—524	CD4+ T-клеточный сайт. Активация вирусспецифичных Th1 и Th2	[24]
422—447	Антигенные сайты IV, V, VI. Индукция синтеза вируснейтрализующих антител	[25]
474—523	Heptad repeat domain 2	[15]
483—488	Индукция синтеза нейтрализующих антител	[26]
525—548	Трансмембранный домен	[12]
54—574—COOH	Цитоплазматический домен (COOH-конец цепи F-белка)	[12]

Примечание. \* — три консервативных гидрофобных домена (heptad repeat domain) F-белка, образованы биспиралями  $\alpha$ -участков со звеном спирали из 7 АО, участвуют в конформационных перестройках при созревании F0, что необходимо для высвобождения пептида слияния.

который индуцирует синтез вируснейтрализующих АТ [18, 21]. Замена положительно заряженного аргинина на незаряженный серин может повлечь за собой локальные пространственные сдвиги в структуре молекулы белка и изменения ее антигенных свойств. АО 276 принадлежит к АГ-сайту II (АП 255—278), к которому направлены РСВ-нейтрализующие АТ, в том числе препарат гуманизированных МКА паливизумаб (PVZ). Показано, что замена N276S у РСВ-А вызывает снижение связывания с PVZ, а также провоцирует возникновение других мутаций (K272E), приводящих к полной резистентности к препарату [22, 23]. АО 302 и 367 входят в регион F-белка с неизвестной функцией. Тем не менее известно, что пролин действует как структурный разрушитель регулярных элементов вторичной структуры пептидной цепи, таких как альфа-спирали и бета-листы, что приводит к конформационным изменениям молекулы. Положение цистеинов в белках РСВ, как правило, исключительно консерва-

тивно, поскольку они стабилизируют пространственную конфигурацию белков S=S-связями [25]. Поэтому замены Q302P или C367G/W с большой долей вероятности повлекут за собой изменения конформации и антигенных свойств белка в эпитопе.

Для двух вирусов из антигенных подгрупп 2 и 3 снижение взаимодействия с МКА не было связано с какими-либо заменами в АП F-белка, характерными для других изолятов. Однако анализ результатов секвенирования G-белка показал наличие характерных именно для этих изолятов множественных замен в сайте с АП 164—198. Этот регион вовлечен в белок-белковые взаимодействия при создании трёхмерной структуры молекулы G-белка. Известно, что помимо сложной пространственной организации мономеров и тримеров F-белок образует гетероолигомеры с G-белком за счет S=S-связей [29]. Если учесть эти данные, такие значимые замены в G-белке, как появление отрицательно заряженных остатков аспа-



Таблица 2

**Антигенная характеристика F-белка штаммов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге от пациентов с ОРВИ в 2013—2014 гг. (по результатам мк-ИФА)**

Вирусы	Антигенная группа вирусов	№ под-группы*	Число штаммов	Эффективность взаимодействия РСВ с МКА, % **					
				RS-25	9C5	5F3	4F2	5H8	1H3
Long (1956), референс-штамм	PCB-A	—	1	100	100	100	100	100	100
9320 (1979), референс-штамм	PCB-B	5	1	82	79	32	94	23	20
Штаммы, выделенные в Санкт-Петербурге	PCB-A	1	18	86 ± 10	90 ± 9	84 ± 11	95 ± 5	53 ± 12	83 ± 5
	PCB-A	2	17	89 ± 12	88 ± 9	87 ± 8	94 ± 4	57 ± 10	61 ± 9
	PCB-A	3	27	90 ± 8	87 ± 8	68 ± 4	93 ± 5	46 ± 8	64 ± 7
	PCB-A	4	2	85 ± 12	86 ± 7	60 ± 4	43 ± 7	43 ± 7	60 ± 6
	PCB-B	5	5	88 ± 8	89 ± 3	36 ± 3	90 ± 5	34 ± 9	36 ± 4

Примечание. \* — согласно данным антигенного анализа, проведенного с использованием полученных МКА; \*\* — % от уровня связывания данного типа МКА с PCB Long, принятого за 100% (положительный контроль К+). Здесь и в табл. 3: темно-серым цветом выделены случаи, когда показатели OD<sub>450</sub> составляли 60—75% от К+, светло-серым — показатели OD<sub>450</sub> ниже 60% от показателя К+. Доза заражения вирусами составляла 100 ПЦД<sub>50</sub>, рабочая концентрация МКА при детекции F-белка в мк-ИФА — 1—2 мкг/мл.

Таблица 3

**Сопоставление антигенной и генетической характеристик F-белка РСВ, выделенных от пациентов, госпитализированных в Санкт-Петербурге в 2014 г.**

Штамм	Антигенная под-группа*	Взаимодействие РСВ с МКА**						Характерные замены по отношению к PCB Long	Локализация характерных замен
		RS-25	9C	5F3	4F	5H	1H		
Long	—	100	100	100	100	100	100	—	—
RSV/St Petersburg/479/2014	1	93	93	79	92	46	90	F-белок: C367G	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 367)
RSV/St Petersburg/14959/2014	1	80	81	78	85	59	90	F-белок: C367W	
RSV/St Petersburg/5577/2014	2	100	79	99	100	59	55		Антигенный сайт F-белка (АП 205—221); рецепторный сайт F-белка (АП 201—217); антигенный сайт II F-белка (АП 255—278)
RSV/St Petersburg/13764/2014	2	92	93	99	106	70	68		
RSV/St Petersburg/5934/2014	2	100	95	98	118	72	38		
RSV/St Petersburg/7108/2014	2	100	100	90	85	51	75	F-белок: R213S,	
RSV/St Petersburg/878/2013	3	88	88	68	93	37	65		
RSV/St Petersburg/4210/2014	3	87	86	70	94	48	69		
RSV/St Petersburg/1086/2014	3	90	91	72	98	53	71	F-белок: N276S/H	
RSV/St Petersburg/8951/2014	3	81	85	68	92	52	60		
RSV/St Petersburg/10891/2014	3	99	99	60	90	35	60		
RSV/St Petersburg/3546/2014	3	100	100	67	97	44	75		
RSV/St Petersburg/6979/2014	3	96	81	69	96	57	71		
RSV/St Petersburg/14349/2014	3	88	88	63	85	42	58		
RSV/St Petersburg/5904/2014	3	97	88	75	93	45	50		
RSV/St Petersburg/14597/2014	3	86	92	69	86	37	58	F-белок: Q302P	Эпитоп F-белка с неизвестной функцией (АО 302—303)
RSV/St Petersburg/16063/2014	2	100	88	90	100	73	50	G-белок: H164D, F168Y, P172T, S174R, N178R, W183R, R188T, I189K, N191I, K193N	Центральный консервативный домен G-белка (АП 151—190); рецепторный гепаринсвязывающий сайт G-белка (АП 183—198)
RSV/St Petersburg/4734/2014	3	79	81	72	96	44	71	G-белок: F168V, S177R, P194N, G195D, K197N, T198K	

Примечание. \* — согласно данным, представленным в табл. 2; \*\* — для каждого штамма результаты взаимодействия с МКА выражены в % от уровня связывания данного МКА с PCB Long, принятого за 100% (положительный контроль К+).

рагиновой кислоты в положении 164 или 195, положительно заряженных остатков лизина/аргинина в положениях 174, 178, 183 и 189 или 177 и 198 вместо незаряженных аминокислот, а также замена лизина/аргинина на незаряженные АО (R188T, K193N или K197N), не могли

не повлиять на пространственную структуру G-белка, а, возможно, и комплексированного с ним F-белка.

Большинство РСВ-специфичных АТ, особенно нейтрализующих, взаимодействуют с конформационно-зависимыми эпитопами вирусных белков [7, 14]. От-

существование прямой корреляции между определенными единичными АК-заменами в F-белке и изменениями антигенных свойств вируса может быть связано с тем, что мутации в эпитопе-мишени для связи с АТ способны повлечь за собой конформационные сдвиги как непосредственно в данном сайте, так и в прилегающих регионах, а также, возможно, не только в F-белке. Со своей стороны мутации в G-белке могут влиять на комплексированный с ним F-белок, вызывая в нем локальные пространственные изменения, которые могут сказываться на эффективности взаимодействия с АТ. Отсутствие корреляции между единичными АК-заменами и изменениями его антигенных свойств можно рассматривать как косвенное подтверждение концепции об отсутствии позитивной селекции изменений F-белка РСВ (в отличие от наличия таковой для G-белка) под действием иммунного пресса и о возможной роли негативной селекции — элиминации из популяции вирусов, с которыми активно взаимодействуют противовирусные АТ [5, 22].

**Финансирование.** Часть работы была выполнена при финансовой поддержке гранта «Scientific research on study the role of influenza viruses in development of severe forms of acute viral respiratory infections in hospitalized patients» in frames of international project «Global Influenza Hospital-based Surveillance Network», Branch: Russian Federation, St. Petersburg», учрежденного Фондом по этиологии гриппа, Франция (The Foundation for Influenza Epidemiology).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2—7, 9—29 см. REFERENCES)

- Соминина А.А., Писарева М.М., Бузицкая Ж.В., Осидак Л.В., Суховещкая В.Ф., Афанасьева О.И. и др. Особенности этиологии респираторных вирусных инфекций у госпитализированных больных в зависимости от демографических, социально-экономических факторов и предшествующей вакцинации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2015; (3): 74—83.
- Кривичкая В.З., Петрова Е.Р., Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Сверлова М.В., Фадеев А.В. и др. Получение и характеристика моноклональных антител, специфичных к респираторно-синцитиальному вирусу. *Биотехнология*. 2016; (1): 65—75.

#### REFERENCES

- Sominina A.A., Pisareva M.M., Buzitskaya Zh.V., Osidak L.V., Sukhovetskaya V.F., Afanasyeva O.I., et al. Peculiarities of Etiology of Respiratory Virus Infections in Hospitalized Patients Depending on the Demographic, Socio-Economic Factors and Previous Vaccination. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2015; (3): 74—83. (in Russian)
- Adams O., Werzmirzowsky J., Hengel H. Genetic analysis and antigenic characterization of human respiratory syncytial virus group A viruses isolated in Germany 1996—2008. *Virus Genes*. 2013; 47(2): 210—8.
- Trento A., Ábrego L., Rodríguez-Fernández R., González-Sánchez M.I., González-Martínez F., Delfraro A., et al. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J. Virol.* 2015; 89(15): 7776—85.
- Melero J., Moore M. Influence of respiratory syncytial virus strain differences on pathogenesis and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013; 72: 59—82.
- Kimura H., Nagasawa K., Tsukagoshi H., Matsushima Y., Fujita K., Yoshida L.M., et al. Molecular evolution of the fusion protein gene in human respiratory syncytial virus subgroup A. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 43: 398—406.
- Kimura H., Nagasawa K., Kimura R., Tsukagoshi H., Matsushima Y., Fujita K., et al. Molecular evolution of the fusion protein (F) gene in human respiratory syncytial virus subgroup B. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 52: 1—9.
- Melero J.A., Mas V. The Pneumovirinae fusion (F) protein: A common target for vaccines and antivirals. *Virus. Res.* 2015; 209: 128—35.
- Krivitskaya V.Z., Petrova E.R., Sorokin E.V., Tsareva T.R., Sverlova M.V., Fadeev A.V., et al. Design and Characteristics of Monoclonal Antibodies Specific to Respiratory Syncytial Virus. *Biotechnologiya*. 2016; (1): 65—75. (in Russian)
- Agenbach E., Tiemessen C.T., Venter M. Amino acid variation within the fusion protein of respiratory syncytial virus subtype A and B strains during annual epidemics in South Africa. *Virus Genes*. 2005; 30(2): 267—78.
- Eshaghi A., Duvvuri V.R., Lai R., Nadarajah J.T., Li A., Patel S.N., et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32807.
- Tapia L.L., Shaw C.A., Aideyan L.O., Jewell A.M., Dawson B.C., Haq T.R., et al. Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90786.
- Day N.D., Branigan P.J., Liu C., Gutshall L.L., Luo J., Melero J.A., et al. Contribution of cysteine residues in the extracellular domain of the F protein of human respiratory syncytial virus to its function. *Viol. J.* 2006; (3): 34.
- Castilow E.M., Varga S.M. Overcoming T cell-mediated immunopathology to achieve safe RSV vaccination. *Future Virol.* 2008; 3(5): 445—54.
- McLellan J.S. Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Curr. Opin. Virol.* 2015; (11): 70—5.
- Lambert D.M., Barney S., Lambert A.L., Guthrie K., Medinas R., Davis D.E., et al. Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc. Natl. Acad. USA*. 1996; 93: 2186—91.
- Johnstone C., Guil S., Rico M.A., García-Barreno B., López D., Melero J.A., et al. Relevance of viral context and diversity of antigen-processing routes for respiratory syncytial virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 9): 2194—203.
- Zimmer G., Budz L., Herrler G. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(34): 31642—50.
- Crim R.L., Audet S.A., Feldman S.A., Mostowski H.S., Beeler J.A. Identification of linear heparin-binding peptides derived from human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein that inhibit infectivity. *J. Virol.* 2007; 81(1): 261—71.
- Martin D., Calder L.J., García-Barreno B., Skehel J.J., Melero J.A. Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 6): 1649—58.
- Tripp R.A., Hou S., Etchart N., Prinz A., Moore D., Winter J., et al. CD4(+) T cell frequencies and Th1/Th2 cytokine patterns expressed in the acute and memory response to respiratory syncytial virus I-E(d)-restricted peptides. *Cell Immunol.* 2001; 207(1): 59—71.
- Morton C.J., Cameron R., Lawrence L.J., Lin B., Lowe M., Luttick A., et al. Structural characterization of respiratory syncytial virus fusion inhibitor escape mutants: homology model of the F protein and a syncytium formation assay. *Virology*. 2003; 311(2): 275—88.
- Adams O., Bonzel L., Kovacevic A., Mayatepek E., Hoehn T., Vogel M. Palivizumab-resistant human respiratory syncytial virus infection in infancy. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 51(2): 185—8.
- Zhu Q., McAuliffe J.M., Patel N.K., Palmer-Hill F.J., Yang C.F., Liang B., et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J. Infect. Dis.* 2011; 203: 674—82.
- Singh S.R., Dennis V.A., Carter C.L., Pillai S.R., Jefferson A., Sahi S.V., et al. Immunogenicity and efficacy of recombinant RSV-F vaccine in a mouse model. *Vaccine*. 2007; 25(33): 6211—23.
- López J.A., Bustos R., Orvell C., Berois M., Arbiza J., García-Barreno B., et al. Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Virol.* 1998; 72(8): 6922—8.
- Scopes G.E., Watt P.J., Lambden P.R. Identification of linear epitope on the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 1990; 71: 53—9.
- Oliveira D.B., Iwane M.K., Prill M.M., Weinberg G.A., Williams J.V., Griffin M.R., et al. Molecular characterization of respiratory syncytial viruses infecting children reported to have received palivizumab immunoprophylaxis. *J. Clin. Virol.* 2015; 65: 26—31.
- Zhu Q., Patel N.K., McAuliffe J.M., Zhu W., Wachter L., McCarthy M.P., et al. Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV): effects on RSV susceptibility to palivizumab. *J. Infect. Dis.* 2012; 205(4): 635—8.
- Low K.W., Tan T., Ng K., Tan B.H., Sugrue R.J. The RSV F and G glycoproteins interact to form a complex on the surface of infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 366(2): 308—13.

Поступила 17.08.17

Принята в печать 25.08.17

© КОЛЛЕКТИВАВТОРОВ, 2017

УДК 578.826:578.5

Амосова И.В.<sup>1</sup>, Тимошичева Т.А.<sup>1</sup>, Егорова А.А.<sup>1</sup>, Мусаева Т.Д.<sup>1</sup>, Писарева М.М.<sup>1</sup>, Едер В.А.<sup>1</sup>, Львов Н.И.<sup>2</sup>ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ АДЕНОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СРЕДИ  
ВОЕННОСЛУЖАЩИХ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО РЕГИОНА<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург;<sup>2</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО России, 194044, г. Санкт-Петербург

Доля аденовирусных (АВ) инфекций в общей структуре ОРВИ среди молодых людей призывного возраста может достигать 64,6%. Высокий уровень заболеваемости, пневмонии, в том числе тяжелого течения и с летальными исходами, определяют актуальность изучения антигенного разнообразия АВ, циркулирующих среди военного контингента. С помощью ПЦР исследован 991 назофарингеальный смыв от пациентов, госпитализированных в военные медицинские учреждения с симптомами ОРЗ в 2014—2017 гг. Секвенирование проводили методом Сенгера с использованием прямого и обратного праймеров на участок гена фибриллы. По результатам ПЦР, генетический материал АВ обнаружен в 326 образцах. В 80 из них АВ присутствовал в сочетании с другими респираторными вирусами: в 26 с респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), в 49 с риновирусом, в 2 с бокавирусом, в 1 с РСВ и риновирусом, в 1 с вирусом парагриппа, в 1 с метапневмовирусом. Секвенированы АВ из 31 образца, АВ в 30 образцах принадлежат к группе E, серотип 4, 1 образец относится к группе B, серотип 7.

Ключевые слова: аденовирус; секвенирование.

**Для цитирования:** Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н.И. Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих Северо-Западного региона. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 283-287. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-283-287>

Amosova I.V.<sup>1</sup>, Timoshicheva T.A.<sup>1</sup>, Egorova A.A.<sup>1</sup>, Musaeva T.D., Pisareva M.M.<sup>1</sup>, Eder V.A.<sup>1</sup>, Lvov N.I.<sup>2</sup>GENETIC DIVERSITY OF ADENOVIRUSES CIRCULATING AMONG THE MILITARY  
IN THE NORTH-WEST REGION<sup>1</sup> Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;<sup>2</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

The contribution of adenovirus (AV) infections to the overall structure of acute viral respiratory infections among young people of draft age can reach as high as 64.6%. Wide dissemination, the incidence of AV-associated pneumonias and lethal outcomes in the case of some complicated infections illustrate the urgency of studying the antigenic diversity of AVs circulating among the military. 991 nasopharyngeal swabs from patients hospitalized in military health facilities with symptoms of acute respiratory infections from 2014 to 2017 were detected by real-time PCR. Sanger sequencing was performed using forward and reverse primers matching the fiber gene. AVs were detected in 326 samples. In 80 of those, AVs were present in combination with other respiratory viruses, as follows: 26 with respiratory syncytial viruses (RSV), 49 with rhinoviruses, 2 with bocaviruses, 1 with RSV and rhinovirus, 1 with parainfluenza virus, and 1 with metapneumovirus. 31 samples were sequenced. Thirty AVs belonged to group E (serotype 4), and 1 AV belonged to group B (serotype 7).

Key words: adenovirus; sequencing.

**For citation:** Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Egorova A.A., Musaeva T.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Lvov N.I. Genetic diversity of adenoviruses circulating among the military in the North-West region. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2017; 62(6): 283-287. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-6-283-287>

**For correspondence:** Tat'yana A. Timoshicheva, Junior research associate, Laboratory of biotechnology of diagnostic reagents, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [tatianatim@mail.ru](mailto:tatianatim@mail.ru)

**Information about authors:**Timoshicheva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-0679-8714>; Pisareva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-1499-9957>;Eder V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9970-3325>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 17 August 2017

Accepted 25 August 2017

Аденовирусы (АВ) человека представляют собой ДНК-содержащие безоболочечные вирусы рода *Mastadenovirus* семейства Adenoviridae. В настоящее время семейство объединяет около 130 серотипов вирусов, выделенных от человека, млекопитающих и птиц. В 1999 г. Международным комитетом по таксономии вирусов АВ

человека рода *Mastadenovirus* отнесены к семи группам А—G по степени гомологии ДНК и содержания в ней GC-пар основания [1].

Капсид АВ состоит из 252 структурных единиц, 240 из которых — гексоны, 12 — пентоны, расположенные на вершинах икосаэдра и снабженные фибриллами. Белок

**Для корреспонденции:** Тимошичева Татьяна Александровна, мл. науч. сотр. лаб. биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [tatianatim@mail.ru](mailto:tatianatim@mail.ru)

Таблица 1

## Разнообразие клинических форм заболеваний, вызываемых АВ

Группа АВ	Серотипы АВ	Характер заболевания	Группы риска
A	12, 18, 31, 61	Гепатиты, гастроэнтериты	Дети, пациенты с трансплантацией органов
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Острый геморрагический цистит, гастроэнтериты, ОРВИ	Новобранцы, курсанты военных училищ, дети
C	1, 2, 5, 6	Фарингиты	Дети
D	8—10, 13, 15, 17, 19, 19a, 19p, 20, 22—30, 32, 33, 36—39, 42—49, 51	Эпидемические и спорадические кератоконъюнктивиты	Все группы населения
E	4	ОРВИ, фолликулярные конъюнктивиты	Новобранцы, курсанты военных училищ, все группы населения
F	40	Гастроэнтериты	Дети младшего возраста
G	41, 52	Гастроэнтериты	Дети младшего возраста

гексона содержит родо- и группоспецифическую детерминанты, типоспецифическими являются детерминанты белка гексона и белка фибриллы, которые расположены на поверхности вириона и против которых вырабатываются нейтрализующие антитела [2].

АВ обладают широким спектром тканевого тропизма и вызывают поражения лимфоидной ткани (группа С), центральной нервной системы, слизистых оболочек респираторного тракта (группы В, С, Е), кишечника (группы F и G), конъюнктивы и мочеполовых путей (группы В и D) [3]. АВ распространены повсеместно и могут вызывать локальные вспышки инфекции (табл. 1) [4].

Вспышки АВ-инфекций обычно происходят в закрытых коллективах, например в больницах, школах, военных подразделениях и т. п. Дети и взрослые с нарушениями иммунной системы наиболее восприимчивы к АВ и предрасположены к осложнениям. Около 7% инфекций верхних дыхательных путей и 10% пневмоний у детей до 4 лет вызваны АВ [5]. В Вооруженных Силах России в эпидемический сезон острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ) переболевает более 30% контингента, из них до 20—40% — АВ-инфекцией [6].

Вспышки АВ-инфекций также могут происходить среди здоровых людей, однако поскольку подобные инфекции являются самоограниченными, они редко отслеживаются системой здравоохранения. Причины, по которым такие серьезные заболевания, как, например, пневмония, возникают и приводят к летальному исходу пациентов без нарушений иммунитета, остаются неясными. АВ способны длительно персистировать в организме человека и переходить в хроническую форму (хронические тонзиллиты, гаймориты, ангины и другие), а также вызывать аллергические состояния, сопровождающиеся развитием астматического бронхита и ларинготрахеита [4].

От типа АВ зависит степень и характер возможных осложнений, поэтому необходимо точно знать, какой именно серотип АВ вызвал заболевание, чтобы своевременно и грамотно помочь больному и избежать серьезных осложнений. В настоящее время для быстрого и качественного определения в клиническом материале ДНК АВ используют ПЦР с детекцией в реальном времени. Для определения серотипов АВ также используют ПЦР и секвенирование, основанное на определении нуклеотидных последовательностей высоковариабельных участков гексона и фибриллы АВ.

В настоящей работе представлены результаты исследования генетического разнообразия АВ, циркулировавших среди военнослужащих Северо-Западного региона в 2014—2017 гг.

### Материал и методы

**Материал.** В работе исследованы назофарингеальные смывы от 991 пациента, госпитализированного с симптомами ОРЗ в военно-медицинские организации МО РФ с апреля 2014 по март 2017 г. Смывы собирали не позднее 6 сут от начала заболевания. Материалы были получены из лаборатории молекулярной вирусологии и геномной инженерии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, где они хранились в транспортной среде при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 3 мес.

**Эталонные штаммы.** В качестве положительного контроля при постановке ПЦР использовали АВ серотипа 6 штамм Tonsill-99 (получен из музея ОРВИ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России).

**ПЦР с детекцией в реальном времени.** Для выявления

в материалах нуклеиновых кислот вирусов гриппа А и В и других ОРВИ методом ПЦР с детекцией в реальном времени использованы тест-системы «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИЭ, Москва).

**Молекулярно-генетический анализ.** Выделение ДНК АВ, секвенирование гена фибриллы АВ и филогенетический анализ проводили, как описано в работе [7].

### Результаты

В ходе выполнения настоящей работы на наличие АВ-антигена исследован 991 назофарингеальный смыв от больных с симптомами ОРЗ. Материалы были получены из военно-медицинских организаций МО РФ Северо-Западного региона в период с апреля 2014 по март 2017 г. У госпитализированных военнослужащих наблюдалось повышение температуры тела, недомогание и интоксикация, ринит, фарингит, тонзиллит, конъюнктивит, катаральные явления, такие как гиперемия зева, кашель, заложенность носа и выделения из него (от слизистых до слизисто-гнойных), а также по данным клинического анализа крови — ускорение СОЭ, лейкоцитоз, лимфопения. Преобладала респираторная форма заболевания средней тяжести, в 8 случаях диагностирована пневмония.

По результатам ПЦР с детекцией в реальном времени в 424 образцах был обнаружен генетический материал респираторных вирусов, включая моно- и микст-инфекции. Вирусы гриппа А были выявлены в 205 образцах, вирусы гриппа В — в 128 образцах, АВ — в 326, риновирус — в 115, респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) — в 56, вирус парагриппа типа 3 — в 6, метапневмовирус — в 3, бокавирус — в 2, коронавирус — в 2 образцах (рис. 1). В остальных 567 образцах генетический материал возбудителей ОРВИ не был обнаружен.

Из 326 образцов, положительных по данным ПЦР на наличие АВ, 95 (29,1%) содержали генетический материал других респираторных вирусов. Наиболее частым вариантом сочетанной инфекции было сочетание АВ с

риновирусами ( $n = 47$ ) и РСВ ( $n = 23$ ). В 15 случаях АВ сочетались с вирусами гриппа А, в том числе в 2 случаях также обнаружен риновирус, в одном случае — вирус гриппа В и РСВ, в 4 случаях — с вирусами гриппа В, в том числе в одном случае вирус гриппа В сочетался с РСВ, с бокавирусом — в 2 случаях, с вирусом парагриппа типа 3 и метапневмовирусом — по одному случаю соответственно. В одном материале АВ были обнаружены в сочетании с РСВ и риновирусом (см. рис. 1).

При исследовании 8 образцов, полученных от больных пневмонией, в 4 образцах был обнаружен генетический материал только АВ; один образец содержал генетический материал АВ и риновирусов; в 3 случаях были обнаружены только риновирусы; в одном случае возбудители ОРВИ не обнаружены.

Циклы выявления АВ при исследовании в ПЦР составили 6—30, тогда как для гетерологичных вирусов в случаях сочетанной с АВ инфекцией циклы выявления были значительно выше и варьировали в пределах 16—34, что может свидетельствовать о ведущей роли АВ в данной патологии.

Для дальнейшего секвенирования в целях определения серотипов АВ, вызвавших подьемы заболеваемости среди военнослужащих, из общего количества положительных на содержание АВ материалов был отобран 31 образец (10 образцов, полученных в 2014 г., 15 образцов эпидемического сезона 2015—2016 гг. и 6 образцов эпидемического сезона 2016—2017 гг.). По результатам лабораторной диагностики, в этих образцах присутствовали только

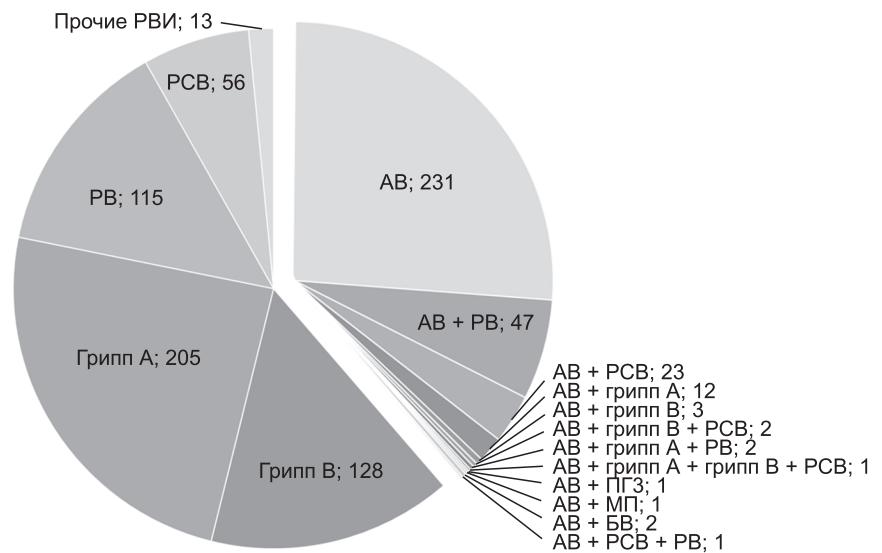


Рис. 1. Выявление возбудителей ОРВИ в клинических материалах методом ПЦР с детекцией в реальном времени.

РВ — риновирус; вирус парагриппа типа 3 (ПГЗ) выявлен в 6 образцах, метапневмовирус (МП) — в 3 образцах, бокавирус (БВ) — в 2 образцах, коронавирус — в 2 образцах; АВ + РВИ: сочетание АВ с БВ — в 2 случаях, с вирусом ПГЗ и МП, с РСВ и РВ — по одному случаю соответственно.

АВ, и циклы ПЦР-выявления не превышали 10.

Филогенетическое дерево выделенных АВ построено с использованием двухпараметрической модели Кимуры методом ближайших соседей (neighbor-joining) в программе MEGA 6 относительно целевых последовательностей участков фибриллы референс-штаммов различных серотипов АВ, депонированных в базе данных GenBank (табл. 2).

Результаты филогенетического анализа по участку гена фибриллы показали, что 10 образцов АВ, полученных в 2014 г., принадлежали к серотипу 4 (группа Е). Среди 15 образцов, полученных в 2015—2016 гг., 14 АВ также принадлежали к серотипу 4 (группа Е), один образец принадлежал к серотипу 7 (группа В). В 6 образцах, полученных в 2016—2017 гг., АВ принадлежали к серотипу 4 (группе Е). Филогенетическое дерево АВ, построенное на основании целевых нуклеотидных последовательностей области гена, кодирующего ген фибриллы, представлено на рис. 2.

### Обсуждение

К настоящему моменту известно о существовании более 50 серотипов АВ человека, включающих более 70 различных генотипов [4], что определяет многообразие клинических форм АВ-инфекций. Удельный вес АВ в общей структуре ОРЗ, по данным Национального центра по надзору за гриппом и ОРВИ, на территории России составляет около 5%. Вспышки АВ-инфекций регистрируются в течение всего года, особенно в детских коллективах и среди военнослужащих РФ [8—11]. В очагах таких вспышек наблюдается увеличение частоты пневмоний, в том числе тяжелого течения [12—14]. В Вооруженных Силах России в эпидемический сезон более 30% военнослужащих переболевает ОРВИ, из них на долю АВ-инфекции приходится до 50% [6], что наносит значительный ущерб как здоровью военнослужащих, так и российской армии в целом.

Таблица 2

Коды доступа для полногеномных нуклеотидных последовательностей АВ человека различных типов

Human adenovirus A	9	AJ854486	39	JN226760	
12	AC_000005	10	JN226746	42	JN226761
18	GU191019	13	JN226747	43	JN226761
31	AM749299	15	AB562586	44	JN226763
Human adenovirus B	17	AC_000006	45	JN226764	
3	NC_011203	19	EF121005	46	AY875648
7	AC_000018	20	JN226749	47	JN226757
16	AY601636	22	FJ404771	48	EF153473
21	AY601633	23	JN226750	49	DQ393829
11	AY163756	24	JN226751	51	JN226765
14	AY803294	25	JN226752	53	FJ169625
34	AY737797	26	EF153474	54	AB333801
35	AY128640	27	JN226753		Human adenovirus E
50	AY737798	28	FJ824826	4	AY487947
Human adenovirus C	29	AB562587			Human adenovirus F
1	AF534906	30	JN226755	40	L19443
2	ADRCG	32	JN226756	41	DQ315364
5	AC_000008	33	JN226758		Human adenovirus G
6	FJ349096	36	GQ384080	52	DQ923122
Human adenovirus D	37	DQ900900			Вакцинный штамм АВ серотипа 7
8	AB448767	38	JN226759		AY594256

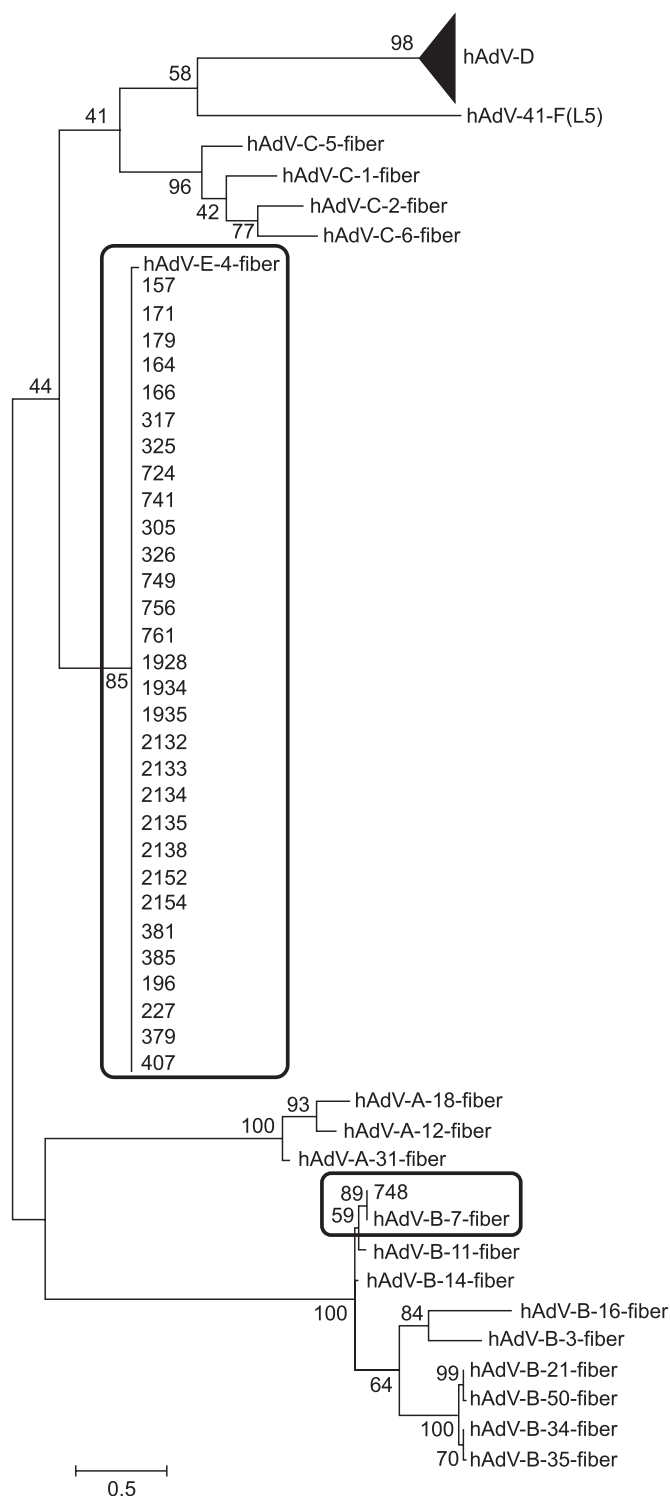


Рис. 2. Филогенетическое дерево АВ, построенное на основании целевых нуклеотидных последовательностей области гена, кодирующего ген фибриллы. Выделенные образцы секвенированы в лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в ходе исследования, остальные последовательности получены из базы данных GenBank.

В период с апреля 2014 по март 2017 г. был собран и исследован на наличие респираторных вирусов 991 назофарингеальный смыв от военнослужащих. Как правило, это

были молодые люди призывного возраста 17—27 лет, госпитализированные в военно-медицинские организации МО РФ Северо-Западного региона России с симптомами ОРВИ. АВ были выявлены в 326 (32,9%) случаях, из них как единственный этиологический агент — в 231 (70,9%) случае и в сочетании с другими вирусами — в 95 (29,1%) случаях. Этиологическим агентом в 5 из 8 случаев диагностированной пневмонии также явились АВ. Секвенирование 31 образца показало принадлежность большинства (30 образцов) исследуемых АВ к серотипу 4 группы Е и одного АВ к серотипу 7 группы В. Эти серотипы АВ широко циркулируют в человеческой популяции, вызывая вспышки ОРЗ, в том числе с осложнениями (пневмонией). В период с 2010 по 2014 г. среди населения Москвы циркулировали АВ серотипов 1, 2, 3, 4, 6 и 7 [15], АВ серотипа 7 явились причиной нескольких вспышек среди военнослужащих РФ [10]. Основными этиологическими агентами, вызывающими ОРЗ среди военнослужащих в США, также являются АВ серотипов 4 и 7 [11]. АВ серотипов 7 и 3 являются причиной тяжёлых АВ-инфекций с летальными исходами [9, 16]. Нередко встречается сочетание серотипов 3 и 2 АВ [9].

АВ-инфекции вызывают серьёзные заболевания среди здоровых военнослужащих, причины возрастающей патогенности АВ при этом остаются неясными. Очевидно, АВ претерпевают мутации и изменения в процессе циркуляции среди людей, но эти фенотипические изменения редко обнаруживаются вследствие нерегулярности подобных вспышек и недостаточности биологических исследований вызывающих их серотипов АВ. В США получены вакцины для защиты военнослужащих от респираторных заболеваний, вызванных АВ. В России разработки в этой области в настоящее время не ведутся.

### Заключение

Дальнейшее изучение и анализ генома циркулирующих среди людей АВ остается важной и актуальной задачей для разработки и создания безопасных вакцин, эффективных препаратов этиотропной терапии, а также препаратов для диагностики АВ-инфекций.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5, 9—11, 14, 16 см. REFERENCES)

1. Киселёв О.И., Жилинская И.Н., ред. *Вопросы общей вирусологии: Учебное пособие*. СПб: СПбГМА им. И.И.Мечникова; 2007 г.
2. Филдс Б., Найп Д., ред. *Вирусология*. Пер. с англ. М.: Мир; 1989.
3. Лобзин Ю.В., Жданов К.В., ред. *Руководство по инфекционным болезням. Книга 2*. СПб.: Фолиант; 2011: 70—89.
4. Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Роль аденовирусов в возникновении острой кишечной инфекции у детей. *Журнал МедиАль*. 2014; (2): 45—57.
5. Львов Н.И., Писарева М.М., Мальцев О.В., Бузицкая Ж.В., Афанасьева В.С., Михайлова М.А. и др. Особенности этиологической структуры ОРВИ в отдельных возрастных и профессиональных группах населения Санкт-Петербурга в эпидемический сезон 2013—2014 гг. *Журнал инфектологии*. 2014; 6(3): 62—70.
6. Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Использование микрочультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(4): 230—5.
7. Львов Н.И. *Аденовирусная инфекция у военнослужащих: клиника, диагностика и лечение*: Автореф. дисс. ... д-ра. мед. наук. Санкт-Петербург; 2016.
8. Иванов В.В., Харитонов М.А., Грозовский Ю.Р., Щеголев А.В., Садыков Р.Р., Журкин М.А. и др. Тяжёлая вирус-ассоциированная пнев-

мония у военнослужащих. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2015; (1): 146—52.

12. Шестовицкий В.А., Гринштейн Ю.И., Аристов А.И. Вирусиндуцированная пневмония. *Сибирское медицинское обозрение*. 2011; 69(3): 94—7.
15. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В. и др. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004—2014 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; (5): 50—7.

#### REFERENCES

1. Kiselev O.I., Zhilinskaya I.N., eds. *Questions of General Virology: Textbook [Voprosy obshchey virusologii: Uchebnoe posobie]*. St. Petersburg: SPbSMA named after I.I. Mechnikov; 2007. (in Russian)
2. Fields B., Knipe D., eds. *Fundamental Virology*. New York: Raven Press Book, Ltd.; 1986.
3. Lobzin Yu.V., Zhdanov K.V., eds. *Communicable Diseases Manual. Book 2 [Rukovodstvo po infektsionnym boleznyam. Kniga 2]*. St. Petersburg: Foliant; 2011: 70—89. (in Russian)
4. Epifanova N.V., Novikova N.A. Role of adenoviruses in the occurrence of acute enteric infections in children. *Zhurnal Medial'*. 2014; (2): 45—57. (in Russian)
5. Pavia A.T. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52(4): 284—9.
6. L'vov N.I., Pisareva M.M., Mal'tsev O.V., Buzitskaya Zh.V., Afanas'eva V.S., Mikhaylova M.A., et al. Peculiarities of the etiological structure of acute respiratory viral infection in certain age and occupational groups of the population of St. Petersburg in the epidemic season 2013—2014. *Zhurnal infektologii*. 2014; 6(3): 62—70. (in Russian)
7. Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya Zh.V., Egorova A.A., L'vov N.I. Perspectives of applying of cell-elisa and modified immunofluorescence for diagnosis of adenovirus infection. *Klin-*

- icheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(4): 230—5. (in Russian)
8. L'vov N.I. *Adenoviral infection in the military: a clinic, diagnosis and treatment*. Diss. St. Petersburg; 2016 (In Russian).
9. Metzgar D., Osuna M., Kajon A.E., Hawksworth A.W., Irvine M., Russell K.L. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(10): 1465—73.
10. Zhu R., Song Q., Qian Y., Zhao L., Deng J., Wang F., et al. Virus profile in children with acute respiratory infections with various severities in Beijing, China. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2014; 127(21): 3706—11.
11. Zou L., Zhou J., Li H., Wu J., Mo Y., Chen Q., et al. Human adenovirus infection in children with acute respiratory tract disease in Guangzhou, China. *APMIS*. 2012; 120(8): 683—8.
12. Ivanov V.V., Kharitonov M.A., Grozovskiy Yu.R., Shchegolev A.V., Sadykov R.R., Zhurkin M.A., et al. Severe virus-associated pneumonia in the military. *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. 2015; (1): 146—52. (in Russian)
13. Shestovitskiy V.A., Grinshteyn Yu.I., Aristov A.I. Virus-induced pneumonia. *Sibirskoe meditsinskoe obozrenie*. 2011; 69(3): 94—7. (in Russian)
14. Brosch L., Tchandja J., Marconi V., Rasnake M., Prakash V., McKnight T., et al. Adenovirus serotype 14 pneumonia at a basic military training site in the United States, spring 2007: a case series. *Mil. Med.* 2009; 174(12): 1295—9.
15. Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorob'eva N.S., Valdokhina A.V., El'kina M.A., Gorelov A.V., et al. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infections in Moscow in 2004—2014 years. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (5): 50—7. (in Russian)
16. Lin Y.C., Lu P.L., Lin K.H., Chu P.Y., Wang C.F., Lin J.H., et al. Molecular Epidemiology and Phylogenetic Analysis of Human Adenovirus Caused an Outbreak in Taiwan during 2011. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127377.

Поступила 17.08.17

Принята в печать 25.08.17

## РЕЦЕНЗИИ

© УРЫБАЕВ Л.В., 2017

УДК 615.281.8.03:616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064

**А.В. Кравченко, Г.А. Галегов, В.Г. Канестри.** Фосфазид. Москва: Медицина; 2017. 193 с.

Раскрытие на молекулярном уровне отдельных последовательных этапов репродукции вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) обусловило создание комплекса высокоспецифичных лекарственных препаратов, направленных на лечение этой смертельно опасной, глобально распространяющейся инфекции человека. В соответствии с этим были созданы эффективные лекарства, являющиеся ингибиторами обратной транскриптазы ВИЧ, интегразы ВИЧ, а также ингибиторами проникновения ВИЧ в клетку. Выдающиеся результаты в лечении ВИЧ-инфекции были достигнуты после 1987 г., когда стала проводиться комбинированная лекарственная терапия этой инфекции на основе сочетанного применения ингибиторов обратной транскриптазы и протеазы ВИЧ. Эффективность лечения ВИЧ-инфекции на основе высокоактивной антиретровирусной терапии продолжает возрастать вплоть до настоящего времени.

В списке практически значимых лекарственных препаратов против ВИЧ в нашей стране видное место занимает отечественный препарат Фосфазид (Никавир), который является гидроген-фосфонатом азидотимидина. Он был создан отечественными химиками, биоорганиками, токсикологами и клиницистами в конце 80-х годов прошлого столетия и внедрен в медицинскую

практику в конце 90-х годов коллективом специалистов под руководством академика РАН А.А. Краевского (1933—1999). Вскоре Фосфазид (Никавир) был защищен патентами СССР, Японии и США. Важно, что Фосфазид широко применяется в медицинской практике и в настоящее время. Препарат выпускается предприятием «Ассоциация АЗТ» под руководством лауреата Государственной премии РФ кандидата технических наук А.В. Кононова.

В рецензируемой монографии всесторонне и последовательно обобщается вся имеющаяся информация о теоретических основах создания этого препарата, приводятся сведения о его химическом синтезе, токсикологии и фармакокинетике, антивирусных свойствах.

Большой раздел посвящён изложению его терапевтической эффективности как в виде средства монотерапии, так и в составе комбинированной антиретровирусной терапии. В монографии приведена информация о предотвращении вертикальной передачи ВИЧ-инфекции (от инфицированной ВИЧ матери к новорождённому младенцу), а также включены материалы об успешном применении Фосфазид у ВИЧ-инфицированных пациентов с одновременно протекающим туберкулёзом лёгких и вирусным гепатитом С.

Монография предваряется предисловием, написанным академиком РАН В.В. Покровским, который вместе со своими сотрудниками внес значительный вклад во внедрение Фосфазида в медицинскую практику. Логично включение в монографию (последняя глава) информации о новом препарате бНР (аммоний 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-карбомоилфосфонат), который является новым структурным аналогом фосфазида и имеет большую перспективу практического применения в качестве антиретровирусного лекарства пролонгированного анти-ВИЧ-действия.

Фосфазид как эффективный анти-ВИЧ/СПИД-препарат в настоящее время применяется в Российской Федерации в составе предпочтительных и альтернативных схем антиретровирусной терапии первого ряда.

Монография «Фосфазид», публикацию которой следует приветствовать, будет чрезвычайно полезна для широкого круга врачей-инфекционистов, исследователей и преподавателей медицинских вузов, а также специалистов в области разработки и практического применения лекарственных препаратов.

*Член-корреспондент РАН Урываев Л.В. (Москва)*

## УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ» В 2017 г.

### ОБЗОРЫ

**Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А., Цветков В.Б., Клотченко С.А.** Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека 6, 246—258

**Галегов Г.А.** Фосфазид (никавир) — высокоэффективный лекарственный препарат для лечения ВИЧ/СПИД-инфекции 1, 5—11

**Глотова Т.И., Никонова А.А., Глотов А.Г.** Противовирусные соединения и препараты, эффективные в отношении вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 5, 204—210

**Костина Л.В., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Антипова Н.В., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А.** Вакцины против гриппа птиц в птицеводстве 2, 53—60

**Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В.** Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом: заболевание, вызываемое новым флебовирусом 2, 60—65

**Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В.** Геморрагическая лихорадка Луйо 4, 149—153

**Снегирёва И.И., Дармостукова М.А., Затолочина К.Э., Казаков А.С., Аляутдин Р.Н.** Взаимозаменяемость препаратов вирусных вакцин для иммунизации населения 5, 197—203

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н.И.** Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих Северо-Западного региона 6, 283-287

**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 4, 186—192

**Борисевич И.В., Черникова Н.К., Марков В.И., Краснянский В.П., Борисевич С.В., Рождественский Е.В.** Опыт клинического применения специфического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей в качестве средства экстренной профилактики лихорадки Эбола 1, 25—29

**Ворович М.Ф., Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Романенко В.В., Анкудинова А.В., Халчаев Ю.Х., Карганова Г.Г., Ишмухаметов А.А., Дроздов С.Г.** Иммунологическая эффективность и безопасность вакцины «Клещ-Э-Вак»: «взрослая» форма 2, 73—80

**Генералов С.В., Ерохин П.С., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Абрамова Е.Г., Никуфоров А.К., Щербак С.А.** Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, *Lissavirus*, *Rhabdoviridae*) 5, 227—232

**Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., Чичаева М.А., Эспер С.А., Львов Д.К.** Природные очаги гриппа А в Западной Арктике 1, 11—17

**Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К., Ботиков А.Г., Альховский С.В.** Генетическое разнообразие вирусов вида *Chenuda virus* (*Orbivirus*, *Reoviridae*), циркулирующих в Средней Азии 2, 81—86

**Жирнов О.П.** Активация парамиксовирусов протеазами в культурах нормальных и раковых клеток 2, 65—72

**Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е.** Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской области 3, 101—108

**Казённова 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 4, 154—161

**Казорина Е.В., Красовская Т.Ю., Казанцев А.В., Найденова Е.В., Шарова И.Н., Захаров К.С., Поршаков А.М., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Шилов М.М., Яковлев С.А., Князева Т.В., Толоконникова С.И., Миронова Н.И., Частов А.А., Казакова Л.В., Кириллова Л.П., Красильникова Н.Н., Кожанова О.И., Щербак С.А., Кутырев В.В.** Лихорадка Западного Нила на территории Саратовской области в 2013—2015 гг. 5, 219—226

**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 4, 162—168

**Колосов А.В., Терновой В.А., Швалов А.Н., Мусеева А.А., Сафатов А.С., Михеев В.Н.** Адаптация вируса одиночно-капсидного ядерного полиэдроза американской хлопковой совки (*Helicoverpa zea* SNPV) для контроля популяции хлопковой совки (*Helicoverpa armigera*) 3, 134—137

**Коноплева М.В., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семенов Т.А., Суслов А.П.** Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности 4, 179—186

**Коноплева М.В., Соколова М.В., Шевлягина Н.В., Баженов А.И., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Борисова В.Н., Семенов Т.А., Нестеренко В.Г., Суслов А.П.** Морфологический анализ вируса гепатита В с эскейп-мутациями в S-гене G145R и S143L 3, 119—128