

**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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел. +7-495-150-07-47 доб. 101
E-mail: info@idm.msk.ru
www.medlit.ru

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

Редактор *Е.П. Мороз*
Технический редактор
Л.В. Зюкина
Вёрстка *Е.М. Архипова*

Сдано в набор 20.07.2018.
Подписано в печать 15.09.2018.
Формат 60 × 88%.
Печать офсетная.
Печ. л. 6,00.
Усл. печ. л. 5,88.
Уч.-изд. л. 6,36.

Отпечатано в ООО "ПОЛИ ПРИНТ
СЕРВИС", 119049, г. Москва,
Калужская пл., д. 1, корп. 2
ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии*. 2018.
Т. 63. № 4. 145-192.

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

Свидетельство о регистрации № 1170
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

4

Том 63 · 2018

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

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

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

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

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)

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

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

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

Титов Л.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, M.Sc.; Frederick, USA)

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

VOPROSY VIROSOLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 63 • 4 • 2018

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.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco 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, Russia)

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok, Russia)

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

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

Borisevich S.V. – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

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

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

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk, Russia)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan, Russia)

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Kuzin A.A. – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)

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

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

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Stepanova T.F. – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)

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

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

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

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

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan, Russia)

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

Advisory Board

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

Gribkova N.V. – 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)

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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



СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Андропова В.Л.** Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (Часть 2) 149
- Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Васильева А.Д., Еропкин М.Ю.** Проблемы выделения, идентификации и антигенного анализа современных вирусов гриппа А(Н3N2) 160

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Костюшева А.П., Липатников А.Д., Смирский В.Н., Мамонова Н.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П.** Усиление образования фокусов фосфорилированного гистона H2AX в ядрах клеток при инфекции вирусами гепатита В и D. . 165
- Чернова Н.Г., Тихомиров Д.С., Соболева Н.П., Марьяна С.А., Сидорова Ю.В., Синицына М.Н., Двирнык В.Н., Куликов С.М., Туполева Т.А., Звонков Е.Е.** Сравнительный анализ серологических маркеров герпесвирусных инфекций и количественных иммуноглобулинопатий у первичных больных ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой 171
- Карпова Л.С., Волик К.М., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Соминина А.А., Бурцева Е.И.** Особенности эпидемического процесса при гриппе А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) в России с 2009 по 2017 г. . . 177
- Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д.** Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири 185

ИНФОРМАЦИЯ

- Анонс VIII Международного ветеринарного конгресса . . . 192

CONTENTS

REVIEWS

- Andronova V.L.** Modern ethiotropic chemotherapy of herpesvirus infections: advances, new trends and perspectives. Alphaherpesviruses (Part II)
- Petrova P.A., Konovalova N.I., Danilenko D.M., Vassilieva A.D., Eroarkin M.Yu.** Problems of isolation, identification and antigenic characterization of recent human A(H3N2) influenza viruses

ORIGINAL RESEARCH

- Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Lipatnikov A.D., Simirskii V.N., Mamonova N.A., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P.** Increased formation of phosphorylated H2AX foci in nuclei of cells infected by hepatitis B and B+D viruses
- Chernova N.G., Tihomirov D.S., Soboleva N.P., Mariina S.A., Sidorova Y.V., Sinitsyna M.N., Dvirnyk V.N., Kulikov S.M., Tupoleva T.A., Zvonkov E.E.** Comparative analysis of serological markers of herpes viruses and quantitative immunoglobulinopathies in primary patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma
- Karpova L.S., Volik K.M., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Sominina A.A., Burtseva E.I.** Features of epidemic process of influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) in Russia from 2009 to 2017
- Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D.** Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia

INFORMATION

- VIII International Veterinary Congress: Call for Papers

Уважаемые авторы и читатели журнала!

Обращаем Ваше внимание на то, что мы обновили сайт журнала «Вопросы вирусологии».

Новый адрес сайта: www.medlit.ru/journalsview/virology

Вы можете подписаться через наш сайт на электронную версию журнала или купить отдельные статьи по издательской цене. Для этого нужно пройти регистрацию на сайте.

ОБЗОРЫ

© АНДРОНОВА В.Л., 2018
УДК 616.98:578.825.11]=085:008

Андропова В.Л.

СОВРЕМЕННАЯ ЭТИОТРОПНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ: ДОСТИЖЕНИЯ, НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. АЛЬФАГЕРПЕСВИРУСЫ (ЧАСТЬ II)

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

Ключевую роль в лечении герпесвирусных инфекций играют модифицированные нуклеозиды и их предлекарства – ацикловир (АЦВ), его L-валиновый эфир (валацикловир) и фамцикловир (предлекарство пенцикловира – ПЦВ). Биологическая активность соединений этого класса определяется их сходством с природными нуклеозидами. После фосфорилирования вирусной тимидинкиназой и затем клеточными ферментами до трифосфатной формы АЦВ и ПЦВ ингибируют активность вирусной ДНК-полимеразы и синтез вирусной ДНК. Возрастающая роль герпесвирусных инфекций в инфекционной патологии человека, а также развитие лекарственной резистентности у вирусов, главным образом у пациентов с иммунодефицитами различного генеза, обуславливают необходимость поиска новых соединений, обладающих антигерпесвирусной активностью, использующих в качестве биомишени не ДНК-полимеразу, а другие вирусные белки и ферменты, уникальные или отличающиеся от клеточных белков, выполняющих аналогичные функции. Целью данной работы были поиск научной литературы, посвящённой описанию новых соединений с альтернативным механизмом действия, с помощью международных баз данных (PubMed, MedLine, РИНЦ и других) и проведение анализа собранных данных о соединениях, потенциально пригодных для создания на их основе лекарственных противогерпетических препаратов.

Ключевые слова: обзор; вирус герпеса простого; вирус варицелла зостер; антивирусный агент; лекарственный препарат.

Для цитирования: Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (часть II). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 149-159.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-149-159>

Andronova V.L.

MODERN ETHIOTROPIC CHEMOTHERAPY OF HERPESVIRUS INFECTIONS: ADVANCES, NEW TRENDS AND PERSPECTIVES. ALPHAHERPESVIRUSES (PART II)

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

A key role in the treatment of herpesviral infections is played by modified nucleosides and their predecessors – acyclovir, its L-valine ester (valaciclovir) and famciclovir (prodrug of penciclovir). The biological activity of compounds of this class is determined by their similarity to natural nucleosides. After phosphorylation by viral thymidine kinase and then cell enzymes to the triphosphate forms, acyclovir and penciclovir inhibit the activity of viral DNA polymerase and synthesis of viral DNA. The increasing role of herpesvirus infections in human infectious pathology, as well as the development of drug resistance in viruses, mainly in patients with immunodeficiencies of various origins, necessitate the search for new compounds possessing anti-herpesvirus activity, using as a biological target not DNA polymerase, but other viral proteins and enzymes, unique or different from cellular proteins, performing similar functions.

The aim of this work was to search international databases (PubMed, MedLine, RINC, etc.) for scientific literature describing new compounds with an alternative mechanism of action and to analyze the collected data on compounds potentially suitable for the development of antiherpesvirus drugs.

Key words: review; herpes simplex virus; varicella zoster virus; antiviral agent; drug.

For citation: Andronova V.L. Modern ethiotropic chemotherapy of herpesvirus infections: advances, new trends and perspectives. Alphaherpesviruses (Part II). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 149-159. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-149-159>

For correspondence: Valeriya L. Andronova, Ph.D., Leading Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Для корреспонденции: Андропова Валерия Львовна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Information about authors:Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 01 November 2017

Accepted 12 December 2017

Введение

Герпетические инфекции (ГИ) имеют чрезвычайно широкое распространение. Среди них эндемичные во всем мире альфагерпесвирусные инфекции, вызываемые вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) и герпесвирусом 3-го типа (вирус варицелла зостер – ВВЗ), занимают одно из ведущих мест в инфекционной патологии человека. Значимость ГИ определяется, во-первых, высокой контагиозностью герпесвирусов, разнообразием путей передачи инфекции, источником которой могут являться не только больные, но и вирусоносители, во-вторых, – полиорганным тропизмом (альфагерпесвирусы могут поражать кожу и слизистые оболочки, внутренние органы, ЦНС), в-третьих, – способностью устанавливать пожизненную латентную инфекцию с периодическими манифестациями. Кроме того, частота и тяжесть течения рецидивов зависят от иммунореактивности организма вирусоносителя, поэтому возрастание роли ГИ обусловлено не только увеличением числа лиц с иммунодефицитами различной этиологии (ВИЧ-инфекция, прием иммунодепрессантов и др.), но и повышением роли внешних факторов, влияющих на состояние иммунной системы (ухудшение экологической ситуации, отток населения из сельских районов в города, старение населения и пр.) [1].

Экспертами ВОЗ определены этиотропные химиотерапевтические препараты (ЭХТП) первой линии для лечения и профилактики инфекций, вызываемых альфагерпесвирусами. Это препараты ацикловира (АЦВ) зовиракс и дженерики, валлиновый эфир АЦВ (Вал-АЦВ; валтрекс) и фамцикловира (ФЦВ; фамвир), относящиеся к классу модифицированных нуклеозидов или их метаболитических предшественников. Препараты триназиевой соли фосфономуравьиной кислоты (ФМК; фоскарнет, пирофосфатный аналог) и цидофовира (ЦДВ; вистид, нуклеотид) являются препаратами выбора (ЭХТП второй линии) в случаях неэффективности ЭХТП первой линии [1]. Биомисшенью для обеих групп препаратов является вирусная ДНК-полимераза (ДНК-*pol*) [2].

Развитие лекарственной резистентности существенно снижает эффективность проводимой противовирусной химиотерапии. У лиц с иммунодефицитом различного генеза, у которых рецидивы ГИ протекают особенно тяжело, частота изоляции мутантов ВПГ, резистентных к АЦВ и родственному соединению, составляет 3,5 – 7%, а у некоторых категорий пациентов достигает 47% [3]. ВОЗ включила ВПГ в перечень микроорганизмов, у которых развитие лекарственной резистентности представляет значительную проблему для здравоохранения [4]. Резистентность к модифицированным нуклеозидам в 95% случаев обусловлена возникновением мутаций в гене тимидинкиназы (ТК), приводящих к полной потере или значительному снижению активности фермента (ТК-негативные и ТК-дефицитные мутанты), либо изменению его субстратной специфичности [5]. Такие мутанты не способны катализировать кинирование АЦВ и родственных соединений с образованием монофосфата, вследствие чего становится невозможным образование

их биологически активных трифосфатных форм, необходимое для включения в синтезирующуюся вирусную ДНК с последующим прерыванием синтеза, и ингибирования активности вирусной ДНК-*pol*. Большая часть ТК-мутантов резистентна ко всем ЭХТП первого ряда. В 5% случаев резистентность связана с мутациями по гену ДНК-*pol* [5]. Важно подчеркнуть, что такие мутанты могут быть перекрестно резистентны к ЭХТП второго ряда [6]. Кроме того, ФМК и ЦДВ нефротоксичны и за рубежом используются только в особо тяжелых случаях, а в России их применение запрещено.

До настоящего времени практическая медицина не располагала эффективными и безопасными противовирусными препаратами, воздействующими на репродукцию альфагерпесвирусов способом, принципиально отличным от механизма действия модифицированных нуклеозидов. Это объясняется тем, что герпесвирусы, подобно другим вирусам, являются облигатными внутриклеточными паразитами, репродукция которых теснейшим образом связана с клеточными метаболитическими процессами, что существенно осложняет создание соединений, избирательно ингибирующих репродукцию вируса и влияющих на клетку-хозяина. Ни один из имеющихся в арсенале противовирусных ЭХТП не действует на вирусы, находящиеся в латентном состоянии, что делает невозможным полную элиминацию вируса из организма.

Так как механизм действия всех коммерческих противовирусных ЭХТП первой и второй линий состоит в ингибировании активности вирусной ДНК-*pol*, одно из основных направлений разработки новых ЭХТП заключается в поиске противовирусных агентов, биомисшенью для которых являются другие вирусные белки, вовлеченные в репродуктивный цикл вирусов на любом этапе от адсорбции вируса на поверхности клетки до высвобождения новой генерации вирионов из клетки. Альтернативная стратегия разработки новых противовирусных ЭХТП состоит в использовании в качестве мишени клеточных белков, требующихся на различных этапах репродуктивного цикла вирусов. Успехи науки, связанные с расширением представлений о процессах, происходящих на различных этапах репродуктивного цикла вирусов, позволили определить такие вирусные мишени – ферменты и белки, функцию которых наиболее целесообразно ингибировать с помощью синтетических соединений, и проводить направленный поиск противовирусных агентов. Очевидно, появление ЭХТП, механизм действия которых не связан с ДНК-*pol* вируса, позволит эффективно воздействовать на ГИ, резистентную к действию ЭХТП первого и/или второго ряда.

В этой статье мы остановимся на разработках наиболее интересных соединений, использующих альтернативные вирусные мишени, прежде всего соединений, проходящих стадию клинических испытаний и представляющих потенциальный интерес для практической медицины. Структуры некоторых из них приведены в таблице.

Избирательное угнетение репродукции вируса можно обеспечить на различных этапах его жизненного цик-

Ингибиторы герпесвирусов, механизм действия которых не связан с активностью вирусной ДНК-полимеразы

Структура соединения 1	Дополнительная информация 2
<i>Адсорбция/пенетрация</i> SPL7013 ; структурная формула приведена на рис. 1; C ₅₈₁ H ₆₁₆ N ₆₃ O ₂₈₆ S ₆₄ Na ₆₄ ; Mг 16580,93	ЦД ₅₀ > 60 мкМ; ИД ₅₀ для ВПГ-1 и ВПГ-2 – 0,12 и 0,03 мкМ; ХТИ > 500 и > 2000 соответственно. Завершена II фаза клинических испытаний в качестве средства для предотвращения инфицирования ВПГ-2 и ВИЧ половым путём
<i>Репликация вирусной ДНК</i> 15Lys-bis-Nt (((H-Lys) ₂ -Lys) ₂ -Lys) ₂ -Lys-Gly ₂ -Apc ₂ -Gly ₃ -Apc ₂ -NH-(CH ₂) ₃ -NMe ₂ , где Apc – остаток 1-N-пропил-4-аминопиррол-2-карбоновой кислоты; структурная формула приведена на рис. 2; C ₁₃₇ H ₂₄₉ N ₄₅ O ₂₄ ; Mг 2910,77 Прителвир (BAY 57-1293, AIC316; 348086-71-5; UNII-07-HQ1TJ4JE); <i>N</i> -метил- <i>N</i> -(4-метил-5-сульфамойл-1,3-тиазол-2-ил)-2-(4-пиридин-2-илфенил)ацетамид; C ₁₈ H ₁₈ N ₄ O ₃ S ₂ ; Mг 402,49 Аменаевир (ASP2151, UNII-94X46KW4AE; 841301-32-4); <i>N</i> -(2,6-диметилфенил)- <i>N</i> -[2-[4-(1,2,4-оксадиазол-3-ил)анилино]-2-оксоэтил]-1,1-ди- <i>о</i> -оксотан-4-карбоксамид; C ₂₄ H ₂₆ N ₄ O ₅ S; Mг 482,56 BILS 179 BS (UNII-KE7I39514Q; AC1NUMFT); <i>N</i> -[2-[4-(2-амино-1,3-триазол-4-ил)анилино]-2-оксоэтил]- <i>N</i> -[(1S)-1-фенилэтил]пиридин-4-карбоксамид; C ₂₅ H ₂₃ N ₅ O ₂ S; Mг 457,55	Активность в отношении ВПГ-1 сопоставима с активностью АЦВ (ИД ₅₀ 1,07 и 1,62 мкМ соответственно). Показана активность при генерализованной инфекции мышей и кожном герпесе у морских свинок, вызванных ВПГ-1 ИД ₅₀ 20–26 и 29 нМ для ВПГ-1 и ВПГ-2 соответственно, ХТИ около 2500. Завершена II фаза клинических испытаний (лечение ГГ, вызванного ВПГ-2, при пероральном введении), начат набор участников еще двух исследований II фазы Активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 (ИД ₅₀ 28–460 нМ, ХТИ > 5500) и ВВЗ (ИД ₅₀ 47–460 нМ), включая АЦВ-резистентные штаммы. Завершено 3 клинических испытания III фазы (лечение орофациального герпеса, ГГ или герпеса зостер при приеме рег ос 1 раз в день). Активен в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 <i>in vitro</i> . ИД ₅₀ в среднем равна 27 нМ, ХТИ превышает 2000. При введении рег ос биодоступность превышает 49%, эффективен на модели кожного герпеса мышей
<i>Ингибиторы герпетической протеазы</i> 1,4-дигидроксиафталин (1,4-нафталиндиол; 571-60-8; 1,4-нафтогидрохинон; гидронафтохинон, <i>нафталин-1,4-диол</i>); C ₁₀ H ₈ O ₂ ; Mг 160,17); 5-гидрокси-1,4-нафтохинон (юглон; 481-39-0; <i>5-гидроксиафталин-1,4-дион</i>); C ₁₀ H ₆ O ₃ ; Mг 174,15 <i>Ингибиторы РНКазы Н (терминазы и/или SSB-белка ICP8)</i> 118 ; 4-([1,1'-бифенил]-4-карбонил)-2,7-дигидрокси-5-метилциклопента-2,4,6-триен-1-он; C ₂₁ H ₁₆ O ₄ ; Mг 332,36 XZ45 ; 2,3-дигидрокси- <i>N</i> '-(2-гидроксибензил)-бензогидразид; SCHEMBL403574; BDBM107691; SCHEMBL4218154; 2,3-дигидрокси- <i>N</i> '-(2-гидрокси-бензил)бензогидразид; C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₃ ; Mг 288,26	ЦД ₅₀ > 100 мкМ. Показана активность <i>in vitro</i> на моделях ВПГ-1, а также ЦМВ человека: ИД ₅₀ 6,4–16,9 и 7,7–16,9 мкМ, ХТИ > 6–16 и > 6–13 соответственно Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1 (ИД ₅₀ 0,12 мкМ, ХТИ > 830), ВПГ-2 (ИД ₅₀ 0,081 мкМ, ХТИ > 1200), а также ЦМВ Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 (ИД ₅₀ 0,35–1,1 мкМ, ЦД ₅₀ > 500 мкМ, ХТИ > 500), а также ЦМВ и вируса герпеса человека 8-го типа
<i>Ингибиторы портового белка</i> WAY-150138 , 273388-09-3; Бензамид; AC1MHFF8; NPZHFVHONVAVCF-UHFFFAOYSA-N; <i>N</i> -[3-хлор-4-[(5-хлор-2,4-диметоксифенил)карбамтиоиламино]-фенил]-2-фторбензамид; C ₂₂ H ₁₈ Cl ₂ FN ₃ O ₃ S; Mг 494,36 <i>Ингибиторы циклинзависимых киназ клетки-хозяина</i> Росковитин , 2-(1-этил-2-гидроксиэтиламино)-6-бензиламино-9-изопропилпурин; Селициклиб; 186692-46-6; C ₁₉ H ₂₆ N ₆ O; Mг 354,46	Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1 (активность штаммоспецифична) Активен <i>in vitro</i> в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ. В условиях одноциклового опыта титр ВПГ-1 снижается на 4,5–5 lg при добавлении РКВ до конечной концентрации 100 мкМ в течение 1–3 ч инфекции

Примечание: систематические (по ИЮПАК) наименования соединений даны курсивом. ИД₅₀ – минимальная активная концентрация соединения; ЦД₅₀ – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток; ХТИ (химиотерапевтический индекс) вычисляется как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀.

ла, ингибируя функцию различных вирусных белков, и таким образом избежать негативного влияния ЭХТП на клетку-хозяина.

Ингибиторы адсорбции и пенетрации вируса в клетку

В адсорбцию ВПГ на поверхности клетки и последующую его пенетрацию вовлечены по крайней мере 5 из 12 гликопротеинов оболочки вируса (gC, gB, gD, gH и gL) и 3 класса мембранных рецепторов клетки хозяина – TNFRSF14 (член семейства рецепторов фактора некро-

за опухоли), нектин-1 и нектин-2 (члены суперсемейства иммуноглобулинов) и глюкозаминогликан клеточной поверхности (прежде всего гепарансульфат, ГС) [7]. Очевидно, соединения, способные препятствовать адсорбции вируса, не нуждаются в проникновении в клетку для проявления противовирусной активности, и это является основным их преимуществом. Однако агенты, способные предотвращать проникновение герпесвирусов в клетку, до сих пор не представлены на фармацевтическом рынке. Ряд микробицидов, способных при местном использовании предотвращать передачу вируса контактным путем, в

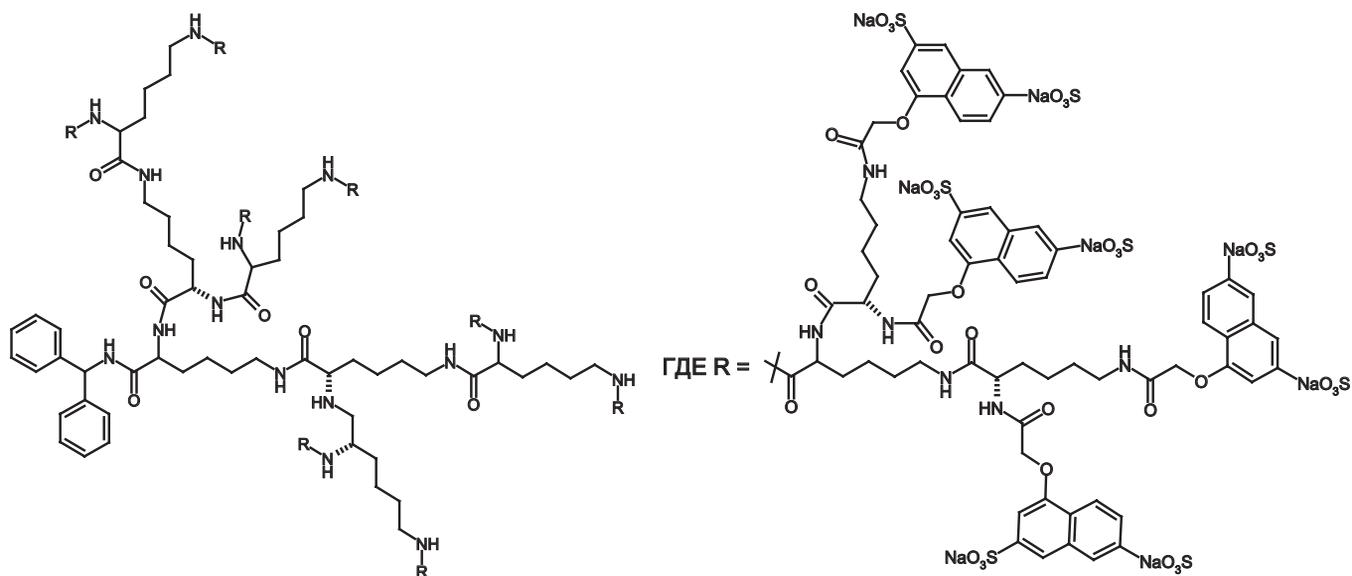


Рис. 1.

настоящее время проходят клинические испытания во II или III фазе. Некоторые из них созданы на основе сульфатированных полимеров и взаимодействуют с гликопротеинами оболочки вируса, препятствуя его прикреплению к клетке (Emmelle[®]/декстрин-2-сульфат, сульфонат полистирола (PRO2000/5TM), CarraguardTM, UsherCellTM, дендримеры (SPL7013 и SPL7115)) [8]. В качестве примера можно привести SPL7013. Его молекула представляет собой полилизиновый дендримерный каркас, у которого к концевым фрагментам, располагающимся на поверхности молекулы, присоединены нафтидисульфонатные группы (см. таблицу и рис. 1). Этот микробицид эффективно предотвращает репродукцию ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток Vero в нецитотоксичных концентрациях. Созданный на основе SPL7013 3% гель (w/w) VivaGel[®] («Starpharma Pty Ltd.», Австралия) успешно прошел I и II фазы клинических испытаний как интравагинальное средство для предотвращения инфицирования женщин ВПГ-2 и ВИЧ-1 (NCT00331032, NCT01201057, NCT00740584) [9].

Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы (PP) вируса

ВПГ кодирует собственную PP, катализирующую преобразование рибонуклеотиддифосфатов в соответствующие дезоксирибонуклеотиды, требующиеся для синтеза вирусной ДНК. PP ВПГ высококонсервативны и состоят из большой R1 (продукт гена *UL39*) и малой R2 (продукт гена *UL40*) гомодимерных субъединиц. PP обладает также протеинкиназной активностью и вовлечена в транскрипцию ранних генов вируса. В опытах на лабораторных животных показано, что фермент необходим для реактивации ВПГ из латентного состояния, репликации ВПГ при офтальмогерпесе и является одним из факторов, определяющих вирулентность вируса. Критическую роль в сборке ферментативного комплекса играет С-концевой фрагмент R2 [10, 11].

Нонапептид **BILD 1633 SE** («Boehringer Ingelheim», Германия) является пептидомиметиком С-концевой последовательности малой субъединицы PP ВПГ – R2 и, действуя как несубстратоподобный высокоселективный

противовирусный агент, препятствует ассоциации двух субъединиц, формирующих фермент. *In vitro* селекционирован вирусный штамм, резистентный к BILD 733 (пептиду, аналогичному BILD 1633 SE). Показано, что мутации, обуславливающие резистентность, локализованы на С-конце субъединицы R1 (A1091S и P1090L) [12]. BILD 1633 SE не влияет на активность PP человека в концентрации до 250 мкМ, в отношении ВПГ-1 *in vitro* он в 10 раз эффективнее, чем АЦВ (ИД₅₀ 0,35–0,46 мкМ, ХТИ около 35); активность соединения не зависит от чувствительности вируса к АЦВ и ФМК. Взаимодействие BILD 1633 SE и АЦВ носит синергидный характер, что объясняется снижением в условиях ингибирования функции PP внутриклеточного пула дезоксигуанозинтрифосфата (дезоксигТФ), с которым АЦВ-трифосфат (АЦВ-ТФ) конкурирует за включение в синтезирующуюся цепь ДНК вируса. BILD 1633 SE эффективен при местном использовании на моделях кератита у мышей (крем 5%) и кожного герпеса у мышей (мазь 5%), индуцированных ВПГ-1, в том числе АЦВ-резистентным вариантом вируса. На модели кожного герпеса мышей был также подтвержден синергидный эффект мази BILD 1633 SE и вводимого per os АЦВ [13]. Однако дальнейшие разработки препарата были прекращены.

Ингибиторы репликации герпесвирусов

Геном ВПГ-1 содержит 3 уникальных участка – ориджина репликации: 2 копии *OriS* и 1 копию *OriL*, включающие участки узнавания белка-инициатора *UL9 box I, box II* и *box III*. *Box I* и *box II* разделены спейсерами, состоящими из 18 (*OriS*) или 20 (*OriL*) АТ-пар и образующими малую бороздку. Инициация репликации начинается с того, что *pUL9* специфически связывается с *box I* и *box II* двухцепочечной ДНК и обеспечивает локальное раскручивание АТ-тракта и прилегающих к нему участков [14], после чего собирается репликативный комплекс, включающий *pUL9*, ДНК-*pol* (гетеродимер, состоящий из двух субъединиц – *pUL30* и *pUL42*), *pUL29*, связывающийся с одноцепочечной ДНК, и хеликазо-праймазный комплекс (ХПК), состоящий из трёх субъединиц *pUL5*, *pUL8* и *pUL52*.

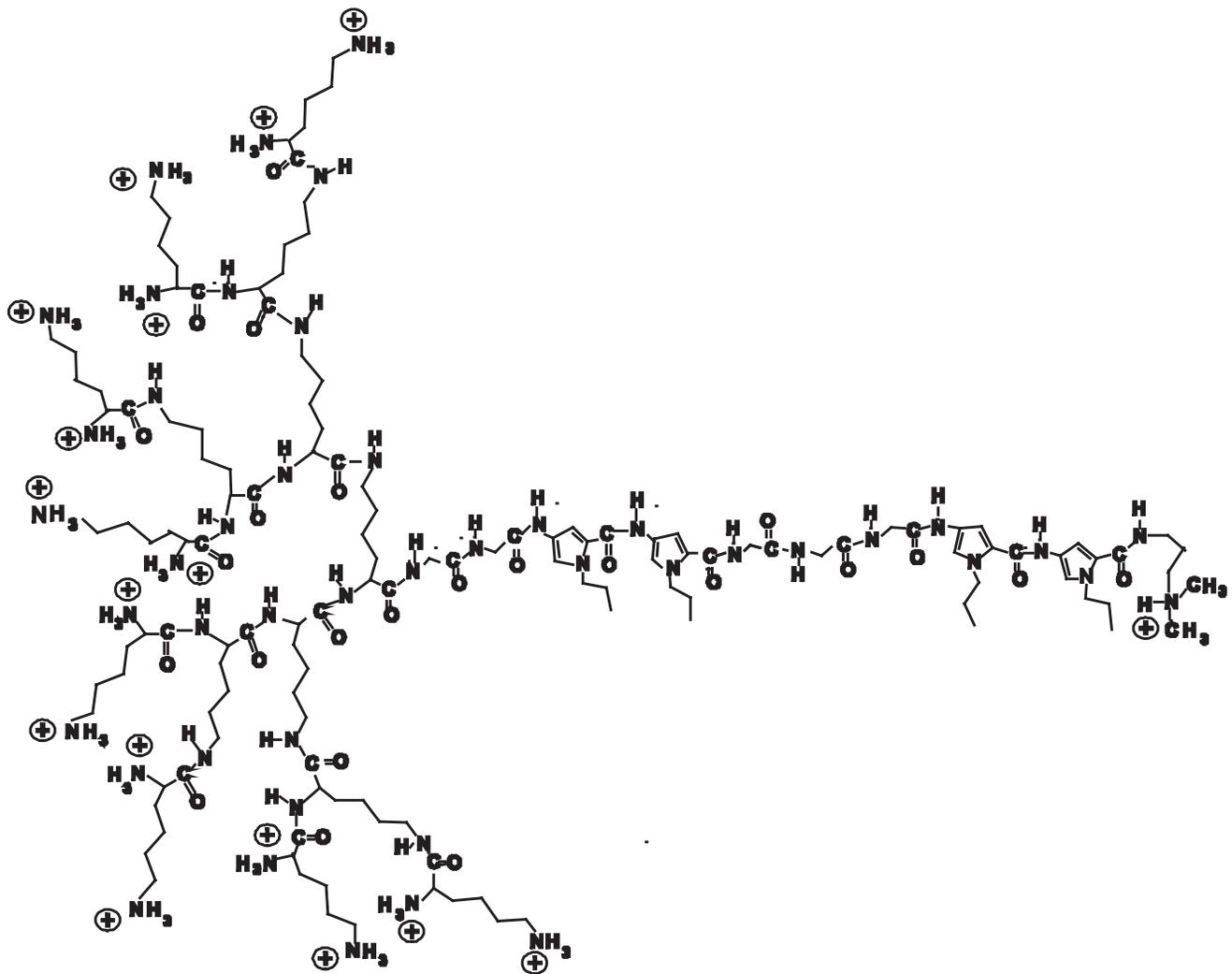


Рис. 2.

Ингибиторы инициации репликации герпесвирусов

При изучении противовирусной активности димерных производных (бис-производных, бис-Nt) ненуклеозидного ДНК-тропного антибиотика нетропсина (Nt) на модели ВПГ-1 установлены соединения, способные в нецитотоксичных концентрациях высокоселективно ингибировать репродукцию вируса, включая варианты, устойчивые к действию базовых противогерпетических ЭХТП АЦВ и ФМК [15, 16]. Бис-Nt избирательно связываются с протяжёнными участками АТ-тракта ДНК ВПГ-1 в зоне *Ori*. Формирование прочного комплекса бис-Nt с участком АТ-тракта ДНК препятствует реализации хеликазной активности *pUL9* и локальному расплетанию АТ-тракта, что приводит в результате к ингибированию процесса инициации репликации.

Видимо, предложенные модификации молекулы Nt увеличивают специфичность взаимодействия бис-Nt с элементами малой бороздки именно вирусной, а не клеточной ДНК, и повышают стабильность полученного комплекса, что проявляется улучшением химиотерапевтических показателей бис-Nt относительно Nt. Если Nt связывается с 4 АТ-парами [17], то, например, **15Lys-bis-Nt** (см. таблицу и рис. 2) – с 14–16 АТ-парами оснований [18], благодаря чему обладает значительно большей

избирательностью действия (ЦД₅₀ 60,5 мкМ, ИД₅₀ 1,07 мкМ, ХТИ 57), чем Nt (ЦД₅₀ 87 мкМ, ИД₅₀ 11,61 мкМ, ХТИ 7,5) [15, 16, 19]. Низкая селективность действия Nt объясняет его значительную токсичность для макроорганизма при системном введении (ЛД₅₀ Nt при внутрибрюшинном (в/б) введении мышам составляет 50 мг/кг [20]), в результате чего Nt не нашёл применения в клинической практике в качестве противовирусного ЭХТП. Токсичность 15Lys-bis-Nt существенно ниже – ЛД₅₀ при в/б введении превышает 300 мг/кг [21].

В опытах *in vitro* показано, что бис-Nt обеспечивают значительное усиление (в 3–8 раз) противогерпетического действия имеющих практическое значение модифицированных нуклеозидов (АЦВ, ганцикловира, 5-бромвинил-2'-дезоксинуридина и других), ФМК, глицирризиновой кислоты и α2-интерферона [16, 19].

Важно, что проведение серийного пассирования ВПГ-1 в присутствии 15Lys-bis-Nt или его комбинации с АЦВ не привело к снижению чувствительности вируса к 15Lys-bis-Nt (возможно, для нарушения связывания бис-Nt с АТ-трактом требуются множественные мутации или они летальны для вируса), в то время как чувствительность популяции вируса к АЦВ при пассировании в присутствии комбинации соединений постепенно сни-

жалась, но медленнее, чем при пассировании вируса в аналогичных условиях в присутствии одного АЦВ [16].

На модели генерализованной летальной ГИ у мышей установлен защитный эффект 15Lys-bis-Nt при в/б введении, подтверждён синергидный характер взаимодействия 15Lys-bis-Nt и АЦВ [21]. Эффективность 15Lys-bis-Nt при использовании в виде 0,15% мази при экспериментальном кожном герпесе у морских свинок, вызванном ВПГ-1, хорошо сопоставима с эффективностью 5% мази АЦВ [22]. Таким образом, соединения класса бис-Nt могут представлять интерес для дальнейшей разработки с целью создания на их основе ЭХТП (в том числе комбинированных) для лечения ГИ, устойчивых к АЦВ.

Ингибиторы ХПК

ХПК, входящий в состав репликативного комплекса, совершенно необходим для осуществления репликации ДНК ВПГ и потому представляет собой превосходную мишень для противовирусной терапии. Он включает 3 вирусных белка – хеликазную и праймазную субъединицы, а также кофактор, кодируемые генами *UL5*, *UL52* и *UL8*, соответственно. ХПК раскручивает двухцепочечную вирусную ДНК с образованием репликативной вилки и генерирует праймеры для синтеза ДНК [23].

Содержащее триазолилсульфонамид соединения **прителивир** (ПТВ, «AiCuris Anti-infective Cures GmbH», Германия; см. таблицу) обладает высокой анти-ВПГ-активностью *in vitro*, включая АЦВ-резистентные штаммы: активность в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 в 15–70 раз выше, чем у АЦВ [24, 25]. В опытах на лабораторных животных – мышях, крысах (летальная инфекция), морских свинок (модели кожной инфекции и генитального герпеса (ГГ) и кроликах (офтальмогерпес) – при оральном и местном введении ПТВ оказался значительно активнее, чем АЦВ и Вал-АЦВ, в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2. Например, орально ПТВ можно вводить в разовых дозах, в 15–70 раз меньших, чем Вал-АЦВ. ПТВ сохраняет эффективность даже при отсрочке начала лечения, не проявляет системной токсичности, эффективно подавляет рецидивы заболевания и бессимптомное выделение вируса (репликация ВПГ не обнаруживается в нейронах леченых животных), а также имеет благоприятные фармакокинетические параметры [25, 26].

Скорость формирования резистентности у ВПГ к ПТВ *in vitro* существенно ниже, чем к АЦВ. Однако резистентные к ПТВ штаммы удалось выделить из клинического материала от пациентов, не получавших ранее это соединение [27]. Их патогенные и вирулентные свойства не изменены. Резистентность обусловлена одиночными заменами в *pUL5* (G352R или K356Q/N/T) либо *pUL52* (A899T). Примечательно, что вирус, одновременно содержащий мутации в генах *UL5* (K356T) и *UL52* (A899T), в 2500 раз менее чувствителен к ингибитору (для сравнения: мутация K356T в *pUL5* приводит к 100-кратной резистентности, а мутация A899T в *pUL52* – к 43–100-кратной резистентности). Вероятно, ПТВ взаимодействует с обоими компонентами ХПК [27, 28].

Гены ВПГ *UL5*, *UL52* и *UL8* гомологичны генам *UL105*, *UL70* и *UL102* цитомегаловируса человека (ЦМВ) и генам *ORF55*, *ORF6* и *ORF52* ВВЗ [29], поэтому можно было бы ожидать, что ПТВ, ингибирующий активность ХПК ВПГ, будет обладать активностью и в отношении других членов семейства Herpesviridae. Однако спектр противовирусной активности ПТВ ограничен ВПГ-1 и ВПГ-2, в отношении ВВЗ его активность примерно в 1000 раз ниже.

В I и II фазах клинических испытаний была установ-

лена безопасность ПТВ. Так как частый приём препарата не требуется ($t_{1/2}$ в плазме крови 80 ч.), при проведении клинических испытаний (NCT01047540) 156 пациентов с диагнозом ГГ (наличие ВПГ-2 в организме было подтверждено лабораторно) получали ПТВ орально 1 раз в день по 5, 25 и 75 мг или 1 раз в неделю 400 мг либо плацебо в течение 28 дней. Наилучшие результаты были получены при использовании ПТВ в дозе 75 мг/день или 400 мг/нед: снижение вирусной нагрузки составило 68%, почти полностью прекратилось бессимптомное выделение ВПГ-2, а риск распространения вируса снизился на 87% по сравнению с группой, получавшей плацебо. В 2 раза сократились сроки регресса герпетических поражений. При этом частота нежелательных побочных эффектов не превышала таковую в контрольной группе даже при использовании ПТВ в высоких концентрациях [30]. Следующее испытание NCT01658826 II фазы было инициировано с целью изучения протективной активности ПТВ у пациентов с часто рецидивирующим ГГ, вызванным ВПГ-2 (частота эпизодов от 4 до 9 в год, приём препарата начинали в межрецидивный период). В первый день однократная доза ПТВ составляла 400 мг, затем 100 мг per os 1 раз в день в течение 27 дней. Вторая группа пациентов принимала Вал-АЦВ (500 мг 1 раз в день в течение 28 дней). При сравнении показателей клинической эффективности ПТВ и Вал-АЦВ было установлено, что в обеих группах участников были снижены частота субклинического выделения вируса (1,8% против 4,1%), частота развития и продолжительность рецидивов (2,4% и 3 дня против 5,3% и 6 дней), титр вируса в пробах генитальных секретов (3,2 lg против 3,7 lg копий ДНК/мл) [31]. К сожалению, при проводимом параллельно изучении безопасности сверхвысоких доз ПТВ (75–1000 мг/кг в сутки), в 70–900 раз превышающих максимальную дозу, получаемую пациентами, у обезьян появились нежелательные дерматологические и гематологические нарушения. Поэтому в июне 2013 г. FDA приняло решение досрочно остановить проведение текущего клинического исследования ПТВ NCT01658826, несмотря на то что у пациентов, прошедших полный курс терапии (более половины участников испытаний), на фоне приема ПТВ не было зафиксировано развитие серьезных неблагоприятных эффектов, а полученные результаты, как описано выше, носили позитивный характер.

Только в феврале 2017 г. было инициировано новое рандомизированное двойное слепое мультицентровое исследование (NCT02871492, II фаза) с целью оценки безопасности и эффективности 5% мази ПТВ для лечения рецидивирующего herpes labialis. Нанесение мази должно быть начато самим больным в течение часа после появления первых признаков развития рецидива (например, продромы). Мазь ПТВ, плацебо или крем Зовиракс должны наноситься на поражённую область 5 раз в день в течение 4 дней до полного выздоровления или максимально в течение 13 дней.

В марте 2017 г. начался набор участников для проведения ещё одного рандомизированного мультицентрового исследования безопасности и эффективности ПТВ для лечения мукоцитарной ВПГ-инфекции у лиц со сниженным иммунитетом, у которых клиническая неэффективность АЦВ обусловлена развитием резистентности у вируса, что должно быть подтверждено с помощью генотипического и/или фенотипического тестирования. Пациенты в первый день получают 4 таблетки ПТВ (400 мг/день), затем будут принимать по одной таблетке (100 мг/день). Контрольной группе пациентов будет вводить-

ся фоскарнет в виде инфузий (в дозе 40 мг/кг каждые 8 ч или 60 мг/кг каждые 12 ч). Курс в обоих случаях составит максимально 28 дней или, если заживление пораженных ВПГ произойдет раньше, дополнительно в течение 7 дней после заживления (NCT03073967, II фаза).

Другая группа противогерпетических аминотиазолил-фенилсодержащих соединений («Boehringer Ingelheim», Германия) также терминирует элонгацию вирусной ДНК как результат ингибирования хеликазной, праймазной и ДНК-зависимой АТФазной функций ВПГ и проявляет анти-ВПГ-активность в наномолярных концентрациях. На модели кожного герпеса у мышей, вызванного ВПГ-1, показано, что одно из соединений этого ряда **BILS 179 BS** (см. таблицу) при введении *per os* в дозах 75–100 мг/кг в день более чем на 95% снижает число герпетических элементов и ускоряет заживление по сравнению с плацебо. Аналогичные результаты получены на модели ГГ у мышей, вызванного ВПГ-2 (**BILS 179 BS** вводили *per os*, 25–200 мг/кг/день). Полученный эффект значительно превосходил эффект АЦВ на обеих моделях и сохранялся даже при введении **BILS 179 BS** через 65 ч после заражения. Антивирусная активность **BILS 179 BS** ВПГ-специфична, он не ингибирует репликацию других членов семейства *Herpesviridae* [32].

Биодоступность **BILS 45 BS** (*N*-[2-[4-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)анилино]-2-оксоэтил]-*N*-бензилпиримидин-4-карбоксамид), являющегося аналогом **BILS 179 BS**, при однократном оральном введении мышам в дозе 25 мг/кг составляет 49%, а C_{max} в плазме 31,5 мкМ достигается через 0,4 ч и в 200 раз превышает ИД₅₀ (0,13–0,25 мкМ). Введение **BILS 45 BS** *per os* при экспериментальной кожной инфекции мышей, вызванной ВПГ-1, практически полностью предупреждает развитие кожных герпетических поражений. Активность соединения намного выше, чем у АЦВ, и сохраняется в отношении штаммов, резистентных к АЦВ и ФМК. При этом частота приема **BILS 45 BS** ниже по сравнению с АЦВ (100 мг/кг в день и 125 мг/кг 3 раза в день, соответственно) [33].

У вариантов ВПГ-1, резистентных к **BILS 22 BS** (*N*-[2-[4-(2-амино-1,3-тиазол-4-ил)анилино]-2-оксоэтил]-*N*-бензилциклогексанкарбоксамид); $C_{25}H_{27}N_4O_2S$, Mr 447,58; см. таблицу), другому аналогу **BILS 179 BS**, были идентифицированы две замены в хеликазе *pUL5* (K356N, G352V, снижающие чувствительность вируса в 2500 и 316 и более раз), которые обуславливают глубокую резистентность к ПТВ (более 500 000- и 400-кратную соответственно). Чувствительность к АЦВ, а также патогенность и способность реактивироваться из латентного состояния у полученных вирусных мутантов не изменены. Примечательно, что замена A899T, детектированная в праймазе *pUL52* ПТВ-резистентных вариантов ВПГ-1, не приводит к кросс-резистентности к **BILS 22 BS** [34]. В соответствии с пресс-релизом, размещенным на сайте «Boehringer Ingelheim», разработка этой серии соединений прекращена по инициативе компании-разработчика в связи с изменением приоритетного направления для финансирования.

Еще одно соединение – оксадиазофенильное производное **аменамевир** (АМВ, «Astellas Pharma Inc.», Япония; см. таблицу) ингибирует активность ХПК и проявляет высокую противовирусную активность *in vitro*, хорошо сопоставимую с активностью ПТВ в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2. Однако, в отличие от ПТВ, АМВ оказался в той же степени эффективен и на модели ВВЗ, включая АЦВ-резистентные штаммы [35–37].

In vitro показано, что АМВ в комбинации с АЦВ или

ПЦВ проявляет синергидный эффект на моделях ВПГ-1, ВПГ-2 и ВВЗ. При кожном герпесе у мышей (зостер-форма) сочетанное применение АМВ и Вал-АЦВ обеспечивает аддитивный (ВПГ-2) или синергидный (ВВЗ) характер взаимодействия [36].

При оральном введении на модели кожного герпеса у мышей (зостер-форма) АМВ проявляет высокую анти-ВПГ-1-активность, превосходящую таковую Вал-АЦВ. Так, при использовании АМВ или Вал-АЦВ в дозе 30 мг/кг по схеме дважды в день в течение 5 дней смертность животных составила 10 и 30%, соответственно, при 90% смертности в контроле [35]. Аналогичные результаты были получены при сравнительном изучении эффективности АМВ и Вал-АЦВ на модели ГГ морских свинок: АМВ проявлял выраженный противовирусный эффект, даже если его введение (орально 30 мг/кг) начинали после появления первых симптомов заболевания. Улучшение наблюдалось уже через сутки. При введении Вал-АЦВ аналогичный эффект был получен только после трех дней лечения при использовании гораздо более высокой разовой дозы (300 мг/кг) [37].

В 2010 г. первое клиническое исследование безопасности АМВ NCT00870441 I фазы, проводимое в США, было прервано из-за развития серьезных нежелательных эффектов (результаты не опубликованы). Дальнейшие испытания эффективности и безопасности препарата были продолжены в Японии.

Клиническое исследование АМВ (NCT00486200, II фаза) показало, что пероральный прием препарата (100, 200 и 400 мг/день в течение 3 дней или 1200 мг однократно) для лечения ГГ приводит к сокращению сроков заживления герпетических поражений на 20–38 ч (в зависимости от дозы) у всех больных. Полученный эффект хорошо сопоставим с эффектом Вал-АЦВ, принимаемого по 500 мг 2 раза в день в течение 3 дней. Побочных эффектов не обнаружено [38]. Важно, что столь короткосрочный курс терапии АМВ не приводит к формированию резистентности. Однако в лабораторных условиях получен резистентный к АМВ мутант ВВЗ, содержащий 2 мутации в гене *ORF55* (хеликаза) – N336K и R446K – и 1 мутацию в гене *ORF6* (праймаза) N939D [35].

В 2013 – 2016 гг. были проведены двойные слепые рандомизированные плацебо-контролируемые клинические испытания АМВ в рамках III фазы с целью изучения эффективности и безопасности препарата у пациентов с орофациальным герпесом или ГГ (200 мг *per os* 1 раз в день; NCT02209324, NCT01959295) или герпесом зостер (200 или 400 мг *per os* 1 раз в день; лечение начинали не позднее чем через 72 ч после появления сыпи; пациенты контрольной группы получали Вал-АЦВ по 1000 мг 3 раза в день; NCT01959841). Спонсор – «Maruho Co., Ltd.» (Япония). К сожалению, полученные результаты до настоящего времени не опубликованы.

Таким образом, ингибиторы ХПК несомненно представляют практический интерес как противогерпетические ЭХТП, механизм действия которых принципиально отличается от такового модифицированных нуклеозидов. Отсутствие кросс-резистентности с АЦВ позволяет рассматривать эту группу ингибиторов в качестве альтернативных ЭХТП для лечения АЦВ-резистентных инфекций ВПГ-1 и ВПГ-2. Вместе с тем целесообразно проведение дальнейших исследований профиля безопасности ПТВ и АМВ при длительном приеме, а также поиска их аналогов с менее выраженной системной токсичностью.

Ингибиторы герпетической протеазы

Протеаза ВПГ кодируется геном *UL26*. Первичный транскрипт гена обладает протеазной активностью – нарезает капсидный белок около его С-конца, а также способен к самонарезанию [39].

Герпетические протеазы необходимы для продукции инфекционных вирусных частиц, и супрессия их функции приводит к ингибированию репродукции герпесвирусов. Ряд свойств герпетических протеаз делает их привлекательными в качестве мишени для разработки новых ЭХТП. Протеазы ВПГ-1, ВПГ-2, ВВ3 и ЦМВ человека являются уникальным классом сериновых протеаз с каталитической триадой Ser-His-His, имеют гомологичные последовательности и негомологичны другим протеазам [40–42].

1,4-дигидроксинафталин и **3 нафтохинона (1,4-нафтохинон, 5-гидрокси-1,4-нафтохинон и 5,8-дигидрокси-1,4-нафтохинон;** см. таблицу) являются высокоэффективными ингибиторами протеаз ВПГ-1 и ЦМВ. Среди всех проверенных дигидроксинафталинов 1,4-дигидроксинафталин является самым мощным ингибитором протеазы ВПГ-1. Дигидроксинафталины, содержащие гидроксигруппы в других положениях, либо существенно менее активны, либо не проявляют противовирусной активности даже в концентрации 100 мкМ. Несмотря на сходство структур, 1,4-дигидроксинафталин ингибирует протеазу ВПГ-1 по конкурентному механизму, тогда как 3 нафтохинона являются неконкурентными ингибиторами. Действие этих соединений селективно в отношении герпетических протеаз, они не проявляют существенной ингибирующей активности против сериновых протеаз млекопитающих (химотрипсин, трипсин, калликреин, плазмин, тромбин и фактор Ха) в концентрации 100 мкМ [43]. Таким образом, вышеописанные непептидные соединения могут представлять интерес для дальнейшего изучения их активности *in vivo*.

Ингибиторы РНКазы Н (терминазы и/или SSB-белка ICP8)

Обратная транскриптаза (ОТ) и интеграза (ИН) ВИЧ-1 обладают активностью РНКазы Н. Известны соединения, супрессирующие репродукцию ВИЧ-1 благодаря связыванию с рибонуклеазными сайтами ИН и/или ОТ [44, 45]. Недавно установлено, что ряд ингибиторов РНКазы Н ВИЧ-1 (гидрокситрополоны, гидроксиксантеноны, аминоксианотиофены и другие) подавляют репродукцию ВПГ *in vitro*. Наиболее активные из них гидрокситрополоны в нецитотоксичных концентрациях ($IC_{50} > 100$ мкМ) эффективны в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2, включая АЦВ-резистентные (ТК-дефицитные) штаммы. ID_{50} для ВПГ-1 и ВПГ-2 составляют 0,08–1,94 и 0,22–4,12 мкМ, ХТИ >52 – >1235 и >24 – >455 , соответственно. Величины ID_{50} этой группы соединений сопоставимы с ID_{50} АЦВ (0,16 и 1,40 мкМ), а на примере одного из этих соединений **118** (см. таблицу) показано, что при его сочетанном использовании с АЦВ наблюдается выраженный взаимоусиливающий эффект [46, 47].

Механизм действия гидрокситрополонов до конца не ясен, но наиболее вероятными биомишенями этой группы соединений представляются два белка ВПГ, у которых идентифицированы активные сайты РНКазы Н – большая субъединица терминазы ВПГ *pUL15* [48–50] и *pUL29* (ICP8), связывающий одноцепочечную ДНК (ssДНК) [51]. Благодаря РНКазе Н-активности термина-

за ВПГ катализирует нарезание синтезирующейся конкатемерной ДНК ВПГ на линейные геномные молекулы и упаковку их в капсиды [50], а ICP8 проявляет свойства рекомбиназы и вместе с нуклеазой ВПГ *UL12* участвует в гомогенной рекомбинации между длинной двухцепочечной линейной молекулой и кольцевой молекулой ssДНК в процессе репликации [52].

Показано, что молекулы α -гидрокситрополонов связываются с активным центром *pUL15*, тем самым прерывая катализ [48]. Поскольку гены, кодирующие структуру большой субъединицы терминазы, высококонсервативны в семействе Herpesviridae, небольшие молекулы-антагонисты РНКазы Н могут иметь широкий спектр действия. Действительно, гидрокситрополоны ингибируют репродукцию ЦМВ человека [46].

Среди ингибиторов ИН выявлено несколько гидразидных соединений и оксоизоиндолов, снижающих титр ВПГ-1 и ВПГ-2 на 5–7 порядков в концентрации 100 мкМ. **XZ45** проявляет наибольшую активность (см. таблицу). Установлено, что в клетках, инфицированных ВПГ-1, **XZ45** не влияет на связывание ICP8 с ssДНК, но блокирует синтез и рекомбинацию вирусной ДНК путём ингибирования функции рекомбиназы ICP8. Однако синтез вирусной ДНК в присутствии **XZ45** супрессирован только в 50 раз, что значительно меньше, чем 1000-кратное снижение накопления вируса в тех же условиях. [53]. Видимо, ингибирование репродукции ВПГ только частично обеспечивается подавлением синтеза вирусной ДНК, и действие **XZ45** связано не только с ICP8, но и с другими мишенями. Частично эффект **XZ45** может определяться ингибированием нуклеазной функции терминазы [49, 50]. Эта гипотеза подтверждается следующими данными. *In vitro* не удалось селекционировать вариант ВПГ-1, резистентный к **XZ45** в процессе пассирования вируса в присутствии **XZ45**. Медленное формирование резистентности к этой группе соединений или даже невозможность получения резистентных штаммов можно объяснить несколькими причинами: связанные с резистентностью мутации летальны для вируса; резистентность может развиться только при условии возникновения мутаций одновременно в двух или более вирусных белках-мишенях или в белке-мишени клетки, который более важен для вирусной репликации, чем для клеточного роста [53].

Помимо ВПГ, **XZ45** ингибирует репродукцию ЦМВ человека и индукцию герпесвируса саркомы Капоши из латентного состояния *in vitro* [53].

Таким образом, ингибиторы РНКазы Н ВПГ имеют потенциал как платформа для создания средств широкого противогерпесвирусного действия. Если учесть, что инфекция ВПГ-2 повышает вероятность передачи и заражения ВИЧ-1, стимулирует репликацию ВИЧ-1 в клетках, а ГИ являются ВИЧ/СПИД-сопутствующими инфекциями, разработка ЭХТП, эффективных одновременно против ГИ и ВИЧ-1, весьма желательна.

Ингибиторы портового белка ВПГ

Сборка капсидов герпесвирусов *de novo*, как и синтез герпетической ДНК, осуществляется в ядре клетки. Вновь синтезированные молекулы вирусной ДНК после нарезания упаковываются в капсиды через сформированный 12 молекулами белка *UL6* портал [54], после чего образовавшиеся нуклеокапсиды транспортируются из ядра в цитоплазму.

WAY-150138 (см. таблицу) ингибирует репродукцию ВПГ-1, но эффект штаммоспецифичен: образование бля-

шек штаммом Patton полностью предотвращается в присутствии 20 мкМ WAY-150138, тогда как для штамма KOS ингибирование не превышает 40% в присутствии 101 мкМ. Соединение не влияет на репликацию вирусной ДНК и сборку вирусного капсида. Однако в присутствии WAY-150138 ингибируется упаковка вирусной ДНК в капсиды. Мутации, ассоциированные с резистентностью к WAY-150138, локализованы в гене *UL6* портового белка [55].

Потенциальные клеточные мишени для разработки анти-ВПГ ЭХТП

В репродукции вирусов участвуют не только вирусные белки, но и белки клетки-хозяина, которые также можно рассматривать в качестве антивирусных мишеней.

Клеточные циклинзависимые киназы (cyclin-dependent kinase – cdk)

Cdk требуются для репликации ВПГ, так как в инфицированных клетках активируется комплекс cdk2/cdk1. Вероятно, cdk2 – один из факторов, необходимых для реактивации ВПГ из латентного состояния: cdk2 не экспрессируется в находящихся в покое нейронах, но при стрессовом стимулировании начинается синтез ядерной cdk2, и параллельно с этим происходит реактивация ВПГ, а в присутствии специфичного ингибитора cdk2 реактивация ВПГ-1 в нейронах ингибируется [56].

Росковитин (РКВ, ингибитор cdk1, cdk2, cdk3, cdk5 клетки; см. таблицу) обладает выраженной антивирусной активностью *in vitro* в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ЦМВ при добавлении в экспериментальную систему в самых ранних стадиях инфекции (в первые 3 ч). РКВ влияет на репликацию вирусной ДНК, подавляя активность cdk клетки, необходимых для фосфорилирования белка ретинобластомы и высвобождения связанного с ним транскрипционного фактора E2F, в функцию которого входит активация транскрипционных факторов, вовлеченных в синтез вирусной ДНК. Кроме того, РКВ супрессирует инициацию транскрипции сверхранних (*ICP4*, *ICP22* и *ICP0*) и ранних (*ICP8* и *TK*) генов ВПГ, влияет на фосфорилирование вирусных белков *ICP4* и *ICP0*; нарушает способность *ICP0* к уничтожению или деградации клеточных белков, связанных с ядерными структурами *ND10* [57].

ЭХТП, ингибирующие активность cdk, одинаково эффективно ингибируют репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2, включая штаммы с множественной лекарственной резистентностью. Несмотря на неоднократные попытки получить устойчивые к этим соединениям штаммы ВПГ-1, до сих пор не удалось их изолировать. Видимо, это объясняется с тем, что механизм их антивирусного действия связан как с вирусными, так и с клеточными белками.

Ингибиторы биосинтеза полиаминов

Известно, что в заражённых ВПГ-1 клетках сохраняется биосинтез полиаминов, а экспрессия двух ключевых ферментов этого процесса, S-аденозилметиониндекарбоксилазы (SAMDC) и орнитиндекарбоксилазы, не нарушается [58]. Эти данные позволяют предположить, что полиамины участвуют в репродуктивном цикле ВПГ-1. Действительно, вирионы ВПГ-1 содержат 2 типа полиаминов – спермидин в оболочке и спермин в нуклеокапсиде. Кроме того, полиамины вовлечены в репликацию ДНК ВПГ-1 [58, 59]. Специфический ингибитор SAMDC – метилглиоксаль-бис-гуанингидразон (LP082150; OR013931; 2-[(1-[(диаминометилиден)амино]имино}-пропан-2-илиден)амино]гуанидина гидрат дигидрохло-

гид; 2-[1-(диаминометилиден)гуанидин]пропан-2-илиденамино]гуанидин; $C_5H_{12}N_8 \times H_2O \times 2HCl$, Mг 257,12 (ангидрид)) подавляет репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток (в том числе клинических изолятов, резистентных к традиционным антивирусным ЭХТП – АЦВ и ФМК), при этом эффективность ингибирования возрастает, если клетки подвергнуть преобработке этим соединением до вирусной адсорбции или до сверхранних и ранних этапов инфекции [58]. Следовательно, ингибиторы SAMDC и других ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе полиаминов, можно рассматривать в качестве кандидатов для создания анти-ВПГ ЭХТП.

Ингибиторы топоизомеразы II

Клеточная топоизомераза II особенно интересна потому, что это один из ключевых ферментов, требуемых для синтеза ДНК ВПГ, который не кодируется вирусным геномом. Недавно в качестве возможных антигерпетических агентов были изучены ингибиторы топоизомеразы II триарилзамещённые гетероциклические соединения, включая акридоны (9-гидроксиакридины), ксантоны (оксibenзофеноны) и производные акридина. Установлена их способность ингибировать репликацию ВПГ, наиболее вероятно как следствие блокирования связывания топоизомеразы II с ДНК и нарушения процесса релаксации суперспирализованной ДНК. Однако селективность действия этих соединений невелика: ХТИ не превышает 3,8 [60].

Заключение

Обобщая вышеизложенное, можно заключить следующее. К настоящему времени установлены все существенные для репродукции герпесвирусов вирусные белки, каждый из которых можно рассматривать как потенциальную мишень для ЭХТП. Такие ЭХТП, направленно ингибирующие вирусспецифические функции, малотоксичны, высокоселективно ингибируют репродукцию одного или нескольких членов семейства герпесвирусов и редко обладают противовирусной активностью широкого спектра. Однако существует вероятность возникновения резистентности к таким соединениям.

ЭХТП, созданные на базе соединений, использующих в качестве мишеней белки клетки-хозяина, вовлеченные в репродукцию герпесвирусов, теоретически должны иметь ряд преимуществ: способность ингибировать более широкий диапазон вирусов и низкую вероятность появления устойчивых вирусных штаммов. Действительно, ингибиторы cdk2 подавляют репликацию не только ВПГ и других герпесвирусов, включая вирусы с лекарственной резистентностью, но даже неродственных вирусов, например, ВИЧ-1. Однако существенный недостаток этой стратегии состоит в том, что соединения, действующие на клеточные белки, могут оказаться высокотоксичными для клеток.

Важно отметить, что ингибиторы клеточной cdk5, видимо, не только обладают активностью в отношении реплицирующихся вирусов, но также ингибируют реактивацию ВПГ из латентного состояния, что может позволить не только купировать острые эпизоды, но и предотвращать рецидивы заболевания.

Соединения, использующие в качестве биомишени белки, формирующие ХПК (ПТВ и АМВ), проходят клинические испытания II и III фаз, кроме того, успешно завершены клинические испытания микробицида SPL7013 в рамках II фазы. Введение в практику соединений с механизмом действия, отличающимся от такового использующихся в на-

стоящее время в медицинской практике ЭХТП, позволит существенно увеличить эффективность противовирусной химиотерапии благодаря расширению возможностей для разработки высокоэффективных комбинаций ЭХТП. При сочетанном использовании ЭХТП с неперекрывающимися механизмами действия, ингибирующих функции различных вирусных и/или клеточных белков, не только создаются условия для снижения токсического воздействия ЭХТП на макроорганизм, предотвращения или значительного уменьшения вероятности селекции и распространения устойчивых к ЭХТП вариантов вирусов, но и открывается перспектива для предотвращения реактивации вирусов из латентного состояния. Кроме того, в таких условиях создаётся возможность уменьшить дозы ЭХТП без потери активности, что понизит стоимость курса химиотерапии, особенно при проведении лечения и профилактики ГИ у лиц со сниженным иммунным статусом, нуждающихся в длительном приеме ЭХТП.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5-14, 17, 18, 20, 23-60 см. REFERENCES)

- Информационный бюллетень ВОЗ. Вирус простого герпеса. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/ru/>
- ВОЗ. Значимость устойчивости к противомикробным препаратам для общественного здравоохранения. Available at: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/ru/
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Антигерпетическая активность димерных производных нетропсина. *Доклады Академии наук*. 2001; 380(4): 548-51.
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Действие димерного аналога нетропсина 15Lys-bis-Nt и ацикловира на репродукцию вируса простого герпеса. Поиск вариантов вируса герпеса с лекарственной устойчивостью к 15Lys-bis-Nt и ацикловиру. *Доклады Академии наук*. 2015; 460(5): 595-600.
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Антигерпетическая активность комбинаций производных нетропсина с модифицированными нуклеозидами и фосфоноуксусной кислотой на модели вируса герпеса простого первого типа в культуре клеток Vero. *Доклады Академии наук*. 2005; 400(6): 822-6.
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Галегов Г.А. Действие димерных производных нетропсина и их комбинаций с ацикловиrom на герпесвирусную инфекцию мышей. *Доклады Академии наук*. 2007; 43(6): 830-4.
- Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суrowая А.Н., Гурский Г.В., Дерябин П.Г., Львов Д.К. и др. Оценка активности производных бис-нетропсина на модели экспериментального кожного герпеса морских свинок. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 32-5.

REFERENCES

- Fact sheet of WHO. Herpes Simplex Virus. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
- Elion G.B. Acyclovir discovery, mechanism of action and selectivity. *J. Med. Virol.* 1993; (Suppl. 1): 2-6. PMID: 8245887
- Frobert E., Burrell S., Ducastelle-Lepretre S., Billaud G., Ader F., Casalegno J.S., et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res.* 2014; 111: 36-41. PMID: 25218782 DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.08.013
- WHO. Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. Available at: http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/
- Gilbert C., Bestman-Smith J., Boivin G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resist. Updat.* 2002; 5(2): 88-114. PMID: 12135584
- Frobert E., Cortay J.C., Ooka T., Najioullah F., Thouvenot D., Lina B., et al. Genotypic detection of acyclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV-sensitive and 14 ACV-resistant viruses. *Antiviral Res.* 2008; 79(1): 28-36. PMID: 18336925 DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.01.153

- Spear P.G., Eisenberg R.J., Cohen G.H. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology*. 2000; 275(1): 1-8. PMID: 11017782
- Keller M.J., Tuyama A., Carlucci M.J., Herold B.C. Topical microbicides for the prevention of genital herpes infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55(4): 420-3. PMID: 15743896 DOI: 10.1093/jac/dki056
- Price C.F., Tyssen D., Davie A., Evans S., Lewis G.R., Xia S., et al. SPL7013 Gel (VivaGel®) retains potent HIV-1 and HSV-2 inhibitory activity following vaginal administration in humans. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24095. PMID: 21935377 PMCID: PMC3174146 DOI: 10.1371/journal.pone.0024095
- Smith C.C., Peng T., Kulka M., Aurelian L. The PK domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotidoreductase (ICP10) is required for immediate-early gene expression and virus growth. *J. Virol.* 1998; 72(11): 9131-41. PMID: 9765459 PMCID: PMC110331
- Idowu A.D., Fraser-Smith E.B., Poffenberger K.L., Herman R.C. Deletion of the herpes simplex virus type 1 ribonucleotidoreductase gene alters virulence and latency in vivo. *Antiviral Res.* 1992; 17(2): 145-56. PMID: 1313220
- Bonneau A.M., Kibler P., White P., Bousquet C., Dansereau N., Cordingley M.G. Resistance of herpes simplex virus type 1 to peptidomimetic ribonucleotidoreductase inhibitors: selection and characterization of mutant isolates. *J. Virol.* 1996; 70(2): 787-93. PMID: 8551616
- Duan J., Liuzzi M., Paris W., Lambert M., Lawetz C., Moss N., et al. Antiviral activity of a selective ribonucleotidoreductase inhibitor against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(7): 1629-35. PMID: 9660995
- Koff A., Schwedes J.F., Tegtmeier P. Herpes simplex virus origin-binding protein (UL9) loops and distorts the viral replication origin. *J. Virol.* 1991; 65(6): 3284-92. PMID: 1851878 PMCID: PMC240986
- Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Gurskiy G.V., Galegov G.A. Antiherpetic activity of dimeric derivatives of netropsin. *Doklady Akademii nauk*. 2001; 380(4): 548-51. (in Russian) PMID: 11727562
- Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Gurskiy G.V., Galegov G.A. Effect of dimeric netropsin analogue 15Lys-bis-Nt and acyclovir on the reproduction of herpes simplex virus type 1. The search for variants of herpes virus with drug resistance to 15Lys-bis-Nt and acyclovir. *Doklady Akademii nauk*. 2015; 460(5): 595-600. (in Russian) PMID: 25772989 DOI: 10.1134/S1607672915010123
- Wemmer D.E. Ligands recognizing the minor groove of DNA: development and applications. *Biopolymers*. 1999-2000; 52(4): 197-211.
- Bazhulina N.P., Surovaya A.N., Gurskiy Y.G., Andronova V.L., Moiseeva E.D., Nikitin C.A., et al. Complex of the herpes simplex virus type 1 origin binding protein UL9 with DNA as a platform for the design of a new type of antiviral drugs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014; 32(9): 1456-73. PMID: 23879454 DOI: 10.1080/07391102.2013.820110
- Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Gurskiy G.V., Galegov G.A. The antiviral activity of the combinations of netropsin derivatives with modified nucleosides and phosphonoacetic acid as estimated in the model of herpesvirus type 1 in a vero cell culture. *Doklady Akademii Nauk*, 2005; 400(6): 822-6. (in Russian) PMID: 15846992
- ChemIDplus. A Toxnet Database. Netropsin. Available at: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/1438-30-8>
- Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Gurskiy G.V., Galegov G.A. Effect of dimeric derivatives of netropsin and their combinations with acyclovir on herpes simplex virus type 1 infection in mice. *Doklady Akademii Nauk*. 2007; 43(6): 830-4. (in Russian) PMID: 17546959
- Andronova V.L., Grokhovskiy S.L., Surovaya A.N., Gurskiy G.V., Deryabin P.G., L'vov D.K., et al. Estimation of activity of bis-netropsin derivatives based on a model of an experimental cutaneous herpes simplex virus disease of guinea pigs. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(1): 32-5. (in Russian)
- Whitley R.J., Prichard M. A novel potential therapy for HSV. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(3): 273-4. DOI: 10.1056/NEJMe1313982.
- Field H.J., Huang M.L., Lay E.M., Mickleburgh I., Zimmermann H., Birkmann A. Baseline sensitivity of HSV-1 and HSV-2 clinical isolates and defined acyclovir-resistant strains to the helicase-primase inhibitor pritelivir. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 297-9. PMID: 24021190 DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.08.024/
- Betz U. A., Fischer R., Kleymann G., Hendrix M., Rubsamen-Waigmann H. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(6): 1766-72. PMID: 12019088 PMCID: PMC127257
- Kaufman H.E., Varnell E.D., Gebhardt B.M., Thompson H.W., Atwal E., Rubsamen-Waigmann H., et al. Efficacy of a helicase-primase inhibitor in the treatment of genital herpes simplex virus infection. *Antiviral Res.* 2008; 79(1): 28-36. PMID: 18336925 DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.01.153

- mase inhibitor in animal models of ocular herpes simplex virus type 1 infection. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2008; 24(1): 34-42. PMID: 18201137 PMID: PMC2365309 DOI: 10.1089/jop.2007.0084
27. Sukla S., Biswas S., Birkmann A., Lischka P., Zimmermann H., Field H.J. Mismatch primer-based PCR reveals that helicase-primase inhibitor resistance mutations pre-exist in herpes simplex virus type 1 clinical isolates and are not induced during incubation with the inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(7): 1347-52. PMID: 20453068 PMID: PMC2835512 DOI: 10.1093/jac/dkq135
 28. Biswas S., Kleymann G., Swift M., Tiley L.S., Lyall J., Aguirre-Hernández J., et al. A single drug-resistance mutation in HSV-1 UL52 primase points to a difference between two helicase-primase inhibitors in their mode of interaction with the antiviral target. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61(5): 1044-7. PMID: 18299638 DOI: 10.1093/jac/dkn057
 29. Davison A.J., Scott J.E. Complete DNA Sequence of Varicella-Zoster Virus. *J. Gen. Virol.* 1986; 67(Pt. 9): 1759-816. PMID: 3018124 DOI: 10.1099/0022-1317-67-9-1759
 30. Wald A., Corey L., Timmler B., Magaret A., Warren T., Tyring S., et al. Helicase-primase inhibitor pritelivir for HSV-2 infection. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(3): 201-10. PMID: 24428466 DOI: 10.1056/NEJ-Moa1301150
 31. Walt A., Timmler B., Magaret A., Warren T., Tyring S., Johnston C., et al. Effect of pritelivir compared with valacyclovir on genital HSV-2 shedding in patients with frequent recurrences: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2016; 316(23): 2495-503. DOI: 10.1001/jama.2016.18189
 32. Crute J.J., Grygon C.A., Hargrave K.D., Simoneau B., Faucher A.M., Bolger G., et al. Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nat. Med.* 2002; 8(4): 386-91. PMID: 11927945 DOI: 10.1038/nm0402-386
 33. Duan J., Liuzzi M., Paris W., Liard F., Browne A., Dansereau N., et al. Oral bioavailability and in vivo efficacy of the helicase-primase inhibitor BILS 45 BS against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(6): 1798-804. PMID: 12760851 PMID: PMC155846
 34. Biswas S., Field H.J. Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors: resent findings from the study of drug resistance mutations. *Antivir. Chem. Chemother.* 2008; 19(1): 1-6. PMID: 18610552 DOI: 10.1177/095632020801900101
 35. Chono K., Katsumata K., Kontani T., Kobayashi M., Sudo K., Yokota T., et al. ASP2151, a novel helicase-primase inhibitor, possesses antiviral activity against varicella-zoster virus and herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(8): 1733-41. PMID: 20534624 DOI: 10.1093/jac/dkq198
 36. Chono K., Katsumata K., Suzuki H., Shiraki K. Synergistic activity of amenamevir (ASP2151) with nucleoside analogs against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 2013; 97(2): 154-60. PMID: 23261844 DOI: 10.1016/j.antiviral.2012.12.006
 37. Katsumata K., Chono K., Sudo K., Shimizu Y., Kontani T., Suzuki H. Effect of ASP2151, a herpesvirus helicase-primase inhibitor, in a guinea pig model of genital herpes. *Molecules.* 2011; 16(9): 7210-23. PMID: 21869749 DOI: 10.3390/molecules16097210
 38. Tyring S., Wald A., Zadeikis N., Dhadda S., Takenouchi K., Rorig R. ASP2151 for the treatment of genital herpes: a randomized, double-blind, placebo- and valacyclovir-controlled, dose-finding study. *J. Infect. Dis.* 2012; 205(7): 1100-10. PMID: 22351940 DOI: 10.1093/infdis/jis019
 39. Weinheimer S.P., McCann P.J., O'Boyle D.R., Stevens J.T., Boyd B.A., Drier D.A., et al. Autoproteolysis of herpes simplex virus type 1 protease releases an active catalytic domain found in intermediate capsid particles. *J. Virol.* 1993; 67(10): 5813-22. PMID: 8396657 PMID: PMC237999
 40. Chen P., Tsuge H., Almasy R.J., Gribskov C.L., Katoh S., Vanderpool D.L., et al. Structure of the human cytomegalovirus protease catalytic domain reveals a novel serine protease fold and catalytic triad. *Cell.* 1996; 86(5): 835-43. PMID: 8797829
 41. Dilanni C.L., Stevens J.T., Bolgar M., O'Boyle D.R., Weinheimer S.P., Colonna R.J. Identification of the serine residue at the active site of the herpes simplex virus type 1 protease. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(17): 12672-6. PMID: 8175677
 42. Qiu X., Janson C.A., Culp J.S., Richardson S.B., Debouck C., Smith W.W., et al. Crystal structure of varicella-zoster virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94(7): 2874-9. PMID: 9096314 PMID: PMC20290
 43. Matsumoto M., Misawa S., Chiba N., Takaku H., Hayashi H. Selective nonpeptidic inhibitors of herpes simplex virus type 1 and human cytomegalovirus proteases. *Biol. Pharm. Bull.* 2001; 24(3): 236-41. PMID: 11256477
 44. Budihias S.R., Gorshkova I., Gaidamakov S., Wamiru A., Bona M.K., Parniak M.A., et al. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic. Acids Res.* 2005; 33(4): 1249-56. PMID: 15741178 PMID: PMC552956 DOI: 10.1093/nar/gki268
 45. Chung S., Himmel D.M., Jiang J.K., Wojtak K., Bauman J.D., Rausch J.W., et al. Synthesis, activity, and structural analysis of novel α -hydroxytropolone inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease H. *J. Med. Chem.* 2011; 54(13): 4462-73. PMID: 21568335 PMID: PMC3133734 DOI: 10.1021/jm2000757
 46. Tavis J.E., Wang H., Tollefson A.E., Ying B., Korom M., Cheng X., et al. Inhibitors of nucleotidyltransferase superfamily enzymes suppress herpes simplex virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(12): 7451-61. PMID: 25267681 PMID: PMC4249532 DOI: 10.1128/AAC.03875-14
 47. Ireland P.J., Tavis J.E., D'Erasmus M.P., Hirsch D.R., Murelli R.P., Cadiz M.M., et al. Synthetic α -hydroxytropolones inhibit replication of wild-type and acyclovir-resistant herpes simplex viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(4): 2140-9. DOI: 10.1128/AAC.02675-15
 48. Masaoka T., Zhao H., Hirsch D.R., D'Erasmus M.P., Meck C., Varnado B., et al. Characterization of the C-Terminal Nuclease Domain of Herpes Simplex Virus pUL15 as a Target of Nucleotidyltransferase Inhibitors. *Biochemistry.* 2016; 55(5): 809-19. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01254
 49. Nadal M., Mas P.J., Blanco A.G., Arnan C., Solà M., Hart D.J., et al. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nuclease domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16078-83. PMID: 20805464 PMID: PMC2941324 DOI: 10.1073/pnas.1007144107
 50. Selvarajan Sigamani S., Zhao H., Kamau Y.N., Baines J.D., Tang L. The structure of the herpes simplex virus DNA-packaging terminase pUL15 nuclease domain suggests an evolutionary lineage among eukaryotic and prokaryotic viruses. *J. Virol.* 2013; 87(12): 7140-8. PMID: 23596306 PMID: PMC3676077 DOI: 10.1128/JVI.00311-13
 51. Bryant K.F., Yan Z., Dreyfus D.H., Knipe D.M. Identification of a divalent metal cation binding site in herpes simplex virus 1 (HSV-1) ICP8 required for HSV replication. *J. Virol.* 2012; 86(12): 6825-34. PMID: 23596306 PMID: PMC3676077 DOI: 10.1128/JVI.00311-13
 52. Reuven N.B., Staire A.E., Myers R.S., Weller S.K. The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease and single-stranded DNA binding protein mediate strand exchange in vitro. *J. Virol.* 2003; 77(13): 7425-33. PMID: 12805441 PMID: PMC164775
 53. Yan Z., Bryant K.F., Gregory S.M., Angelova M., Dreyfus D.H., Zhao X.Z., et al. HIV integrase inhibitors block replication of alpha-, beta-, and gammaherpesviruses. *MBio.* 2014; 5(4): e01318-14. DOI: 10.1128/mBio.01318-14
 54. Trus B.L., Cheng N., Newcomb W.W., Homa F.L., Brown J.C., Steven A.C. Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12668-71. PMID: 15507654 PMID: PMC525097 DOI: 10.1128/JVI.78.22.12668-12671.2004
 55. van Zeijl M., Fairhurst J., Jones T.R., Vernon S.K., Morin J., La Rocque J., et al. Novel class of thiourea compounds that inhibit herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation: resistance maps to the UL6 gene. *J. Virol.* 2000; 74(19): 9054-61. PMID: 10982350 PMID: PMC102102
 56. Schang L.M., Bantly A., Schaffer P.A. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. *J. Virol.* 2002; 76(15): 7724-35. PMID: 12097586 PMID: PMC136347
 57. Schang L.M., Rosenberg A., Schaffer P.A. Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. *J. Virol.* 2000; 74(5): 2107-20. PMID: 10666240 PMID: PMC111691
 58. Greco A., Callè A., Morfin F., Thouvenot D., Cayre M., Kindbeiter K., et al. S-adenosyl methionine decarboxylase activity is required for the outcome of herpes simplex virus type 1 infection and represents a new potential therapeutic target. *FASEB J.* 2005; 19(9): 1128-30. PMID: 15863396 DOI: 10.1096/fj.04-2108fje
 59. Francke B. Cell-free synthesis of herpes simplex virus DNA: the influence of polyamines. *Biochemistry.* 1978; 17(25): 5494-9. PMID: 215202
 60. Goodell J.R., Madhok A.A., Hiasa H., Ferguson D.M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14(16): 5467-80. PMID: 16713270 DOI: 10.1016/j.bmc.2006.04.044

Поступила 01.11.17

Принята в печать 12.12.17

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Васильева А.Д., Еропкин М.Ю.

ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И АНТИГЕННОГО АНАЛИЗА СОВРЕМЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2)

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

Вирусы гриппа человека подтипа А(Н3N2) отличаются высокой скоростью эволюции и регулярно вызывают эпидемии по всему миру. Их способность адаптироваться к ускользанию от иммунного ответа хозяина и изменять свою рецепторную специфичность очень высока. За последние 20 лет эти вирусы потеряли способность связываться с эритроцитами кур и индеек и практически перестали выделяться на куриных эмбрионах – основном источнике наращивания и получения противогриппозных вакцин. Выделение вирусов в культуре клеток MDCK привело к отбору штаммов, которые утрачивают один из потенциальных сайтов гликозилирования. Многие штаммы А(Н3N2) приобрели мутации в нейраминидазе, которые искажают результаты антигенного анализа в реакции торможения гемагглютинации – краеугольном методе при анализе соответствия циркулирующих в популяции людей вирусных изолятов штаммам, входящим в состав противогриппозных вакцин. В этой связи характеристика антигенных свойств вирусов гриппа А(Н3N2) традиционными методами становится малоинформативной, а отбор вакцинных штаммов данного подтипа – ошибочным, что и отражается в несоответствии вакцинных и циркулирующих вирусов А(Н3N2) в последние годы (2013–2014, 2014–2015, 2015–2016). Поиск, разработка и внедрение новых алгоритмов выделения и антигенного анализа вирусов гриппа А(Н3N2) представляются крайне актуальными.

Ключевые слова: обзор; вирусы гриппа А(Н3N2); реакция торможения гемагглютинации; реакция микронейтрализации; антигенные свойства.

Для цитирования: Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Васильева А.Д., Еропкин М.Ю. Проблемы выделения, идентификации и антигенного анализа современных вирусов гриппа А(Н3N2). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 160-164. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-160-164>

Petrova P.A., Konovalova N.I., Danilenko D.M., Vasilieva A.D., Erokin M.Yu.

PROBLEMS OF ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF RECENT HUMAN A(H3N2) INFLUENZA VIRUSES

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

Human A (H3N2) influenza viruses are distinguished by a high rate of evolution and regularly cause epidemics around the world. Their ability to adapt and to escape from the host's immune response and to change their receptor specificity is very high. Over the past 20 years, these viruses have lost the ability to agglutinate red blood cells of chickens and turkeys and have practically ceased to propagate in chicken embryos – the main source of influenza vaccines. Isolation of viruses in the MDCK cell culture led to the selection of strains that lose one of the potential glycosylation sites.

Many of the A (H3N2) strains have acquired mutations in neuraminidase, which distort the results of antigenic analysis in the hemagglutination inhibition test – the cornerstone method for the analysis of the match between viral isolates circulating in human population to strains selected for the influenza vaccines. In this regard, the characteristics of the antigenic properties of influenza A (H3N2) viruses by traditional methods become poorly informative, and the selection of vaccine strains of this subtype is erroneous, which is reflected in the discrepancy between vaccine and circulating A (H3N2) viruses in recent years (2013-2014, 2014 -2015, 2015-2016). The search, development and implementation of new algorithms for the isolation and antigen analysis of influenza A (H3N2) viruses are extremely urgent.

Keywords: review; influenza A(H3N2) viruses; hemagglutination inhibition test; microneutralization; antigenic properties.

For citation: Petrova P.A., Konovalova N.I., Danilenko D.M., Vasilieva A.D., Erokin M.Yu. Problems of isolation, identification and antigenic characterization of recent human A(H3N2) influenza viruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 160-164. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-160-164>

For correspondence: Polina A. Petrova, junior researcher, Laboratory of evolutionary variability of influenza viruses, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: polina.petrova@influenza.spb.ru

Information about authors:

Petrova P.A., <http://orcid.org/0000-0001-8527-7946>; Konovalova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-7213-9306>;

Danilenko D.M., <http://orcid.org/0000-0001-6174-0836>; Vasilieva A.D., <http://orcid.org/0000-0001-6818-5548>;

Erokin M.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-3306-847X>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 29 November 2017

Accepted 12 December 2017

Для корреспонденции: Петрова Полина Александровна, младший научный сотрудник лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: polina.petrova@influenza.spb.ru

В 1967 г. в Ленинграде был создан Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа. Всего год спустя в мире разразилась третья в XX веке пандемия гриппа, вызванная вирусом гриппа подтипа А(Н3N2). По традиции место возникновения пандемического штамма стало нарицательным в названии пандемии и штаммов нового подтипа, ранее не циркулировавших в человеческой популяции, которые до сих пор называют гонконгским гриппом [1].

Вирусы гриппа А(Н3N2) обладают самой высокой скоростью изменчивости среди всех подтипов вируса гриппа А, циркулирующих в популяции людей [2]. С момента их появления в циркуляции в 1968 г. в структуре гемагглютинина (НА) и нейраминдазы (НА) этих штаммов произошли множественные генетические и антигенные изменения, которые существенно отличают современные вирусы от циркулировавших ранее [3]. Вирусы гриппа А(Н3N2) остаются одним из основных этиологических факторов гриппозных эпидемий как в России, так и в мире. За последние 8 лет они отсутствовали в циркуляции в нашей стране только в первую волну пандемии 2009–2010 гг., а в прошлом эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. их доля была крайне незначительна (рис. 1).

Вакцинация признана наилучшей защитной мерой в борьбе с гриппом. Высокая изменчивость вируса диктует необходимость своевременного обновления штаммового состава противогриппозных вакцин. Рекомендации по кандидатным вакцинным штаммам для включения в состав вакцин для Северного и Южного полушарий раз в полгода дает Всемирная организация здравоохранения. Для принятия правильного решения комиссия по вакцинным штаммам оценивает антигенные и генетические свойства штаммов, которые циркулировали по всему миру. Основным эталонным методом оценки антигенного соответствия циркулирующих вирусов штаммам, включенным в состав вакцин, остаётся реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Однако использование этого простого и доступного метода для современных вирусов гриппа А(Н3N2) становится всё более затруднительным. Для понимания причин рассмотрим основные проблемы, возникающие при выделении и идентификации вирусов гриппа данного подтипа, связанные с изменением их рецепторной специфичности.

Изменения рецепторной специфичности современных вирусов гриппа А(Н3N2)

Согласно результатам изучения генома вирусов гриппа человека, большинство типов НА и NA произошли от вирусов гриппа птичьего и свиного происхождения. Межвидовая трансмиссия вирусов сопровождалась изменениями специфичности связывания НА с клеточными рецепторами, а также изменениями в функциональной активности НА, необходимой для отпочковывания вирионов от клетки хозяина. НА вируса гриппа в процессе инфицирования клеток-мишеней связывается с клеточными рецепторами, в состав которых входят сиаловые кислоты. Данные рецепторы представлены двумя видами, которые отличаются друг от друга расположением гликозидной связи между сиаловой кислотой и терминальной галактозой: $\alpha 2,3$ (SA $\alpha 2,3$ Gal) и $\alpha 2,6$ (SA $\alpha 2,6$ Gal) [4]. В серии экспериментов в 80-е годы прошлого века J. Paulson [5] и другие исследователи

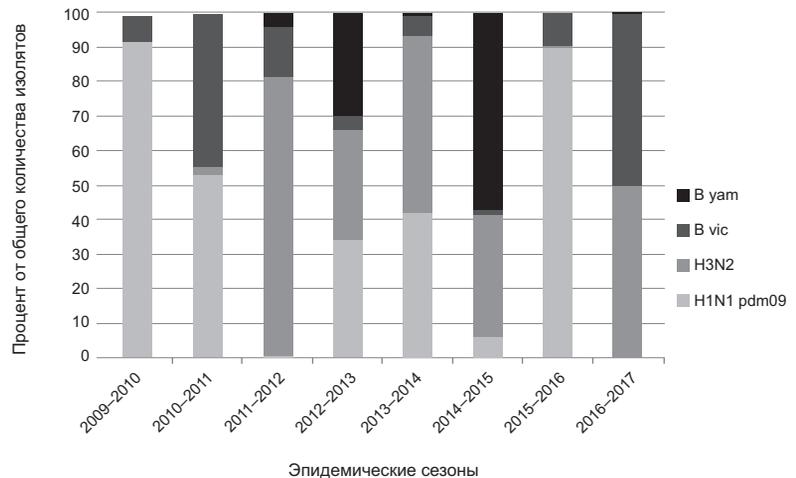


Рис. 1. Процентное соотношение выделенных вирусов гриппа по подтипам возбудителя, проанализированных за 8-летний период (2009–2017) в НИИ гриппа.

установили, что вирусы гриппа птиц и лошадей преимущественно связываются сиаловыми кислотами, характеризующимися $\alpha 2,3$ -гликозидной связью с галактозой (SA $\alpha 2,3$ Gal), вирусы гриппа человека – с SA $\alpha 2,6$ Gal-рецепторами [6]. В своих экспериментальных работах J. Paulson показал, что достаточно всего одной аминокислотной замены, чтобы специфичность связывания рецепторами типа $\alpha 2,6$ поменялась на $\alpha 2,3$, и наоборот. Впоследствии было установлено, что эпителий респираторного тракта свиней имеет оба типа этих рецепторов, и это увеличивает вероятность одновременного заражения и репликации вирусами разных подтипов, в результате чего может произойти генетическая реассортация между ними.

Рецепторной специфичности вирусов гриппа посвящено большое количество работ и обзоров [5, 7, 8, 9]. Для практической работы в рамках надзора за циркулирующими вирусами гриппа важно следующее: сиаловые кислоты являются очень распространёнными на поверхности многих (если не большинства) животных клеток, однако тип и распространённость на клеточной поверхности индивидуальны для различных клеток у разных организмов [4, 9]. Это позволяет использовать культуры клеток животных для выделения вирусов гриппа, а также применять эритроциты разных видов животных и птиц в реакции гемагглютинации (РГА) для определения титра вируса и РТГА для определения антигенных свойств вирусов гриппа. Эти простые «классические» вирусологические методы широко используются в системе надзора за циркулирующими вирусами гриппа человека во всем мире по рекомендации ВОЗ [10]. Однако изменение рецепторной специфичности современных вирусов гриппа А(Н3N2) кардинально влияет на возможности исследователей использовать их в своей работе.

Проблемы выделения вирусов гриппа А(Н3N2)

Производство большинства противогриппозных вакцин основано на культивировании вирусов гриппа в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). В этой связи выделение антигенно актуальных штаммов в этой модельной системе по-прежнему является важной практической задачей лабораторного надзора за гриппом. В результате длительной циркуляции вирусов А(Н3N2) в человеческой популяции в начале 90-х годов прошлого

века во всем мире стала наблюдаться фенотипическая реверсия, связанная с утратой способности агглютинировать куриные эритроциты и репродуцироваться в РКЭ [6]. Последующая лабораторная адаптация вирусов А(Н3N2) к росту в РКЭ приводила к мутациям в позициях V226I, L194I, S193R, расположенных в рецепторсвязывающем сайте НА [11, 12]. Самая неприятная особенность лабораторной адаптации штаммов к росту на РКЭ заключалась в том, что возникающие при адаптации мутации располагались в непосредственной близости от рецепторсвязывающего сайта, а также тех областей НА, к которым образуются вируснейтрализующие антитела. Такие аминокислотные замены влияли как на рецепторсвязывающие свойства штаммов, так и на их антигенные свойства. Известны экспериментальные работы, которые показывают, что авидность связывания вирусного НА с рецепторами может быть основной движущей силой для антигенного дрейфа [13]. Последствия таких изменений нетрудно проследить. Так, в сезоне 2012–2013 г. вакцинные штаммы на основе вируса А/Виктория/361/11 содержали аминокислотные замены, расположенные в рецепторсвязывающем и антигенных сайтах в позициях 156, 190, 219. Впоследствии был опубликован ряд работ, подтверждающих низкую эффективность вакцины в Канаде, США, Европе [14–16].

В настоящее время выделение вирусов гриппа А(Н3N2) в РКЭ по-прежнему ограничено. Сотрудничающие Центры ВОЗ предлагают несколько альтернативных методик для повышения вероятности выделения штаммов А(Н3N2) на куриных РКЭ, однако даже такие усовершенствованные методы, как свидетельствует наш опыт, не позволяют добиться значительного успеха.

Долгое время вирусы гриппа А(Н3N2) эффективно выделялись на культуре клеток MDCK. Эта линия признана наиболее чувствительной для выделения вирусов гриппа и рекомендована ВОЗ для изоляции вирусов гриппа человека. В 2002 г. у ряда штаммов А(Н3N2) были выявлены аминокислотные замены в молекуле НА, которые привели к ослаблению связывания НА с аналогами рецепторов, распознаваемых вирусами гриппа человека. По сравнению со структурой НА вирусов А(Н3N2) 1968 г., несущих 222W и 225G в НА1, большинство вирусов 2004 г. содержали 222R и 225D в НА1, а вирусы 2005 г. приобрели замену 225N [17]. Рентгеноструктурные исследования позволили установить, что в результате этих мутаций 220-я петля НА изменила свою конформацию и сместилась на 1,5 Å от первоначальной позиции в НА вирусов 1968 г., что отчасти вызвало изменение связывания с клеточными рецепторами [18]. Прогрессирующие изменения аффинности к клеточным рецепторам повлекли за собой изменения способности циркулирующих вирусов репродуцироваться в клеточной культуре MDCK.

Известно, что клетки линии MDCK несут на своей поверхности сиаловые рецепторы обоих типов ($\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$) и поэтому являются универсальной культурой для выделения разнообразных вирусов гриппа. Однако распределение типов этих рецепторов неравномерно: рецепторов типа $\alpha 2,6$ значительно меньше, чем $\alpha 2,3$. Изменение рецепторной специфичности вирусов А(Н3N2), в результате которого они утратили способность связываться с $\alpha 2,3$ на поверхности клеток-мишеней (в частности, MDCK), привело к тому, что современные штаммы А(Н3N2) слабо выделяются на данной клеточной линии или имеют очень низкие гемагглютинирующие титры.

Частичным решением этой проблемы стало использование генно-модифицированной линии MDCK-Siat1, полученной в результате трансфекции человеческой 2,6-сиалтрансферазы [19]. Клетки данной линии экспрессируют в 2 раза больше $\alpha 2,6$ -сиаловых рецепторов и в 2 раза меньше $\alpha 2,3$ -сиаловых рецепторов, чем клетки обычной культуры MDCK. Автор линии MDCK-Siat1 отмечает, что клеточная линия MDCK-Siat1 является такой клеточной культурой, которая сможет наиболее эффективно смоделировать пропорциональное содержание рецепторов, у которых гликозидная связь между сиаловой кислотой и галактозой присутствует либо в $\alpha 2,3$ -, либо в $\alpha 2,6$ -положении, находящихся на поверхности эпителия дыхательных путей человека.

Применение линии MDCK-Siat1 существенно улучшило возможности выделения вирусов гриппа А(Н3N2). Некоторые исследователи отмечают, что использование MDCK-Siat1 позволяет избежать ряда адаптационных замен в НА и NA вирусов, которые часто возникают при выделении и последующем пассировании на культуре клеток MDCK [20, 21], однако этот вывод далеко не однозначен [22]. При этом ведение генно-модифицированной клеточной линии MDCK-Siat1 требует постоянного добавления селективного антибиотика генетицина (G-418), что существенно удорожает стоимость работ по выделению вирусов.

Проблемы антигенного анализа вирусов гриппа А(Н3N2)

Влияет ли клеточная система выделения MDCK/MDCK-Siat1 на антигенные характеристики выделяемых вирусов? В некоторых случаях выделение, особенно последующее пассирование, современных вирусов А(Н3N2) в культуре клеток MDCK приводит к селекции вирусов с мутациями в НА и NA. Так, современные штаммы клэйда 3С.2а обладают потенциальным сайтом гликозилирования в позициях 158–160 НА1, расположенным в антигенном сайте В. Этот сайт гликозилирования является уникальной чертой вирусов данного клэйда и не обнаруживается ни у одного другого клэйда современных вирусов А(Н3N2). Гликозилирование поверхностных белков вируса гриппа играет важную роль в ускользании вируса от иммунного ответа хозяина и может влиять на антигенные свойства вируса. Стоит также отметить, что некоторые авторы рассматривают позиции 158 и 159 в НА1 вирусов гриппа А(Н3N2) среди наиболее важных 7 аминокислотных позиций НА, изменения в которых определяют основные антигенные кластеры вирусов данного подтипа [3].

Секвенирование НА вирусов гриппа из первичного материала (мазков) от больных показало, что 99% вирусов клэйда 3С.2а содержат в последовательности 158–160 сайт гликозилирования NYT. Выделение вирусов на культуре клеток MDCK или MDCK-Siat1 привело к тому, что у 28% выделенных штаммов этот сайт гликозилирования был утрачен или наблюдался полиморфизм по составу аминокислот [22]. Авторы данного исследования также отмечают, что имела место четкая корреляция: все штаммы, сохранившие потенциальный сайт гликозилирования, после выделения на культуре клеток были не способны агглютинировать эритроциты морской свинки, в то время как штаммы, утратившие данный сайт, обладали такой способностью.

Примечательно, что в другом исследовании результаты, полученные при выделении вирусов гриппа клэйда



Рис. 2. Зависимость гемагглютинирующего титра вирусов А(Н3N2) от присутствия 20 нМ озельтамивира карбоксилата. Использованы эритроциты человека группы крови 0.

3С.2а, несколько отличались. Штаммы, выделенные из первичного материала от больных (когда наличие потенциального сайта гликозилирования было подтверждено до выделения), сохраняли его во всех случаях при использовании культуры MDCK-Siat1, а при использовании линии MDCK полиморфизм или утрата сайта наблюдалась почти в половине случаев [17]. Все выделенные штаммы другого современного клэйда 3С.3а не приобретали адапционных замен в НА независимо от того, на какой культуре они были изолированы. Отметим, однако, что выборка этого параллельного исследования была весьма незначительной.

Эксперименты, проведенные со штаммами, у которых наблюдался полиморфизм в положениях 158—160, и с теми, у которых он отсутствовал, показали, что антигенные свойства всех протестированных вирусов были сходны со всеми использованными в экспериментах хорьковыми антисыворотками [17]. Эти данные снижают опасения о том, будет ли А(Н3N2)-компонент вакцины на основе штамма А/Гонконг/4801/2014, несущий К160 (вместо Т160), обеспечивать эффективную защиту после вакцинации в отношении циркулирующих вирусов.

Другими важными изменениями, которые наблюдаются у вирусов А(Н3N2) при выделении на культуре клеток MDCK, являются замены в положениях 148 или 151 в НА, которые непосредственно влияют на взаимодействие с клеточными рецепторами [20, 21]. Штаммы с мутацией D151 в молекуле НА в экспериментах демонстрируют способность связывания с $\alpha 2,3$ клеточными рецепторами. При наличии озельтамивира эта способность полностью блокируется, а это указывает на то, что НА вирусов А(Н3N2) связывается с рецепторами типа $\alpha 2,6$ [17, 18, 21]. Однако эта способность НА взаимодействовать с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней очень сильно искажает результаты РГА и РТГА. Если не блокировать активность НА путём добавления 20 нМ раствора озельтамивира карбоксилата, будет наблюдаться ложноположительная агглютинация эритроцитов, обусловленная взаимодействием НА с сиаловыми кислотами на поверхности эритроцитов. Очень многие вирусы гриппа А(Н3N2) клэйда 3С.2а, наиболее широко распространённого в настоящий момент, демонстрируют низкие титры гемагглютинации эритроцитов или не обладают этой способностью вовсе. Такие вирусы невозможно антигенно охарактеризовать в РТГА. При этом большинство вирусов клэйда 3С.3а сохраняют способность агглютинировать эритроциты морской свинки и человека и могут быть охарактеризованы в РТГА.

Система выделения очень сильно влияет на приобретение адапционных замен в НА вирусов гриппа А(Н3N2) независимо от генетической принадлежности штаммов. После трёхкратного пассажа вирусов в клетках MDCK большинство вирусов (свыше 80%) приобретают полиморфизм в положениях 148 или 151, чего не наблюдается при пассировании в клетках MDCK-Siat1 [17].

Появление вирусов гриппа, у которых НА и выполняет функцию связывания с рецепторами на поверхности клеток, и соответственно обладает способностью агглютинировать эритроциты, вначале датировали 2005 г. [21]. Однако более детальные исследования позволили установить, что такие вирусы появились ещё в 1994 г. [20]. Более того, гемагглютинирующая активность вирусов, выделенных на MDCK в период с 1994 до 2008 г., также подавлялась добавлением озельтамивира или занамивира. В отличие от MDCK-вариантов вирусы, выделенные из тех же образцов от больных, на РКЭ сохраняли способность агглютинировать куриные эритроциты, как и вирусы, выделенные на MDCK в 1993 г. или ранее.

Данные, полученные в Национальном центре по гриппу в Санкт-Петербурге в текущем сезоне, полностью соответствуют мировым наблюдениям. Был исследован 161 штамм вирусов гриппа А(Н3N2). Среди вирусов гриппа, выделенных на культуре клеток MDCK, у 30,2% штаммов гемагглютинирующий титр вируса в присутствии озельтамивира был равен титру в РГА без ингибитора, у 20,5% штаммов титр снизился в 8 раз, у 16,1% — в 16 раз и у 3,7% — в 32 раза (рис. 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что 70% выделенных штаммов обладали НА, которая была способна агглютинировать эритроциты человека.

Заключение

Постоянные изменения вирусов гриппа А(Н3N2) привели к тому, что культура MDCK, признанная «золотым стандартом» для выделения вирусов гриппа, больше не может считаться таковой. Необходим поиск такой культуры/системы выделения, которая не будет способствовать появлению и/или накоплению адапционных мутаций в поверхностных белках вируса, влияющих на их антигенные и рецепторсвязывающие свойства.

Сотрудничающий центр по гриппу в Лондоне рекомендует использовать культуру MDCK-Siat1 для выделения современных вирусов гриппа А(Н3N2) [23]. Однако эта культура не должна использоваться для работы с вирусами гриппа подтипа А(Н1N1)pdm09, так как эти вирусы приобретают замены в НА при пассировании в данной культуре клеток. Некоторые исследования показывают, что выделение вирусов А(Н3N2) на линии MDCK-Siat1 ведёт к появлению замен в НА. Однако на сегодняшний день именно эта культура клеток признана наиболее оптимальной для выделения вирусов гриппа человека данного подтипа.

Ещё более сложной становится проблема антигенного анализа вирусов А(Н3N2). Поскольку для большинства современных вирусов РТГА не может быть использована в связи с утратой гемагглютинирующей способности вирусов, необходимо применять серологические методы, не основанные на агглютинации, в частности реакцию микронеutralизации. По сравнению с РТГА, микронеutralизация является намного более трудоёмким и длительным методом анализа антигенных свойств. Замещение РТГА микронеutralизацией в рамках надзора за

изменчивостью вирусов гриппа в глобальном масштабе приведёт к тому, что общее число вирусов, охарактеризованных антигенно, станет намного меньше. С другой стороны, производительность современных методов генетического анализа в последние годы резко возросла. В этой связи необходимо продолжать работу по анализу больших массивов генетических данных и связанных с ними данных антигенного анализа для того, чтобы выявить закономерности изменчивости современных вирусов гриппа человека. Возможно, в скором времени данные генетического анализа наряду с математическим моделированием направления изменчивости вирусов гриппа практически полностью заменят антигенную характеристику вирусов. Первые шаги в этом направлении уже сделаны [24, 25].

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-10, 12-25 см. REFERENCES)

11. Ларионова Н.В. *Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте*: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. СПб.; 2017.

REFERENCES

- Kilbourne E.D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(1): 9-18.
- Pan K., Deem M.W. Quantifying selection and diversity in viruses by entropy methods, with application to the haemagglutinin of H3N2 influenza. *J. R. Soc. Interface.* 2011; 8(64): 1644-53.
- Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M., van der Vliet S., Skepner E., Lewis N.S., et al. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution. *Science.* 2013; 342(6161): 976-9.
- Xiong X., McCauley J.W., Steinhauer D.A. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 385: 63-91.
- Paulson J.C. Interactions of animal viruses with cell surface. In: *The Receptors. Volume 2*. Los Angeles: Academic Press; 1985: 131-219.
- Gulati S., Smith D.F., Cummings R.D., Couch R.B., Griesemer S.B., St George K., et al. Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLoS One.* 2013; 8(6): e66325.
- Böttcher-Friebertshäuser E., Garten W., Matrosovich M., Klenk H.D. The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 385: 3-34.
- Ji Y., White Y.J., Hadden J.A., Grant O.C., Woods R.J. New insights into influenza A specificity: an evolution of paradigms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017; 44: 219-31.
- Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* 1994; 205(1): 17-23.
- Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Press; 2011.
- Larionova N.V. *Influenza virus: variability in nature and experimental settings*: Diss. St. Petersburg; 2017 (in Russian)
- Parker L., Wharton S.A., Martin S.R., Cross K., Lin Y., Liu Y., et al. Effects of egg-adaptation on receptor-binding and antigenic properties of recent influenza A (H3N2) vaccine viruses. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(6): 1333-44.
- Hensley S.E., Das S.R., Bailey A.L., Schmidt L.M., Hickman H.D., Jayaraman A., et al. Hemagglutinin receptor binding avidity drives influenza A virus antigenic drift. *Science.* 2009; 326(5953): 734-6.
- Skowronski D.M., Janjua N.Z., De Serres G., Dickinson J.A., Winter A.L., Mahmud S.M., et al. Interim estimates of influenza vaccine effectiveness in 2012/13 from Canada's sentinel surveillance network, January 2013. *Eurosurveillance.* 2012; 18(5): 9-14.
- Flannery B., Thaker S.N., Clippard J., Monto A.S., Ohmit S.E., et al. Interim adjusted estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness – United States. *MMWR.* 2013; 2013: 119-23.
- Valenciano M., Kissling E., Collective I. Early estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness in Europe: results from the I-MOVE multicenter case-control study, 2012/2013. *Eurosurveillance.* 2013; 18(7): 20400.
- Lin Y., Wharton S.A., Whittaker L., Dai M., Ermetal B., Lo J., et al. The characteristics and antigenic properties of recently emerged subclade 3C.3a and 3C.2a human influenza A(H3N2) viruses passaged in MDCK cells. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017; 11(3): 263-74.
- Lin Y., Xiong X., Wharton S.A., Martin S.R., Coombs P.J. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(52): 21474-9.
- Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N.A., Klenk H. Overexpression of the α -2,6-Sialyltransferase in MDCK Cells Increases Influenza Virus Sensitivity to Neuraminidase Inhibitors. *J. Virol.* 2003; 77(15): 8418-25.
- Mohr P.G., Deng Y.M., McKimm-Breschkin J.L. The neuraminidases of MDCK grown human influenza A(H3N2) viruses isolated since 1994 can demonstrate receptor binding. *J. Virol.* 2015; 12(1): 67-78.
- Lin Y.P., Gregory V., Collins P., Kloess J., Wharton S., Cattle N., et al. Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J. Virol.* 2010; 84(13): 6769-81.
- Skowronski D.M., Sabaiduc S., Chambers C., Eshaghi A., Gubbay J.B., Kraiden M., et al. Mutations acquired during cell culture isolation may affect antigenic characterization of influenza A(H3N2) clade 3C.2a viruses. *Eurosurveillance.* 2016; 21(3): 30112.
- Annual report. WORLDWIDE INFLUENZA CENTRE WHO CC for Reference & Research on Influenza. THE FRANCIS CRICK INSTITUTE. Available at: https://www.crick.ac.uk/media/358671/crick_nh_vcm_report_feb_2017_v2.pdf
- Luksa M., Lässig M.A predictive fitness model for influenza. *Nature.* 2014; 507(7490):57-61.
- Neher R.A., Bedford T. Nextflu: real-time tracking of seasonal influenza virus evolution in humans. *Bioinformatics.* 2015; 31(21): 3546-8.

Поступила 29.11.17

Принята в печать 12.12.17

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 578.891.083.233

Костюшев Д.С.¹, Брезгин С.А.^{1,2}, Костюшева А.П.^{1,3}, Липатников А.Д.^{1,4}, Смирский В.Н.⁵, Мамонова Н.А.¹,
Волчкова Е.В.², Малеев В.В.¹, Чуланов В.П.^{1,2}

УСИЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФОКУСОВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В ЯДРАХ КЛЕТОК ПРИ ИНФЕКЦИИ ВИРУСАМИ ГЕПАТИТА В И D

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва;³ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва;⁴ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва;⁵ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 119334, г. Москва

Исходами хронического гепатита В (ХГВ) являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. Гибель и трансформация гепатоцитов при ХГВ связаны с влиянием вируса гепатита В (HBV) на клетку. Самым опасным видом повреждения генома клеток является образование двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Ранее было показано, что образование фокусов фосфорилированного гистона H2AX (уH2AX) является надёжным индикатором ДЦР. Целью работы было изучение формирования фокусов уH2AX при инфекции, вызванной HBV и HDV, на модели HBV *in vitro*, а также в биоптатах пациентов с ХГВ и ХГВ с дельта-агентом в биоптатах печени. Клетки гепатомы человека HepG2-1.1merHBV с активным циклом HBV были использованы для оценки экспрессии прегеномной РНК, уровней ДНК и кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК) HBV и иммуноцитохимического анализа образования уH2AX-гистона. Срезы биоптатов печени пациентов с ХГВ и ХГВ + D использовали для подтверждения результатов по генерации уH2AX-гистона. В результате показано, что HBV вызывает образование многочисленных фокусов уH2AX в культуре клеток HepG2-1.1merHBV *in vitro* и гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D. В гепатоцитах пациента с ХГВ доля клеток без фокусов значительно ниже ($49,9 \pm 12,3\%$ против $85,5 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$), а доля клеток с 1–10 фокусами уH2AX выше ($49,3 \pm 12,6\%$ против $14,5 \pm 0,9\%$; $p < 0,05$) в сравнении со здоровым донором. При ХГВ + D происходит увеличение среднего числа уH2AX-фокусов ($3,5 \pm 1,1$ и $5,5 \pm 1,5$ против $0,5 \pm 0,16$ в контроле; $p < 0,05$). У пациентов с ХГВ и ХГВ + D снижается доля гепатоцитов без уH2AX, возрастает доля клеток с 1–10 уH2AX, появляются клетки с многочисленными (11–30 уH2AX/клетку) фокусами. Таким образом, уH2AX-фокусы образуются при инфекции HBV *in vitro*, в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D и могут использоваться для оценки повреждения генома, связанного с HBV и HDV.

Ключевые слова: вирус гепатита В; вирус гепатита D; двухцепочечные разрывы ДНК; уH2AX; повреждение генома; гепатоциты; клетки гепатомы.

Для цитирования: Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Костюшева А.П., Липатников А.Д., Смирский В.Н., Мамонова Н.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. Усиление образования фокусов фосфорилированного гистона H2AX в ядрах клеток при инфекции вирусами гепатита В и D. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 165-170

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-165-170>

**Kostyushev D.S.¹, Brezgin S.A.^{1,2}, Kostyusheva A.P.^{1,3}, Lipatnikov A.D.^{1,4}, Simirskii V.N.⁵, Mamonova N.A.¹,
Volchkova E.V.², Maleev V.V.¹, Chulanov V.P.^{1,2}**

INCREASED FORMATION OF PHOSPHORYLATED H2AX FOCI IN NUCLEI OF CELLS INFECTED BY HEPATITIS B AND B+D VIRUSES

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation;² I.M. Sechenov First State Medical University, Moscow, 119991, Russian Federation;³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation;⁴ D.I. Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125047, Russian Federation;⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334, Russian Federation

Liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma are the most common outcomes of chronic hepatitis B. Hepatitis B virus (HBV) induces transformation and cell death in chronic hepatitis B (CHB). DNA double strand breaks (DSBs) represent the most dangerous type of genome damage. It was shown previously that generation of phosphorylated histone H2AX foci is a reliable marker of DSBs. The aim of this study was to analyse generation of уH2AX foci in HBV and hepatitis D virus (HDV) infection *in vitro* and in liver biopsies of patients with CHB and CHB with delta-agent (CHD). Human hepatoma cell line HepG2-1.1merHBV with activated HBV life cycle was used to perform real-time PCR for analysis of pregenomic RNA, HBV DNA, HBV cccDNA and for immunocytochemical analysis of уH2AX. Liver biopsies from CHB and CHD patients were analyzed to confirm the results. HBV induces multiple discrete уH2AX foci in HepG2-1.1merHBV cells *in vitro* and in biopsies of CHB and CHB+D patients. The ratio of hepatocytes w/o уH2AX foci is significantly lower ($49,9 \pm 12,3\%$ vs. $85,5 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$), while the

Для корреспонденции: Костюшев Дмитрий Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: dk@rcvvh.ru

proportion of cells with 1-10 γ H2AX foci is higher (49,3 \pm 12,6% vs. 14,5 \pm 0,9%, $p < 0,05$) compared to healthy control. There is a significant increase in the mean number of γ H2AX foci in biopsies from CHB+D patients (3,5 \pm 1,1 and 5,5 \pm 1,5 vs. 0,5 \pm 0,16 in control hepatocytes, $p < 0,05$). The ratio of hepatocytes w/o γ H2AX foci is significantly lower in CHB and CHB+D patients, while percentage of cells with 1-10 γ H2AX foci is higher. Rare hepatocytes with multiple (11-30 γ H2AX foci per cell) foci appear in CHB and CHB+D patients. In conclusion, γ H2AX foci are generated in hepatocytes of CHB and CHB+D patients and can be utilized to assess genome damage, associated with HBV and HDV viral infection.

Key words: hepatitis B virus; hepatitis D virus; double strand breaks; γ H2AX; genome damage; hepatocytes; hepatoma cells.

For citation: Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Lipatnikov A.D., Simirskii V.N., Mamonova N.A., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P. Increased formation of phosphorylated H2AX foci in nuclei of cells infected by hepatitis B and B+D viruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 165-170. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-165-170>

For correspondence: Dmitry S. Kostyushev, scientist, Laboratory of viral hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: dk@revh.ru

Information about authors:

Kostyushev D.S., <http://orcid.org/0000-0002-1851-7441>;

Brezgin S.A., <http://orcid.org/0000-0003-4792-0739>;

Kostyusheva A.P., <http://orcid.org/0000-0001-8346-5839>;

Lipatnikov A.D., <http://orcid.org/0000-0003-2925-9924>;

Simirskii V.N., <http://orcid.org/0000-0001-5069-2939>;

Mamonova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1505-6931>;

Volchkova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-4581-4510>;

Maleyev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-8508-4367>;

Chulanov V.P., <http://orcid.org/0000-0001-6303-9293>

Acknowledgment. This study was supported by RSF grant №16-15-10426.

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

Received 23 October 2017

Accepted 06 March 2018

Введение

Хронический гепатит В (ХГВ) – тяжелое заболевание, вызываемое вирусом гепатита В (HBV). Частыми исходами ХГВ являются цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК). По данным ВОЗ, на сегодняшний день более 250 млн человек инфицированы HBV, при этом около 1 млн человек ежегодно погибают от ГЦК. Причинами ГЦК при ХГВ является повреждение гепатоцитов, ассоциированное с длительным воздействием воспалительного микроокружения в печени, прямым ДНК-повреждающим действием HBs- и HBx-белков HBV, а также проонкогенными свойствами HBx-белка HBV. Нестабильность генома – одна из основных причин развития ГЦК при ХГВ. В 5–30% случаев инфекции, вызванной HBV, наблюдается коинфицирование вирусом гепатита D (дельта-агентом, HDV). В 5% случаев при этом развивается фульминантная форма гепатита, в 80–90% случаев происходит хронизация инфекции. ХГВ с дельта-агентом (ХГВ + D) – наиболее агрессивная форма гепатита, быстро приводящая к развитию цирроза печени и ГЦК [1, 2].

Фосфорилирование гистона H2AX (γ H2AX) происходит при индукции двухцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК клеток, одного из самых опасных повреждений генома. Ранее было продемонстрировано, что Х-белок HBV может вызывать ДЦР генома, усиливая образование реактивных форм кислорода в цитоплазме клетки [3]. Вместе с этим при повреждении ДНК происходит активация сенсоров повреждения, киназ ATM и ATR, которые, с одной стороны, участвуют в фосфорилировании H2AX и репарации повреждений [4], а с другой – используются HBV для репликации [5]. Репарация ДЦР происходит при участии γ H2AX. В онкологии γ H2AX используется как надежный биомаркер оценки повреждения генома. Ранее было показано, что γ H2AX ассоциирован с повреждением генома гепатоцитов пациентов с ХГВ и может служить важным биомаркером

для оценки степени повреждения генома и рисков развития ГЦК [6].

Целью данного исследования было изучение распределения γ H2AX-фокусов в культуре клеток *in vitro* на индуцируемой модели HBV HepG2-1.1merHBV и в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D.

Материал и методы

Культура клеток HepG2-1.1merHBV

Клетки HepG2-1.1merHBV (предоставлены проф. Dieter Glebe, University of Giessen) с интегрированным геномом 1.1merHBV под индуцибельным tet-on промотором выращивали в среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 1% раствором L-глутамина, 1% раствором стрептомицина/пенициллина. Для активации цикла HBV клетки инкубировали с раствором доксициклина (100 нг/мл) в течение 24 ч.

Выделение нуклеиновых кислот и ПЦР

Для подтверждения активации жизненного цикла HBV в клетках HepG2-1.1merHBV и определения вирусной нагрузки в сыворотках крови, полученных от пациентов за сутки до забора биопсийного материала, нуклеиновые кислоты выделяли при помощи набора AmpliSens «РИБО-преп». ДНК в дальнейшем использовалась для количественного определения ДНК HBV (AmpliSens «HBV monitor-FL») и РНК HDV (AmpliSens «HDV monitor-FRT»). Уровни экспрессии прегеномной РНК (пРНК) (после постановки реакции обратной транскрипции с помощью набора AmpliSens «РЕВЕРТА-FL») и кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК) (после обработки ферментом plasmid-safe ATP-dependent DNase) в клетках HepG2-1.1merHBV определяли со специфическими праймерами относительно внутриклеточного РНК GAPDH и бета-глобина генома соответственно. Расчет относительной экспрессии проводился по методу $\Delta\Delta C_t$.

Анализ апоптоза

Анализ апоптоза проводили на неактивированных клетках HepG2-1.1merHBV и клетках с активированным циклом HBV на 3-и сутки после активации с помощью двух описанных ранее методов: 1) методом оценки морфологических изменений ядер клеток по двойному окрашиванию красителем Hoechst 33342 и пропидия йодидом [7]. Клетки, снятые с планшетов с помощью трипсина, инактивированные полной средой и промытые ледяным фосфатным буфером до плотности $5 \cdot 10^5$ кл/мл, инкубировали в растворе Hoechst 33342 (10 мкг/мл) при 37°C в течение 7 мин, окрашивали пропидия йодидом (2,5 мкг/мл). Образцы держали в темноте на льду в течение 15 мин, после чего сразу же анализировали на флуоресцентном микроскопе Leica DMI6000 (20-кратное увеличение) после нанесения суспензии образцов на предметные стёкла. По крайней мере 400 клеток были использованы для анализа морфологических изменений. Процент апоптотических и некротических клеток рассчитывали по формулам:

$$\% \text{ апоптотических клеток} = [(LA + DA)/(LN + LA + DN + DA)] \cdot 100,$$

$$\% \text{ некротических клеток} = [DN/(LN + LA + DN + DA)] \cdot 100,$$

где LN – живые клетки с нормальным ядром (голубое окрашивание хроматина организованной структуры), LA – живые клетки с апоптотическим ядром (голубое окрашивание конденсированного или фрагментированного хроматина), DN – мёртвые клетки с нормальным ядром (розовое окрашивание хроматина организованной структуры), DA – мёртвые клетки с апоптотическим ядром (ярко-розовое окрашивание высококонденсированного или фрагментированного хроматина); 2) по оценке области суб-G1 в клетках, как описано ранее [8], с модификациями. Вкратце, клетки снимали с планшетов с помощью трипсина, трипсин инактивировали полной средой, центрифугировали 5 мин при 500 г, промывали в фосфатном буфере с последующей фиксацией в ледяном 70% этаноле в течение 30 мин при 4°C, после чего клетки промывали дважды фосфатным буфером (600 г, 5 мин), обрабатывали 50 мкл РНКазы А (100 мкг/мл) и 200 мкл пропидия йодида (50 мкг/мл). Анализ и интерпретацию данных выполняли, как описано ранее («Abscam»), с помощью флуоресцентного проточного цитометра (NovoCyte ACEA Biosciences) на канале PI-A.

Биопсийный материал

Срезы толщиной 6 мкм были получены из парафинового блока с биопсийным материалом от 1 здорового донора, 1 пациента с ХГВ и 2 пациентов с ХГВ + D (B + D_1 и B + D_2). Парафиновые срезы последовательно помещали в подставки по схеме: ксилол (2 раза по 3 мин), 100% этанол (2 раза по 3 мин), 95% этанол (2 раза по 3 мин), 70% этанол (3 мин). После промывки водой (3 мин) стёкла со срезами выдерживали в фосфатном буфере, затем проводили иммуноцитохимическое окрашивание. Все клинические образцы были получены с информированного согласия, полученного от каждого пациента. Протокол исследования и информированное согласие одобрены этическим комитетом ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии».

Иммуноцитохимия и микроскопия

Монослойные культуры клеток HepG2-1.1merHBV, выращенных на покровных стёклах, фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин и промывали трижды раствором Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0). Далее культуры клеток или депарафинизированные срезы биоптатов

промывали блокирующим буфером (0,02% Тритон X-100, 10% лошадиная сыворотка и 150 мМ NaCl в Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0), инкубировали с первичными кроличьими поликлональными анти-yH2AX-антителами (ab11174) в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза промывочным буфером (0,2% Тритон X-100 и 200 мМ NaCl в Tris-HCl (50 мМ, pH 8,0), затем инкубировали со вторичными антикроличьими IgG-антителами Alexa Fluor 488 (ab150077) и раствором Hoechst33342 для окрашивания ядра, вновь промывали трижды отмывочным буфером и фиксировали с помощью реагента Fluoroshield (ab104135). Фокусы yH2AX визуализировали на микроскопе Leica DMI6000 при 100-кратном увеличении с помощью иммерсионного объектива. Для подсчёта брали более 200 клеток для культур клеток и более 400 клеток для биопсийного материала.

Патологистологическое исследование биопсийного материала

Использованы результаты патологистологических исследований (индекс гистологической активности и степень фиброза), проведенных у пациентов в ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского» по медицинским показаниям.

Статистика

Статистический анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (где это применимо) в программе IBM SPSS 19.0. Отличия с $p < 0.05$ считали значимыми.

Результаты**Активный цикл HBV индуцирует многочисленные ДЦР генома**

Поскольку ранее образование yH2AX-фокусов на культурах клеток с активным вирусным циклом показано не было, модель клеток HepG2-1.1merHBV с трансгеном HBV под индуцибельным tet-on промотором была использована для воспроизведения жизненного цикла HBV и анализа повреждений генома. Для оценки пригодности культуры HepG2-1.1merHBV *in vitro* и изучения влияния HBV на генерацию фокусов yH2AX в активированных и неактивированных клетках были изучены основные показатели репликации HBV (ДНК HBV, пгРНК, ккзДНК). В результате через 48 ч после инкубации клеток с доксициклином происходит увеличение внутриклеточной ДНК HBV с 262 507 ± 5990 до 1 176 571 ± 46 281 копии ($p < 0,05$). Экспрессия пгРНК HBV возрастает в ≈10 раз (уровень пгРНК $0,085 \pm 0,025$ ($p < 0,05$) относительно активных клеток) и уровень ккзДНК – в ≈3,3 раза (уровень ккзДНК $0,318 \pm 0,172$ ($p < 0,05$) относительно активных клеток) соответственно. Эти данные говорят об активном протекании вирусного цикла, таким образом, модель HepG2-1.1merHBV может быть использована для изучения эффектов, связанных с действием HBV на клетку.

Вместе с этим активация цикла HBV вызывает генерацию фокусов yH2AX в клетках HepG2-1.1merHBV (рис. 1, см. 3-ю полосу обложки). Клетки HepG2 являются клетками гепатомы, генетически нестабильной линией, поэтому число спонтанных фокусов в неактивированных клетках довольно высокое (≈2 фокусов на клетку). Тем не менее при активации цикла HBV число фокусов возрастает в ≈4 раза с $2,0 \pm 0,4$ до $13,5 \pm 1,1$ ($p < 0,05$) на клетку (рис. 2). Анализ распределения клеток по числу фокусов yH2AX показал, что с неактивным циклом HBV yH2AX-фокусы не образуются в 70% клеток, еще около 10% клеток со-

Таблица 1

Распределение фокусов уН2АХ на клетках по популяциям

Количество фокусов уН2АХ на ядро клетки	НерG2-1.1merHBV, %	актНерG2-1.1merHBV, %
0	70,5 ± 0,0	0
Диффузное ядро	3,1 ± 0,0	2,2 ± 3,9
1–10	23,3 ± 0,0	51,1 ± 4,8
11–20	2,6 ± 0,0	26,7 ± 9,3
21–30	0,5 ± 0,0	12,5 ± 3,3
31–50	0	6,3 ± 5,6
50	0	1,1 ± 1,0

Примечание. Диффузное ядро – окрашивание на уН2АХ паннуклеарное, без дискретных фокусов. Здесь и в табл. 4: 0 – клетки без фокусов; 1–10, 11–20, 21–30, 31–50, > 50 – доля клеток с числом уН2АХ-фокусов в пределах указанных значений.

Таблица 2

Изменение процентных долей клеток в состоянии апоптоза и некроза

Клетки	Апоптоз	Некроз	Живые клетки	Суб-G1 (апоптоз)
Неактивные	15,2 ± 2,6	30,7 ± 4,6	54,1 ± 2,0	2,25 ± 0,1
Активированные	16,3 ± 3,5	29,7 ± 6,8	53,9 ± 3,3	3,67 ± 0,7

Примечание. Все различия статистически незначимы. Образование фокусов уН2АХ в гепатоцитах пациентов с ХГВ и ХГВ + D.

держат от 1 до 10 фокусов на клетку, небольшая пропорция содержит 11–20 и 21–30 фокусов на клетку (табл. 1). С другой стороны, при активации HBV полностью исчезают клетки, негативно окрашиваемые на уН2АХ-гистон. От 1 до 10 фокусов детектируется более чем в 50% клеток (51,1 ± 4,8% в активированных клетках против 23,3 ± 0,0% в неактивированных клетках; $p < 0,05$). В значительной доле клеток число генерируемых фокусов составляет 11–20 (26,7 ± 9,3% против 2,6 ± 0,0%; $p < 0,05$), 21–30 (12,5 ± 3,3% против 0,5 ± 0,0%; $p < 0,05$) и 31–50 на клетку (6,3 ± 5,6% против 0). В редких ядрах идентифицировано более 50 фокусов уН2АХ (1,12 ± 1,02). В результате было наглядно продемонстрировано, как активная репликация HBV *in vitro* индуцирует образование многочисленных фокусов уН2АХ, ассоциированных с ДЦР ДНК.

Усиление образования фокусов уН2АХ не связано с увеличением уровней апоптоза при активации цикла HBV

Одной из причин масштабного фосфорилирования H2АХ-гистона является апоптоз, гибель клетки, сопро-

вождаемая фрагментацией ДНК эндогенными нуклеазами [10]. Считается, что при репарации ДЦР уН2АХ способствует удержанию двух концов ДНК в области разрыва, тогда как при апоптозе фосфорилирование уН2АХ-гистона участвует в упаковке фрагментированной ДНК в апоптотические тельца. Показано, что при репликации HBV белки вируса могут действовать как проапоптотические или как антиапоптотические факторы. Методами морфологического анализа ядер клеток с помощью флуоресцентной микроскопии мы показали, что значимого увеличения доли апоптотических и некротических клеток при активации цикла HBV в клетках НерG2-1.1merHBV не происходит (табл. 2). Результаты морфологического анализа были подтверждены данными проточной цитофлуориметрии.

Несмотря на то что в недавних исследованиях уже было установлено важное практическое значение образования уН2АХ-фокусов у пациентов с ХГВ в оценке рисков развития ГЦК [6], генерации уН2АХ у пациентов с ХГВ + D описано не было. В табл. 3 представлены данные об 1 здоровом доноре без заболеваний печени, 1 пациенте с ХГВ и 2 пациентах с ХГВ + D, биопсийный материал которых был использован в работе. Все пациенты и здоровый донор не принимали препараты прямого противовирусного действия на момент взятия биопсии, не страдали алкогольной или табачной зависимостью и не употребляли наркотические вещества. Пациенты с ХГВ и ХГВ + D и здоровый донор не были инфицированы ВИЧ или HCV. В биопсийном материале здорового пациента иммуноцитохимически были выявлены редкие клетки (4,5% от общего числа анализированных клеток), в которых детектировались немногочисленные (от 1 до 10) фокусы.

Среднее число фокусов составило всего 0,5 ± 0,16 на клетку (табл. 4). Редкие явления образования спонтанных фокусов уН2АХ в норме происходят при коллапсе репликативной вилки, делении клеток и спонтанных разрывах [11]. По результатам морфологического исследования биоптата пациента с ХГВ был выявлен склероз стромы с расширением без формирования фиброзных септ (фотографии не представлены). В подавляющем большинстве трактов наблюдалась умеренная лимфоидно-клеточная инфильтрация с примесью единичных плазмочитов и эозинофильных лейкоцитов. На территории портальных трактов лимфоидные фолликулы с небольшими реактивными центрами, обнаруживаются признаки лёгкого лобулита в виде мелкоочаговых лимфогистиоцитарных инфильтратов в отдельных долях, очаги крупнокапельного ожирения гепатоцитов.

При иммуноцитохимическом окрашивании среднее число фокусов уН2АХ (см. табл. 4) составило 2,4 ± 0,4 на клетку, что несколько выше в сравнении с биопсией материала от здорового донора, но незначимо статистически. Однако при анализе распределения фокусов (см. табл. 4) выяснилось, что доля клеток без фокусов на 30% ниже (49,9 ± 12,3% у пациента с ХГВ против 85,5 ± 0,9% у здорового донора; $p < 0,05$), а доля клеток с числом фокусов 1–10 значительно выше (49,3 ± 12,6% против 14,5 ± 0,9%; $p < 0,05$) в сравнении со здоровым донором.

Далее были изучены биопсии от двух пациентов с ХГВ + D. У пациента В+D_1 в биоптате печени наблюдается расширение портальных трактов за счёт фиброза и воспалительной инфильтрации (фотографии не представлены). Форма порталь-

Таблица 3

Клинико-лабораторная характеристика пациентов, включённых в исследование

Показатель	Здоровый донор	Пациент с гепатитом В	Пациент с гепатитом В и D (В + D_1)	Пациент с гепатитом В и D (В + D_2)
Пол	м.	ж.	м.	ж.
Возраст, годы	25	35	56	39
ИМТ	22,58	32,79	26,84	21,87
ДНК ВГВ, МЕ/мл	Отр.	5 176 470	787,9	71,1
РНК HDV, МЕ/мл	-	-	128 855,8	1 422 547,5
Шкала METAVIR	-	A1F1	A2F1-2 с преобладанием F1	A3F2

Примечание. ИМТ – индекс массы тела.

Таблица 4
Распределение клеток по числу уН2АХ-фокусов и среднее число уН2АХ-фокусов на клетку в биоптатах пациентов

Пациент	Доля клеток по числу уН2АХ-фокусов, %				уН2АХ/клетку, ед.
	0	1–10	11–20	21–30	
Здоровый пациент	85,5 ± 0,9	14,5 ± 0,9	0,0	0,0	0,5 ± 0,16
Пациент с ХГВ	49,9 ± 12,3	49,3 ± 12,6	0,84 ± 0,8	0,0	2,4 ± 0,4
V + D_1	42,3 ± 8,3	50,9 ± 7,1	6,5 ± 0,8	0,27 ± 0,5	3,5 ± 1,1
V + D_2	28,4 ± 14,6	56,2 ± 6,3	13,4 ± 5,0	1,9 ± 3,3	5,5 ± 1,5

ных трактов изменена за счёт расходящихся в разных направлениях стенок склерозированных синусоидов. Воспалительный инфильтрат представлен преимущественно лимфоидными клетками с примесью эозинофильных лейкоцитов и единичных плазмочитов. В перипортальных зонах, а также на территории долек неравномерно распределены мелкие некротические очаги, в паренхиме – неравномерное крупнокапельное ожирение гепатоцитов. Наблюдается гиперплазия купферовских клеток и зернистая дистрофия цитоплазмы гепатоцитов. В биоптате печени пациента V + D_2 более чем в половине портальных трактов наблюдается воспалительная лимфоидно-клеточная инфильтрация с примесью эозинофильных лейкоцитов и умеренной воспалительной активностью в перипортальных зонах и очагами лобулярной активности воспалительного процесса. Выражен фиброз портальных трактов, а также формирование отдельных фиброзных септ. Выявляются участки склероза стенок синусоидов. В участках среза биоптата наблюдается активное воспаление перипортальных зон, определяется дистрофия гепатоцитов и некроз отдельных клеток.

Среднее число фокусов уН2АХ на клетку значительно различается между здоровым донором и пациентами V + D_1, V + D_2 (0,5 ± 0,16 против 3,5 ± 1,1 ($p < 0,05$) и 0,5 ± 0,16 против 5,5 ± 1,5 ($p < 0,01$)) (см. табл. 4; рис. 3, см. 3-ю полосу обложки). Кроме того, число уН2АХ на клетку у пациента V+D_2 значительно выше, чем у пациента с ХГВ ($p < 0,05$). Также выявлены значительные различия в доле клеток без уН2АХ-фокусов и доле кле-

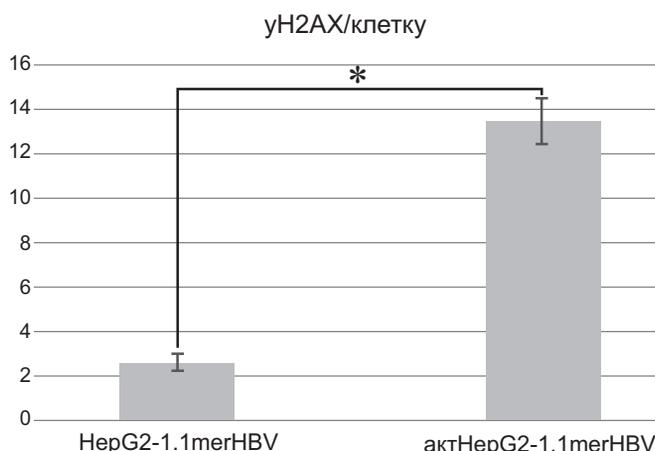


Рис. 2. Подсчёт среднего числа фокусов уН2АХ на клетку в клетках с активацией цикла HBV и без неё. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * – $p < 0,05$.

ток с 1–10 уН2АХ на клетку между здоровым донором и V + D_1 ($p < 0,05$), V + D_2 ($p < 0,01$). Процент клеток с 11–20 уН2АХ на клетку значительно выше у V + D_2 ($p < 0,01$) в сравнении со здоровым донором. Кроме того, в биопсиях пациентов V + D_1 и V + D_2 появляются редкие клетки с числом уН2АХ-фокусов 20–30 на клетку.

Визуально уН2АХ в биоптатах могут распространяться равномерно по ядру, образуя дискретные, удалённые фокусы, либо концентрироваться в определённом компартменте ядра. В сравнении с культурами клеток гепатомы *in vitro*, фокусы уН2АХ в биоптатах пациентов выглядят менее крупными и встречаются с меньшей частотой на клетку. Это может быть связано с гиперэкспрессией HBx-белка HBV на модели клеток *in vitro* [12], генетической нестабильностью клеток гепатомы и массивной гиперпродукцией вирусных частиц и белков при активации интегрированного трансгена под сильным промотором цитомегаловируса.

Обсуждение

Образование фокусов фосфорилированного гистона H2АХ (уН2АХ) обычно связано с генерацией ДЦР в ДНК клетки. Тем не менее образование уН2АХ-фокусов в клетках, инфицированных вирусом, может быть вызвано рядом других факторов, в том числе:

- репликацией вирусов и повреждением ДНК; этот механизм характерен для представителей семейства *Herpesviridae* (вирус простого герпеса, вирус Эпштейна – Барр, вирус саркомы Капоши). В таком случае вирусы индуцируют ДЦР и используют активные пути репарации и фокусы уН2АХ как центры репликации вирусного генома;

- репликацией вирусов без повреждения генома (представители семейства *Adenoviridae*). Аденовирусная инфекция активирует ответ клеток на повреждение (DNA damage response, DDR) и пути репарации. Несмотря на то что уН2АХ является маркером ДЦР, при репликации аденовирусов фосфорилирование H2АХ происходит без повреждения ДНК;

- ДНК-повреждающим действием вирусов, в частности Х-белок HBV (HBx) не только дисрегулирует метаболизм нуклеиновых кислот клеткой, но и может индуцировать ДЦР, что в совокупности приводит к хромосомным аномалиям [13].

Ещё в 2008 г. Fan Zhao и соавт. [14] показали, что уровень фосфорилированной формы H2АХ увеличивается при инфицировании HBV. Фундаментальное значение уН2АХ-фокусов в инфекции HBV остаётся неясным. В частности, в наших [данные не представлены] и других исследованиях [14] было выявлено, что ингибирование путей репарации ДЦР влияет на репликацию HBV. Кроме этого, в недавней работе G. Shah и С. O'Shea [15] было обнаружено, что вирусные геномы и клеточный геном активируют отличающиеся друг от друга пути репарации повреждения ДНК. В результате появляется потенциальная возможность разработки противовирусных препаратов, действующих на пути репарации повреждённый ДНК, не подвергая риску генетической нестабильности клетки человека.

Масштабное фосфорилирование уН2АХ происходит при фрагментации ДНК, связанной с процессами апоптоза [9]. Известно, что белки HBV могут действовать как проапоптотические, так и антиапоптотические фак-

торы [10]. В данной работе на модели клеток HepG2-1.1merHBV мы исключили возможность влияния апоптоза на интерпретацию данных, связанных с образованием фокусов уН2АХ на культуре клеток HepG2-1.1merHBV *in vitro*. Действительно, несмотря на значительное увеличение фокусов уН2АХ в активированных клетках к 3-м суткам в сравнении с неактивированными клетками, доля апоптотических клеток практически не меняется.

Кроме того, как показали результаты недавних исследований [6], образование уН2АХ-фокусов в клинике коррелирует с рисками развития цирроза и ГЦК.

В данном исследовании объём выборки пациентов недостаточен для того, чтобы отследить возможные корреляции между данными о уН2АХ-фокусах и данными о пациентах (см. табл. 3). Исследования по выявлению корреляций между вирусной нагрузкой при ХГВ или ХГВ + D и уН2АХ-фокусами ранее не проводились, однако в культуре клеток *in vitro* активация HBV индуцирует образование многочисленных фокусов. Если концентрация ДНК HBV в сыворотке крови пациента с ХГВ составляет 5 176 470 МЕ/мл, нагрузка ДНК HBV в сыворотке крови пациентов В + D 1 и В + D 2 оказывается значительно ниже (787,9 и 71,1 МЕ/мл). Это хорошо согласуется с общими представлениями о явлении подавления вирусом гепатита D репликации вируса гепатита В [16]. Действительно, концентрация РНК HDV в сыворотке крови В + D 1 и В + D 2 составляет 128 855 и 1 422 547 МЕ/мл. Поскольку, как показано нами на культуре клеток *in vitro*, репликация HBV вызывает индукцию фокусов уН2АХ, высокая нагрузка вируса должна быть ассоциирована с большим числом фокусов уН2АХ. В случае с пациентами В + D, возможно, HDV оказывает ещё более сильное генотоксическое действие либо усиливает повреждение ДНК генома, связанное с HBV.

В 2017 г. в крупном исследовании, проводившемся на образцах биопсий, взятых в период с 2004 по 2014 г. от пациентов с ХГВ, было показано, что сформированные фокусы уН2АХ ассоциированы с высокими уровнями гамма-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы (индикаторами повреждения печени), низкими уровнями альбумина, более длительным протромбиновым временем (индикаторами функции гепатоцитов) и высокими концентрациями ДНК HBV (индикатором активной репликации вируса). В целом исследователи делают вывод, что уН2АХ-фокусы можно использовать в качестве нового маркера в прогнозировании ГЦК, а также предполагают использование уН2АХ в виде потенциальной терапевтической мишени [17].

Чтобы выяснить, оказывает ли HDV генотоксическое действие напрямую, или это может быть связано с другими механизмами, необходимо детальное изучение явлений повреждения генома, связанного с репликацией HDV, в культуре клеток. Отметим, что числовые показатели уН2АХ возрастают в ряду В- > В + D 1- > В + D 2, что соответствует градации степени фиброза по шкале METAVIR A1F1- > A1F1-2- > A3F2 (см. табл. 1). В более ранней работе У. Matsuda и соавт. [6] было показано, что индекс окрашивания на уН2АХ значимо увеличен при хроническом гепатите (В и С) и циррозе печени, что согласуется с данными, полученными в нашей работе. В целом необходимо изучение распределения фокусов уН2АХ в биопсиях пациентов с ХГВ + D, а также определение их прогностической значимости на крупных выборках пациентов.

Заключение

В данной работе впервые было показано, что фокусы уН2АХ генерируются не только при инфекции HBV *in vitro* и в гепатоцитах пациента с ХГВ, но и при коинфекции HBV + HDV, проведён подсчёт среднего числа уН2АХ-фокусов на клетку, впервые изучено распределение клеток по числу фокусов уН2АХ и приведена морфологическая характеристика распределения фокусов в ядрах клеток. Образование фокусов уН2АХ – важная эпигенетическая модификация генома клеток, ассоциированная с репликацией вируса и ДЦР, и может использоваться для оценки рисков развития ГЦК и цирроза печени.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РФ №16-15-10426.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bahcecioglu I.H., Sahin A. Treatment of delta hepatitis: today and in the future – a review. *Infect. Dis. (Lond)*. 2017; 49(4): 241-50.
- Mallet V., Hamed K., Schwarzinger M. Prognosis of patients with chronic hepatitis B in France (2008-2013): A nationwide, observational and hospital-based study. *J. Hepatol*. 2017; 66(3): 514-520.
- Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y., et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol*. 2015; 96(8): 2242-51.
- Maréchal A., Zou L. DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2013; 5(9): a012716.
- Zhao F., Hou N.B., Song T., He X., Zheng Z.R., Ma Q.J., et al. Cellular DNA Repair Cofactors Affecting Hepatitis B Virus Infection and Replication. *World. J. Gastroenterol*. 2008; 14(32): 5059-65.
- Matsuda Y., Wakai T., Kubota M., Osawa M., Takamura M., Yamagiwa S., et al. DNA Damage Sensor γ -H2AX Is Increased in Preneoplastic Lesions of Hepatocellular Carcinoma. *Sci. World J*. 2013; 2013: 597095.
- Syed Abdul Rahman S.N., Abdul Wahab N., Abd Malek S.N. In Vitro Morphological Assessment of Apoptosis Induced by Antiproliferative Constituents from the Rhizomes of *Curcuma zedoaria*. *Evid. Based Complement Alternat. Med*. 2013; 2013: 257108.
- Wlodkovic D., Skommer J., Darzynkiewicz Z. Flow Cytometry-Based Apoptosis Detection. *Methods Mol. Biol*. 2009; 559: 19-32.
- Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(13): 9390-5.
- Lee W.P., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Lin H.C., Lee S.D. Pro-apoptotic or anti-apoptotic property of X protein of hepatitis B virus is determined by phosphorylation at Ser31 by Akt. *Arch. Biochem. Biophys*. 2012; 528(2): 156-62.
- Turinetto V., Giachino C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic. Acids Res*. 2015; 43(5): 2489-98.
- Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y., et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol*. 2015; 96(8): 2242-51.
- Dan Y., Zhang Y., Cheng L., Ma J., Xi Y., Yang L., et al. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by 1H-NMR-based metabolomics. *Sci. Rep*. 2016; 6: 24430.
- Zhao F., Hou N.B., Song T., He X., Zheng Z.R., Ma Q.J., et al. Cellular DNA repair cofactors affecting hepatitis B virus infection and replication. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(32): 5059-65.
- Shah G.A., O'Shea C.C. Viral and Cellular Genomes Activate Distinct DNA Damage Responses. *Cell*. 2015; 162(5): 987-1002.
- Arribas J.R., González-García J.J., Lorenzo A., Montero D., Ladrón de Guevara C., Montes M., et al. Single (B or C), dual (BC or BD) and triple (BCD) viral hepatitis in HIV-infected patients in Madrid, Spain. *AIDS*. 2005; 19(13): 1361-5.
- Chen W.D.P. Chronic inflammation injury promotes hepatocellular carcinoma development via up-regulation of γ -H2AX. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 10(4); 4431-40.

Поступила 23.10.17

Принята в печать 06.03.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.11] = 06:616 = 006.441] = 078.33

Чернова Н.Г., Тихомиров Д.С., Соболева Н.П., Марьяна С.А., Сидорова Ю.В., Сеницына М.Н., Двирнык В.Н., Куликов С.М., Туполева Т.А., Звонков Е.Е.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЁРОВ ГЕРПЕСВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОПАТИЙ У ПЕРВИЧНЫХ БОЛЬНЫХ АНГИОИММУНОБЛАСТНОЙ Т-КЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва

Введение. Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) в большинстве случаев ассоциирована с вирусом Эпштейна – Барр (ВЭБ). Считается, что субстратом поликлональной гипергаммаглобулинемии, наблюдающейся у 53–80% больных АИТЛ, являются антитела к вирусам герпетической группы.

Цель работы – сравнительный анализ серологических маркёров герпесвирусных инфекций и количественных иммуноглобулинопатий классов М и G у первичных больных АИТЛ.

Материал и методы. В анализ включено 26 первичных больных АИТЛ, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с 2002 по 2017 г. Соотношение мужчины/женщины — 16:10. Медиана возраста составила 62 (29–81) года. Всем пациентам было проведено определение общего уровня иммуноглобулинов классов М и G, а также исследование серологических маркёров ВЭБ, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2). **Результаты.** Обнаружена значимая связь между наличием вирусспецифических IgM (IgM ВПГ-1, ВПГ-2, IgM ЦМВ, IgM VCA ВЭБ) и повышением уровня поликлональных IgM ($p < 0,0001$). При изучении профиля противовирусных антител показано, что наибольший вклад в эту зависимость вносит наличие IgM ВПГ-1, ВПГ-2 ($p < 0,0001$), тогда как для IgM ЦМВ и IgM VCA ВЭБ связь с гаммапатией не была подтверждена ($p = 0,15$ и $p = 0,36$ соответственно). Не было обнаружено значимой связи между поликлональной IgG-гипергаммаглобулинемией и повышением титра противовирусных IgG, как анамнестических (IgG ВПГ-1, ВПГ-2, IgG ЦМВ, IgG EBNA-1 ВЭБ), так и острой фазы инфекции (IgG EA ВЭБ) ($p > 0,37$). **Заключение.** В нашей работе показано, что наличие серологических маркёров активных герпесвирусных инфекций (противовирусных IgM) сильно коррелирует с поликлональной гипергаммаглобулинемией класса М, тогда как повышенный уровень противовирусных вирусспецифических антител IgG не вносит существенного вклада в поликлональную гипергаммаглобулинемию класса G и может наблюдаться даже у пациентов на фоне IgG-гипогаммаглобулинемии.

Ключевые слова: герпесвирусы; ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома; количественные иммуноглобулинопатии.

Для цитирования: Чернова Н.Г., Тихомиров Д.С., Соболева Н.П., Марьяна С.А., Сидорова Ю.В., Сеницына М.Н., Двирнык В.Н., Куликов С.М., Туполева Т.А., Звонков Е.Е. Сравнительный анализ серологических маркёров герпесвирусных инфекций и количественных иммуноглобулинопатий у первичных больных ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомой. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(4): 171-176.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-171-176>

Chernova N.G., Tihomirov D.S., Soboleva N.P., Mariina S.A., Sidorova Y.V., Sinitsyna M.N., Dvirnyk V.N., Kulikov S.M., Tupoleva T.A., Zvonkov E.E.

COMPARATIVE ANALYSIS OF SEROLOGICAL MARKERS OF HERPES VIRUSES AND QUANTITATIVE IMMUNOGLOBULINOPATHIES IN PRIMARY PATIENTS WITH ANGIOIMMUNOBLASTIC T-CELL LYMPHOMA

National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation

Introduction. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is associated with the Epstein–Barr virus (EBV) in most cases. It is believed polyclonal hypergammaglobulinaemia observed in 53–80% of AITL patients has anti-herpes viral antibodies as its substrate.

Aim. The aim of the study was to compare serological markers of herpes viruses and quantitative immunoglobulinopathies of classes M and G in primary patients with AITL.

Materials and methods. 26 primary patients with newly diagnosed AITL treated at the National Research Center for Hematology from 2002 to 2017 were enrolled in the study. The male/female ratio was 16/10; median age was 62 (29–81) years. The levels of total immunoglobulins of classes M and G, serological markers of EBV, cytomegalovirus (CMV) and herpes simplex virus type 1 and type 2 (HSV 1, 2) were assessed in all patients.

Results. Significant relationship was found between the presence of virus-specific IgM (IgM HSV 1, 2, IgM CMV, IgM VCA EBV) and an elevated level of total immunoglobulins of class M ($p < 0,0001$). Studies of each virus separately showed that the greatest correlation was observed for IgM HSV 1, 2 ($p < 0,0001$), whereas the association of IgM CMV and IgM VCA EBV with quantitative immunoglobulinopathies of class M was not confirmed ($p = 0,15$ and $p = 0,36$ respectively). There was no considerable relationship between polyclonal IgG hypergammaglobulinaemia and an increased level of antiviral IgG (IgG HSV 1, 2, IgG CMV, IgG EBNA-1 EBV, IgG EA EBV) ($p > 0,37$).

Conclusion. We have shown that the presence of the anti-herpes viral IgM strictly correlates with polyclonal IgM hypergammaglobulinaemia, while an increased level of virus-specific IgG antibodies does not affect the formation of polyclonal IgG hypergammaglobulinaemia and can be observed in IgG hypogammaglobulinaemia.

Для корреспонденции: Чернова Наталья Геннадьевна, канд. мед. наук, врач-гематолог отделения интенсивной химиотерапии лимфом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва.
E-mail: ngchernova@mail.ru

Key words: *herpes viruses; angioimmunoblastic T-cell lymphoma; quantitative immunoglobulinopathies.*

For citation: Chernova N.G., Tihomirov D.S., Soboleva N.P., Mariina S.A., Sidorova Y.V., Sinitsyna M.N., Dvirnyk V.N., Kulikov S.M., Tupoleva T.A., Zvonkov E.E. Comparative analysis of serological markers of herpes viruses and quantitative immunoglobulinopathies in primary patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 171-176. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-171-176>

For correspondence: Natalia G. Chernova, PhD, hematologist, National Research Center for Hematology, Moscow, 125167, Russian Federation. E-mail: ngchernova@mail.ru

Information about authors:

Chernova N.G., <http://orcid.org/0000-0002-0827-4052>;

Tihomirov D.S., <http://orcid.org/0000-0002-2553-6579>;

Soboleva N.P., <http://orcid.org/0000-0002-1903-2446>;

Maryna S.A., <http://orcid.org/0000-0002-9375-4076>;

Sidorova Yu.V., <http://orcid.org/0000-0003-1936-0084>;

Sinitcina M.N., <http://orcid.org/0000-0002-0750-8005>;

Dvirnyk V.N., <http://orcid.org/0000-0002-9877-0796>;

Tupoleva T.A., <http://orcid.org/0000-0003-4668-9379>;

Kulikov S.M., <http://orcid.org/0000-0002-6288-7570>;

Zvonkov E.E., <http://orcid.org/0000-0002-2639-7419>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 30 October 2017

Accepted 12 December 2017

Введение

Ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома (АИТЛ) – редкое Т-клеточное лимфопролиферативное заболевание, протекающее с генерализованной лимфаденопатией, гепатоспленомегалией, симптомами интоксикации и диспротеинемией [1]. При этой неходжкинской лимфоме большинство авторов отмечают развитие различных иммунных нарушений, таких как гипергаммаглобулинемия, положительная проба Кумбса, выработка аутоантител, криоглобулинов, холодовых агглютининов [2, 3]. Поликлональная гипергаммаглобулинемия, характеризующаяся повышением продукции иммуноглобулинов одного или нескольких классов многими клонами В-лимфоцитов или плазматических клеток, выявляется у 82,5% больных, а в каждом десятом случае наблюдается секреция олиго- и/или моноклональных иммуноглобулинов [4, 5].

По данным литературы, развитие АИТЛ в 70–90% случаев ассоциировано с вирусом Эпштейна – Барр (ВЭБ) [6]. В 1990 г. Н. Кнеcht и соавт. [7] впервые опубликовали данные о выявлении ДНК ВЭБ в 5 из 8 исследованных биоптатов лимфоузла у больных АИТЛ. Этим вирусом инфицирована большая часть населения планеты, в то же время возникновение многих злокачественных лимфоидных и эпителиальных опухолей, таких как лимфома Беркитта или назофарингеальная карцинома, связывают именно с его онкогенным действием [8]. Несмотря на то, что вирус был впервые описан ещё в конце 50-х годов XX века и к настоящему моменту хорошо изучены его биологические свойства [9] и онкогенный потенциал, роль ВЭБ в патогенезе АИТЛ остаётся не до конца ясной. Часть авторов объясняют присутствие вирионов ВЭБ, продуктов вирусных генов и противовирусных антител как вторичную реактивацию эндогенной инфекции из латентно инфицированных В-лимфоцитов вследствие дисрегуляции иммунного ответа и состояния глубокого иммунодефицита при АИТЛ [10, 11]. До последнего времени не было описано модели, подтверждающей инфицирование ВЭБ *in vivo* и *ex vivo* опухолевых или неопухолевых Т-клеток, что могло бы объяснить прямое участие вируса в лимфомогенезе. Однако в

2015 г. появились сообщения, описывающие модель, согласно которой изоляты ВЭБ, лишённые способности индуцировать опухолевую трансформацию В-клеток, инфицируют Т-лимфоциты, меняя их функциональную активность. Это в свою очередь приводит к повышению способности вирусного штамма к становлению латентной инфекции путём альтерации иммунного ответа через продукты вирусных генов, аналогов противовоспалительных цитокинов [12]. Согласно другой точке зрения, ВЭБ может являться триггерным звеном в патогенезе АИТЛ или включаться в патогенез за счёт клеточного взаимодействия в герминальном центре лимфоузла [2, 13]. В соответствии с одной из теорий в результате иммуномодулирующего действия вируса и перmissive микроокружения из опухолевых Т-хелперов происходит экспансия клона ВЭБ-инфицированных В-лимфоцитов, способствующая прогрессированию заболевания [14]. Кроме того, в качестве этиологического агента или триггера АИТЛ рассматривались другие вирусы герпетической группы. Так, M. Lurri и соавт. [15] сделали предположение о возможной роли вируса герпеса человека 6-го типа в патогенезе АИТЛ. При исследовании образцов лимфоузлов, печени, селезёнки и мононуклеаров периферической крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) у 7 (58%) из 12 больных АИТЛ была выявлена ДНК вируса. Однако для данного вируса не описан механизм, позволяющий объяснить его участие в лимфомогенезе, кроме способности герпесвируса человека 6-го типа напрямую инфицировать Т-лимфоциты и вызывать или усугублять иммуносупрессию [16]. По мнению некоторых авторов, гипериммунная реакция, наблюдающаяся у больных АИТЛ и проявляющаяся гипергаммаглобулинемией в 50–83% случаев, индуцирована именно вирусами герпетической группы [2, 17]. Считается, что именно противовирусные антитела, в основном анти-ВЭБ IgM и IgG, являются субстратом поликлональной гипергаммаглобулинемии.

В нашей статье мы представили сравнительный анализ серологических маркёров герпесвирусных инфекций и количественных иммуноглобулинопатий у 26 первичных больных АИТЛ

Материал и методы

Пациенты

Проведен анализ основных клинико-лабораторных показателей и данных вирусологических исследований у 26 первичных больных АИТЛ, наблюдавшихся в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России с 2002 по 2017 г. Соотношение мужчины/женщины — 16:10. Медиана возраста составила 62 (диапазон 29–81) года. Клинико-лабораторная характеристика пациентов представлена в табл. 1.

Методы диагностики

Всем больным, включённым в исследование, было проведено комплексное клинико-лабораторное обследование. Диагноз АИТЛ устанавливали согласно критериям классификации ВОЗ 2008 г. Для патоморфологической верификации АИТЛ проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследование опухолевого субстрата с расширенной панелью моноклональных антител (CD2, CD3ε, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD20, CD30, PD1, CXCL13, BCL6, PAX-5, Ki67). Распространённость опухолевого процесса определяли согласно классификации Ann Arbor (1971), при выявлении поражения костного мозга и/или экстранодальных очагов устанавливали IV стадию заболевания.

С целью характеристики количественных изменений иммуноглобулинов у первичных больных АИТЛ было выполнено иммунохимическое исследование сыворотки крови, включающее количественное определение иммуноглобулинов классов G и M методом кинетической нефелометрии (Image 800, «Beckman Coulter», США), выявление и типирование моноклональных иммуноглобулинов методом капиллярного электрофореза с иммунотипированием (Capillarys 2, «Sebia», Франция) и иммунофиксированного электрофореза в агарозном геле с набором моноспецифических антисывороток к тяжёлым и лёгким цепям иммуноглобулинов человека (Hydrasys 1200, «Sebia», Франция).

При проведении вирусологического исследования определяли серологические маркёры ВЭБ, цитомегаловируса (ЦМВ) и вируса простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2). Методом твердофазного непрямого иммуноферментного анализа выполняли исследование сыворотки крови больных на наличие IgM к ЦМВ (IgM ЦМВ), ВПГ 1-го, 2-го типов (IgM ВПГ-1, ВПГ-2) и вирусному капсидному антигену ВЭБ (IgM VCA ВЭБ), а также оценивали титр антител IgG к ЦМВ (IgG ЦМВ), IgG к ВПГ-1, ВПГ-2 (IgG ВПГ-1, ВПГ-2), IgG к раннему антигену ВЭБ (IgG EA ВЭБ) и количество IgG к ядерному антигену 1-го типа ВЭБ (IgG EBNA-1 ВЭБ). Титр специфических противовирусных IgG, соответствующий разведению 1:3200 и выше, был определён как превышающий нормальные значения. Концентрация IgG EBNA-1 ВЭБ более 60 усл. ед. была определена как высокая. Проведён сравнительный анализ данных иммунохимического исследования и серологических маркёров вируса герпеса.

При анализе данных были применены стандартные методы описательной статистики, частотного, корреляционного и дисперсного анализа. Обработку данных и аналитические расчеты проводили с помощью статистического пакета SAS v. 9.1.3 [18].

Результаты

Поликлональная гипергаммаглобулинемия по классам G и/или M была выявлена у 15 (57,7%) из 26 пациентов (табл. 2). Повышение уровня иммуноглобулинов

Таблица 1

Клинико-лабораторная характеристика больных

Клинико-лабораторные параметры	Количество больных, n (%)
Всего	26 (100)
Медиана возраста (диапазон), годы	62 (29–81)
Соотношение мужчины/женщины	16:10
Стадия III–IV (Ann Arbor)	26 (100)
В-симптомы:	26 (100)
Слабость	26 (100)
Лихорадка более 38°C	20 (76,9)
Потеря массы тела	15 (57,7)
Поражение костного мозга (по данным морфологического исследования)	14 (53,8)
Поражение лёгких	18 (69,2)
Гепатомегалия	14 (53,8)
Спленомегалия	20 из 25 (80,0)
Повышение активности ЛДГ	24 (92,3)
Повышение активности ЩФ	4 из 25 (16,0)
Повышение концентрации глобулинов	15 (57,7)
Анемия (гемоглобин ниже 120 г/л)	14 (53,8)
Тромбоцитопения (тромбоциты ниже 100·10 ⁹ /л)	5 (19,2)
Лейкопения (лейкоциты менее 4·10 ⁹ /л)	7 (26,9)
Лейкоцитоз (лейкоциты более 9·10 ⁹ /л)	6 (23,1)
Лимфопения (менее 19%)	15 (57,7)

Примечание. ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЩФ – щелочная фосфатаза.

классов M и G наблюдалось с одинаковой частотой и было выявлено у 11 (42,3%) и 11 (42,3%) из 26 больных АИТЛ соответственно. Поликлональная гипергаммаглобулинемия одновременно по двум классам M и G была отмечена в 7 (26,9%) случаях. Гипогаммаглобулинемия, характеризующаяся снижением уровня иммуноглобулинов одного или нескольких классов, была определена у 8 (30,8%) пациентов. Гипогаммаглобулинемия класса M выявилась в 4 (15,4%) случаях, класса G – в 8 (30,8%) случаях.

Полученные результаты при исследовании вирусологических маркёров представлены в табл.3. Серологические маркёры активной фазы герпесвирусной инфекции (наличие IgM к какому-либо вирусу) были выявлены у 14 (53,8%) из 26 больных. При этом IgM VCA ВЭБ были обнаружены только у 3 (11,5%) больных, IgM ЦМВ – у 4 (15,4%), а IgM ВПГ-1, ВПГ-2 – у 11 (42,3%). У 2 больных определялись противовирусные антитела IgM против 2 вирусов одновременно, и у одного пациента наблюдалось наличие противовирусных IgM к 3 вирусам.

Таблица 2

Имунохимические показатели больных АИТЛ

Лабораторные параметры	Количество больных, n (%)
Всего	26 (100)
Поликлональная гипергаммаглобулинемия	15 (57,7)
IgM (> 3,24 г/л)	11 (42,3)
IgG (> 18,8 г/л)	11 (42,3)
IgM + IgG	7 (26,9)
Гипогаммаглобулинемия	8 (30,8)
IgM (< 0,48 г/л)	4 (15,4)
IgG (< 7,6 г/л)	8 (30,8)

Таблица 3

Серологические маркёры герпесвирусных инфекций

Лабораторные параметры	Количество больных, n (%)
Всего	26 (100)
Наличие противовирусных IgM	14 (53,8)
IgM ВПГ-1, ВПГ-2	11 (42,3)
IgM ВЭБ	3 (11,5)
IgM ЦМВ	4 (15,4)
Повышение уровня противовирусных IgG	22 (84,6)
IgG ВПГ-1, ВПГ-2	20 (76,9)
IgG EA ВЭБ *	2 (7,7)
IgG EBNA-1	16 (61,1)
IgG ЦМВ	7 (26,9)

Примечание. Здесь и в табл. 5:* – определение IgG EA ВЭБ проводили качественным методом без оценки уровня, так как данное антитело является маркёром поздней фазы активной инфекции или ранней постинфекции.

Повышение уровня противовирусных IgG наблюдалось у 22 (84,6%) из 26 больных. Среди них повышение концентрации (60 усл. ед. и более) IgG EBNA-1 было выявлено в 16 (61,1%) случаях, антитела к раннему антигену ВЭБ обнаружены у 2 больных. Повышение титра (1:3200 и выше) IgG ВПГ-1, ВПГ-2 наблюдали в 20 (76,9%) случаях, IgG ЦМВ – лишь в 7 (26,9%).

В последующем был проведён сравнительный анализ данных иммунохимического и вирусологического исследования, оценена корреляция между уровнем поликлональных иммуноглобулинов и противовирусных антител классов М и G в совокупности и к каждому вирусу в отдельности. Полученные результаты представлены в табл. 4 и 5. Наличие противовирусных антител класса М было выявлено во всех 11 (100%) случаях IgM-поликлональной гипергаммаглобулинемии, у 10 (90,9%) больных из них выявлялись IgM ВПГ-1, ВПГ-2, у 3 – IgM ЦМВ и только у 2 больных – IgM ВЭБ. В остальных 3 случаях наличие серологических маркёров активной герпетической инфекции (противовирусных антител класса М) наблюдалось на фоне нормального уровня поликлональных иммуноглобулинов класса М. Не выявлено ни одного случая поликлональной гипергаммаглобулинемии класса М при отсутствии противовирусных IgM, а также ни одного случая противовирусных антител класса М на фоне IgM-гипогаммаглобулинемии.

Таблица 4

Уровень поликлональных IgM у больных с наличием противовирусных антител класса М

Уровень поликлональных IgM, число больных	Число больных с наличием противовирусных IgM, n=14, из них:		
	IgM ВПГ-1, ВПГ-2, n = 11	IgM VCA ВЭБ, n = 3	IgM ЦМВ, n = 4
Поликлональная IgM-гипергаммаглобулинемия, n = 11	10 из 11 (90,9%)	2 из 3 (66,7%)	3 из 4 (75%)
Нормальный уровень поликлонального IgM, n = 11	1 из 11 (9,1%)	1 из 11 (33,3%)	1 из 4 (25%)
Гипогаммаглобулинемия IgM, n = 4	0 из 11 (0%)	0 из 3 (0%)	0 из 4 (0%)
p	0,0001	0,37	0,15

При корреляционном анализе отмечена прямая значимая связь между наличием каких-либо вирусспецифических IgM (IgM ВПГ-1, ВПГ-2, IgM ЦМВ, IgM VCA ВЭБ) и повышением уровня поликлональных IgM ($p < 0,0001$). При изучении профиля противовирусных антител было установлено, что поликлональная гипергаммаглобулинемия класса М чаще всего ассоциировалась с наличием IgM ВПГ-1, ВПГ-2 ($p < 0,0001$), тогда как для других противовирусных иммуноглобулинов класса М (IgM ЦМВ и IgM VCA ВЭБ) связь с гаммапатией не была доказана ($p = 0,15$ и $p = 0,36$ соответственно).

Аналогичный сравнительный анализ данных иммунохимического исследования и серологических маркёров герпесвирусных инфекций был проведён для антител класса IgG. Повышенный уровень противовирусных IgG был определён в 9 (81,8%) из 11 случаев поликлональной гипергаммаглобулинемии. У 8 больных из них отмечен повышенный титр IgG ВПГ-1, ВПГ-2, у 3 – IgG ЦМВ, у 6 наблюдалась высокая концентрация IgG EBNA-1 ВЭБ и в 2 случаях были выявлены IgG EA ВЭБ. В 2 случаях IgG-поликлональной гипергаммаглобулинемии не было выявлено повышения уровня противовирусных антител класса G ни к одному исследуемому вирусу (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ, ЦМВ). Примечательно, что в 7 (87,5%) из 8 случаев IgG-гипогаммаглобулинемии наблюдалось повышение уровня противовирусных иммуноглобулинов этого класса.

При изучении корреляции между поликлональной IgG-гипергаммаглобулинемией и повышением уровня противовирусных IgG, как анамнестических (IgG ВПГ-1, ВПГ-2, IgG ЦМВ, IgG EBNA-1 ВЭБ), так и острой фазы инфекции (IgG EA ВЭБ), не было обнаружено значимой связи как для каждого вируса в отдельности, так и в совокупности ($p > 0,37$).

Таким образом, исследование серологического профиля противовирусных IgG к каждому вирусу в отдельности не позволило установить достоверно значимую зависимость между гаммапатией и повышенным уровнем противовирусных IgG.

Обсуждение

Опухолевые лимфопролиферативные процессы сопровождаются вторичной иммунологической несостоятельностью и развитием гипо- или гипериммунных реакций на опухолевый и/или присоединившийся инфекционный процесс. В подавляющем большинстве случаев АИТЛ в биоптате лимфоузла выявляется ВЭБ молекулярными методами (гибридизацией *in situ* или ПЦР-исследованием) [2, 11, 13]. Поликлональная гипергаммаглобулинемия и различные иммунные нарушения, наблюдаемые у большинства больных АИТЛ, многими исследователями рассматриваются как гуморальный ответ на активную вирусную инфекцию [2, 17]. Как известно, активная ВЭБ-инфекция сопровождается не только появлением специфических противовирусных антител. Проплиферация В-лимфоцитов, инфицированных ВЭБ, приводит к синтезу большого количества разнообразных аутоантител (холодовые агглютинины, ревматоидный фактор, антинуклеарные антитела и др.) и других вирусных продуктов, участвующих в модуляции иммунного ответа. Иммуноглобулины, так называемые гетерофильные антитела Пауля – Буннеля, продуцируемые В-лимфоцитами при активной ВЭБ-инфекции, не направлены к каким-либо антигенам вируса и являются случайными продуктами [19].

Таблица 5

Уровень поликлональных IgG у больных с повышенным титром противовирусных антител класса G

Уровень поликлональных IgG, число больных	Число больных с повышенным титром противовирусных антител класса G, n=22, среди них:			
	IgG ВПГ-1, ВПГ-2, n = 20	IgG EA* ВЭБ, n = 2	IgG EBNA-1 ВЭБ, n = 16	IgG ЦМВ, n = 7
Поликлональная IgG-гипергаммаглобулинемия, n = 11	8 из 20 (40,0%)	2 из 2 (100%)	6 из 16 (37,5%)	3 из 7 (42,8%)
Нормальный уровень поликлонального IgG, n = 7	6 из 20 (30,0%)	0 из 2 (0%)	3 из 16 (18,7%)	2 из 7 (28,6%)
Гипогаммаглобулинемия IgG, n = 8	6 из 20 (30,0%)	0 из 2 (0%)	7 из 16 (43,8%)	2 из 7 (28,6%)
<i>p</i>	0,37	-	0,53	0,97

Полученные нами результаты иммунохимического исследования образцов периферической крови у первичных больных АИТЛ были сопоставимы с данными зарубежных авторов [2]. Поликлональная гипергаммаглобулинемия IgG и/или IgM была выявлена у 57,7% больных.

Результаты проведённых вирусологических исследований оказались весьма неожиданными. Нами была определена высокая частота выявления противовирусных IgM – 53,8%. При этом IgM ВПГ-1, ВПГ-2 выявлялись чаще (42,3%), чем серологические маркёры активной ВЭБ- и ЦМВ-инфекции (даже суммарно). IgM ВПГ-1, ВПГ-2 появляются в кровотоке в результате первичного инфицирования, реже при реактивации инфекции [20]. В нашем исследовании ни одного случая первичного инфицирования ВПГ-1, ВПГ-2 не было обнаружено. IgM ВПГ-1, ВПГ-2 характеризуется коротким сроком циркуляции (от 5 до 12 дней), что делает его обнаружение достаточно редким явлением. При классическом варианте ВПГ-1-, ВПГ-2-инфекции, как правило, антигенообразование ограничивается синтезом тканевых IgE в области локализации патологического процесса (кожные покровы и слизистые оболочки). В дальнейшем наблюдается активация клеточных факторов противовирусной защиты (синтез и секреция интерферонов α и β , эукариотических факторов инициации и элонгации, фактора некроза опухоли и др.), миграция НК-клеток, макрофагов и цитотоксических Т-лимфоцитов к месту активной вирусной репликации. Клеточный иммунный ответ подавляет вирусную репликацию, переводя вирус в латентное состояние, а в поражённой ткани после регресса герпетических поражений наблюдаются ВПГ-специфические Т-клеточные инфильтраты [20]. Постоянное присутствие вирусспецифических CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов в тригеминальных ганглиях предотвращает реактивацию вируса, находящегося в них в латентном состоянии. Реактивация герпетической инфекции, по данным литературы [20], провоцируется снижением синтеза γ -интерферона и числа НК-клеток. Длительная презентация антигена дендритными клетками поддерживает определённый уровень анamnестических антител класса IgG, но не IgM. Появление антител IgM ВПГ-1, ВПГ-2 при рецидивирующем течении ВПГ-2-инфекции наблюдается только у 70–80% пациентов. Выявление в дебюте АИТЛ IgM ВПГ-1, ВПГ-2, вероятно, является особенностью этой категории больных. Имеются публикации, в которых описаны тяжёлые инфекционные осложнения,

ассоциированные с ВПГ-1, ВПГ-2 у пациентов со вторичным иммунодефицитом [21–23]. Столь высокая ассоциация маркёров активной ВПГ-1-, ВПГ-2-инфекции у пациентов с АИТЛ требует дальнейшего изучения роли этого вируса в развитии инфекционных осложнений, а также его влияния на патогенез основного заболевания. По сравнению с IgM ВПГ-1, ВПГ-2 антитела острой фазы ВЭБ-инфекции были обнаружены только в 11,5% случаев, что может свидетельствовать о низкой частоте активной ВЭБ-инфекции у данной категории пациентов или о несостоятельности иммунной системы.

Повышение уровня противовирусных IgG, как анamnестических, так и острой фазы инфекции/ранней постинфекции (IgG EA ВЭБ), наблюдалось у 84,6% больных. Наиболее часто повышенный уровень противовирусных IgG наблюдался к ВПГ-1, ВПГ-2 у 76,9% больных, несколько реже – к ВЭБ (IgG EBNA-1) – у 61,1%.

Проведённый нами сравнительный анализ данных иммунохимического исследования и серологических вирусных маркёров классов G и M продемонстрировал противоположные закономерности. Мы обнаружили сильную корреляцию между наличием поликлональной IgM-гипергаммаглобулинемии и появлением антител острой фазы ВПГ-1-, ВПГ-2-инфекции. Напротив, для ВЭБ-инфекции была показана самая слабая корреляция между IgM-гаммапатией и серологическими маркёрами активной инфекции. Поликлональная гипергаммаглобулинемия класса G, наоборот, не была ассоциирована с повышением уровня противовирусных IgG. При корреляционном анализе не было выявлено значимой связи между повышенным уровнем противовирусных антител класса G и поликлональной IgG-гипергаммапатией. Возможно, повышение уровня поликлональных IgG у больных АИТЛ не является иммунной реакцией организма на активную вирусную инфекцию и обусловлено другими процессами, требующими дальнейшего изучения.

В ходе исследования были получены данные, подтверждающие сомнению традиционно устоявшуюся точку зрения, согласно которой субстратом поликлональной гаммапатии являются антитела к ВЭБ, а сам ВЭБ является прямой причиной неопластической трансформации. Многочисленными исследованиями было показано, что онкогенный потенциал вируса ассоциирован с типом латенции [9, 24, 25]. Полный спектр продуктов латентных генов включает 6 ядерных антигенов (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C и так называемый лидерный протеин LP), 3 латентных мембранных протеина (LMP-1, LMP-2A и LMP-2B), 2 малых некодирующих РНК (EBER1 и EBER2) и 3 кластера микроРНК. В зависимости от набора синтезируемых генных продуктов различают 3 типа латенции ВЭБ (0–I, II и III). Латенция III типа подразумевает экспрессию всех латентных генных продуктов. Многие из этих белков являются высокоиммуногенными, и их длительная экспрессия оказывает иммуномодулирующее действие и возможна только в условиях нарушения Т-клеточного иммунного звена. В этом случае было бы закономерным развитие оппортунистических инфекций, к которым относится и инфекция ВЭБ. Однако частота серологических маркёров активной ВЭБ-инфекции по сравнению с другими

герпесвирусными инфекциями в нашем исследовании оказалась минимальной.

Нынешнее понимание роли ВЭБ в лимфогенезе человека неразрывно связано с такими его свойствами, как повсеместная распространённость и способность индуцировать В-клеточную трансформацию и лимфопрлиферацию. Оно концептуально закреплено в динамическом равновесии взаимодействия иммунной системы хозяина и латентного вируса. Однако эта парадигма не объясняет механизмов, подходящих для большинства ВЭБ-ассоциированных Т-клеточных злокачественных новообразований, в том числе АИТЛ, когда эволюционные отношения между вирусом и опухолью, вероятно, более динамичны и сложны.

Таким образом, у больных АИТЛ в дебюте заболевания обнаруживается высокий процент серологических маркёров активных герпетических инфекций. Неожиданной находкой явилось частое обнаружение IgM к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типов в отсутствие классической клинической картины. В результате проведённой работы было показано, что повышение уровня противовирусных IgM сильно коррелирует с поликлональной гипергаммаглобулинемией класса М, тогда как противовирусные вирусспецифические анamnестические антитела IgG не вносят существенного вклада в поликлональную гипергаммаглобулинемию класса G.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4, 6-16, 18-20, 22, 23, 25 см. REFERENCES)

3. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Сидорова Ю.В., Капланская И.Б., Гилязитдинова Е.А., Горенкова Л.Г. и др. Длительные режимы цитостатической терапии ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфомы. Клиническая онкогематология. *Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2014; 7(1): 57-62.
5. Чернова Н.Г., Виноградова Ю.Е., Марьяна С.А., Двирнык В.Н., Сидорова Ю.В., Сивичева М.Н. и др. Значение иммунохимического исследования при ангиоиммунобластной Т-клеточной лимфоме. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(Прил. 1): 192.
17. Ковынев И.Б., Агеева Т.А., Обголец Ю.Н. Клинические маски периферических Т-клеточных лимфом: ангиоиммунобластная Т-клеточная неходжкинская лимфома. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2011; 31(2): 108-11.
21. Тихомиров Д.С., Гаранжа Т.А., Туполева Т.А., Троицкая В.В., Галстян Г.М., Филатов Ф.П. Факторы, влияющие на частоту возникновения вирусных пневмоний у онкогематологических больных. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(1): 37-42.
24. Гурцевич В.Э. Роль вируса Эпштейна-Барр в онкогематологических заболеваниях человека. Клиническая онкогематология. *Фундаментальные исследования и клиническая практика.* 2010; 3(3): 222-34.

REFERENCES

1. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2008.
2. de Leval L., Gisselbrecht C., Gaulard P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2010; 148(5): 673-89.
3. Chernova N.G., Vinogradova Yu.E., Sidorova Yu.V., Kaplanskaya I.B., Gilyazitdinova E.A., Gorenkova L.G., et al. Long-term regimens of cytostatic therapy of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika.* 2014; 7(1): 57-62. (in Russian)

4. Lin P., Hao S., Handy B.C., Bueso-Ramos C.E., Medeiros L.J. Lymphoid neoplasms associated with IgM paraprotein: a study of 382 patients. *Am. J. Clin. Pathol.* 2005; 123(2): 200-5.
5. Chernova N.G., Vinogradova Yu.E., Mar'ina S.A., Dvirnyk V.N., Sidorova Yu.V., Sinit'syna M.N., et al. The Importance of immunochemical investigation during angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2016; 61(Suppl. 1): 192. (in Russian)
6. Weiss L.M., Jaffe E.S., Liu X.F., Chen Y.Y., Shibata D., Medeiros L.J. Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood.* 1992; 79(7): 1789-95.
7. Knecht H., Sahli R., Shaw P., Meyer C., Bachmann E., Odermatt B.F., et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Br. J. Haematol.* 1990; 75(4): 610-4.
8. Kim H.J., Ko Y.H., Kim J.E., Lee S.S., Lee H., Park G., et al. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders: Review and Update on 2016 WHO Classification. *J. Pathol. Transl. Med.* 2017; 51(4): 352-358.
9. Longnecker R.M., Kieff E., Cohen J.I. Epstein-Barr Virus. In: Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B., eds. *Fields Virology. Chapter 61. Volume 2.* Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2013: 1898-959.
10. Anagnostopoulos I., Hummel M., Finn T., Tiemann M., Korbjuhn P., Dimmler C., et al. Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood.* 1992; 80(7): 1804-12.
11. Dogan A., Attygalle A.D., Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2003; 121(5): 681-91.
12. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301-12.
13. Gru A.A., Haverkos B.H., Freud A.G., Hastings J., Nowacki N.B., Barrionuevo C., et al. The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. *Curr. Hematol. Mag. Rep.* 2015; 10(4): 456-67.
14. Xu Y., McKenna R.W., Hoang M.P., Collins R.H., Kroft S.H. Composite angioimmunoblastic T-cell lymphoma and diffuse large B cell lymphoma: a case report and review of the literature. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002; 118(6): 848-54.
15. Luppi M., Marasca R., Barozzi P., Artusi T., Torelli G. Frequent detection of human herpesvirus-6 sequences by polymerase chain reaction in paraffin-embedded lymph nodes from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Leuk. Res.* 1993; 17(11): 1003-11.
16. Kondo K., Kazuhiro T., Okuno T., Takahashi M., Yamanashi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J. Gen. Virol.* 1991; 72(6): 1401-8.
17. Kovynev I.B., Ageeva T.A., Obgol't's Yu.N. Angioimmunoblastic T-cell non-hodgkin's lymphoma hides under different masks. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal.* 2011; 31(2): 108-11. (in Russian)
18. SAS Institute Inc. *SAS 9.1. 3 Help and Documentation.* 2004; Cary, NC: SAS Institute Inc.
19. Paul J.R., Bunnell W.W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. *Amer. J. Med. Sci.* 1932; 183(1): 90-103.
20. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D., Howley P., eds. *Fields Virology.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007: 2502-601.
21. Tikhomirov D.S., Garanzha T.A., Tupoleva T.A., Troitskaya V.V., Galstyan G.M., Filatov F.P. Factors affecting the incidence of viral pneumonia in patients with hematological malignancies. *Gematologiya i transfuziologiya.* 2016; 61(1): 37-42. (in Russian)
22. Guerrero M.D., Swenson K.K. Herpes simplex virus-related oral mucositis in patients with lymphoma. *Oncol. Nurs. Forum.* 2014; 41(3): 327-30.
23. Moldovan B., Mentha G., Majno P., Berney T., Morard I., Giostra E., et al. Demographics and outcomes of severe herpes simplex virus hepatitis: a registry-based study. *J. Hepatol.* 2011; 55(6): 1222-6.
24. Gurteyev V.E. The role of the Epstein-Barr virus in hematological malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya. Fundamental'nye issledovaniya i klinicheskaya praktika.* 2010; 3(3): 222-34. (in Russian)
25. Tempera I., Lieberman P.M. Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 2014; 26: 22-9.

Поступила 30.10.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.921.5+036.22(470+571) «2009—2017»

Карпова Л.С.¹, Волик К.М.¹, Столяров К.А.¹, Поповцева Н.М.¹, Столярова Т.П.¹, Соминина А.А.¹,
Бурцева Е.И.²

ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРИ ГРИППЕ А(Н1N1)PDM09 И А(Н3N2) В РОССИИ С 2009 ПО 2017 г.

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

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва

Цель работы – сравнение основных параметров эпидемий гриппа разной этиологии. Проведен анализ 4 эпидемий гриппа с доминированием гриппа А(Н1N1)pdm09 и 4 эпидемий гриппа А(Н3N2) по данным ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ о заболеваемости, госпитализации, летальных исходах гриппа в 59 городах в период с 2009 по 2017 г. Интенсивность эпидемий с участием гриппа А(Н1N1)pdm09 снизилась с высокой до средней, а эпидемий гриппа А(Н3N2) повысилась от низкой до средней. В эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 снизилась по населению в целом заболеваемость гриппом и ОРВИ (в 1,6 раза) и летальность среди заболевших (в 1,7 раза) и во всех возрастных группах, кроме лиц старше 65 лет, среди которых увеличилась заболеваемость (в 1,4 раза) и летальность (в 2,3 раза). В эпидемии А(Н3N2) выявлена тенденция роста заболеваемости и летальности, более выраженная среди лиц старше 65 лет. Пандемический грипп остаётся основной причиной летальных исходов. Среди умерших во время эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 снизилась доля молодых лиц, в том числе беременных, в 4 раза, но увеличилась доля лиц старше 65 лет в 7,8 раза, а во время эпидемии гриппа А(Н3N2) – только в 2,5 раза. В ходе эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 среди умерших увеличилась доля лиц с сердечно-сосудистой патологией и болезнями внутренних органов, а в эпидемии гриппа А(Н3N2) – с иммунодефицитами, болезнями внутренних органов и органов дыхания.

Ключевые слова: эпидемии гриппа А(Н3N2) и А(Н1N1)pdm09; заболеваемость; летальность.

Для цитирования: Карпова Л.С., Волик К.М., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Соминина А.А., Бурцева Е.И. Особенности эпидемического процесса при гриппе А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) в России с 2009 по 2017 г. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 177-184.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-177-184>

Karpova L.S.¹, Volik K.M.¹, Stolyarov K.A.¹, Popovtseva N.M.¹, Stolyarova T.P.¹, Sominina A.A.¹, Burtseva E.I.² FEATURES OF EPIDEMIC PROCESS OF INFLUENZA A(H1N1)PDM09 AND A(H3N2) IN RUSSIA FROM 2009 TO 2017

¹Federal State Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FGBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation

The goal of this work is to compare the key parameters of influenza epidemics of different etiology. Four epidemics of influenza with predominance of influenza A(H1N1)pdm09 and 4 epidemics of influenza A(H3N2) were analyzed using the database of the Federal State Research Institute of Influenza on morbidity, hospitalization, deaths from influenza in 59 cities in the period from 2009 to 2017. The intensity of epidemics involving the influenza A(H1N1)pdm09 decreased from high to medium, while the intensity of epidemics of influenza A(H3N2) increased from low to medium. In the epidemic of influenza A(H1N1)pdm09 in the total population, the incidence of influenza and ARI decreased by a factor of 1.6, while the mortality among patients decreased by a factor of 1.7 in all age groups, except for those over 65 years, for whom the incidence and mortality increased by factors of 1.4 of 2.3, respectively. In the epidemic of A(H3N2), a trend for increasing morbidity and mortality was more pronounced among individuals older than 65 years. Pandemic influenza remains the leading cause of deaths. Among the dead in the epidemic of influenza A(H1N1)pdm09, the proportion of young individuals decreased (including a fourfold decrease of lethality in pregnant women), while the proportion of persons over 65 years increased 7.8 times; in the epidemic of influenza A(H3N2) only 2.5-fold increase was observed. In the epidemic of influenza A(H1N1)pdm09, the proportion of lethality increased among people with cardiovascular diseases and diseases of the internal organs; in the epidemic of influenza A(H3N2), the proportion of lethality increased among people with immunodeficiency, diseases of the internal organs and respiratory system.

Key words: influenza epidemic A(H3N2) and A(H1N1)pdm09; morbidity; mortality.

For citation: Karpova L.S., Volik K.M., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Sominina A.A., Burtseva E.I. Features of epidemic process of influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) in Russia from 2009 to 2017. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 177-184. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-177-184>

For correspondence: Lyudmila S. Karpova, Dr. Med. Sci., Head of the Laboratory of influenza and ARD epidemiology, Federal State Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: epidlab@influenza.spb.ru

Information about authors:

Karpova L.S., <http://orcid.org/0000-0001-6621-5977>; Sominina A.A., orcid.org/0000-0001-9671-0629;

Burtseva E.I., <http://orcid.org/0000-0003-2518-6801>

Acknowledgment. This work was performed in the framework of the State-funded Research Project No. AAAA-A16-116022510058-5

Для корреспонденции: Карпова Людмила Серафимовна, д-р мед. наук, руководитель лаборатории эпидемиологии гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: epidlab@influenza.spb.ru

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

Received 30 September 2017
Accepted 12 December 2017

Введение

Уточнение изменений эпидемического процесса при гриппе и ОРВИ в условиях постоянного изменения свойств циркулирующих вирусов гриппа и меняющейся демографической ситуации в России позволит более объективно определять прогнозы, стратегию и тактику противоэпидемических мероприятий.

Цель исследования – сравнение основных параметров эпидемий гриппа и выявление их особенностей в зависимости от доминирования в этиологии заболеваний актуальных вирусов гриппа А(Н1N1)рdm09 или А(Н3N2).

Материал и методы

Анализ эпидемий гриппа в России проведен по данным базы Федерального центра по гриппу при ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ о еженедельной заболеваемости, госпитализации, летальных исходах гриппа в 59 наблюдаемых городах за период с 2009 по 2017 г.

Методика оперативного эпидемиологического анализа основана на сравнении текущей заболеваемости с недельными эпидемическими порогами для всего населения и отдельных возрастных групп в каждом из городов, которые значительно различаются между городами даже в пределах одного региона. Расчёт недельных эпидемических порогов проведён по данным еженедельной неэпидемической заболеваемости гриппом и ОРВИ в 59 городах за последние 10 лет методом НИИ гриппа «Методика расчёта эпидемических порогов по гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям по субъектам Российской Федерации». Методические рекомендации МР 3.1.0005-10. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко от 23 июля 2010 г. М.: 2010;1–88. [1]

Для раннего распознавания начала эпидемии используют 2 основных эпидемиологических критерия: устойчивое превышение недельных эпидемических порогов в сочетании с нарастанием темпов прироста заболеваемости в сравнении с предыдущими неделями. Дополнительными критериями оценки эпидемиологической ситуации по гриппу служит увеличение числа клинически зарегистрированных случаев «гриппа» и повышение частоты госпитализации среди заболевших гриппом и ОРВИ, а также результаты вирусологической диагностики. Анализ этих данных позволяет определить начало и окончание эпидемий гриппа, их продолжительность в городах по отдельным возрастным группам, очередность вовлечения в эпидемию населения разных городов и возрастных групп и заболеваемость в период эпидемии в различных возрастных группах населения и уточнить этиологию эпидемий.

Кроме того, рассчитаны базовые линии в среднем для всего населения городов России и по возрастным группам и для каждого из 9 федеральных округов по показателям неэпидемической заболеваемости в предыдущие сезоны по методу движущихся эпидемий, принятому в европейских странах [2]. Для анализа интенсивности сезонных эпидемий гриппа в России впервые рассчитаны пороги интенсивности по показателям эпидемической

заболеваемости в предыдущие годы по методу движущихся эпидемий [3].

Статистическая обработка полученных результатов проведена с применением t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p = 95\%$. Линии тренда рассчитаны по методу наименьших квадратов в программе Excel.

Результаты

С момента появления в циркуляции в 2009 г. пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 до 2017 г. в России зарегистрировано 8 эпидемий этого заболевания: 4 эпидемии, в этиологии заболеваний которых доминировал вирус гриппа А(Н1N1)рdm09, и ещё 4 эпидемии, в которых доминировал вирус гриппа А(Н3N2) (см. таблицу). Доминирующим штаммом считали тот, доля которого составляла более 50% от всех выявленных штаммов. Его расценили как основной возбудитель эпидемии.

В сезон 2009—2010 гг. пандемия гриппа, вызванная штаммом А/Калифорния/07/09 (Н1N1), началась рано (в конце сентября), что характерно для пандемий гриппа [4, 5]. Последующие эпидемии с участием пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdm09 начинались в обычный для сезонного гриппа период (декабрь – январь) [6–11]. В этиологии эпидемий с участием гриппа А(Н1N1)рdm09 доля основного возбудителя штамма А/Калифорния/07/09, по данным ПЦР-диагностики, снизилась с 99,5% в сезон 2009—2010 гг. до 51,1% в сезон 2012—2013 гг., но через 2 сезона во время эпидемии 2015—2016 гг. снова увеличилась до 94,4%. Таким образом, из 4 эпидемий с участием гриппа А(Н1N1)рdm09 2 можно считать эпидемиями моноэтиологии. Распространялись они по территории России с запада на восток, кроме пандемии 2009—2010 гг., которая шла с востока на запад. В этиологии эпидемий, в которых основным возбудителем был вирус гриппа А(Н3N2), доля этого подтипа составила 78,7% в 2011—2012 гг., в следующие годы уменьшилась до 55,7% в 2013—2014 гг. и 52,4% в 2014—2015 гг., но в последний сезон (2016—2017) увеличилась до 70,5%. Таким образом, эпидемии гриппа А(Н3N2) имели сочетанную этиологию, и вирус гриппа А(Н3N2) циркулировал с гриппом В, а в ходе эпидемии 2013—2014 гг. – с гриппом А/Калифорния/07/09, доля которого составила 27,2%.

Эпидемии гриппа А(Н3N2) распространялись по территории России обоими путями, при этом основной возбудитель продвигался с запада в восточном направлении, а сопутствующие штаммы гриппа В распространялись в том же или обратном направлении, и штамм А/Калифорния/07/09 (2013–2014) шёл с востока (в обратном направлении).

Сравнение 4 эпидемий с участием гриппа А(Н1N1)рdm09 показало, что заболеваемость на пике последующих эпидемий этого подтипа (143,0 и 134,0 на 10 тыс. человек) была сопоставима с пандемией (138,0) и только в эпидемии 2012—2013 гг. была ниже (107,0) (рис. 1). В эпидемии с участием гриппа А(Н3N2) заболеваемость на пике последующих эпидемий нарастала с 76,0 (2011–2012) до 103,4 на 10 тыс. человек (2016–2017).

Пороги интенсивности эпидемии

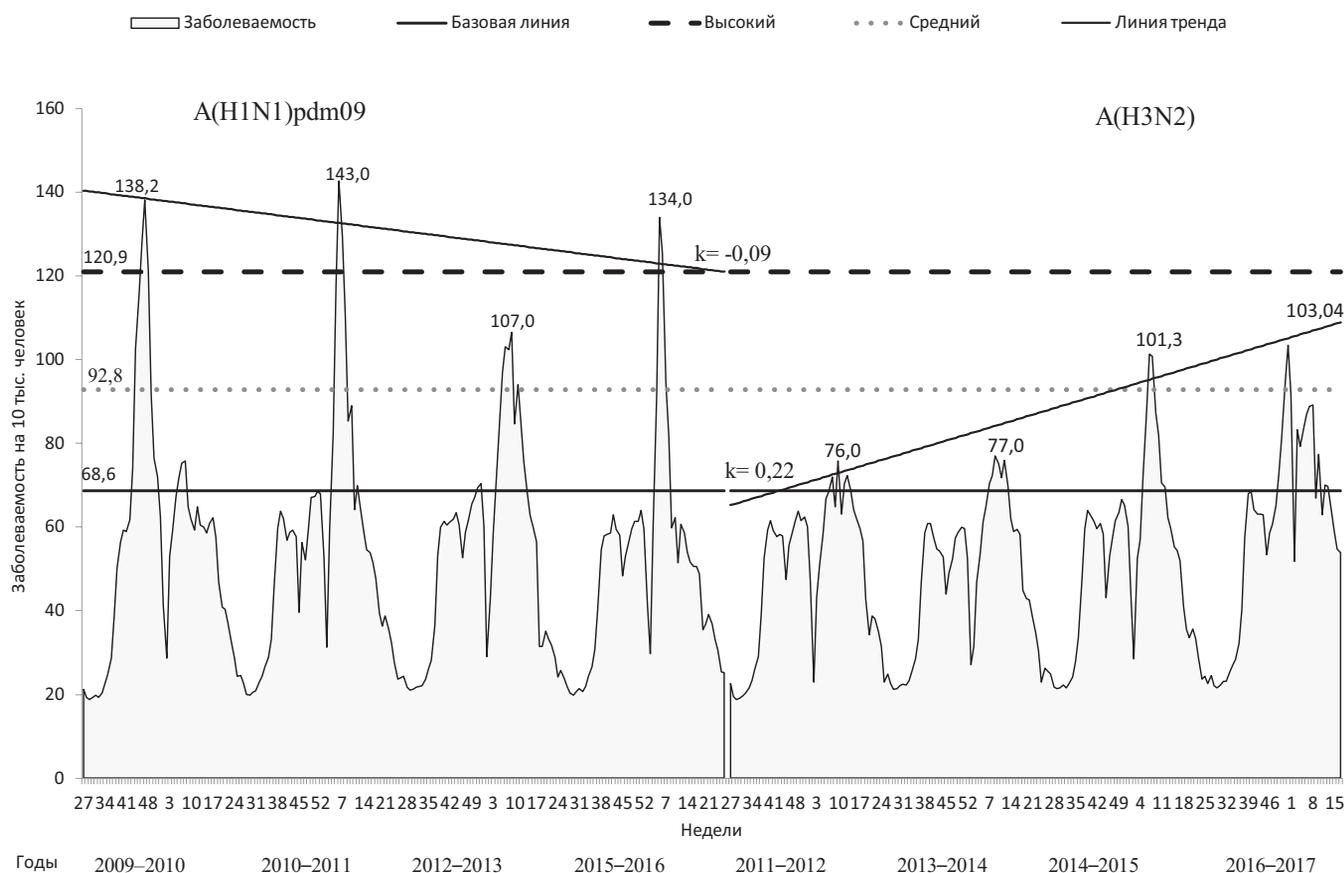


Рис. 1. Интенсивность эпидемий с участием гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2).

Хронология эпидемий гриппа в России с 2009 по 2017 г.

Годы	Этиология эпидемий (по материалам ФЦГ РФ)		Начало эпидемий в России	Время от выявления в мире до эпидемий в России	Стартовые города	Пути распространения по России	Последовательность вовлечения	
	основные штаммы	% от всех штаммов по ПЦР					Москва	Петербург
2009–2010	А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09		Сентябрь 2009	6 мес	Южно-Сахалинск	В	3	5
2010–2011	А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09		Январь 2011	1 год 3 мес 3 года	Томск Магадан	3/В	4	4
	В/Брисбен/60/2008							
2011–2012	А/Перт/16/2009 (H3N2)		Январь 2012	3 года 4 года	Мурманск Хабаровск	3/В	2	2
	В/Брисбен/60/2008							
2012–2013	А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09		Январь 2013	3 года 3 мес	Екатеринбург Биробиджан	3/В	5	4
	А/Victoria/3612011 (H3N2)							
	В/Brisbane/60/2008							
2013–2014	А/Техас/50/12 (H3N2)		Конец января 2014	2года 4 года 10 мес	Санкт-Петербург Владивосток	3/В	9	3
	А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09							
2014–2015	А/Гонконг/4801/14 (H3N2)		Начало декабря 2014	9 мес 1 год 6 мес	Нижний Новгород Чита	3/В	9	8
	А/Швейцария /9715293/2013 (H3N2)							
	В/Пхукет/3073/2013							
2015–2016	А/Калифорния/07/09 (H1N1)pdm09		Январь 2016	6 лет 9 мес	Волгоград Ростов-на-Дону Санкт-Петербург	3	2	1
2016–2017	А/Гонконг/4801/14 (H3N2)		Декабрь 2016	2 года 9 мес	Москва	3	1	2
	В/Брисбен/60/08							

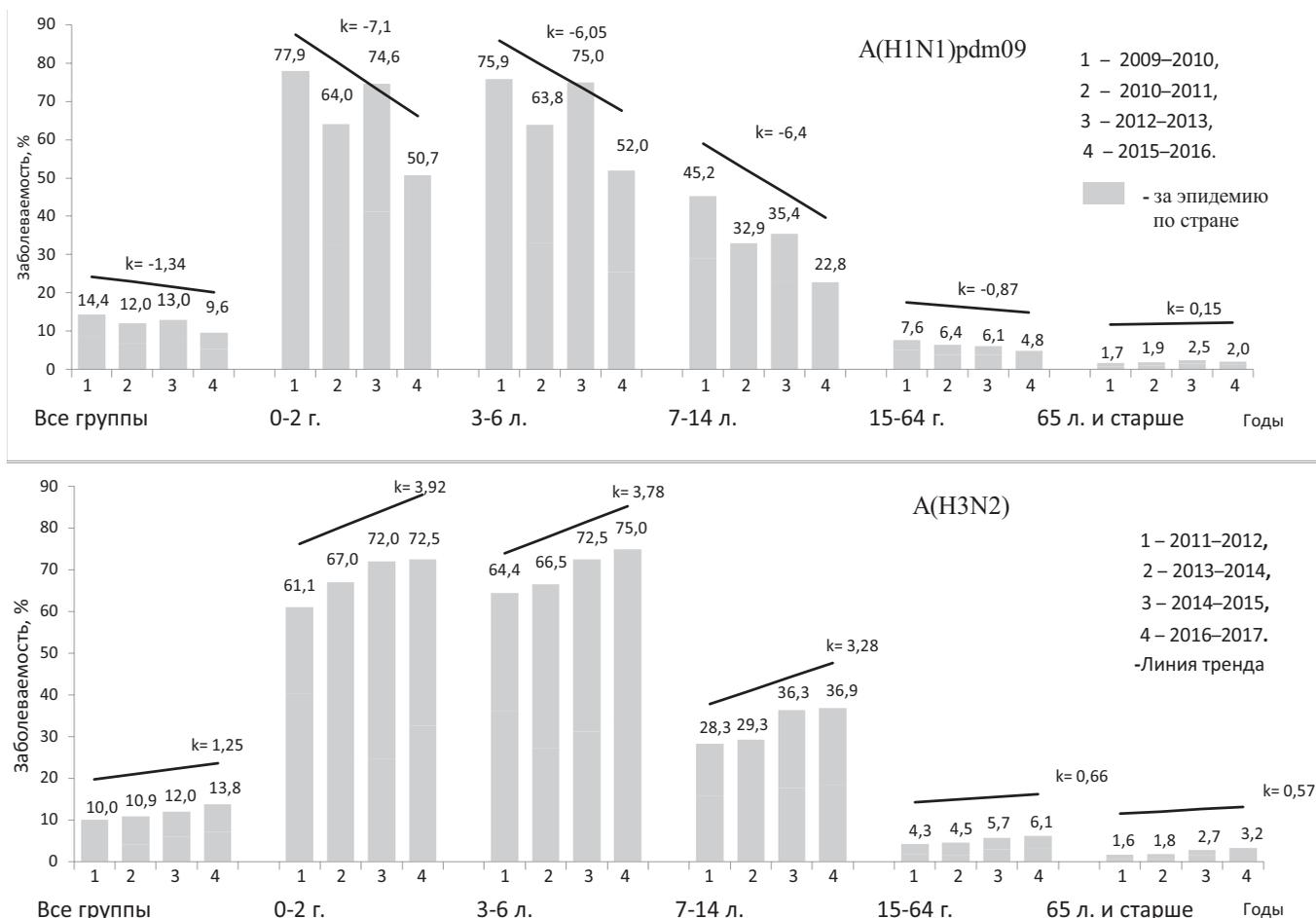


Рис. 2. Заболеваемость гриппом и ОРВИ по возрастным группам во время эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2).

Сравнение показателей заболеваемости на пике эпидемий с порогами интенсивности эпидемий для населения России в среднем показало, что 3 эпидемии с участием гриппа A(H1N1)pdm09 были выше высокого порога интенсивности, и только показатель эпидемии 2012—2013 гг. снизился до среднего порога интенсивности, т. е. интенсивность трех эпидемий была высокой и одной эпидемии – средней (коэффициент угла наклона линии тренда $k = -0,09$). Интенсивность последующих эпидемий с участием гриппа A(H3N2) увеличилась от низкой (первые 2 эпидемии) до средней (2 последние) (коэффициент угла наклона линии тренда $k = 0,22$).

В последующие после пандемии 2009—2010 гг. эпидемии с участием гриппа A(H1N1)pdm09 заболеваемость населения в целом уменьшилась в границах эпидемии для отдельных городов в среднем в 1,6 раза (с 8,5 до 5,4%), за период эпидемии по стране – в 1,5 раза (с 14,4 до 9,6%), во всех возрастных группах детей, школьников 7–14 лет – в 2 раза и лиц в возрасте от 15 до 64 лет – в 1,6 раза (рис. 2). Коэффициент линейного уменьшения заболеваемости по населению в целом $k = -1,34$, при этом в детских возрастных группах (0–2, 3–6, 7–14 лет) он был более выражен ($k = -7,1$, $k = -6,05$, $k = -6,4$), чем среди взрослого населения ($k = -0,87$). Заболеваемость среди лиц 65 лет и старше, наоборот, увеличилась в период эпидемий в городах в 1,4 раза (с 0,9 до 1,3%; $k = 0,15$). Заболеваемость в период эпидемий гриппа A(H3N2) по населению в целом

увеличилась в границах эпидемии в городах в 1,2 раза и по стране в 1,4 раза, во всех возрастных группах, особенно среди лиц в возрасте 15–64 лет, в 1,8 раза и старше 65 лет – в 2,8 раза. Коэффициент линейного увеличения заболеваемости по населению в целом $k = 1,25$, при этом в детских возрастных группах он был больше ($k = 3,92$, $k = 3,78$, $k = 3,28$), чем среди лиц в возрасте 15–64 лет ($k = 0,66$) и 65 лет и старше ($k = 0,57$). Таким образом, в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 показатели заболеваемости снижались во всех возрастных группах, кроме лиц старше 65 лет, а в эпидемии гриппа A(H3N2) – увеличивались во всех возрастных группах. При этом у детей эти тенденции были выражены больше, чем у взрослых, кроме того, в эпидемии с участием пандемического гриппа тенденция снижения заболеваемости была более выражена, чем тенденция увеличения заболеваемости в эпидемии гриппа A(H3N2).

Продолжительность эпидемий с участием гриппа A(H1N1)pdm09 в среднем в городах уменьшилась среди населения в целом и взрослых (на 2 нед), особенно среди школьников (на 3 нед), а продолжительность эпидемий гриппа A(H3N2) увеличилась по населению в целом и среди взрослых старше 15 лет с 4 до 6,3 нед, но уменьшилась в детских возрастных группах (рис. 3). В эпидемии с участием пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 коэффициент угла наклона линии тренда продолжительности по населению в целом $k = -0,5$, при этом у школьников он

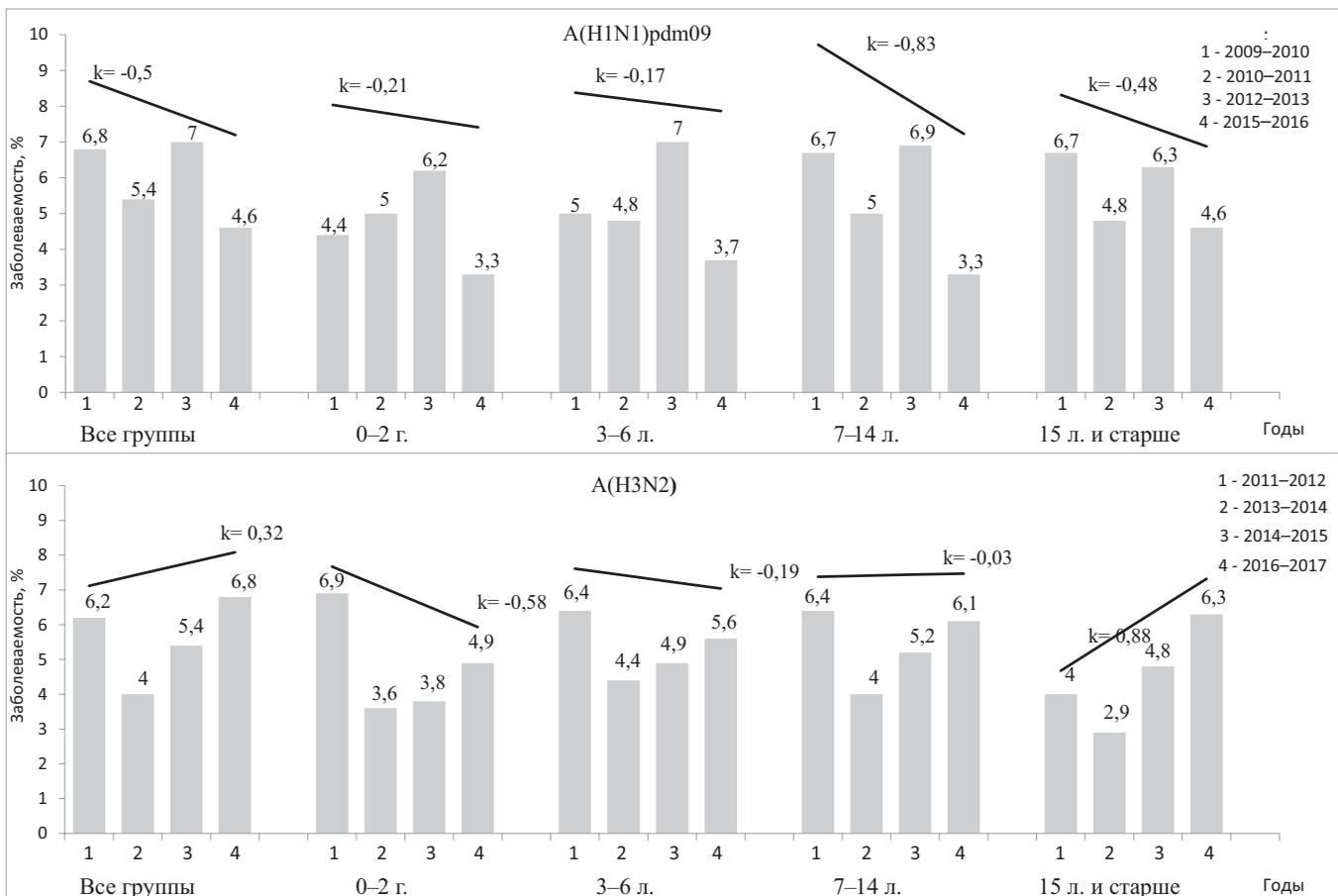


Рис. 3. Продолжительность эпидемий с участием гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2).

был наиболее выраженным ($k = -0,83$), чем среди взрослого населения ($k = -0,48$) и детей 0–2 и 3–6 лет ($k = -0,21$ и $k = -0,17$), а в эпидемии гриппа A(H3N2) – увеличился по населению в целом ($k = 0,32$) и только среди взрослого населения ($k = 0,88$), но уменьшился в детских возрастных группах ($k = -0,58$, $k = -0,19$, $k = -0,03$).

Доля госпитализированных среди заболевших гриппом и ОРВИ увеличилась в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 среди лиц старше 65 лет почти в 2 раза (с 1,4 до 2,7%), в эпидемии гриппа A(H3N2) также увеличился процент госпитализированных с гриппом и ОРВИ и отдельно – с гриппом.

Заболеваемость гриппом и ОРВИ в эпидемии с участием как гриппа A(H1N1)pdm09, так и A(H3N2) была больше в Северо-Западном и Уральском федеральных округах по сравнению с другими округами (рис. 4). В эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 по округам, как и по всей стране, отмечена тенденция снижения заболеваемости населения, коэффициент линейного уменьшения заболеваемости в среднем $k = -1,45$, эта тенденция была наиболее выражена в Центральном ($k = -1,78$) и Сибирском ($k = -1,8$) округах и менее выражена в Северо-Западном ($k = -1,14$), Приволжском ($k = -1$) и Уральском ($k = -0,83$) округах. В эпидемии гриппа A(H3N2) отмечена тенденция увеличения заболеваемости в округах, коэффициент линейного увеличения заболеваемости в среднем $k = 1,34$, эта тенденция была более выражена в Северо-Западном ($k = 2,16$), Уральском ($k = 1,98$) и

Центральном ($k = 1,71$) округах и менее выражена в Южном ($k = 0,97$) и Сибирском ($k = 0,74$) округах.

Число летальных исходов лабораторно подтвержденного гриппа в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 уменьшилось с 622 в сезон 2009–2010 гг. до 125 в сезон 2012–2013 гг. ($k = -2,08$). Пандемический грипп являлся основной причиной летальных исходов, даже в эпидемии 2013–2014 и 2014–2015 гг., когда основным возбудителем эпидемии был вирус гриппа A(H3N2) [3, 4]. В эпидемии гриппа A(H3N2) число летальных исходов увеличилось ($k = 0,19$), и в эпидемии 2016–2017 гг. от гриппа A(H3N2) умерли 22 человека из 24 зарегистрированных случаев смерти (рис. 5).

Летальность среди заболевших гриппом и ОРВИ в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 уменьшилась среди населения в целом в 1,7 раза и во всех возрастных группах населения, детей 0–14 лет в 2,7 раза и лиц в возрасте 15–64 лет в 2,5 раза за исключением лиц пожилого возраста, среди которых она увеличилась в 2,3 раза (рис. 6). Коэффициент угла наклона линии тренда для показателей летальности по населению в целом $k = -1,5$, наиболее выраженным был среди взрослого населения ($k = -5,0$), и менее выраженным у детей ($k = -0,17$), а среди лиц старше 65 лет этот коэффициент $k = 4,9$. В динамике эпидемий гриппа A(H3N2) выявлена тенденция увеличения показателей летальности по населению в целом ($k = 0,11$), при этом она была больше выражена среди лиц старше 65 лет ($k = 0,7$).

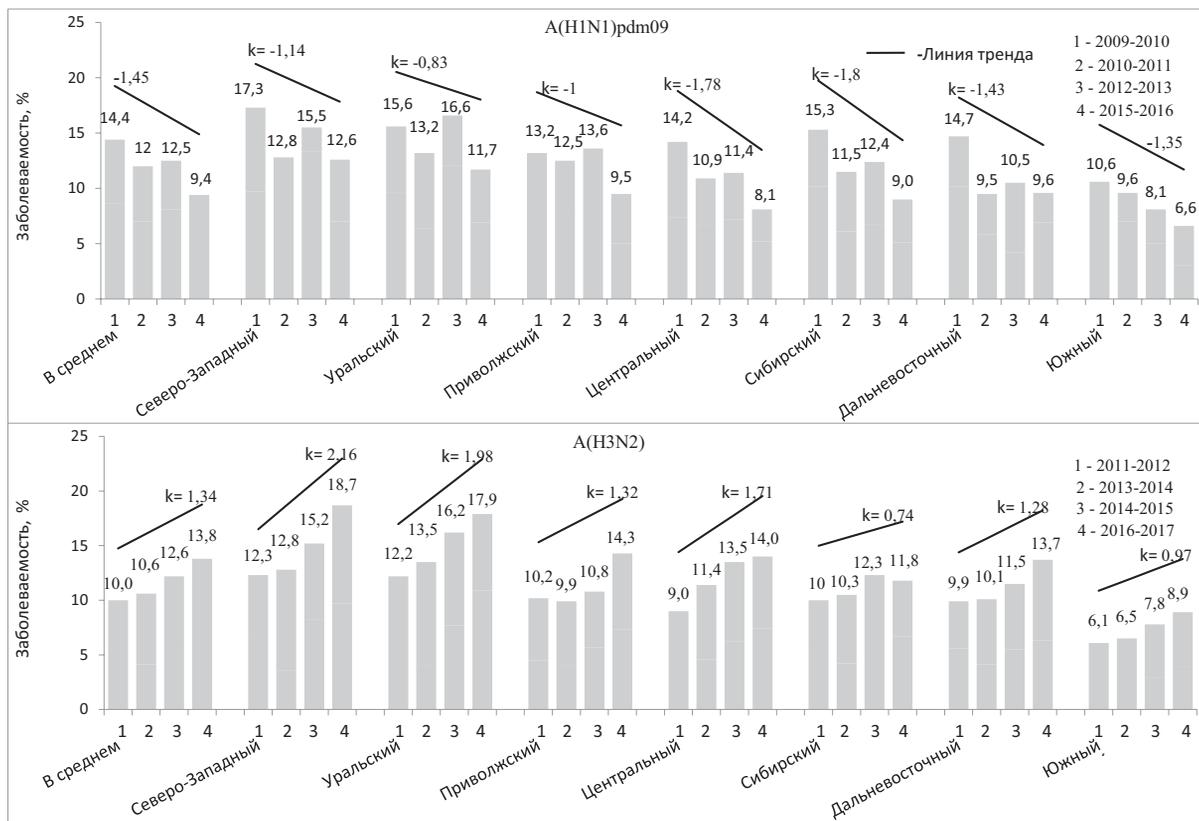


Рис. 4. Заболеваемость гриппом и ОРВИ по округам РФ во время эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 и A(H3N2).

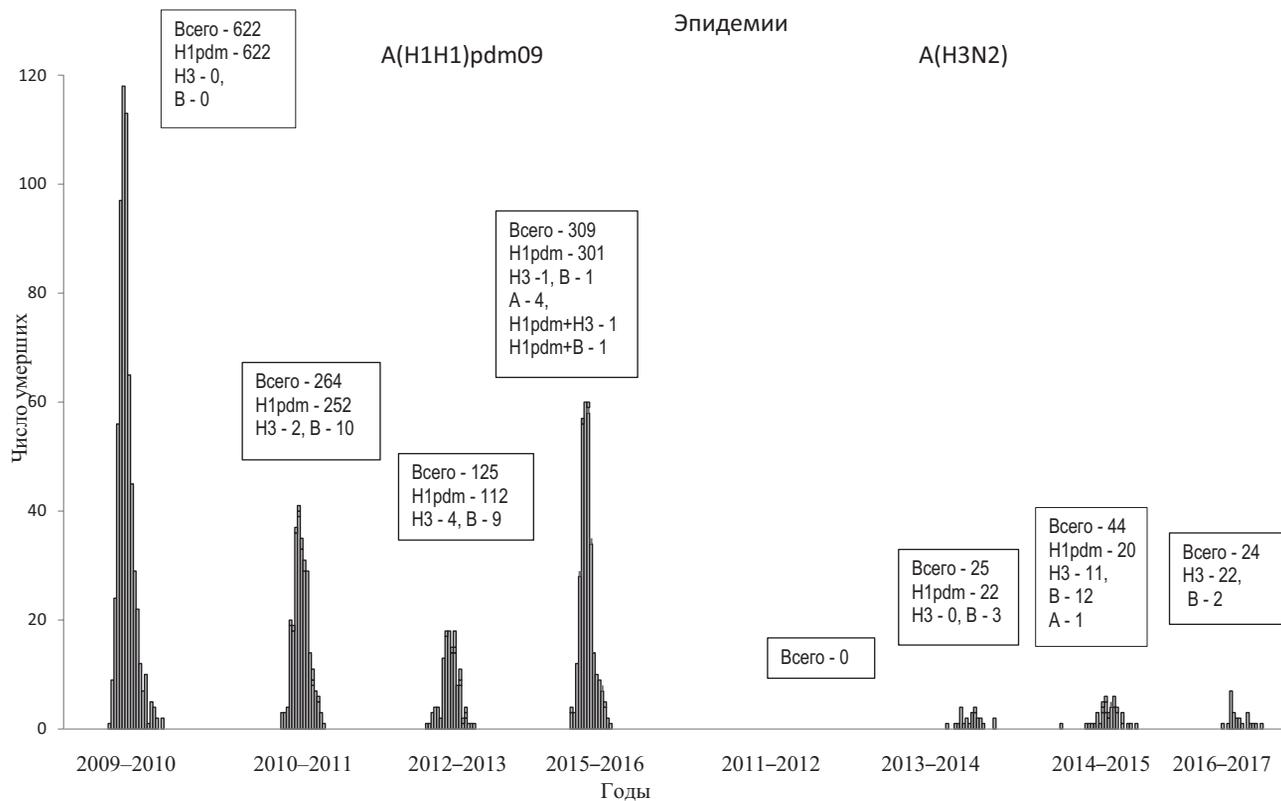


Рис. 5. Количество и этиология летальных исходов лабораторно подтвержденного гриппа в 59 городах РФ во время эпидемии пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 и гриппа A(H3N2).

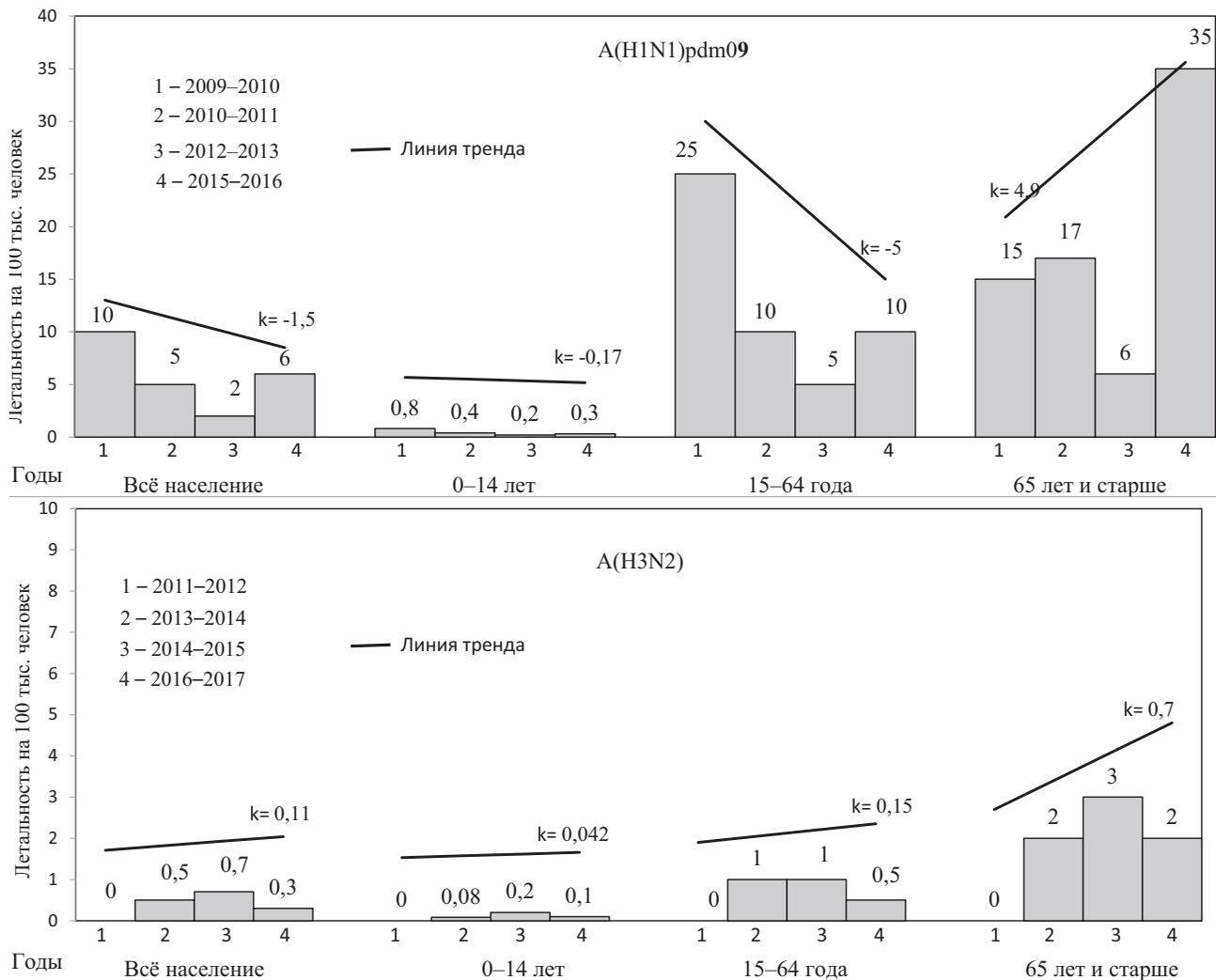


Рис. 6. Летальность вследствие лабораторно подтверждённого гриппа по возрастным группам заболевших гриппом и ОРВИ во время эпидемии с участием пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 и гриппа A(H3N2).

В эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 среди умерших уменьшилась доля молодых лиц в возрасте от 15 до 17 лет в 5 раз (с 1,5 до 0,3%; $p = 0,05$) и от 18 до 31 года – в 4,2 раза (с 27,2 до 6,5%; $p = 0,05$), но увеличилась доля лиц старше 54 лет: в возрасте 54–64 лет – в 2,5 раза (с 12,8 до 31,5%; $p = 0,05$) и старше 65 лет – в 7,8 раза (с 2,4 до 18,8%; $p = 0,05$). В эпидемии гриппа A(H3N2) среди умерших доля детей до 6 лет была больше, чем в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 в 3 раза (3,8% против 13%). Среди умерших доля лиц старше 65 лет, как и в эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09, увеличилась (с 12 до 30,4%; $p = 0,05$), но в меньшей степени (в 2,5 раза против 7,8 раза).

Сравнение хронической патологии у умерших в эпидемиях разной этиологии показало, что в динамике эпидемий пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 увеличилась доля лиц с патологией сердечно-сосудистой системы в 7 раз (с 7,1 до 51,6%; $p = 0,05$) и заболеваниями внутренних органов (печени и почек) в 4 раза (с 8,3 до 34,2%; $p = 0,05$). Диабет и ожирение по-прежнему были факторами риска смертельных исходов ($p = 0,05$). Снизилась доля беременных среди умерших в 4 раза (с 4,7 до 1,2%; $p = 0,05$). В эпидемии гриппа A(H3N2) заболевания сердечно-сосудистой системы остаются основным фактором риска

смертельных исходов. Снизилась роль как факторов риска смертельных исходов ожирения и диабета, но увеличивалась роль иммунодефицитов (с 8 до 17,4%; $p = 0,05$), заболеваний внутренних органов (с 12 до 38,6%; $p = 0,05$), болезней органов дыхания (с 8 до 21,7%; $p = 0,05$).

Обсуждение

Результаты сравнения заболеваемости населения по возрастным группам в России в целом и по регионам за период эпидемий свидетельствуют о снижении интенсивности эпидемий с участием пандемического гриппа A(H1N1)pdm09 с высокой до средней степени, в то время как интенсивность эпидемий гриппа A(H3N2) увеличилась от низкой до средней степени. Снижение интенсивности эпидемического процесса при гриппе подтипа A(H1N1), вызвавшего пандемию 2009 г., по-видимому, объясняется длительной, в течение 8 лет, циркуляцией вируса гриппа A(H1N1)pdm09, практически не изменившего антигенных свойств.

В возрастной структуре умерших в эпидемии гриппа A(H1N1) доля детей в возрасте до 6 лет была меньше (снижение от 2,8 до 3,8%), чем в эпидемии гриппа A(H3N2) (от 11,3 до 13%). Это может быть связано с

меньшей скоростью изменения антигенных свойств вируса гриппа подтипа А(Н1N1), чем подтипа А(Н3N2).

Увеличение среди умерших доли лиц с сердечно-сосудистой патологией и заболеваниями внутренних органов и уменьшение доли беременных в последние эпидемии с участием гриппа А(Н1N1)pdm09 связано со снижением заболеваемости среди лиц молодого возраста и увеличением заболеваемости лиц пожилого возраста.

Выводы

Сравнение эпидемий с участием пандемического гриппа А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) показало, что интенсивность эпидемий гриппа А(Н1N1)pdm09 снизилась с высокой до средней, а эпидемий гриппа А(Н3N2), наоборот, повысилась с низкой до средней.

В эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 снизились по населению в целом заболеваемость гриппом и ОРВИ (в 1,6 раза) и летальность среди заболевших (в 1,7 раза) и во всех возрастных группах, кроме лиц старше 65 лет, среди которых увеличилась заболеваемость (в 1,4 раза) и летальность (в 2,3 раза). В ходе эпидемии А(Н3N2) выявлена тенденция роста заболеваемости во всех возрастных группах и увеличения летальности, более выраженной среди лиц старше 65 лет.

Пандемический грипп остается основной причиной летальных исходов, но в эпидемии гриппа А(Н3N2) 2016—2017 гг. основной причиной летальных исходов был уже грипп А(Н3N2).

В возрастной структуре умерших во время эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 уменьшилась доля молодых лиц в возрасте от 15 до 31 года в 4–5 раз, в том числе беременных – в 4 раза, но увеличилась доля лиц старше 54 лет, особенно старше 65 лет, в 7,8 раза. В эпидемии гриппа А(Н3N2) также увеличилась доля лиц старше 65 лет, но только в 2,5 раза.

Среди умерших в эпидемии гриппа А(Н1N1)pdm09 увеличилась доля лиц с сердечно-сосудистой патологией в 7 раз и заболеваниями внутренних органов в 4 раза. Диабет и ожирение остались факторами риска смертельных исходов. В эпидемии гриппа А(Н3N2) факторами риска смертельных исходов по-прежнему были заболевания сердечно-сосудистой системы, снизилась роль ожирения и диабета, но увеличилась роль иммунодефицитов, заболеваний внутренних органов и болезней органов дыхания.

Финансирование. Работа выполнена на основе финансируемой НИР № гос. регистрации: АААА-А16-116022510058-5

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5, 10 см. REFERENCES)

1. МР 3.1.0005-10. Методика расчета эпидемических порогов по гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям по субъектам Российской Федерации. М.: 2010.
4. Цыбалова Л.М., Карпова Л.С. Пандемии гриппа. Пандемия гриппа А(Н1N1) 2009 г. в мире и России. В кн.: Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И., ред. *Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика*. М.: МИА; 2012: 188-206.
6. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В. и др. Особенности эпидемии гриппа на отдельных территориях России в эпидемическом сезоне 2012-2013 гг. доминирование штаммов вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в странах Европы. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(2): 5-10.
7. Карпова Л.С., Соминина А.А., Дмитриева М.Н., Поповцева

Н.М., Столярова Т.П., Киселев О.И. Сравнение пандемии гриппа в России 2009 – 2010 годах с последующими эпидемиями с участием гриппа А(Н1N1)pdm09 (2011 – 2014 гг.). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; 79(6): 8-15.

8. Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М., и др. Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(3): 19-24.
9. Карпова Л.С., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Столяров К.А., Соминина А.А., Бурцева Е.И. Анализ эпидемии гриппа 2016 года и пандемии 2009 года по материалам двух Национальных Центров ВОЗ в Российской Федерации. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 89(4): 4-12.
11. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В. и др. Вirological, epidemiological, clinical and molecular genetic features of influenza epidemics 2015-2016: доминирование вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в России и странах Северного Полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 159-66.

REFERENCE

1. MR 3.1.0005-10. The method of calculation of the epidemic threshold for influenza and acute respiratory viral infections the subjects of the Russian Federation. Moscow; 2010. (in Russian)
2. Vega T., Lozano J.E., Meerhoff T., Snacken R., Mott J., Ortiz de Lejarazu R., et al. Influenza surveillance in Europe: establishing epidemic thresholds by the moving epidemic method. *Influenza Other Respiratory Viruses*. 2011; 7(4): 546-58.
3. Vega T., Lozano J.E., Meerhoff T., Snacken R., Beaute J., Jorgensen P., et al. Influenza surveillance in Europe: comparing intensity levels calculated using the moving epidemic method. *Influenza Other Respiratory Viruses*. 2015; 9(5): 234-46.
4. Tsybalova L.M., Karpova L.S. Influenza pandemic. Pandemic influenza A (H1N1) 2009 Russia and the world. In: Kiselev O.I., Tsybalova L.M., Pokrovskiy V.I., eds. *Influenza: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Prevention [Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика]*. Moscow: MIA; 2012: 188-206. (in Russian)
5. Sominina A.A., Burtseva E.I., Eropkin M.Yu., Karpova L.S., Zarubaev V.V., Smorodintseva E.A., et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. *Am. J. Infect. Dis.* 2013; 9(3): 77-93.
6. L'vov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Kolobukhina L.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., et al. Characteristics of the epidemic of influenza in certain territories of Russia in the epidemic season 2012-2013, the dominance of strains of the influenza A(H1N1)pdm09 in Europe. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(2): 5-10. (in Russian)
7. Karpova L.S., Sominina A.A., Dmitrieva M.N., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Kiselev O.I. Comparison of pandemic influenza in Russia 2009 with subsequent epidemics involving influenza A(H1N1)pdm09 (2011 – 2014). *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2014; 79(6): 8-15. (in Russian)
8. Karpova L.S., Sominina A.A., Burtseva E.I., Pelikh M.Yu., Feodoritova E.L., Popovtseva N.M., et al. Comparison of influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 in the period from 2009 to 2013. *Voprosy virusologii*. 2015; 60(3): 19-24. (in Russian)
9. Karpova L.S., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Stolyarov K.A., Sominina A.A., Burtseva E.I. Analysis of the influenza epidemic in 2016 and pandemic in 2009 based on two National Centers of WHO in the Russian Federation. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2016; 89(4): 4-12. (in Russian)
10. Komissarov A., Fadeev A., Petrov S., Sergeeva M., Sintsova K., Egorova A., et al. Rapid spread of influenza A(H1N1)pdm09 viruses with a new set of specific mutations in the internal genes in the beginning of 2015/2016 epidemic season in Moscow and Saint-Petersburg (Russian Federation). *Influenza Other Respiratory Viruses*. 2016; 10(4): 247-53. DOI:10.1111/irv.12389.
11. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinical and molecular genetic features of influenza epidemics 2015-2016: dominance of influenza A(H1N1)pdm09 in Russia and the countries of the Northern Hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159-66. (in Russian)

Поступила 14.09.17

Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 578.82/83.083.2

Глотов А.Г.¹, Котенева С.В.¹, Глотова Т.И.¹, Южаков А.Г.², Максюттов Р.А.³,
Забережный А.Д.⁴

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕСТИВИРУСОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ВЫЯВЛЕННЫХ В СИБИРИ

¹ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий» РАН, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск;

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

³ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», 630559, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Кольцово;

⁴ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Представлены результаты филогенетического анализа 3 видов пестивирусов крупного рогатого скота, циркулирующих на территории 5 регионов Сибири, а также выявленных в эмбриональной сыворотке и перевиваемых культурах клеток, который был проведен на основе 5'-нетранслируемого региона (5'-UTR). Среди высокопродуктивного молочного скота установлена циркуляция 5 субтипов вируса вирусной диарей 1-го типа (a, b, d, f, r) и вируса 2-го типа. Преобладающим субтипом являлся BVDV1b (48% положительных проб). Филогенетический анализ выявил 5 субтипов BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) и 1r (8%). Вирус 2-го типа был обнаружен в 12% проб. В перевиваемых линиях культур клеток выявили BVDV1a. Распространение типов и субтипов вирусов имело географические различия. BVDV1b, BVDV1d, BVDV1f и BVDV1r выявляли у больных или персистоно инфицированных (ПИ) животных в хозяйствах, неблагополучных по респираторным болезням. BVDV1a обнаружили в сыворотке крови ПИ нетели без проявления клинических симптомов. BVDV2 вируса выявляли у животных с патологией воспроизводства. Присутствие BVDV3 (атипичный пестивирус) итальянской группы установлено в 7 лотах эмбриональной сыворотки, полученной от двух производителей. Не найдено доказательств циркуляции атипичного вируса среди крупного рогатого скота различных пород, в том числе завезённых по импорту, маралов, северных оленей. Исследования по молекулярной эпизоотологии пестивирусов можно использовать для выбора и оптимизации стратегии контрольных мероприятий и решения вопроса о применении вакцин в конкретном регионе.

Ключевые слова: вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек; вирус 1-го типа; вирус 2-го типа (BVDV1 и BVDV2); атипичный пестивирус (BVDV3); субтиты; крупный рогатый скот; полимеразная цепная реакция; геном; 5'-нетранслируемый регион; нуклеотидный сиквенс; филогенетический анализ; молекулярная эпизоотология.

Для цитирования: Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максюттов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 185-191. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>

Glotov A.G.¹, Koteneva S.V.¹, Glotova T.I.¹, Yuzhakov A.G.², Maksyutov R.A.³, Zaberezhnyy A.D.⁴ PHYLOGENETIC ANALYSIS OF BOVINE PESTIVIRUSES DETECTED IN SIBERIA

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-biotechnologies, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russian Federation;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

³State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation;

⁴All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation

The results of phylogenetic analysis of three species of bovine pestiviruses circulating in six regions of Siberia, as well as those detected in fetal embryonic serum (FBS) and continuous cell cultures, are presented. The typing was made based on comparison of sequences from the 5' untranslated region (5'-UTR) of the viral genome. Among the highly productive dairy cattle, circulation of five subtypes of the BVDV1 (a, b, d, f, r) and BVDV2 was established. The predominant subtype was 1b (48% positive samples). The number of subtypes of BVDV1 was as follows: BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) and 1r (8%) and BVDV2 (12%). Cell cultures revealed BVDV1a. The distribution of types and subtypes of viruses had geographical differences. BVDV1b, BVDV1d, BVDV1f and BVDV1r were detected in cattle or persistently infected (PI) animals in farms with respiratory distress. BVDV 1a revealed in the serum of PI heifer without manifestation of clinical symptoms. BVDV2 were detected in cattle with pathology of reproduction. The presence of the BVDV3 (atypical pestivirus) of the Italian group was established in seven lots of FBS obtained from two manufacturers. No evidence has been found for circulating of the atypical virus among cattle of various breeds, including imported, reindeers and red deers. Studies on the molecular epizootology of pestiviruses can be used to select and optimize the control strategy and address the issue of vaccine use in a particular region.

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, зав. лабораторией биотехнологии-диагностический центр СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Key words: *viral diarrhea-mucosal disease; BVDV1; BVDV2; atypical pestivirus (BVDV3); subtypes; cattle; polymerase chain reaction; genome; 5'-untranslated region; nucleotide sequencing; phylogenetic analysis; molecular epizootology.*

For citation: Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia. *Voprosy Virologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(4): 185-191. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>

For correspondence: Alexander G. Glotov, Dr. Sci. Veter., professor, Head of laboratory, Siberian Federal Scientific Centre of Agro-biotechnologies, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russian Federation. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about authors:

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>;

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>;

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>;

Yuzhakov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>;

Maksyutov R.A., <http://orcid.org/0000-0003-1314-281X>;

Zaberezhnyy A.D., <https://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

Acknowledgment. *The study had no sponsorship.*

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

Received 23 November 2017

Accepted 12 December 2017

Введение

Пестивирусы являются важной причиной экономического ущерба в индустрии молочного скотоводства. Болезни, вызываемые ими, распространены во всем мире с различной превалентностью, связанной с региональными особенностями стратегии ведения животноводства, в том числе в России [1–3].

Вирус вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС, BVDV) является прототипным членом рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Его геном представлен однонитевой РНК положительной полярности размером 12,3 тыс. нуклеотидов. Имеет одну открытую рамку считывания (ORF) длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), фланкированную с 5' и 3' концов нетранслируемыми областями (5'-UTR и 3'-UTR) [4].

Заболевание у крупного рогатого скота (КРС) вызывают 2 разных вида вируса – BVDV1 и BVDV2. Первый из них распространён повсеместно и в настоящее время насчитывает 21 субтип (от 1a до 1u) [5–7]. О выделении BVDV2 от КРС сообщали в США [8], Канаде [9], Бразилии [10], Уругвае [11], некоторых странах Европы: Германии [12], Словакии [13], Италии [14], Азии: Южной Кореи [15], Японии [16], Монголии [17]. Этот тип вируса подразделяется на 5 субтипов (от 2a до 2e) [18].

Для видовой дифференциации вирусов самым надёжным критерием является определение нуклеотидной последовательности геномной РНК. Чаще исследуют 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), являющийся высококонсервативной областью, подходящей для амплификации. Для филогенетического анализа дополнительно анализируют участок гена E2 (наиболее вариабельный) и участки генов E^{ns} и N^{pro} [5, 18].

Потенциальным кандидатом в члены рода является официально неклассифицированный вид вируса, имеющий в литературе несколько названий (BVDV3, NoBi-like pestivirus, атипичный пестивирус), проявляющий высокую степень сходства с BVDV1 и BVDV2. Его присутствие в популяции КРС может компрометировать программы контроля/эрадикации вирусной диареи – болезни слизистых оболочек. В настоящее время актуально изучение его распространения во всем мире через

торговлю животными, продуктами их происхождения и биологическими препаратами (сыворотка эмбрионов коров, культуры клеток, вакцины, сперма, эмбрионы для трансплантации) [19, 20]. Этот вирус впервые выделен в 2004 г. из эмбриональной сыворотки КРС, изготовленной в Бразилии [21], а позднее обнаружен у КРС в Южной Америке [22], Азии [23–25] и Европе [26, 27].

Данные о распространении и филогенетическом анализе пестивирусов КРС в России фрагментарны.

В связи с этим целью настоящей работы являлся филогенетический анализ 3 видов вирусов вирусной диареи – болезни слизистых оболочек, циркулирующих среди высокопродуктивного молочного скота в Сибири, а также присутствующих в образцах коммерческой эмбриональной сыворотки и перевиваемых линиях культур клеток.

Материал и методы

Исследования проводили в 5 регионах Западной и Восточной Сибири: Тюменской, Омской и Новосибирской областях, Красноярском и Алтайском краях, Северном Казахстане на 6 крупных молочных комплексах с поголовьем 800 и более дойных коров со среднегодовой продуктивностью 7–10 тыс. л и выше, где на момент исследований специфическая профилактика болезни не проводилась.

Пробы биоматериала брали от животных различных половозрастных категорий (ремонтные телки случного возраста, нетели, первотёлки, коровы дойные и в запуске, абортированные плоды и мертворождённые телята, телята в возрасте до 6 мес). Исследовали пробы сыворотки крови, лимфоидных органов от клинически здоровых животных (персистентная форма инфекции) и от животных с репродуктивными нарушениями и респираторным синдромом. С целью исключения острой формы инфекции индивидуальные пробы, давшие положительный результат при первом исследовании, отбирали от животных повторно через 30 дней. Диагноз на персистентную инфекцию ставили только при выявлении РНК вируса в парных пробах сыворотки крови. Пробы биоматериала, давшие положительный результат в ПЦР, хранили при -18°C до определения нуклеотидных последовательностей.

Всего исследовали 479 проб биоматериала, 18 образ-

цов эмбриональных сывороток КРС различных производителей: 12 получены из Южной Америки, 5 – из США и 1 – из Новой Зеландии, а также 9 линий перевиваемых культур клеток (MDBK, CRFK, RK13, ТЕВ, L929, MF (Mouse Fibroblasts), КСТ, ВНК21, Vero).

Дополнительно к предыдущим пробам на наличие BVDV3 исследовали 140 проб внутренних органов и 630 проб сыворотки крови от КРС разных пород, в том числе поступивших по импорту, 168 проб сыворотки крови северных оленей и 63 пробы крови маралов.

Молекулярные исследования проводили методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Выделение тотальной РНК вируса осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Реакцию обратной транскрипции для получения кДНК выполняли с использованием коммерческого набора «РЕВЕРТА-Л» производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Для выявления атипичного вируса ВД-БС КРС 1-го и 2-го типов в пробах биоматериала использовали панпраймеры согласно данным в работе [28], фланкирующие регион 5'-UTR с последующим секвенированием для определения принадлежности к типу/субтипу:

5' cat gcc cat agt agg ac 3',

5' cca tgt gcc atg tac ag 3'.

Для выявления атипичного вируса использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры собственного дизайна, комплементарные позициям 9202 – 9218 и 9501 – 9521 генома штамма D32/00_НоВи атипичного пестируса КРС (AB871953.1):

SEQ ID NO:1 – 5' ttgacgcccagcgtag 3',

SEQ ID NO:2 – 5' cctcctgcatctgtcacctt 3'.

Состав реакционной смеси включал следующие компоненты: ПЦР-буфер (60 мМ трис-НСI (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100), 0,2 мМ dNTP, по 0,1 мкг каждого праймера, 1,25 U Taq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК. Температурный режим проведения ПЦР: 95°C – 5 мин – 1 цикл; 95°C – 45 с, 55°C – 45 с, 72°C – 1 мин – 35 циклов; 72°C – 5 мин – 1 цикл.

Определение размера продуктов ПЦР. Продукты ПЦР анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере (рН 8,0) по общепринятой методике [28]. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор». Результат ПЦР с общими праймерами для выявления вирусов 2 типов считали положительным при соответствии длины продукта ПЦР размеру фрагмента 289 пар нуклеотидов (п. н.) и 320 п. н. для атипичного вируса.

Получение положительных контрольных образцов (ПКО) для BVDV3. Методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки вируса длиной 320 п. н., для контроля амплификации получали ПКО. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS («Invitrogen», США) и флуориметра QUBIT («Invitrogen», США). Она составила 0,333 мкг/мкл, что в пересчете на количество копий соответство-

вало $7,4 \cdot 10^{10}$ копий/мкл. Синтезированные ПКО использовали в качестве контроля ПЦР в связи с отсутствием РНК нативного вируса. Для определения чувствительности реакции готовили 10-кратные разведения ПКО, и каждое разведение подвергали исследованию в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный.

Определение нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора BigDye 3.1 («Applied Biosystems», США) в соответствии с указаниями фирмы производителя. Реакцию проводили в программируемом термостате GeneAmp PCR-system 6700 с использованием следующей программы:

Номер цикла	Температура, °C	Время
1-30	96	10 с
	50	15 с
	60	4 мин

После амплификации реакционную смесь очищали от невключившихся флуоресцентно меченных нуклеотидов очисткой на сефадексе G-50 superfine. Нуклеотидные последовательности определяли по обеим цепям ДНК. Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм) проводили с помощью программы Sequencer 4.0.5. («Gene Codes», США).

Анализ последовательностей. Анализ нуклеотидных последовательностей синтезируемых фрагментов проводили методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов BVDV1, BVDV2 и BVDV3 с помощью программы BioEdit 7.0.0. Построение дендрограмм проводили при помощи метода наибольшего правдоподобия (ML – maximum likelihood) в программе MEGA v.7 [30]. Для оценки достоверности топологии использовали бутстрэп-тест (1000 репликаций) [31].

Результаты

BVDV1 и BVDV2. По результатам ПЦР 46 проб биоматериала от животных содержали геном пестирусов, что составило 9,1%, из которых первичные нуклеотидные последовательности удалось определить только для 25 (5,2%) проб.

Количество положительных проб по регионам составило: Тюменская область – 15, Новосибирская область – 6, Омская область – 1, Красноярский край – 2, Северный Казахстан – 1. Всего 25 проб.

В результате среди высокопродуктивного молочного скота установлена циркуляция 5 субтипов вируса вирусной диареи 1-го типа (a, b, d, f, r) и вируса 2-го типа. Преобладающим субтипом являлся BVDV1b (48% положительных проб). Филогенетический анализ выявил 5 субтипов BVDV1: 1a (8%), 1b (48%), 1d (8%), 1f (16%) и 1r (8%). Вирус 2-го типа был обнаружен в 12% проб.

Распространение субтипов имело некоторые географические различия. Вирус субтипа 1a выявили только в Тюменской области во внутренних органах абортированного плода и сыворотке крови телёнка австрийского и голландского происхождения соответственно.

Вирус субтипа 1b выявляли также у животных в Тюменской области, завезённых из Голландии, США, Словении, Германии и Дании с ПИ животными. Две пробы, принадлежащие к этому субтипу, были выявлены в Новосибирской области в сыворотках крови коровы мест-

ной породы и нетели из Германии. В одном случае вирус этого субтипа обнаружили в пробе сыворотки коровы из Красноярского края.

Субтип 1f был обнаружен в Северном Казахстане в пробе сыворотки крови телёнка с респираторной патологией, рождённого нетелью, завезённой из Германии. Также его выявили в сыворотках крови ПИ животных Тюменской, Омской областей и во внутренних органах телёнка с пневмонией в Красноярском крае. Вирус субтипа 1d обнаружили в одном из хозяйств Тюменской (страна-импортёр – Франция) и Новосибирской области (местный скот). Субтип 1g выявили в крови телёнка с респираторной патологией в Тюменской области и селезёнке телёнка местной породы в неблагополучном по респираторным болезням хозяйстве Новосибирской области.

В данной работе нам не удалось определить субтип BVDV2, однако его присутствие было установлено в 12% проб, отобранных от животных с патологией органов воспроизводства, в 2 случаях от животных в Новосибирской области в 2006 и 2010 гг. (абортплоды, местный скот) и в 2013 г. в тканях мертворождённого телёнка от нетели, завезённой в Тюменскую область из США. Хозяйства, в которых был обнаружен этот тип вируса, находились на расстоянии не менее 1000 км друг от друга и не имели связей между собой, что исключает обмен вирусами. Исходя из этого можно предположить, что данный тип вируса существовал у животных отечественных пород задолго до ввоза импортированных и играет определённую роль в возникновении патологии воспроизводства у КРС. Эпизоотологические данные свидетельствуют о низкой вирулентности отечественного вируса, так как показатели заболеваемости и летальности животных были ниже, чем в хозяйстве Тюменской области.

Выявленное в данной работе генетическое разнообразие вирусов предполагает существование различных источников возбудителя, включая импортных высокопродуктивных животных, создаёт риск неконтролируемого его распространения в регионе.

Во всех проверенных нами перевиваемых линиях культур клеток присутствовал в качестве контаминанта BVDV1a. В настоящее время причину такой контаминации установить сложно, так как в процессе культивирования этих линий с 1994 г. использовались различные сыворотки различных производителей. В двух из них выявили геном BVDV1j. Возможно, занос вируса был одномоментным при использовании этих партий сыворотки.

Филогенетическое дерево, построенное на основании сиквенса 5'-UTR региона вируса, приведено на рис 1.

BVDV3. Геном вируса выявили только в 7 из 18 образцов эмбриональных сывороток двух производителей, имеющих в нашем распоряжении. Результаты филогенетического анализа показали, что все 7 проанализированных нуклеотидных последовательностей наиболее близки к штаммам BVDV3, ранее выделенным в Италии. Результаты представлены на рис. 2. Геном вируса присутствовал в 2 лотах (сериях) сыворотки российского производства (расфасовки) (ООО «Биолот») и 5 сериях PAA Laboratories. Следует отметить, что случайно отобранные эмбриональные сыворотки, содержащие атипичный вирус, использовались для культивирования перевиваемых линий культур клеток в 4 российских НИИ ветеринарного и медицинского профиля начиная с

90-х годов прошлого столетия. Результаты исследования проб сыворотки крови и биоматериала от животных в ПЦР на атипичный пестивирус были отрицательными.

Обсуждение

Известно, что пестивирусы благодаря строению своего генома обладают большой мутацонной активностью, выражающейся в постоянно увеличивающемся генотипическом и фенотипическом многообразии штаммов, роль которых в патологии животных до конца не изучена. Существование полиморфизма вирусов затрудняет диагностику болезней и может снижать эффективность вакцинации и контрольных программ, основанных на применении специфической профилактики болезни.

Так, S. Silveira и соавт. [10] в результате филогенетического анализа 81 изолята пестивирусов, полученных от животных крупных молочных ферм, а также из образцов эмбриональной сыворотки, культур клеток, 53,9% отнесли к BVDV1, 33,7% – к BVDV2 и 12,4% – к BVDV3. Распределение субтипов было следующим: BVDV1a – 35,9%, BVDV2b – 31,4%, BVDV1b – 10,1%, BVDV1d – 6,7%, BVDV2c – 2,2% и BVDV1e – 1,1%. BVDV2c и BVDV1e были выявлены впервые в этой стране. Результаты работы подтвердили существование генетической гетерогенности вирусов. Авторы считают, что полученная информация может служить основой для разработки и оценки диагностических тестов, более эффективных вакцин и программ контроля.

Китайскими исследователями M. Deng и соавт. [7] на основании филогенетического анализа гена 5'-UTR 124 проб выявлено преобладание BVDV1 и его субтипов: BVDV1b (33,06%), BVDV1m (49,19%) и нового кластера, обозначенного как BVDV1u (17,74%).

Нами на основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири установлена циркуляция BVDV2 и 5 субтипов BVDV1 (1a, 1b, 1d, 1f, 1r). Дополнительно в эмбриональной сыворотке и культурах клеток обнаружен BVDV1a. В 7 партиях сыворотки, использованной нами для культивирования в 2001–2012 гг., выявили BVDV3, наиболее близкий к атипичным пестивирусам, выделенным в Италии.

В данной работе для секвенирования мы использовали высококонсервативный регион пестивирусов 5'-UTR, что является общепринятым. Использование этого региона даёт наиболее точные результаты, особенно в отношении распределения изолятов вирусов по видам или типам (генотипам), поэтому он является областью, из последовательностей которой наиболее часто выбираются праймеры [5, 28].

В зарубежной литературе есть сообщения о выявлении генома пестивирусов в эмбриональной сыворотке. Например, M. Giammaglioli и соавт. [27] в результате исследования методом ПЦР 26 архивных партий препарата, полученных в 1992–2013 гг., прошедших процесс фильтрования и гамма-облучения, выявили как минимум по одному пестивирусу КРС в каждой из них. Двадцать серий были положительны на BVDV1, 10 – на BVDV2, а 15 содержали NoBi-like вирус. Семь партий были произведены в Южной Америке и одна – в Австралии. Страна происхождения для оставшихся 7 серий не была определена. Филогенетический анализ показал, что обнаруженный вирус относится к бразильской группе вирусов и был занесен в Италию с эмбриональной сывороткой.

По данным F.V. Bauermann и соавт. [32], исследовав-

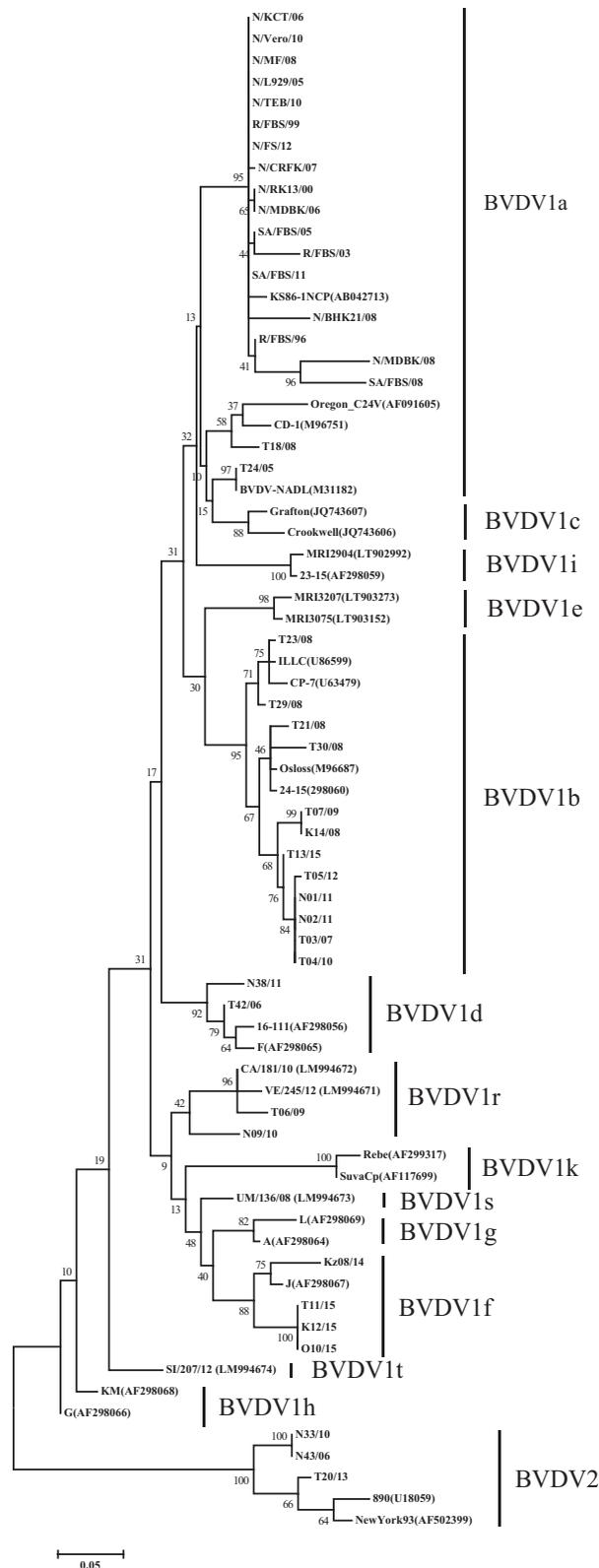


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка 5' нетранслируемой области генома вируса диареи КРС. Здесь и на рис. 2: выравнивание последовательностей провели с использованием ClustalW-метода. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Для референсных штаммов указано название и номер в базе данных GenBank.

ших 90 серий коммерческой сыворотки, произведённой в США, но расфасованной в Европе, вирус обнаружен не был, что дало основание авторам сделать заключение об отсутствии циркуляции вируса в этой стране. Однако часть лотов содержала BVDV. Филогенетический анализ 20 положительных серий показал, что в 19 из них присутствовал BVDV1, а в одной – BVDV2.

Этот факт свидетельствует о возможной контаминации эмбриональных сывороток, маркированных как «произведено в США», в процессе изготовления и упаковки, неправильной маркировки после обработки и смешивания в других географических регионах мира. Это может настораживать, так как на рынке этого препарата чаще всего присутствуют партии, маркированные как «сделано» в США или Австралии, но, по официальным данным, эти страны свободны от атипичного вируса КРС.

Ранее нами была установлена циркуляция BVDV1b, BVDV1d и BVDV2 среди местного скота. В настоящей работе вновь найдено подтверждение циркуляции этих типов вирусов среди местного и импортного КРС [33].

В нашей стране исследования по изучению контаминации культур клеток вирусом вирусной диареи проводили Л.В. Урываев и соавт. [34, 35], которые анализировали частоту контаминации 127 клеточных линий и эмбриональных сывороток телят (ЭТС), используемых в биологических и вирусологических исследованиях, нецитопатогенным BVDV. С использованием моноклональных антител к гликопротеину оболочки вириона вирус выявили в 33% образцов клеток (из 131 клеточной линии и отливок) и более чем в 60% случаев — в ЭТС (из 37 проверенных партий). Установили способность вируса инфицировать широкий спектр культур разной видовой, тканевой и органной специфичности культур и сывороток для их роста (MDBK, ПЭК, Vero, MDCK и др.).

С.В. Алексеев и соавт. [36] установили, что культуры клеток бычьего и свиного происхождения подвержены контаминации вирусом диареи КРС. Результаты филогенетического анализа штаммов MDBK/12, SPEV/12 и KST/12, обнаруженных в одноимённых клеточных культурах, показали их значительное сходство между собой и с эпизоотическим штаммом 190NCP нецитопатогенного биотипа, обнаруженным в Японии в 1987 г. во время вспышки геморрагического гастроэнтерита (сходство первичной структуры генома свыше 98%). Источником вируса, вероятно, послужила сыворотка КРС, используемая в составе среды для роста клеток.

С.В. Вангели и соавт. [37] выявили смешанную хроническую инфекцию перевиваемых культур клеток, используемых при производстве антигена для серологической диагностики лейкоза КРС.

В отношении BVDV3 в доступной отечественной литературе нам удалось найти сообщение об обнаружении атипичного пестивируса в составе коммерческой вакцины против чумы мелких жвачных животных на территории Республики Таджикистан [38].

Распространение этого вируса в отличие от вируса ВД-БС КРС, возможно, ограничено несколькими регионами. Впервые NoBi-like вирус был выделен из партии эмбриональной сыворотки, собранной в Бразилии, но расфасованной в Европе, и охарактеризован в Германии Н. Schirgmeier и соавт. [21]. Изолят, названный D32/00_NoBi, был признан прототипным для бразильской группы вирусов. После этого несколькими авторами были

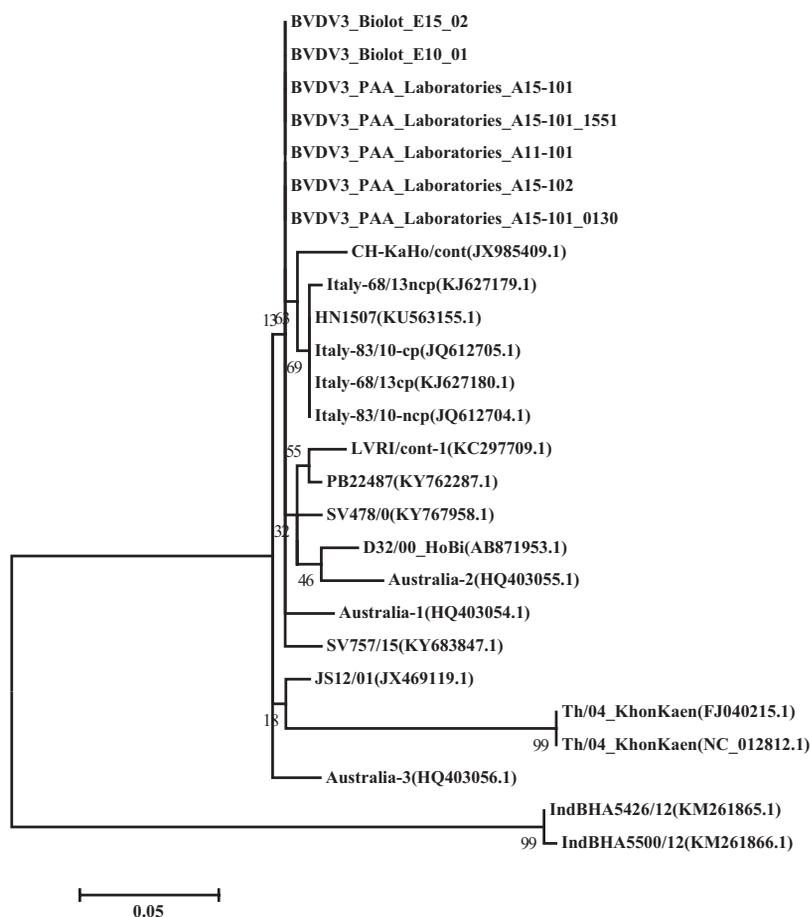


Рис. 2. Филогенетическая дендрогрaмма, построенная на основе участка гена N^{pro} генома вируса диареи КРС 3-го типа.

идентифицированы генетически различающиеся под-типы, имеющие региональное распространение, в частности тайский [32]. Затем N. Mishra и соавт. [25] предположили существование третьей, индийской, группы штаммов. Недавно идентифицирована четвертая группа вирусов, выделенных за пределами Индийского региона, в частности в Италии [27]. Таким образом, к настоящему времени установлено наличие 4 генетических групп данного вируса.

В настоящей работе нами подтверждено присутствие BVDV3 итальянской группы в исследованных образцах коммерческих лотов эмбриональной сыворотки, которая используется на территории России.

Заключение

Если учесть, что в России меняется стратегия ведения животноводства, возрастает количество молочных «мега-ферм», изучение генетического разнообразия пестивирусов является актуальным. В данной ситуации необходимо проводить исследование молекулярной эпизоотологии пестивирусов, циркулирующих среди КРС на молочных комплексах, особенно с наличием животных, завезённых из разных стран. Сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании

новых и высоковирулентных штаммов вирусов. Нами на основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири установлена циркуляция BVDV2 и 5 субтипов BVDV1 (1a, 1b, 1d, 1f и 1r). Преобладающим субтипом является BVDV1b. Распространение типов и субтипов вирусов имеет географические различия. В связи с этим исследования молекулярной эпизоотологии пестивирусов КРС в конкретном регионе можно выполнять с целью оптимизации и выбора стратегии контрольных мероприятий на региональном уровне и решать вопросы о применении вакцин. Это особенно важно при реализации программ вакцинации животных, когда генетические типы вакцинных штаммов не совпадают с типами, циркулирующими среди животных на конкретной территории. Полученная в ходе таких исследований информация может быть полезной при изучении молекулярной эпизоотологии вирусов, разработке эффективных вакцин и программ контроля инфекции.

Выявление BVDV3 в пробах эмбриональной сыворотки создает риск контаминации биологических препаратов и распространения его на территории России.

Полученные данные подтверждают необходимость постоянного обновления и совершенствования методов диагностики пестивирусов КРС, а также соблюдения правил международной торговли эмбриональной сывороткой и животными.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-19, 21-32 с.м. REFERENCES)

- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-1.
- Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13-8.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(4): 399-8.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(6): 43-7.
- Урываев Л.В., Дедова А.В., Дедова Л.В., Ионова К.С., Парасюк Н.А., Селиванова Т.К. и др. О контаминации клеточных культур вирусом диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV). *Бюллетень экспериментальной биологии медицины*. 2012; 153(1): 88-3.
- Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А. и др. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии*. 2012; 5(57): 15-21.
- Алексеевкова С.В., Юров Г.К., Гальбек Т.В., Калита И.А., Юров К.П. Проверка клеточных культур на контаминацию вирусом

диареи крупного рогатого скота — необходимое условие производства биологических препаратов. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013; (1): 15-8.

37. Вангели С.В., Надточей Г.А., Гальнбек Т.В. Смешанные инфекции РНК-содержащих вирусов, в перевиваемых культурах клеток. *Инфекционные болезни*. 2016; 51(14): 57.
38. Юров К.П., Аноятбекова А.М., Алексеенкова С.В. Новый пестивирус-Хоби вирус-контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных. *Ветеринария*. 2016; (10): 8-10.

REFERENCES

1. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105-1.
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. Distribution of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-1. (in Russian)
3. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhoea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13-8. (in Russian)
4. Simmonds P., Becher P., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Meyers G., et al. Family Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Science; 2011: 1003-20.
5. Vilcek S., Durkovic B., Kolesarova M., Paton D.J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev. Vet. Med.* 2005; 72(1-2): 31-5.
6. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Perez Aguirreburualde M.S., Combessies G., Odeón A.C., et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96(1): 204-2.
7. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y., et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134777.
8. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129-9.
9. Carman S., Van Dremel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10(1): 27-5.
10. Silveira S., Weber M.N., Mósena A.C., da Silva M.S., Streck A.F., Pescado C.A., et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(2): 613-23.
11. Maya L., Puentes R., Reolón E., Acun P., Riet F., Rivero R., et al. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 2016; 161(3): 529-5.
12. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 2001; 76(1): 31-2.
13. Novácková M., Jacková A., Kolesárová M., Vilcek S. Genetic analysis of a bovine viral diarrhoea virus 2 isolate from Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52(3): 161-6.
14. Luzzago C., Lauzi S., Ebranati E., Giammarioli M., Moreno A., Cannella V., et al. Extended genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus and frequency of genotypes and subtypes in cattle in Italy between 1995 and 2013. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 147145.
15. Oem J.K., Hyun B.H., Cha S.H., Lee K.K., Kim S.E., Kim H.R., et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2009; 139(3-4): 356-60.
16. Yamamoto T., Kozasa T., Aoki H., Sekiguchi H., Morino S., Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet. Microbiol.* 2008; 127(3-4): 386-1.
17. Ochirkhuu N., Konnai S., Odbileg R., Odzaya B., Gansukh S., Murata S., et al. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.* 2016; 161(8): 2279-83.
18. Giangaspero M., Harasawa R. Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type 1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 5'-untranslated region. *J. Virol. Methods*. 2014; 195: 34-53.
19. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2013; 25(1): 6-15.
20. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical pestiviruses of cattle. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2015; 50(4): 399-8. (in Russian)
21. Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 12): 3647-2.
22. Weber M.N., Mósena A.C.S., Simoes S.V.D., Almeida L.L., Pessoa C. R. M., Budaszewski R.F., et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with "HoBi"-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(1): 92-100.
23. Mao L., Li W., Zhang W., Yang L., Jiang J. Genome sequence of a novel Hobi-like pestivirus in China. *J. Virol.* 2012; 86(22): 12444.
24. Haider N., Rahman M.S., Khan S.U., Mikolon A., Gurley E.S., Osman M.G., et al. Identification and epidemiology of a rare HoBi-like pestivirus strain in Bangladesh. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(3): 193-8.
25. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014; 174: 239-6.
26. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camero M., et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(8): 1549-2.
27. Giammarioli M., Ridpath J.F., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., De Mia G.M., et al. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*. 2015; 43(4): 220-4.
28. Ridpath J.F., Bolin S.R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes*. 1998; 12(2): 101-6.
29. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Ac. Res.* 1994; 22(22): 4673-80.
30. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4.
31. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 1985; 125(1): 1-15.
32. Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R., Ridpath J. F. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26(1): 10-7.
33. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Zaberezhnyy A.D., Aliper T.I. Isolation of noncytopathogenic genotype 2 bovine viral diarrhoea virus from the cattle mucosa in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(6): 43-7. (in Russian)
34. Uryvaev L.V., Dedova A.V., Dedova L.V., Ionova K.S., Parasyuk N.A., Selivanova T.K., et al. On the contamination of cell cultures by the virus of diarrhoea-disease of mucous membranes of large cattle (BVDV). *Byulleten' eksperimental'noy biologii meditsiny*. 2012; 153(1): 88-3. (in Russian)
35. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., et al. Analysis of contamination of cell cultures with Pevidovirus BVDV and mycoplasmas. *Voprosy virusologii*. 2012; 5(57): 15-21. (in Russian)
36. Alekseenkova C.V., Yurov G.K., Gal'nbeek T.V., Kalita I.A., Yurov K.P. Checking of cell cultures for contamination with a bovine diarrhoea virus is a necessary condition for the production of biological preparations. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnyye*. 2013; (1): 15-8. (in Russian)
37. Vangeli S.V., Nadtochey G.A., Gal'nbeek T.V. Mixed infections of RNA-containing viruses, in transplantable cell cultures. *Infektsionnye bolezni*. 2016; 51(14): 57. (in Russian)
38. Yurov K.P., Anoyatbekova A.M., Alekseenkova S.V. The new pestivirus - Hobi virus - is a contaminant vaccine against the plague of small ruminant animals. *Veterinariya*. 2016; (10): 8-10. (in Russian)

Поступила 23.11.17

Принята в печать 12.12.17

ИНФОРМАЦИЯ

Анонс VIII Международного ветеринарного конгресса

С 23 по 25 апреля 2018 г. в Москве, в Доме Союзов, прошел VIII Международный ветеринарный конгресс. Организатором мероприятия выступила Российская ветеринарная ассоциация при поддержке Министерства сельского хозяйства, Российского птицеводческого союза и Национального союза свиноводов. На Конгресс съехались более 1300 участников из-за рубежа и из различных уголков страны. Это всемирно известные зарубежные ученые, руководители государственной ветеринарной службы субъектов РФ, главные врачи комплексов, зоотехники, руководители предприятий и холдингов, ведущие ветеринарные специалисты диагностических лабораторий от федерального до участкового уровня, представители практически всех направлений ветеринарной деятельности, научные сотрудники биологических и ветеринарных НИИ, аспиранты, студенты.

С целью обеспечения эффективной и плодотворной работы в рамках мероприятия была организована работа следующих секций: ключевая секция «Единый мир – единое здоровье» и секции по проблемам ветеринарии в птицеводстве, свиноводстве, молочном и мясном животноводстве, зооантропонозов, аквакультуры, обращения лекарственных средств на территории действия Евразийской экономической комиссии (ЕАЭК).

Для обсуждения были выбраны самые актуальные темы сегодняшнего дня – «Новые и возвращающиеся инфекции – угроза биологической безопасности», «Климатические изменения и новые быстрораспространяющиеся вирусы», «Мировые и российские тренды развития птицеводства: реалии и вызовы будущего», «Современные молекулярно-генетические технологии для разработки противовирусных вакцин», «Ключевые точки эрадикации АЧС», «Новые стратегии прогнозирования и контроля вспышек ящура», «Болезни высоких технологий», «Мониторинг антирабического поствакцинального иммунитета плотоядных», «Стратегия безопасности продукции водного промысла и аквакультуры в России», «Проблемы обращения лекарственных средств для ветеринарного применения» и другие.

На ключевой конференции «Единый мир – единое здоровье» (модераторы: заместитель министра сельского хозяйства Российской Федерации доктор биологических наук, профессор Е.А. Непоклонов и заместитель директора Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ) им. Я.Р. Коваленко доктор биологических наук, профессор А.Д. Забережный) были заслушаны три часовых доклада: «Новые и возвращающиеся инфекции – угроза биологической безопасности (академик РАН Д.К. Львов, академик РАН М.И. Гулюкин, профессор Т.И. Алипер, профессор Е.А. Непоклонов, профессор П.Г. Дерябин); «Вновь возникающие коронавирусы человека и животных» (академик Национальной академии наук США Линда Сайф); «Распространение вирусов, обусловленное изменением климата (профессор Энхуанес Луис, Мадрид, Испания).

Ведущий докладчик конференции – академик РАН, руководитель отдела экологии вирусов Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Дмитрий Константинович Львов.

Доклад академика РАН Д.К. Львова был встречен с профессиональной заинтересованностью слушателями секции и зарубежными учеными, присутствовавшими на конгрессе, активно комментировался в прессе, аккредитованной на форуме, и в специализированных изданиях.