

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

**Почтовый адрес:**

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

**Адрес редакции:** 129515,  
Москва, ул. 1-я Останкинская, д. 26  
Зав. редакцией *Т.М. Курушина*  
Тел.: +7-495-150-07-47 доб. 402  
E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

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

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

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

Сдано в набор 13.11.2018.  
Подписано в печать 3.12.2018.  
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. № 5. 193-240.

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.

**5**

**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 • 5 • 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, Ukraina)

**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

- Львов Д.К., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.** Плазмиды архей как возможные предки ДНК-содержащих вирусов ..... 197
- Андропова В.Л.** Современная этиотропная химиотерапия цитомегаловирусной инфекции человека: клиническая эффективность, молекулярный механизм действия, лекарственная устойчивость, новые тенденции и перспективы. Часть 1. .... 202

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Иванова Э.С., Воробьева Н.Н., Шелудько В.С.** Опыт применения никавира в схемах перинатальной химиопрофилактики ВИЧ-инфекции: оценка иммунологической и вирусологической эффективности ..... 212
- Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Григорян С.С., Исаева Е.И., Балакина А.А., Терентьев А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А.** Механизм действия стимфорте на герпесвирусную инфекцию ..... 218
- Лосич М.А., Зайкова О.Н., Непоклонова И.В., Гребенникова Т.В., Верховский О.А., Оदनоров А.И., Алипер Т.И.** Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA - СВ 20М вируса бешенства ..... 224
- Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В., Мусаева Т.Д., Афанасьева В.С., Го А.А., Образцова Е.А., Суховецкая В.Ф., Комиссаров А.Б.** Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012-2016 гг. .... 233

### НЕКРОЛОГ

- Памяти В.А. Лашкевича. .... 240**

## CONTENTS

### REVIEWS

- Lvov D.K., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V.** Plasmids of archaea as possible ancestors of DNA-containing viruses ..... 197
- Andronova V.L.** Modern ethiotropic chemotherapy of human cytomegalovirus infection: clinical effectiveness, molecular mechanism of action, drug resistance, new trends and prospects. Part 1 ..... 202

### ORIGINAL RESEARCH

- Ivanova E.S., Vorobeveva N.N., Shelud'ko V.S.** The experience in the application of nikavir in the schemes of perinatal chemoprophylactics of HIV infection: evaluation of the immunological and virusological effectiveness ..... 212
- Maldov D.G., Andronova V.L., Grigorian S.S., Isaeva E.I., Balakina A.A., Terentyev A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A.** The mechanism of stimforte action on herpesvirus infection ..... 218
- Losich M.A., Zaykova O.N., Nepoklonova I.V., Grebennikova T.V., Verkhovsky O.A., Odnovorov A.I., Ali-per T.I.** Molecular and biological characteristics of vaccinal ERA-CB 20M of rabies virus ..... 224
- Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., Musaeva T.D., Afanaseva V.S., Go A.A., Obratsova E.A., Sukhovetskaya V.F., Komissarov A.B.** Etiological structure of influenza and other ARVI in St. Petersburg during epidemic seasons 2012-2016 ..... 233

### OBITUARY

- In memory of V.A. Lashkevich**

#### 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](http://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

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 577.083.3, 576.6.086.83

Львов Д.К.<sup>1</sup>, Сизикова Т.Е.<sup>2</sup>, Лебедев В.Н.<sup>2</sup>, Борисевич С.В.<sup>2</sup>

## ПЛАЗМИДЫ АРХЕЙ КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРЕДКИ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;<sup>2</sup>ФГБУ «48 Центральный НИИ» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад-6

Царство Археи (Archaea) наряду с бактериями (Bacteria) относятся к надцарству Prokaryota. Солелюбивые археи (*Halorubrum lacusprofundi*), изолированные из солевых озер Антарктиды, содержат плазмиды (pR1SE), которые кодируют белки, участвующие в формировании стенок везикул архей. В настоящем обзоре представлены данные о молекулярно-генетических и биологических свойствах плазмиды pR1SE и особенностях взаимодействия плазмид с чувствительными клетками архей. Особое внимание обращено на роль структурных белков, кодируемых плазмидой pR1SE, в процессе формирования мембранного комплекса везикул. Везикулы архей, содержащие плазмиды, моделируют некоторые свойства вирусов. Плазмиды архей могут рассматриваться как возможные предки ДНК-содержащих вирусов.

Ключевые слова: обзор; плазмиды; археи; везикулы; геном; ген; ДНК; вирусы; структурные белки; клеточные мембраны.

Для цитирования: Львов Д.К., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Плазмиды архей как возможные предки ДНК-содержащих вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 197-201.  
DOI: [http://dx.doi.org/ 10.18821/0507-4088-2018-63-5-197-201](http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-197-201)

Lvov D.K.<sup>1</sup>, Sizikova T.E.<sup>2</sup>, Lebedev V.N.<sup>2</sup>, Borisevich S.V.<sup>2</sup>

## PLASMIDS OF ARCHAEA AS POSSIBLE ANCESTORS OF DNA-CONTAINING VIRUSES

<sup>1</sup> National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;<sup>2</sup> 48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

The kingdom Archaea, as well as Bacteria, belongs to the overkingdom Prokaryota. Halophilic archaea (*Halorubrum lacusprofundi*) isolated from Antarctic saline lakes contain plasmids (pR1SE) that code proteins taking part in the formation of membranes of archaea vesicles.

The molecular and biological properties of pR1SE and the peculiarity of its interaction with sensitive cells are considered in this article.

The role of structural proteins coded by pR1S in the process of formation of vesicle membrane complex is paid special attention. Plasmid-containing archaea vesicles model some properties of viruses. Archaea plasmids can be viewed as possible ancestors of DNA-containing viruses.

Key words: review; plasmids; archaea; vesicles; genome; gene; DNA; viruses; structural proteins; cell membranes.

For citation: Lvov D.K., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Plasmids of archaea as possible ancestors of DNA-containing viruses. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 197-201. (In Russ.).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-197-201>

For correspondence: Sergey V. Borisevich, Dr. Biol. Sci., Professor, Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, 48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

**Information about authors:**Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-5742-3919>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.Received 03 June 2018  
Accepted 19 June 2018

ДНК-содержащие вирусы представляют собой молекулы ДНК, окружённые внешней белковой оболочкой, структурные компоненты которой закодированы в геноме самого вируса. Помимо функций защиты от повреждающих факторов

окружающей среды, структурные белки вирусов участвуют в процессах адсорбции вируса на чувствительную клетку, пенетрации вируса в клетку и формировании полноценных вирионов и выхода их из клетки [1, 2].

Для корреспонденции: Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН, начальник института ФГБУ «48 ЦНИИ» МО РФ, 141306, г. Сергиев Посад-6. E-mail: 48cnii@mil.ru

Вирусы от других живых организмов имеют принципиальные отличия. В отличие от клеток (и облигатных внутриклеточных паразитов) вирусы не способны к делению, не обладают аппаратом для трансляции белка и не синтезируют аденозинтрифосфат, необходимый для их репликации. Вирусы относятся к неклеточным формам жизни, являясь автономными генетическими структурами, способными к эволюции [3, 4].

До относительно недавнего времени рассматривались 3 основные гипотезы происхождения вирусов: вирусы – потомки древних доклеточных форм жизни, перешедшие к паразитическому способу существования; вирусы – потомки бактерий или других одноклеточных организмов, появившиеся в результате дегенеративной эволюции; вирусы – дериваты клеточных генетических автономных структур, сохранившие зависимость от клеток [4, 5].

Нет резких границ между вирусами и плазмидами – небольшими (с молекулярной массой меньше  $10^7$  Да), циркулярными, реже линейными молекулами ДНК, часто обнаруживаемыми в бактериальных клетках, в свободном виде в цитоплазме или интегрированными в геном клетки-носителя [6]. Плазмиды представляют собой независимо реплицирующуюся двуцепочечную экстрахромосомальную ДНК, кодирующую различные белки, обуславливающие новые свойства микробной клетки. Плазмиды выполняют регуляторные или кодирующие функции.

Обычно плазмиды встречаются у бактерий, реже – у архей и эукариот. Выделяют автономные и интегрированные в хромосомы плазмиды. Встраивание плазмид в геном хозяина с последующей интеграцией в него новых генов, вероятно, является возможным механизмом эволюционной изменчивости микроорганизмов.

Анализ результатов исследований, проведенных в Университете Нового Южного Уэльса (Австралия), даёт основания предполагать, что возможными предками ДНК-содержащих вирусов являются плазмиды архей.

Царство Археи (Archaea) наряду с бактериями (Bacteria) отнесены к надцарству Prokarya. Напомним, что надцарство Eucarya включает морские водоросли (Algae), грибы (Fungi), простейших (Protista), растения (Plantae) и животных (Animalia) [3-5, 7-9]. У архей липиды состоят из соединений глицерина и терпенов, мембраны монослойные липидные, клеточная стенка построена из псевдомуреина или гликопротеидов либо кислых полисахаридов, ДНК-зависимая РНК-полимераза состоит из 9-11 субъединиц, в тРНК нет риботимидина [9].

В пробах воды из антарктических солевых озёр Райер 1 (68°49' ю.ш., 77°51' в.д.) и Дип (Deer Lake) (68°33' ю.ш., 78°11' в.д.) обнаружены солелюбивые археи, плазмиды которых, возможно, являются предками ДНК-содержащих вирусов [10, 11].

Антарктические солёные озера имеют морское происхождение и сформировались во время изостатического смещения Антарктиды в период голоцена (около 3500 лет назад). Из-за высокого содержания солей вода в этих озёрах не замерзает даже при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Солелюбивые археи (*Halorubrum lacusprofundi*) содержат плазмиды (pR1SE), которые кодируют белки, участвующие в формировании стенок везикул архей.

Везикулы – это сферические структуры, выявленные у грамтрицательных микроорганизмов. Предположительно они играют роль в процессе выживания микроорганизма и его взаимодействия с клетками макроорганизма [12].

Рассмотрим молекулярно-биологические свойства плазмиды pR1SE и особенности её взаимодействия с чувствительными клетками архей.

Типовым штаммом *Halorubrum lacusprofundi* является штамм ACAM 34, полученный из популяции архей из проб воды, взятых из озера Дип [10]. Некоторые свойства штамма ACAM 34 представлены в табл. 1 [13].

Геномный и метагеномный анализ данного штамма выполнен в ряде работ.

Кроме того, в исследованиях широко используют штамм R1S1, выделенный из проб воды, собранных из озера Райер 1 в сентябре 2014 г. [14].

Плазида pR1SE, выделенная из штамма R1S1 *Halorubrum lacusprofundi*, состоит из 163090 п.н.о. Она содержит 193 открытые рамки считывания (ОРС). Перечень кодируемых данной плазмидой структурных белков, участвующих в формировании структурных компонентов стенок везикул архей, представлен в табл. 2.

Кодируемые плазмидами структурные белки, участвующие в формировании структурных компонентов стенок везикул архей, играют важную роль в разрушении клеточной мембраны архей, что приводит к выходу везикул с захваченными ими плазмидами в межклеточное пространство [14, 15].

Таблица 1

Некоторые свойства штамма  
ACAM 34 *Halorubrum lacusprofundi* [13]

Свойства	Характеристика свойств
Классификация	Домен – <i>Archaea</i> Отдел – <i>Euryarchaeota</i> Класс – <i>Halobacteria</i> Порядок – <i>Halobacteriales</i> Семейство – <i>Halobacteriaceae</i> Род – <i>Halorubrum</i> Вид – <i>Halorubrum lacusprofundi</i>
Окраска по Граму	Неизвестна
Форма клеток	Плеоморфная
Подвижность	Неподвижные
Спорообразование	Неспорообразующие
Температура среды обитания	От $-1$ до $-40^{\circ}\text{C}$
Оптимальная температура роста	$36^{\circ}\text{C}$
Источник углерода для роста	Сахара, органические кислоты, этанол
Среда обитания	Солевые озера
Содержание NaCl	10-25%
Потребление кислорода	Аэробы
Биотические взаимодействия	Свободноживущие
Патогенность	Апатогенны
Место выделения	Озеро Дип, Антарктика
Размер генома	3692576 п.н.о.
Кодирующая область генома	3199417 п.н.о. (86,64% от общего размера генома)
Количество G + C	2362214 п.н.о. (63,97% от общего размера генома)
Количество экстрахромосомальных элементов	1
Общее количество генов	3725
Количество генов, кодирующих белок	3665 (98,39% от общего количества генов)
Количество CRISP-повторов	3

Таблица 2

**Кодируемые плазмидой pR1SE структурные белки, участвующие в формировании структурных компонентов стенок везикул архей [14]**

№ OPC	Размер белка (аминокислотные остатки)	Функции белка
OPC 6	1384	Мембранный белок, участвующий в формировании структурных компонентов стенок везикул
OPC 7	551	Протеаза, выделяемая клетками и поверхностью везикул
OPC8	264	Активация модифицированного белка, кодируемого плазмидой pR1SE
OPC 9	502	Выделяется клетками и поверхностью везикул, возможно, включается в структуру везикул
OPC 10	98	Белок, обеспечивающий стабильность мембранного комплекса везикул
OPC 13	327	Предполагаемая $\alpha$ -L-фукозидаза, возможно, модифицирующая белки хозяина и белки, кодируемые плазмидой
OPC 14	127	Белок, входящий в состав стенки везикул
OPC 15	133	
OPC 17	305	
OPC 21	199	Неизвестны
OPC 22	340	Интегральный мембранный белок, возможно, представленный в мембранном комплексе везикулы и модифицирующий ДНК
OPC 23	430	Интегральный мембранный белок, возможно, представленный в мембранном комплексе везикулы
OPC 24	567	
OPC 31	378	Белок представлен только в везикулах. Функции неизвестны

Кроме того, в формировании везикул принимают участие структурные белки *Halorubrum lacusprofundi* (табл. 3).

Исследована способность плазмид архей к гетерологичной трансфекции. Плазмиды pR1SE, выделенная из штамма R1S1, и pR1SE2, выделенная из штамма HLS1 *Halorubrum lacusprofundi*, были использованы для трансфицирования архей видов *Hht. litchfieldiae* и *Halobacterium* spp.

В тех же самых условиях эксперимента, при которых проходила трансфекция архей *Halorubrum lacusprofundi*, штамм ACAM 34, трансфекцию указанных выше микроорганизмов плазмидами pR1SE и pR1SE2 не наблюдали [16].

Этот факт может отражать строгую видовую специфичность плазмид pR1SE, обусловленную фундаментальными отличиями структуры плазмид *Halorubrum lacusprofundi* от других представителей семейства. Таким образом, в настоящее время сведения о способности плазмид pR1SE осуществлять межвидовую и тем более межродовую трансфекцию отсутствуют. При этом уровень гомологии генома представителей родов *Halorubrum*, *Halobacterium*, *Haloquadratum*, *Haloarcula*, обитающих в озере Дип, составляет 73%, а гена 16S rPHK – 85%, что указывает на достаточно высокий уровень внутригенного обмена [11].

Для изучения влияния плазмид pR1SE на свойства архей *Halorubrum lacusprofundi* была проведена сравнительная оценка варианта прототипного штамма ACAM34,

трансфицированного плазмидой, и штамма, не содержащего плазмиды.

Присутствие плазмиды у трансфицированного варианта выявляли как с помощью исследования выделенной из микроорганизма тотальной ДНК при обработке рестриктазами, так и при анализе структурных белков. Несмотря на выявленные различия по указанным параметрам, уровни накопления содержащего и не содержащего плазмиду pR1SE вариантов практически не отличались. В то же время у данных вариантов установлены различия морфологии клеточных везикул, что указывает на роль структурных белков, кодируемых плазмидой pR1SE, в процессе формирования мембранного комплекса везикул.

Описанные выше исследования выполнены при использовании архей, выделенных из антарктических солевых озер. Однако аналогичные результаты были получены и при исследовании вирусоподобных везикул и экстрацеллюлярной ДНК, продуцируемых гипертермофильными археями порядка *Thermococcales* [16]. Показано, что большинство штаммов (26 из 34 исследованных) термофильных архей формирует сферические везикулы. При этом экстрацеллюлярная ДНК строго ассоциирована с вирусоподобными везикулами. Ассоциация экстрацеллюлярной ДНК с везикулами является защитным механизмом от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды [14].

При сравнении свойств плазмид архей и ДНК-содержащих вирусов необходимо отметить следующие факторы.

Общими признаками везикул архей и ДНК-содержащих вирусов являются возможность репликации генетического материала только в клетке и дизъюнктивный способ размножения [1]. Как и вирусы, архей содержат компоненты клетки-хозяина. Размер генома плазмид архей сопоставим с размером генома гигантских вирусов [17-19].

Важной отличительной особенностью является то, что плазмиды архей используют кодируемые ими белки только на этапах выхода из клетки-хозяина в окружающую среду и внедрения в новую клетку. Как известно, процесс взаимодействия вируса с клеткой включает ряд

Таблица 3

**Структурные белки *Halorubrum lacusprofundi*, участвующие в формировании везикул [14, 15]**

Обозначение белка	Размер белка (аминокислотные остатки)	Расположение белка в клетке хозяина	Функции белка
Hlac_0271	445	Белок клеточной поверхности	Участие в формировании мембранного комплекса везикулы
Hlac_1892	392		GT-фосфатаза, влияющая на морфологию везикул
Hlac_2346	213	Мембраны клетки хозяина и везикул	GT-фосфатаза, влияющая на формирование мембранного комплекса везикул
Hlac_2402	466		Возможное влияние на формирование мембранного комплекса везикул

Результаты сравнения стадий взаимодействия с клеткой для вирусов и везикул архей, содержащих плазмиды

№ п/п	Стадия взаимодействия с клеткой для	
	вирусов	везикул архей, содержащих плазмиды
1	Адсорбция вируса на клетку	Адсорбция везикул архей, содержащих плазмиды, на клетку
2	Пенетрация вируса через клеточную оболочку	Разрушение белками стенки везикул, кодируемых плазмидой, оболочки клетки-хозяина
3	Депротейнизация вируса	Данный процесс, видимо, происходит во время стадии 2
4	Репликация геномной вирусной нуклеиновой кислоты	Репликация плазмидной ДНК
5	Трансляция вирусспецифических белков	Трансляция белков, кодируемых плазмидной ДНК
6	Сборка вирионов	Включение белков, кодируемых плазмидной ДНК, в состав мембраны везикул
7	Разрушение клеточной оболочки и выход вирусов в межклеточное пространство	Разрушение клеточной оболочки и выход везикул архей, содержащих плазмиды, в межклеточное пространство

последовательных стадий [1]. В табл. 4 представлены результаты сравнения соответствующих стадий взаимодействия с клеткой для вирусов и везикул архей, содержащих плазмиды.

Как следует из представленных в табл. 4 данных, значимые различия в указанном процессе для вирусов и везикул архей, содержащих плазмиды, просматриваются только на этапах 6 и, возможно, 3.

Кардинальным отличием плазмид от вирусов является отсутствие у плазмид белкового капсида, что делает возможным их передачу от одной микробной клетки к другой только при непосредственном контакте.

Отличительным признаком везикул архей, содержащих плазмиды, от вирусов также является то, что в мембрану везикул входят главным образом белки клетки-хозяина, в то время как в состав вирусных частиц входят белки, кодируемые геномом вируса, а клетка-хозяин определяет лишь углеводный и липидный состав оболочки вируса.

Способность плазмид архей кодировать белки, встраивающиеся в стенки клеточных везикул, которые в свою очередь способны транспортировать плазмиды за пределы микробной клетки, что приводит к трансфекции интактных клеток того же вида, представляет собой новый путь горизонтального переноса генетической информации. Таким образом, везикулы архей, содержащие плазмиды, моделируют некоторые свойства вирусов.

Эти свойства определяют сходство указанных плазмид с вирусами и позволяют рассматривать плазмиды архей в качестве предков ДНК-содержащих вирусов.

Необходимо отметить, что вирусоподобные плазмиды выявлены у архей, среда обитания которых характеризуется рядом экстремальных для живых организмов параметров (высокая или низкая температура, высокое содержание солей). Данные архей, ареал распространения которых весьма ограничен, представляют собой реликтовые формы жизни.

Можно предположить, что предками ряда ДНК-содержащих вирусов (наиболее вероятно, семейств гигантских вирусов, входящих в порядок Megavirales) являлись, возможно, вымершие к настоящему времени архей, условия среды обитания которых оптимальны для многих видов водных организмов.

В качестве основных эволюционных этапов перехода от плазмид к вирусам, вероятно, можно рассматривать:

- формирование нуклеопротеинов, компонентами ко-

торых могли бы быть плазмидная ДНК (или её фрагменты) и кодируемые ею белки;

- формирование механизма выхода нуклеопротеинов из клетки в межклеточное пространство;

- расширение спектра чувствительных клеток, в которых может быть запущен процесс репродукции данных нуклеопротеинов (провирусов) от стадии адсорбции вируса на клетку до выхода из клетки в межклеточное пространство.

Высказанную гипотезу косвенно подтверждает анализ свойств гигантских вирусов, представляющих собой форму жизни, которую можно рассматривать как промежуточную между вирусами и клеточными организмами [20]. Предки гигантских вирусов столь же древние, как и предки бактерий, архей и эукариот [21].

Таким образом, полученные в последнее время научные сведения (открытие гигантских вирусов, моделирование везикулами архей, содержащих плазмиды, некоторых свойств вирусов) дают весомые основания предположить, что вирусы как доклеточная форма жизни не являются продуктом обратной эволюции микроорганизмов [14, 15, 22, 23].

Анализ свойств плазмид архей в качестве возможных предков ДНК-содержащих вирусов косвенно подтверждает гипотезу о том, что вирусы (прежде всего ДНК-содержащие вирусы) могут являться потомками «заблудившихся» генов [1]. Это требует дальнейшего углубленного изучения плазмид архей.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 6-22 см. REFERENCES)

4. Жданов В.М., Львов Д.К. Место вирусов в биосфере. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 46-66.
5. Жданов В.М., Львов Д.К. *Эволюция возбудителей инфекционных болезней*. М.: Медицина; 1984.

#### REFERENCES

1. Lwoff A., Tournier P. The classification of viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* 1966; 20: 45-74.
2. Race N.R. Time for a change. *Nature*. 2006; 441(7091): 289.
3. Van Regenmortel M.H. Introduction to the species concept in virus taxonomy. In: Van Regenmortel M.H., Fanquet C.M., Bishop D.H., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., et al. *Virus Taxonomy*.



- Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press; 2000.
4. Zhdanov V.M., L'vov D.K. Place of Viruses in the Biosphere. In: L'vov D.K., ed. *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 46-66. (in Russian)
  5. Zhdanov V.M., L'vov D.K. *Evolution of Pathogens of Infectious Diseases [Evolutsiya vzbuditeley infektsionnykh bolezney]*. Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian)
  6. Goldstain R., Sevidg J., Ljungquist E. Propagation of satellite phage P4 as a plasmid. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982; 79(2): 515-9.
  7. Carstens E.B. Introduction to virus taxonomy. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.Y. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press; 2012: 3-7.
  8. Van Regenmortel M.H. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification. *Intervirology*. 1990; 31(5): 241-54.
  9. Stoet P., Ziller W. Archeobacterial bacteriophages. In: *Encyclopedia of Virology. Volume 1*. London: Elsevier Academic Press; 1994: 50-8.
  10. Franzmn P.D., Stackebrandt E., Sanderson K., Volkman J.K., Cameron D.E., Stevenson P.L., et al. Halobacterium lacusprofundi sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 1988; 11(1): 20-7.
  11. DeMaere M.Z., Williams T.J., Allen M.A., Brown M.V., Gibson J.A., Rich J., et al. High level of intergenera gene exchange shapes the evolution of haloarchaea in an isolated Antarctic lake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(42): 16939-44.
  12. Chutkan H., MacDonald I., Manning A., Kuehn M.J. Quantitative and qualitative preparation of bacterial outer membrane vesicles. In: Delcour H., ed. *Bacterial Cell Surfaces: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science; 2013.
  13. Anderson I.J., DasSarma P., Lucas S., Copeland A., Lapidys A., Del Rio T.G., et al. Complete genome sequence of the Antarctic Halo-  
rubrum lacusprofundi type strain ACAM 34. *Stand. Genomic. Sci.* 2016; 11(1): 70.
  14. Tschitschko B., Williams T.J., Allen M.A., Zhong L., Raftery M.J., Cavicchioli R. Ecophysiological distinctions of Haloarchaea from a Hypersaline Antarctic Lake as Determined by metaproteomics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(11): 3165-73.
  15. Tschitschko B., Williams T.J., Allen M.A., Páez-Espino D., Kyrpides N., Zhong L., et al. Antarctic archaea-virus interactions: metaproteome-led analysis of invasion, evasion and adaptation. *ISME J.* 2015; 9(9): 2094-107.
  16. Soler M., Marguet E., Verbavatz J.M., Forterre P. Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Res. Microbiol.* 2008; 159(5): 390-9.
  17. Antwerpen M.H., Georgi E., Zoeller L., Woelfel R., Stoecker K., Scheid P. Whole-Genome Sequencing of a *Pandoravirus* isolated from Keratitis-inducing *Acanthamoeba*. *Genome Announc.* 2015; 3(2): 1-2.
  18. Benamar S., Reteno D.G., Bandaly V., Labas N., Raoult D., La Scola B. Faustoviruses: Comparative genomics of new Megavirales Family members. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 3.
  19. Dornas F.P., Khalil J.Y.B., Pagnier I., Raoult D., Abrahao J., La Scola B. Isolation of new Brazilian giant viruses from environmental samples using a panel of protozoa. *Front. Microbiol.* 2015; 6(1086): 1-9.
  20. Sharma V., Colson P., Chabrol O., Scheid P., Pontarotti P., Raoult D. Welcome to pandoraviruses at the 'Fourth TRUC' club. *Front. Microbiol.* 2015; 6(423): 1-11.
  21. Aherfi S., Colson P., La Scola B., Raoult D. Giant Viruses of Amoebas: An Update. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 349.
  22. Claverie J.M., Abergel C. Giant viruses: The difficult breaking of multiple epistemological barriers. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* 2016; 59: 89-99.

Поступила 03.06.18

Принята в печать 19.06.18

*Андропова В.Л.*

## СОВРЕМЕННАЯ ЭТИОТРОПНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА: КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ, НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. ЧАСТЬ I

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

Современная химиотерапия цитомегаловирусных (ЦМВ) инфекций располагает весьма ограниченным арсеналом препаратов первой линии – это препараты ганцикловира (ГЦВ), относящегося к классу модифицированных нуклеозидов, и его валинового эфира (метаболического предшественника ГЦВ). После трех-этапного фосфорилирования ГЦВ как структурный аналог природного нуклеотида тимидинтрифосфата конкурирует с ним за связывание с ДНК-полимеразой и благодаря структурным особенностям ингибирует её активность. Однако при длительном применении ГЦВ главным образом в условиях иммуносупрессии у вируса развивается лекарственная устойчивость, связанная в большинстве случаев с заменами в *pUL97*, катализирующем первый этап фосфорилирования ГЦВ, а также в каталитической субъединице ДНК-полимеразы. При появлении вариантов вирусов, резистентных к ГЦВ, используют препараты второго ряда – пирофосфатный аналог фоскарнет и нуклеотид цидофовир. Развивающаяся к препаратам второго ряда резистентность обуславливается мутациями по *pol*-гену и в ряде случаев приводит к мультирезистентности, что делает невозможным использование традиционных анти-ЦМВ-лекарств. Кроме того, применение всех вышеперечисленных препаратов сопровождается развитием тяжёлых побочных эффектов. Всё вышеизложенное определяет необходимость поиска новых соединений, способных эффективно ингибировать репродукцию вируса, безвредных для макроорганизма, удобных в применении, преодолевающих барьер лекарственной устойчивости у вирусов. В результате поиска в международных базах данных (PubMed, MedLine, eLIBRARY.RU, ClinicalTrials.gov и др.) были определены основные тенденции поиска новых анти-ЦМВ-агентов. В первой части обзора мы сконцентрировали внимание на соединениях, представляющих собой модификации известных антивирусных агентов, используемых в настоящее время в клинической практике, наиболее перспективных для создания лекарственных анти-ЦМВ-препаратов.

**Ключевые слова:** обзор; цитомегаловирус человека; антивирусный агент; лекарственный препарат.

**Для цитирования:** Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия цитомегаловирусной инфекции человека: клиническая эффективность, молекулярный механизм действия, лекарственная устойчивость, новые тенденции и перспективы. Часть I. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 202-211.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-202-211>

*Andronova V.L.*

### MODERN ETHIOTROPIC CHEMOTHERAPY OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION: CLINICAL EFFECTIVENESS, MOLECULAR MECHANISM OF ACTION, DRUG RESISTANCE, NEW TRENDS AND PROSPECTS. PART 1

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

Modern chemotherapy of cytomegalovirus (CMV) infections has a very limited arsenal of first-line drugs. These are preparations of ganciclovir (GCV) belonging to the class of modified nucleosides and its metabolic precursor ganciclovir valine ester. After three-step phosphorylation, GCV, as a structural analogue of the natural nucleotide, competes with it for binding to DNA polymerase and, due to its structural features, inhibits its activity. However, with prolonged use of GCV, mainly under conditions of immunosuppression, the virus develops drug resistance associated in most cases with changes in *pUL97* catalyzing the first stage of GCV phosphorylation, as well as in the catalytic subunit of DNA polymerase. When variants of viruses resistant to GCV appear, second-line drugs are used: pyrophosphate analog of foscarnet and nucleotide cidofovir. Resistance to second-line drugs is due to mutations in the *pol*-gene and in a number of cases leads to multiresistance, which makes it impossible to use traditional anti-CMV drugs. In addition, the use of all of the above drugs is accompanied by the development of severe side effects. All of the above determines the need to search for new compounds that can effectively inhibit the reproduction of the virus, harmless to the macroorganism, convenient to use, overcoming the drug resistance barrier in viruses.

As a result of the search in international databases (PubMed, MedLine, eLIBRARY.RU, ClinicalTrials.gov, etc.), the main trends in the search for new anti-CMV agents were identified. In the first part of the review, we concentrated on compounds that are modifications of known antiviral agents currently used in clinical practice, the most promising for the development of drug anti-CMV drugs.

**Key words:** overview; human cytomegalovirus; antiviral agent; medicinal product.

**Для корреспонденции:** Андропова Валерия Львовна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории химиотерапии вирусных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [andronova.vl@yandex.ru](mailto:andronova.vl@yandex.ru)

**For citation:** Andronova V.L. Modern ethiotropic chemotherapy of human cytomegalovirus infection: clinical effectiveness, molecular mechanism of action, drug resistance, new trends and prospects. Part 1. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 202-211. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-202-211>

**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](mailto: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 15 November 2017

Accepted 12 December 2017

## Введение

Цитомегаловирус человека (ЦМВ), или вирус герпеса человека 5-го типа (ВГЧ-5), ДНК-содержащий вирус семейства Herpesviridae, подсемейства Betaherpesvirinae – является одним из самых распространённых патогенов человека. По некоторым оценкам, инфицированность населения ЦМВ составляет 30–90% в странах с высокими социально-экономическими показателями и более 90% в развивающихся странах [1]. Доля серопозитивных лиц среди взрослого населения в РФ составляет 73–98% [2]. ЦМВ может передаваться через любые секреты (слюна, моча, вагинальный секрет, сперма, грудное молоко и др.), биологические жидкости (кровь, амниотическая жидкость, ликвор), от матери к плоду во время беременности, а в трансплантологии источником инфекции могут служить органы, полученные от серопозитивных доноров. Первичное инфицирование ЦМВ возможно воздушно-капельным, контактно-бытовым, парентеральным и половым путём и обычно протекает бессимптомно, после чего вирус сохраняется в латентном состоянии на протяжении всей жизни. Развитие манифестной формы ЦМВ-инфекции (ЦМВИ) связано с иммуносупрессией. Так, у больных СПИДом, реципиентов солидных органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) ЦМВИ может принимать генерализованную форму, сопровождающуюся дисфункцией органов, лихорадкой, лейкопенией, тромбоцитопенией, и является ведущей причиной заболеваемости и смертности [3, 4]. По результатам ретроспективного анализа основных причин заболеваемости и смерти у больных ВИЧ-инфекцией в 4А–4В стадиях, проведённого в стационаре Центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями Санкт-Петербурга, за период с 2009 по 2011 гг. частота развития генерализованных ЦМВИ возросла с 0,5 до 2,5%, а смертности – с 4,8 до 10,9% [5]. Инфицирование плода на ранних сроках беременности при первичной ЦМВИ также может иметь для него тяжелейшие последствия – глухоту, слепоту, слабоумие, церебральный паралич, поражение костного мозга, печени, ЖКТ, вызывать патологии течения беременности, обуславливающие в 10–20% случаев гибель новорождённого [6].

### Современная этиотропная химиотерапия цитомегаловирусной инфекции

Имеется ограниченный перечень этиотропных химиотерапевтических препаратов (ЭХТП), позволяющих контролировать ЦМВИ: препараты ганцикловира (ГЦВ) и его предлекарства валинового эфира ГЦВ (Вал-ГЦВ), тринатриевой соли фосфономуравьиной кислоты (ФМК) и цидофовира (ЦДВ). Некоторые характеристики коммерческих анти-ЦМВ-ЭХТП приведены в табл. 1.

Современные анти-ЦМВ-препараты отличаются значительной токсичностью для макроорганизма. Наиболее частыми побочными эффектами ГЦВ при системном введении являются нейтропения, тромбоцитопения, токсичное действие на ЦНС, эзофагит, тошнота, рвота, диарея и др. При введении в стекловидное тело наблюдаются бактериальный эндофтальмит, лёгкое рубцевание конъюнктивы, субконъюнктивальное кровоизлияние, боли в глазах и ушах, конъюнктивит, нарушение функции почек и др., при использовании глазного геля – затуманивание зрения, раздражение глаза, точечный кератит и гиперемия конъюнктивы, а хирургическое внесение внутриглазного имплантата в редких случаях может приводить к кровотечению в стекловидном теле, отделению сетчатки и эндофтальмитам. Противопоказаниями для приема ГЦВ являются гиперчувствительность к препарату, химиотерапия (саркома Капоши, неходжкинская лимфома). При лейкопении, анемии, тромбоцитопении требуется коррекция дозы или отмена препарата. С осторожностью следует применять ГЦВ больным с хронической почечной недостаточностью, пациентам, получающим миелодепрессанты, лучевую терапию, а также в период лактации, детям младше 12 лет и пациентам старше 65 лет (нет данных об эффективности и безопасности). Необходимы надёжные методы контрацепции, так как ГЦВ оказывает тератогенное и канцерогенное действие. При беременности возможно назначение только по жизненным показаниям [7].

Вал-ГЦВ имеет побочные эффекты и противопоказания, аналогичные ГЦВ, так как при пероральном приеме эффективно всасывается в тонком кишечнике и быстро превращается в ГЦВ (в стенке кишечника и печени): при однократном приеме 900 мг Вал-ГЦВ  $C_{max}$  ГЦВ в крови через 2 ч достигает величины 5,9–6,7 мкг/мл, сопоставимой с концентрацией ГЦВ (8–11 мкг/мл) после его внутривенного (в/в) введения в рекомендуемой дозе 5 мг/кг. Для сравнения, после перорального введения ГЦВ в разовой дозе 1000 мг  $C_{max}$  = 1,18 мкг/мл [7]. Вальцит (препарат Вал-ГЦВ) лицензирован для основного и поддерживающего лечения ЦМВ-ретинита у больных СПИДом и профилактики ЦМВИ у пациентов после трансплантации сердца и почек [7], зарегистрирован и разрешён к использованию в РФ. После одобрения Вал-ГЦВ лекарственная форма ГЦВ для приёма внутрь применяется редко и в дальнейшем использоваться не должна, а в/в применение ГЦВ рекомендуется ограничить тяжелобольными и пациентами, не способными принимать пероральные ЭХТП.

Из-за низкой биодоступности при приёме внутрь ФМК используется в форме раствора для в/в введения.

Таблица 1

Структура и биологическая характеристика современных провиогерпетических соединений [2, 7–10]

Соединение/формула	Активность in vitro/in vivo	Показания к применению	Коммерческие препараты	Дополнительная информация
1	2	3	4	5
<i>Модифицированные нуклеозиды (ТК-зависимые ингибиторы ДНК-полимеразы, ингибиторы синтеза вирусной ДНК)</i>				
<b>Ганцикловир</b> ; 9-[(1,3-дигидрооксен-2-пропокси)-метил]-гуанин; 2-амино-9-(1,3-дигидроокситрипан-2-ил-оксиметил)-3Н-пуриин-6-он C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ; Мг: 255.23	Активен <i>in vitro</i> в отношении ЦМВ (ИД <sub>50</sub> 0,98–11,75 мкМ), ВПГ-1 и ВПГ-2 (ИД <sub>50</sub> 0,04–5,64 мкМ), ВВЗ (1,49–29,38 мкМ), ВЭБ (ИД <sub>50</sub> 0,05–16,85 мкМ). При введении мышам <i>per os</i> ЛД <sub>50</sub> > 2 г/кг. При в/в введении собакам ЛД <sub>50</sub> > 150 мг/кг. Симптомы передозировки: необратимая панцитопения, острая почечная недостаточность	<i>Внутрирь</i> : поддерживающая супрессивная терапия ЦМВИ; <i>в/в</i> : ЦМВИ (пневмония, колит, ретинит, эзофагит, менингоэнцефалит, гепатит у больных со сниженным иммунным статусом; <i>интравитреальная инъекция</i> : ЦМВ-ретинит, острый некроз сетчатки, вызванный ВВЗ; <i>глазной гель и внутрисглазной имплантат</i> : ЦМВ-ретинит	<i>Цимевен/Цитовен</i> : капсулы 250 мг; лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций, 500 мг/флакон; <i>Зирган, Вирган</i> : 0,15% глазной гель; <i>вирасепт</i> : глазной имплантат	Препарат первого ряда (в виде лекарственной формы для в/в введения). БДО 5% (натощак), 6–9% (во время еды). При системном введении нейтропения, тромбоцитопения, токсическое действие на ЦНС
<b>Валганцикловир</b> ; L-валиновый эфир ГЦВ; [2-(1-(2-амино-6-оксо-3Н-пуриин-9-ил)-метокси)-3-гидроксипропил] (2S)-2-амино-3-метилбутаноат; C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> ; Мг: 354.37	Так как практически полностью превращается в ГЦВ и L-валиновый эфир, подобно ГЦВ активен в отношении ЦМВ, ВПГ, ВЭБ. При введении мышам <i>per os</i> ЛД <sub>50</sub> > 2 г/кг	Основное и поддерживающее лечение ЦМВ-ретинита у больных СПИДом, профилактика ЦМВИ у пациентов после трансплантации сердца и почек	<i>Вальцит</i> : таблетки по 450 мг	Препарат первого ряда, метаболический предшественник ГЦВ. БДО 60%. Тромбоцитопения, анемия, лейкопения; тошнота, рвота, диарея
<i>Модифицированный нуклеотид, ингибитор вирусной ДНК-полимеразы, ингибирует синтез ДНК</i>				
<b>Цидофовир</b> ; (S)-1-[3-гидрокси-2-(фосфонилметокси)-пропил]-цитозин; [(2S)-1-(4-амино-2-оксотиримидин-1-ил)-3-гидроксипропан-2-ил] оксиметилфосфоновая кислота; C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> ; Мг: 279.19	ЦМВ: ИД <sub>50</sub> 0,36–2,87 мкМ; ВПГ-1/2: ИД <sub>50</sub> 1,43–118,20 мкМ; ВВЗ: ИД <sub>50</sub> 0,79 мкМ; ВЭБ: ИД <sub>50</sub> 0,04–8,95 мкМ <i>In vivo</i> активен при системном (в/б) и местном введении. Неотоксичен для мышей при введении 2 раза в день в течение 5 дней в дозе 200 мг/кг ( <i>per os</i> , в/б), а также при однократном субкутанном введении в дозе 500 мг/кг	<i>В/в</i> : ЦМВ-ретинит у ВИЧ-инфицированных лиц при развитии резистентности к ГЦВ и ФМК; есть позитивный опыт лечения ВПГ-инфекций, нечувствительных к терапии АЦВ и/или ФМК у иммунокомпромированных лиц (генитальный и кожный герпес)	<i>Вистид</i> : раствор по 375 мг/5 мл	БДО < 5%. Препарат второго ряда для лечения ЦМВИ; нефротоксичен
<i>Структурный аналог пиррофосфата, ингибитор ДНК-полимеразы</i>				
<b>Фосфомомуравьиной кислоты триагриновая соль</b> ; Карбоксифосфат, <i>Фосфоноформат</i> ; C <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P; Мг: 191.95	Активен <i>in vitro</i> в отношении ЦМВ (ИД <sub>50</sub> 50–800 мкМ), ВПГ-1 (ИД <sub>50</sub> 100–224 мкМ), ВПГ-2 (ИД <sub>50</sub> 125–312 мкМ), ВВЗ (ИД <sub>50</sub> 125–312 мкМ), включая штаммы ВПГ и ВВЗ, резистентные к АЦВ, и штаммы ЦМВ, резистентные к ГЦВ; ВЭБ: ИД <sub>50</sub> 3,13–5,21 мкМ	<i>В/в</i> : лечение ВПГ-инфекций, ВВЗ-инфекций, нечувствительных к терапии АЦВ и ГЦВ-резистентных ЦМВИ у иммунокомпромированных лиц	<i>Фоскарнет/Фоскавир</i> : раствор для инъекций 24 мг/мл (6000 мг/250 мл)	БДО 5–8%. Препарат второго ряда. Нефротоксичен, может вызывать электролитные нарушения

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: систематические (по ИЮПАК) наименования указаны курсивом. БДО – биодоступность при пероральном приеме. ВПГ-1/ВПГ-2 – вирус простого герпеса 1-го или 2-го серотипа; ВВЗ – вирус варицелла зостер; ВЭБ – вирус Эпштейна Барр; ТК – тимидинкиназа; ИД<sub>50</sub> – минимальная активная концентрация соединений; ЦД<sub>50</sub> – концентрация соединения, вызывающая гибель 50% клеток; химиотерапевтический индекс (ХТИ) вычисляется как отношение ЦД<sub>50</sub> к ИД<sub>50</sub>.

Высокая нефротоксичность ФМК (протеинурия, почечная недостаточность, острый тубулярный некроз, кристаллурия, интерстициальный нефрит) ограничивает возможность его применения. С целью снижения нефротоксического действия ФМК перед в/в инфузией вводят 2 л физиологического раствора в/в, так как при обезвоживании организма риск поражения почек возрастает. Из-за плохой растворимости ФМК в воде её вводят в большом объеме жидкости капельно (не более 1 мг/кг/мин в течение 1 ч и более). Необходим контроль функции почек. Также часто развиваются электролитные нарушения (гипокальциемия, гипокалиемия, гипомagneмия, гипофосфатемия), которые могут сопровождаться аритмиями, изменениями ЭКГ, тремором, судорогами и даже нарушениями психики. Для профилактики гипокальциемии необходимо введение 10% раствора кальция непосредственно перед инфузией ФМК (1 ампула в 100 мл 5% раствора глюкозы). До или после введения ФМК вводят 0,5–1 л 5% раствора глюкозы. Среди других побочных эффектов отмечаются диспептические и диспепсические расстройства, нейротоксичность (головная боль, галлюцинации, депрессия), гематотоксичность (анемия, гранулоцитопения). Из-за тяжёлых побочных эффектов отказ пациентов от приема ФМК фиксируется в 3 раза чаще, чем в случае терапии ГЦВ [10, 11].

Главный побочный эффект ЦДВ – высокая дозозависимая нефротоксичность, наблюдаемая у 15% пациентов, а у 25% развивается протеинурия, являющаяся ранним признаком нефротоксического действия. Возможны также нейтропения (15% случаев), синдром Фанкони, метаболический ацидоз, увеит, астения, снижение внутриглазного давления, иридоциклит, алоpecia, анорексия, диспноэ, анемия. Исследования безопасности и эффективности ЦДВ для пациентов старше 60 лет и детей не проводились, поэтому этой группе пациентов его введение показано только по жизненным показаниям. Во время беременности использовать только в случаях, когда потенциальная польза для матери оправдывает риск для плода. Так как неизвестно, экскретируется ли ЦДВ в молоко, его не следует вводить кормящим матерям. Для снижения нефротоксичности ЦДВ его введение предваряется и завершается введением 1–2 л физиологического раствора, а также сочетается с пероральным приёмом пробенецида [12].

ФМК и ЦДВ из-за высокой токсичности используются только для лечения ЦМВИ с тяжёлым течением, вызванных штаммами вирусов, резистентными к ГЦВ/Вал-ГЦВ или в случаях непереносимости ГЦВ.

#### **Лекарственная резистентность. Клинические и молекулярные аспекты**

У пациентов с ослабленным иммунитетом профилактический приём анти-ЦМВ-ЭХТП значительно снижает показатели заболеваемости ЦМВИ, риск других оппортунистических вирусных и бактериальных инфекций и смертности по этим причинам [9]. Вместе с тем такое лечение, продолжающееся в течение не менее 3 мес, повышает вероятность развития резистентности у ЦМВ [5, 13]. К другим факторам риска относят иммуносупрессию, многократные эпизоды реактивации ЦМВ, высокий уровень вирусной нагрузки и субоптимальные концентрации антивирусных агентов из-за несоблюдения режима приёма или плохой адсорбции ЭХТП [14].

Развитие лекарственной резистентности ЦМВ к ГЦВ и ФМК приводит к увеличению смертности среди больных СПИДом: средняя выживаемость в группе пациентов с диагнозом ЦМВ-ретинит составляет 12,6 мес, а в

группе пациентов, у которых развилась лекарственная резистентность, этот показатель снижается до 7 мес [15]. Эксперты ВОЗ включили ЦМВ в перечень микроорганизмов, развитие лекарственной резистентности у которых представляет серьёзную проблему для общественного здравоохранения [16].

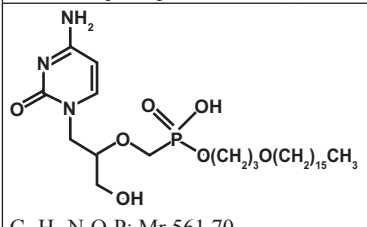
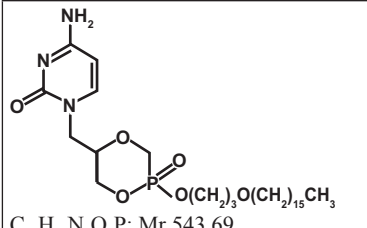
Варианты ЦМВ, устойчивые к ГЦВ, встречаются в клинической практике почти исключительно у пациентов с ослабленным иммунитетом (с числом лимфоцитов CD4 < 50÷100/мкл), получающих длительную противовирусную терапию. Так, от 7–8% больных СПИДом, получавших в течение 3 мес ГЦВ в/в для лечения ЦМВ-ретинита, удаётся выделить ГЦВ-устойчивые штаммы ЦМВ (с ИД<sub>50</sub> > 6–12 мкМ), а через 6 и 9 мес доля таких пациентов увеличивается до 12 и 28%, соответственно [17]. У реципиентов солидных органов и костного мозга резистентные штаммы ЦМВ изолируют с частотой 2,1–9% через 79–100 дней терапии. У пациентов высокого риска (ЦМВ-серопозитивный донор/ЦМВ-серонегативный реципиент) после пересадки лёгких резистентность к ГЦВ наблюдается в 5–9 раз чаще, чем у ЦМВ-серопозитивных реципиентов (15,2÷27%), у реципиентов поджелудочной железы – в 21% случаев, у реципиентов сердца, почек, печени – до 5% случаев [18, 19].

Как аналог естественного нуклеозида 2'-дезоксигуанозина, ГЦВ после трехэтапного фосфорилирования конкурирует с 2'-дезоксигуанозинтрифосфатом за сайт связывания ДНК-полимеразы (ДНК-*pol*) вируса, включается в вирусную ДНК и, вызывая конформационные изменения фермента, замедляет и в итоге останавливает элонгацию вирусной ДНК [20]. Таким образом, резистентность ЦМВ к ГЦВ/Вал-ГЦВ может обеспечиваться мутациями в генах *UL97* (*pUL97* катализирует первый этап фосфорилирования ГЦВ до монофосфата) и/или *UL54* (*pUL54* – каталитическая субъединица ДНК-*pol* ЦМВ) [20]. В клинической практике в 90% случаев резистентные к ГЦВ штаммы ЦМВ несут мутации в гене *UL97* [13, 21]. Большая их часть локализована в области сайта связывания субстрата или в непосредственной близости от него (в кодонах 405–607) и приводит к значительному снижению эффективности фосфорилирования ГЦВ. Наиболее часто встречающиеся мутации – M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S и S603W [7, 13].

ФМК и ЦДВ не нуждаются в предварительной активации (фосфорилировании), благодаря чему эффективно ингибируют репликацию ГЦВ-резистентных штаммов ЦМВ, синтезирующих дефектный белок *UL97* [7, 10]. Как аналог пирофосфата, ФМК образует неактивные комплексы с центром связывания пирофосфата ДНК-*pol* ЦМВ и предотвращает отщепление пирофосфата от НТФ, подавляя таким образом элонгацию вирусной ДНК [20]. ЦДВ является нуклеотидом (ациклическим аналогом 2'-дезоксигуанозинтрифосфата), поэтому также не зависит от активности *pUL97*. Фосфорилирование до моно- и дифосфата осуществляется клеточными ферментами. Дифосфатная форма ЦДВ (активный метаболит), являясь конкурентом 2'-дезоксигуанозинтрифосфата, включается в синтезирующуюся цепь вирусной ДНК и прерывает её синтез по терминационному механизму путём последовательного включения двух его молекул [20]. Кроме того, дифосфат ЦДВ селективно ингибирует полимеразу ЦМВ – синтез ДНК ЦМВ полностью ингибируется при концентрациях, в 100 и более раз меньших, чем концентрации, необходимые для ингибирования синтеза клеточных ДНК [12].

Мутации, ассоциированные с лекарственной резис-

Модифицированные производные ЦДВ – ингибиторы репродукции ЦМВ человека

Структурная формула соединения	Название соединения	Дополнительная информация
<i>Ингибиторы герпетической ДНК-полимеразы</i>		
 <p><math>C_{27}H_{52}N_3O_7P</math>; Mr 561.70</p>	<b>Бринцидофовир</b> ; гексадецилоксипропил-ЦДВ, CMX001, HDP-CDV и др.; [(2S)-1-(4-амино-2-оксо-пиримидин-1-ил)-3-гидроксипропан-2-ил]оксиметил-(3-гексадекокси-пропокси) фосфиновая кислота	Метаболический предшественник ЦДВ. БДО 88%. Завершена пилотная часть III фазы клинических испытаний
 <p><math>C_{27}H_{50}N_3O_6P</math>; Mr 543.69</p>	<b>ГДП-иЦДВ</b> ; гексадецилоксипропилцикло-ЦДВ; HDP-cCDV; AC1LA8G6; SCHEMBL138629; STK6E0131; SCHEMBL1650054 и др.; 4-амино-1-[[[(5S)-2-(3-гексадекоксипропокси)-2-оксо-1,4,2-диоксафосфинан-5-ил]метил]пиримидин-2-он	Показана эффективность на модели ретинита кроликов, вызванного ВПГ-1

тентностью к ФМК и ЦДВ (ингибиторам ДНК-*pol* ЦМВ), картируются в каталитической субъединице фермента *pUL54* и могут приводить к множественной резистентности. Так, мутации в *Eco II* и области  $\delta$ -С вовлечены в резистентность к ЦДВ и ГЦВ, но к ФМК чувствительность сохраняется, а мутации в консервативных областях II и VI, наоборот, не влияют на чувствительность к ЦДВ и ГЦВ, но ассоциированы с резистентностью к ФМК. Вирусы с заменами в консервативной области III главным образом связаны с множественной резистентностью к ГЦВ, ЦДВ и ФМК одновременно [22, 23].

Вероятность выделения ФМК-резистентных штаммов ЦМВ возрастает с увеличением продолжительности терапии. Так, в соответствии с данными одного из исследований, через 3, 6 и 9 мес доля резистентных штаммов составляет 9, 26 и 37%. Скорость развития резистентности к ЦДВ, видимо, близка к таковой ФМК. Через 3 мес величина ИД<sub>50</sub> у 29% изолятов превысила пороговую величину 2 мкМ [24].

Понимание молекулярных механизмов развития лекарственной резистентности у ЦМВ позволило выработать стратегию контроля ЦМВИ. Если лечение ГЦВ оказывается неэффективным, пациента переводят на ФМК, так как мутации в гене *UL54* гораздо чаще обуславливают кросс-резистентность ЦМВ к ГЦВ и ЦДВ, чем к ГЦВ и ФМК, при этом снижение чувствительности к ФМК, как правило, незначительно. С другой стороны, если генотипический анализ выявил мутации только в гене *UL97*, можно использовать ЦДВ. Если уровень резистентности к ГЦВ не высок, можно повысить дозу ГЦВ (до 10 мг/кг массы тела 2 раза в день в/в) [25] или использовать комбинированную терапию, включающую ГЦВ и ФМК или ФМК и ЦДВ, но следует учитывать риск увеличения токсического воздействия [11, 26]. Не исключено, что более рациональной стратегией в таких случаях будет повышение иммунного статуса пациента: снижение интенсивности иммуносупрессивной терапии у реципиентов трансплантата или агрессивной антиретровирусной терапии у больных СПИДом.

### Возможные направления развития химиотерапии ЦМВИ

Тяжёлые побочные эффекты современных ЭХТП, используемых для профилактики и лечения ЦМВИ, а также высокая вероятность развития лекарственной резистентности у вируса, обуславливают необходимость поиска новых путей воздействия на ЦМВ.

Одной из стратегий создания новых молекул является модификация структуры известных анти-ЦМВ-агентов с целью повышения их биодоступности, эффективности и безопасности для макроорганизма.

#### Модификации ЦДВ

ЦДВ проявляет антивирусную активность на моделях всех герпесвирусов человека, но из-за высокой нефротоксичности утверждён только для лечения ретинитов, вызванных ЦМВ человека у иммунокомпромированных пациентов. Кроме того, ЦДВ вводится в/в, так как при физиологическом значении pH существует в растворе в форме дианиона, что обуславливает его низкую биодоступность при оральном введении.

Алкоксиалкильная этерификация ЦДВ маскирует отрицательный заряд дианиона ЦДВ, что обеспечивает лёгкое всасывание препарата в тонком кишечнике и эффективную клеточную пенетрацию [27].

Биодоступность соединения этого ряда CMX001 (табл. 2) при пероральном введении в 17–18 раз больше, чем у ЦДВ [28, 29]. Только внутри клетки CMX001 подвергается метаболическим превращениям путём нарезания молекулы фосфолипазой С по фосфонатному фрагменту (-P-CH<sub>2</sub>-) с отщеплением липидной боковой цепочки и образованием ЦДВ. Отсутствие фосфолипазы С в плазме и панкреатических секретах обеспечивает длительную циркуляцию CMX001 в крови [29].

Собственно антивирусной активностью обладает ЦДВ. При этом обеспечиваются внутриклеточные концентрации ЦДВ-дифосфата, в 100 и более раз превышающие таковые, получаемые при использовании немодифицированного ЦДВ [29], что приводит к 100- и даже 1000-кратному увеличению противовирусной активности. Этот эффект, являющийся важнейшим преимуществом

СМХ001 перед ЦДВ, показан *in vitro* на моделях целого ряда герпесвирусов. Соотношение величин ИД<sub>50</sub> ЦДВ и СМХ001 на модели ЦМВ человека составляет в среднем 467, на моделях ВПГ-1 и ВПГ-2 – 340 и 294, ВВЗ – 1250, ВЭБ – 3885, для вирусов герпеса человека (ВГЧ) - ВГЧ-6А и ВГЧ-6В – 90 и 770, ВГЧ-8 – 130 [30, 31, 32].

СМХ001, подобно ЦДВ, обладает широким спектром антивирусного действия, включающим все 5 семейств вирусов, содержащих двухцепочечную ДНК – герпесвирусы, ортопоксвирусы, полиомавирусы (включая вирус ВК), папилломавирусы и аденовирусы [31, 33].

Эффективность СМХ001 превышает таковую ацикловира (АЦВ) при летальной инфекции ВПГ-1 и ВПГ-2 у мышей. СМХ001 при пероральном введении в дозах 5 и 1,25 мг/кг 1 раз в день эффективно снижал смертность животных, даже если лечение начинали через 48–72 ч после заражения, а величина инфекционного титра вируса в мозге мышей была на 3–5 lg БОЕ/г ниже по сравнению с животными, получавшими АЦВ [30].

В отличие от ЦДВ СМХ001 не накапливается в клетках почечных проксимальных канальцев: при его пероральном введении мышам в дозе 17,8 мкг/кг С<sub>max</sub> в почках в 30 раз меньше, а показатель АUC – в 6,9 раза меньше, чем при в/в введении эквивалентной дозы ЦДВ [28]. Это объясняется тем, что превращение СМХ001 в ЦДВ в крови происходит крайне неэффективно, и ЦДВ после перорального приема СМХ001 обнаруживается в незначительных количествах [29], а СМХ001 в отличие от ЦДВ не является субстратом для белков-транспортёров органических анионов (hOAT1), которые локализованы в проксимальных почечных канальцах и главным образом отвечают за накопление ЦДВ в почках [28].

Установлено также, что СМХ001 (в 5% растворе декстрозы) после интравитреальной инъекции кроликам поглощается клетками сетчатки, а в стекловидном теле формирует мицеллярные структуры, благодаря чему обеспечивается пролонгированное действие препарата: величина t<sub>1/2</sub> СМХ001 составила 8,4 дня в сетчатке и 6,2 дня в стекловидном теле. Для сравнения, аналогичные показатели для ЦДВ равны 66 и 42 ч, соответственно. Через 24 ч после введения СМХ001 в дозе 28 мкг/50 мкл/глаз С<sub>max</sub> СМХ001 в сетчатке достигает 143 мкМ, а в стекловидном теле 6,79 мкМ. Даже через 35 дней концентрации СМХ001 снижаются до 1,51 и 0,05 мкМ, соответственно, что существенно превышает ИД<sub>50</sub> СМХ001, определенную *in vitro* в отношении ЦМВ человека (0,001 мкМ). СМХ001 медленно метаболизируется с образованием ЦДВ, который обнаруживается в сетчатке в С<sub>max</sub> (около 1,4 мкМ) только через 3 сут после введения, а через 2 нед его концентрация снижается до 0,43 мкМ, что соответствует ИД<sub>50</sub> ЦДВ для ЦМВ человека [31, 34, 35]. Несмотря на то, что антивирусная активность СМХ001 *in vivo* при интравитреальном введении изучена и подтверждена только на модели ретинита, вызванного ВПГ-1, фармакокинетические свойства и благоприятный профиль безопасности препарата позволяют предположить, что он может представлять интерес как средство пролонгированного действия для профилактики и лечения ЦМВ-ретинитов.

*In vitro* при проведении пассирования вируса в присутствии СМХ001 удалось получить резистентные к ЦДВ варианты ЦМВ человека. Аминокислотные замены, приводящие к резистентности, локализируются в каталитической субъединице ДНК-pol pUL54. Замена D542E в ExoIII (домен δС/экзонуклеаза III) не приводит к изменению чувствительности вируса к базовым ЭХТП – ФМК и ГЦВ

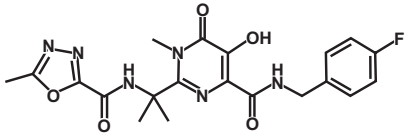
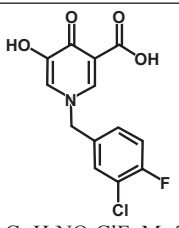
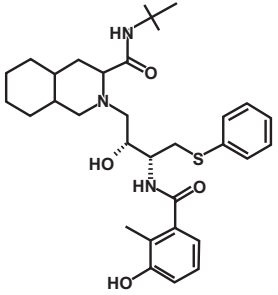
[36]. Полученные в аналогичных экспериментальных условиях варианты вируса, содержащие мутации в 3′-5′-экзонуклеазном домене (E303G/D, N408K или D413Y), в 6–11 раз менее чувствительны к СМХ001, в 9–20 раз – к ЦДВ и в 4–7 раз – к ГЦВ. Замена V812L в консервативной области IV, ассоциированная с низкоуровневой резистентностью к ЦДВ, ГЦВ и ФМК (увеличение ИД<sub>50</sub> в 2–3 раза), в сочетании с заменой E303G обуславливает значительное снижение чувствительности к СМХ001 (17-кратное), ЦДВ (34-кратное) и ГЦВ (10-кратное). Чувствительность к ФМК сохраняется на исходном уровне [37]. Так как ЦДВ не нуждается в кинировании вирусными ферментами, СМХ001 эффективен против ГЦВ-устойчивых клинических изолятов ЦМВ человека и АЦВ-резистентных изолятов ВПГ-1 и ВПГ-2, содержащих замены в pUL97 и ТК, соответственно. В доступной литературе не удалось обнаружить информации о характере взаимодействия СМХ001 и ГЦВ. Однако показано, что в комбинации СМХ001 и АЦВ взаимодействуют синергидно как в культуре клеток, так и на модели летальной инфекции мышей, заражённых ВПГ-1 или ВПГ-2 [31, 32].

СМХ001 (Бринцидофовир) был высоко оценен при проведении I и II фаз клинических испытаний в качестве средства для предотвращения развития ЦМВИ (ClinicalTrials.gov: NCT00780182 и NCT00942305). При однократном пероральном введении взрослым волонтерам в дозе 2 мг/кг массы тела СМХ001 быстро абсорбируется в тонком кишечнике и через 2,5–3 ч (T<sub>max</sub>) обнаруживается в плазме крови в максимальной концентрации (C<sub>max</sub> = 350 нг/мл); t<sub>1/2</sub> = 24 ч, АUC = 2,65 ч × мг/мл. Соответствующие показатели для ЦДВ при оральном приеме в той же дозе составляют C<sub>max</sub> = 31,2 нг/мл, T<sub>max</sub> = 11,5 ч, t<sub>1/2</sub> = 63 ч, АUC = 1,74 ч × мг/мл. Существенным преимуществом СМХ001 перед немодифицированным ЦДВ является отсутствие нефротоксичности при пероральном введении, часто наблюдаемой при в/в введении ЦДВ [28, 33]. СМХ001 безопасен и хорошо переносится в дозах 2 мг/кг 1 раз или 1 мг/кг при трёхкратном введении с интервалом 6 ч [29, 33].

В двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование в рамках II фазы клинических испытаний было включено 230 ЦМВ-положительных взрослых реципиентов ГСК. После трансплантации пациенты получали СМХ001 *per os* по 100 мг 2 раза в неделю или 200 мг 1 раз в неделю в течение 9–13 нед. Ежедневно проводили ПЦР-анализ на наличие ДНК ЦМВ в плазме крови. Частота развития ЦМВИ в опытной группе была снижена до 10% по сравнению с 37% в группе пациентов, получавших плацебо. Миелосупрессия и нефротоксичность не зафиксированы. У 30–70% пациентов наблюдалась диарея (в зависимости от дозы; в группе плацебо – 27%), тошнота, рвота в 19–37% случаев против 10% в группе плацебо [38].

К сожалению, при проведении пилотной части III фазы клинических испытаний СМХ001 для предотвращения ЦМВИ у пациентов после трансплантации ГСК (*per os* по 100 мг 2 раза в неделю, NCT01769170) не удалось выявить статистически значимого противовирусного эффекта (через 14 нед превентивной терапии частота развития клинически значимых ЦМВИ составила 24% против 36% в группе плацебо). Поэтому в мае 2015 г. было прервано проведение двух рандомизированных двойных слепых многоцентровых исследований III фазы с целью установления эффективности, безопасности и переносимости СМХ001 по сравнению с Вал-ГЦВ для профилактики ЦМВИ у серонегативных (NCT02439970)

## Антиретровирусные агенты, проявляющие активность против ЦМВ человека

Структурная формула соединения	Название соединения	Дополнительная информация
<i>Ингибиторы РНКазы/интегразы ВИЧ-1</i>		
 $C_{20}H_{21}FN_6O_5$ ; Mr 444.42	<b>Ралтегравир</b> ; Raltegravir; 518048-05-0; Isentress; МК-0518; UNII-22VKV8053U; Isentress(TM); <i>N</i> -[2-[4-[(4-фторфенил)-метилкарбамоил]-5-гидрокси-1-метил-6-оксопиримидин-2-ил]пропан-2-ил]-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоновая кислота	Установлена активность <i>in vitro</i> в отношении ЦМВ человека и мышей, ВПГ-1 и ВПГ-2
 $C_{13}H_9NO_4ClF$ ; Mr 297.67	<b>10k</b> ; 1-(3-хлор-4-фторбензил)-5-гидрокси-4-оксо-1,4-дигидропиримидин-3-карбоновая кислота	Установлена активность <i>in vitro</i> в отношении ЦМВ человека
<i>Ингибиторы протеазы ВИЧ-1</i>		
 $C_{32}H_{45}N_3O_4S$ ; Mr 567.79	<b>Нелфинавир</b> ; Nelfinavir; 159989-64-7; Вирасепт; Лирасепт; VRX496; UNII-НО3ОGH5D7I; (3 <i>S</i> , 4 <i>aS</i> , 8 <i>aS</i> )- <i>N</i> -трет-бутил-2-[(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i> )-2-гидрокси-3-[(3-гидрокси-2-метилбензоил)амино]-4-phenylsulfanylbutyl]-3,4,4 <i>a</i> ,5,6,7,8,8 <i>a</i> -октагидро-1 <i>H</i> -изохинолин-3-карбоновая кислота	Активен <i>in vitro</i> на моделях ЦМВ человека, ВПГ-1 и ВГЧ-8. Завершено клиническое испытание II фазы (лечение ЦМВ-ретинита у ВИЧ-инфицированных пациентов)

и серопозитивных (NCT02439957) реципиентов почек. Более подробная информация на сайте компании-разработчика («Chimerix, Inc.», США) отсутствует, и перспективы проведения дальнейших исследований CMX001 в качестве средства для профилактики и лечения ЦМВИ остаются неясными. Однако есть ряд более поздних сообщений об успешном применении CMX001 для купирования ГЦВ-резистентной ЦМВИ у 2 больных раком пациентов [39] и мультирезистентной ЦМВИ у реципиента почки [40].

Результаты завершённых клинических исследований II и III фаз показали, что профилактическое применение CMX001 не приводит к развитию лекарственной резистентности. Однако R. Vial и соавт. [40] сообщают, что популяция ЦМВ, резистентная не только к CMX001/ЦДВ, но и к ФМК, сформировалась через 15 дней при приёме реципиентом почки CMX001 по схеме 100 мг 2 раза в неделю (к резистентности привела замена F412L в ДНК-*pol pUL54*) [40].

Тем не менее, важно подчеркнуть, что предложенная модификация ЦДВ существенно расширяет спектр его клинического применения, позволяет заменить инъекционную форму введения на удобную пероральную и использовать препарат при различных формах почечной недостаточности. Успешно завершена II фаза клинических испытаний CMX001 для лечения инфекций, вызванных полиомавирусом ВК (NCT00793598), аденовирусной инфекции у иммуносупрессивных пациентов (NCT01241344) и профилактики поксвирусных

инфекций и поствакцинальных осложнений [41]. FDA одобрено проведение исследований III фазы для оценки безопасности и эффективности CMX001 при лечении аденовирусных инфекций у детей и взрослых пациентов (NCT02087306, в настоящее время идёт регистрация участников). Кроме того, продолжаются исследования CMX001 в качестве препарата против натуральной оспы (в опытах на кроликах ввиду невозможности проведения подобных исследований на людях). По данным компании «Chimerix», в группах животных, получавших CMX001 при появлении первых клинических симптомов заболевания или через 24–48 ч после этого наблюдалось статистически значимое снижение смертности по сравнению с группой кроликов, получавших плацебо [41]. Окончательные результаты этого исследования ожидаются в ближайшее время.

Ещё одна модификация ЦДВ – ГДП-цЦДВ (см. табл. 2) представляет собой метаболический предшественник ЦДВ. В фосфатном буферном растворе при 37°C медленно гидролизует с образованием CMX001 [34]. Активен *in vitro* против ЦМВ, ВГЧ-6, ВПГ-1, ВПГ-2, ВВЗ, ВЭБ, ВГЧ-8 [31]. *In vivo* исследовался только на модели ретинита у кроликов, вызванного ВПГ-1. Важно однако подчеркнуть, что однократное интравитреальное введение ГДП-цЦДВ в дозе 100 мкг на глаз не оказывает токсического воздействия на сетчатку и цилиарное тело глаза и обеспечивает значительную пролонгацию действия – даже через 8 нед концентрация ГДП-цЦДВ в стекловидном теле составляет 0,002 мкМ, что соответ-



ствуется ИД<sub>50</sub> препарата для ЦМВ человека (0,001–0,002 мкМ). Период полувыведения ГДП-цЦДВ из стекловидного тела ( $t_{1/2}$ ) составил 6,3 дня, что значительно превосходит по этому показателю ЦДВ ( $t_{1/2} = 20$  ч) и циклический ЦДВ ( $t_{1/2} = 10$  ч) [42].

Описанные модификации ЦДВ оптимизируют его фармакокинетику параметры, но СМХ001 и ГДП-цЦДВ не супрессируют репродукцию ЦДВ-резистентных штаммов ЦМВ, так как являются метаболическими предшественниками ЦДВ [31].

#### Антиретровирусные препараты

Потенциальная возможность использования антиретровирусных препаратов для профилактики и лечения герпесвирусных инфекций представляется весьма привлекательной, учитывая, что, во-первых, эти ЭХТП уже одобрены для лечения ВИЧ-инфекции, а, во-вторых, рецидивы герпесвирусных инфекций, часто развивающиеся в условиях иммунодефицита (в том числе при ВИЧ-инфекции) и определённые ВОЗ как СПИД-индикаторные болезни, плохо поддаются лечению [43]. Кроме того, проведение высокоактивной антиретровирусной терапии, включающей комбинацию антиретровирусных препаратов, обладающих одновременно анти-ВИЧ- и противогерпетической активностью и поражающих различные вирусные биомишени, может быть не только полезно для профилактики рецидивов герпесвирусных инфекций, но и предотвращать возможность развития лекарственной резистентности у вирусов, а также купировать рецидивы ЦМВИ, резистентной к ГЦВ. Использование таких ЭХТП и их комбинаций может быть полезно и у ВИЧ-негативных пациентов, например у реципиентов трансплантатов солидных органов и стволовых клеток, которые также подвержены высокому риску развития ЦМВИ.

Установлено, что известный антиретровирусный препарат Ралтегравир (РТВ, «Merck Sharp & Dohme, V.V.», Нидерланды; табл. 3), блокирующий интеграцию кДНК ВИЧ-1 в клеточный геном [44, 45], *in vitro* в нецитотоксичных концентрациях ингибирует репродукцию ЦМВ человека и мышей, ВПГ-1 и ВПГ-2. Так, для ЦМВ человека ИД<sub>50</sub> составляет 20 мкМ, ХТИ не менее 20 [46]. Возможно, биомишенью для РТВ является большая субъединица терминазы ЦМВ человека – продукт гена *UL86*, обладающий эндонуклеазной активностью. В структуре *pUL86* установлен домен, имеющий близкую структуру с РНКазой-каталитическим сайтом обратной транскриптазы (ОТ) ВИЧ-1 и проявляющий РНКазу/интегразаподобную активность. РНКазный каталитический сайт ВИЧ-1 включает 4 аминокислотных остатка Asp443, Asp498, Glu478 и Asp549, координирующих 2 катиона  $Mg^{2+}$ , а эндонуклеазный каталитический сайт *pUL86* сформирован Asp463, Asp651, Glu534 и Ala465, которые координируют 2 катиона  $Mn^{2+}$  [47, 48]. Поэтому представляет очевидный интерес поиск структурных аналогов РТВ с более высокой антивирусной активностью.

Ряд антиретровирусных агентов, ингибирующих РНКазу-активность ОТ ВИЧ-1, оказались активны и в отношении ЦМВ человека. Так, производные гидроксипиридонкарбоновой кислоты, подобно РТВ, содержат хелатную структуру, способную образовывать водородные связи с Glu534 и Asp651, локализованными в эндонуклеазном каталитическом кармане *pUL86*, а взаимодействие между соединениями этого класса и ионами  $Mn^{2+}$  играет ключевую роль в их анти-*pUL86*-активности. Наибольшую активность на модели ЦМВ человека проявило

соединение 10к (ИД<sub>50</sub> 4 мкМ, ЦД<sub>50</sub> > 200 мкМ, ХТИ > 50; см. табл. 3). Показано, что биомишенью для 10к является *pUL86*: в присутствии 10к ингибируется эндонуклеазная активность *pUL86* и нарезание вирусной конкатемерной ДНК на единичные геномы [48].

Нелфинавир (НФВ, «Agouron Pharmaceuticals, Inc.», США; см. табл. 3), ингибитор протеазы ВИЧ, *in vitro* эффективно подавляет также репродукцию ЦМВ человека, ВПГ-1 и ВГЧ-8. Величины ИД<sub>50</sub> 4,4, 5,3 и 2–7,4 мкМ, соответственно, хорошо сопоставимы с показателями  $S_{max}$  в плазме крови, которые обеспечиваются при приёме препарата в рекомендованных дозах 7 мкМ (при приёме НФВ по схеме 1250 мг 2 раза в день) или 5,3 мкМ при использовании схемы 750 мг 3 раза в день [49]. Остаётся неясным механизм действия НФВ на репродукцию герпесвирусов. Маловероятно, что он ингибирует герпетические протеазы, поскольку кодируемые герпесвирусами сериновые протеазы не имеют явной гомологии с аспарагил-протеазой ВИЧ [50]. Есть основания полагать, что анти-ВПГ-1-активность НФВ связана с его воздействием на клетку-хозяина [51, 52]. Однако точный механизм действия НФВ на репродукцию ЦМВ не установлен.

К сожалению, приём НФВ, широко использовавшегося для профилактики перинатальной передачи ВИЧ [53], не проявил активности в качестве потенциально-превентивного средства для снижения риска врождённой ЦМВИ у новорождённых при его приёме ВИЧ-инфицированной матерью во время беременности [54], что может быть связано с неэффективным проникновением НФВ через плаценту [55].

Учитывая активность НФВ в отношении ВИЧ-1, альфа-, бета- и гамма-герпесвирусов, можно ожидать, что он может снижать вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных лиц с герпетическими инфекциями и вероятность развития рецидивов. Было проведено клиническое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование эффективности НФВ у ВИЧ-инфицированных пациентов с ЦМВ-ретинитом (NCT00002169, II фаза). Однако полученные результаты не опубликованы.

Необходимы дальнейшие исследования для оценки эффективности НФВ для лечения заболеваний, вызываемых герпесвирусами, и определения его механизма действия для разработки новых ЭХТП.

#### Заключение

К сожалению, при проведении специфической анти-ЦМВ-терапии с использованием современных ЭХТП первого и второго ряда (ГЦВ/Вал-ГЦВ, ФМК и ЦДВ) развиваются трудноконтролируемые побочные эффекты, а необходимость использования этих ЭХТП диктуется как тяжестью заболевания, так и отсутствием препаратов с более благоприятным профилем терапевтической безопасности. Одним из подходов, позволяющих не только снизить вероятность развития нежелательных эффектов современных ЭХТП, но и расширить спектр их антивирусной активности, является их химическая модификация.

Этерификация ЦДВ (СМХ001) позволяет повысить биодоступность препарата при пероральном приёме, а также предотвращает развитие нефротоксичности – основного побочного эффекта ЦДВ, являющегося главным фактором, лимитирующим его системное применение.

Известно, что одним из наиболее распространённых

заболеваний, развивающихся на фоне иммунодефицита, является ЦМВ-ретинит, способный привести к необратимой потере зрения [57]. При пероральном, внутримышечном или в/в введении только незначительная часть лекарственного средства достигает целевого сайта ЦМВ-инфекции (стекловидного тела, сетчатки и сосудистой оболочки). Другая проблема доставки лекарственного средства в сетчатку состоит в необходимости поддержания его достаточных уровней в сайте инфекции в течение длительного времени. Поэтому требуется либо использование больших и потенциально токсичных доз ЭХТП, либо необходимо его введение напрямую в стекловидное тело. При этом частота таких болезненных инъекций определяется периодом полураспада вводимого ЭХТП. По этой причине предпринятые модификации препарата ЦДВ (ГДП-цДВ и СМХ001), позволяющие существенно снизить частоту интравитреальных инъекций при сохранении противовирусного эффекта, представляют значительный практический интерес.

В настоящее время одной из глобальных проблем здравоохранения во всём мире является рост числа лиц с иммунодефицитными состояниями различной этиологии. Так, в соответствии с данными ВОЗ на конец 2016 г. общее число только ВИЧ-инфицированных лиц превысило 36,7 млн человек, из которых 1,8 млн были инфицированы в течение 2016 г., и около 1 млн человек умерли от связанных с ВИЧ причин в течение того же года [56]. В связи с этим возрастает значимость оппортунистических инфекций, в том числе ЦМВИ. Антивирусная активность ряда коммерческих антиретровирусных препаратов в отношении ЦМВ и других герпесвирусов позволяет выработать направления поиска новых агентов широкого спектра действия, ингибирующих репродукцию неродственных вирусов (ЦМВ, ВПГ и ВИЧ) в условиях коинфекции. Модификация молекул РТВ и НФВ может обеспечить повышение их активности в отношении герпесвирусов. Очевидно, для реализации такого подхода воздействия на герпесвирусные инфекции требуется понимание точных молекулярных механизмов, посредством которых РТВ и НФВ ингибируют репродукцию герпесвирусов.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 4, 6, 7, 9-15, 17-55, 57 см. REFERENCES)

2. Цитомегаловирусная инфекция у взрослых (исключая больных ВИЧ-инфекцией). Клинические рекомендации (Утверждены решением Пленума правления Национального научного общества инфекционистов 30 октября 2014 года). Available at: [http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/CMV\\_adult.pdf](http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/CMV_adult.pdf)
5. Леонова О.Н., Виноградова Т.Н., Сизова Н.В., Степанова Е.В. Проблемы лечения больных с тяжелыми формами ВИЧ-инфекции. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2013; 5(2): 58-65.
8. Галегов Г.А., Андропова В.Л., Колобухина Л.В., Львов Н.Д. Специфическая лекарственная терапия распространенных и социально значимых вирусных инфекций человека. *Вопросы вирусологии*. 2012; (Прил. 1): 180-9.
16. Значимость устойчивости к противомикробным препаратам для общественного здравоохранения. Available at: [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/ru/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/ru/)
56. ВИЧ/СПИД. Информационный бюллетень. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/ru/>

#### REFERENCES

1. Lanzieri T.M., Dollard S.C., Bialek S.R., Grosse S.D. Systematic review of the birth prevalence of congenital cytomegalovirus infection in developing countries. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 22: 44-8. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.12.010
2. Cytomegalovirus infection in adults (excluding patients with HIV infection). Clinical recommendations (Approved by decision of the Plenum of the Board of the National Scientific Society of Infectious Diseases on October 30, 2014). Available at: [http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/CMV\\_adult.pdf](http://nnoi.ru/uploads/files/protokoly/CMV_adult.pdf) (in Russian)
3. Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Asberg A., Chou S., Danziger-Isakov L., et al. Updated international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation*. 2013; 96(4): 333-60. PMID: 23896556 DOI: 10.1097/TP.0b013e31829df29d
4. Ljungman P., Hakki M., Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2010; 24(2): 319-37. PMID: 20466273 DOI: 10.1016/j.idc.2010.01.008
5. Leonova O.N., Vinogradova T.N., Sizova N.V., Stepanova E.V. Problems of treatment of patients with severe forms of HIV infection. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2013; 5(2): 58-65. (in Russian)
6. do Carmo A.M., Santos F.M., Ortiz-Agostinho C.L., Nishitokukado I., Frota C.S., Gomes F.U., et al. Cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease is not associated with worsening of intestinal inflammatory activity. *PLoS One*. 2014; 9(11): e111574.
7. Product monograph "Valcyte". Available at: [http://www.rochecanada.com/content/dam/roche\\_canada/en\\_CA/documents/Research/ClinicalTrialsForms/Products/ConsumerInformation/MonographsandPublicAdvisories/Valcyte/Valcyte\\_PM\\_E.pdf](http://www.rochecanada.com/content/dam/roche_canada/en_CA/documents/Research/ClinicalTrialsForms/Products/ConsumerInformation/MonographsandPublicAdvisories/Valcyte/Valcyte_PM_E.pdf)
8. Galegov G.A., Андропова В.Л., Колобухина Л.В., Львов Н.Д. Specific and effective drug therapy for widely distributed viral infections of humans. *Voprosy virusologii*. 2012; (Suppl. 1): 180-9. (in Russian)
9. Boeckh M., Geballe A.P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J. Clin. Invest.* 2011; 121(5): 1673-80. DOI: 10.1172/JCI45449
10. Foscavir - FDA prescribing, side effects and uses. Available at: <https://www.drugs.com/pro/foscavir.html>
11. The Studies of Ocular Complications of AIDS Research Group in Collaboration with the AIDS Clinical Trials Group. Combination foscarnet and ganciclovir therapy vs monotherapy for the treatment of relapsed cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. The Cytomegalovirus Retreatment Trial. *Arch. Ophthalmol.* 1996; 114(1): 23-33.
12. Vistide® (cidofovir injection). Available at: <http://www.gilead.com/~media/files/pdfs/medicines/other/vistide/vistide.pdf>
13. Lurain N.S., Chou S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(4): 689-712. DOI: 10.1128/CMR.00009-10
14. Drew W.L. Cytomegalovirus resistance testing: pitfalls and problems for the clinician. *Clin. Infect. Dis.* 2010; 50(5): 733-6. DOI: 10.1086/650463
15. Jabs D.A., Martin B.K., Forman M.S. Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Research Group. Mortality associated with resistant cytomegalovirus among patients with cytomegalovirus retinitis and AIDS. *Ophthalmology*. 2010; 117(1): 128-32. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.06.016. PMID: 19818505
16. Public Health Importance of Antimicrobial Resistance. Available at: [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/en/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/)
17. Jabs D.A., Enger C., Dunn J. P., Forman M. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: ganciclovir resistance. CMV Retinitis and Viral Resistance Study Group. *J. Infect. Dis.* 1998; 177(3): 770-3. PMID: 9498461
18. Limaye A.P., Raghu G., Koelle D.M., Ferrenberg J., Huang M.L., Boeckh M. High incidence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection among lung transplant recipients receiving preemptive therapy. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(1): 20-7. PMID: 11756977 DOI: 10.1086/338143
19. Lurain N.S., Bhorade S.M., Pursell K.J., Avery R.K., Yeldandi V.V., Isada C.M., et al. Analysis and characterization of antiviral drug-resistant cytomegalovirus isolates from solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(6): 760-8. PMID: 12198609 DOI: 10.1086/342844
20. 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
21. Jabs D.A., Martin B.K., Forman M.S., Dunn J.P., Davis J.L., Weinberg D.V., et al. Mutations conferring ganciclovir resistance in a cohort of patients with acquired immunodeficiency syndrome and cytomegalovirus retinitis. *J. Infect. Dis.* 2001; 183(2): 333-7. PMID: 11120934 DOI: 10.1086/317931
22. Chou S., Lurain N.S., Thompson K.D., Miner R.C., Drew W.L. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(1): 32-9. PMID: 12825168 DOI: 10.1086/375743
23. Scott G.M., Weinberg A., Rawlinson W.D., Chou S. Multidrug resistance conferred by novel DNA polymerase mutations in human cytomegalovirus isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(1): 89-94.

- PMID: 17043128 PMID: PMC1797699 DOI: 10.1128/AAC.00633-06
24. Jabs D.A., Enger C., Forman M., Dunn J.P. Incidence of foscarnet resistance and cidofovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(9): 2240-4. PMID: 9736542 PMID: PMC105794
  25. West P., Schmiedeskamp M., Neeley H., Oberholzer J., Benedetti E., Kaplan B. Use of high-dose ganciclovir for a resistant cytomegalovirus infection due to UL97 mutation. *Transpl. Infect. Dis.* 2008; 10(2): 129-32. PMID: 17605740 DOI: 10.1111/j.1399-3062.2007.00249.x
  26. Jacobsen T., Sifontis N. Drug interactions and toxicities associated with the antiviral management of cytomegalovirus infection. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2010; 67(17): 1417-25. PMID: 20720240 DOI: 10.2146/ajhp090424
  27. Raggars R.J., Pomorski T., Holthuis J.C.M., Kälin N., van Meer G. Lipid raft: the ABC of transbilayer movement. *Traffic.* 2000; 1(3): 226-34. PMID: 11208106
  28. Ciesla S.L., Trahan J., Winegarden K.L., Aldern K.A., Painter G.R., Hostetler K.Y. Esterification of cidofovir with alkoxyalkanols increases oral bioavailability and diminishes drug accumulation in kidney. *Antiviral. Res.* 2003; 59(3): 163-71. PMID: 12927306
  29. Hostetler K.Y. Alkoxyalkyl prodrugs of acyclic nucleoside phosphonates enhance oral antiviral activity and reduce toxicity: current state of the art. *Antiviral. Res.* 2009; 82: A84-98. PMID: 19425198 PMID: PMC2768545
  30. Quenelle D.C., Lampert B., Collins D.J., Rice T.L., Painter G.R., Kern E.R. Efficacy of CMX001 against herpes simplex virus infections in mice and correlations with drug distribution studies. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(10): 1492-9. PMID: 20923374 PMID: PMC2957530 DOI: 10.1086/656717
  31. Williams-Aziz S.L., Hartline C.B., Harden E.A., Daily S.M., Prichard M.N., Kushner N.L., et al. Comparative activity of lipid esters of cidofovir and cyclic cidofovir against replication of Herpesviruses in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(9): 3724-33. PMID: 16127046 PMID: PMC1195409 DOI: 10.1128/AAC.49.9.3724-3733.2005
  32. Prichard M.N., Kern E.R., Hartline C.B., Lanier E.R., Quenelle D.C. CMX001 potentiates the efficacy of acyclovir in herpes simplex virus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4728-34. PMID: 21788472 PMID: PMC3186990 DOI: 10.1128/AAC.00545-11
  33. Painter W., Robertson A., Trost L.C., Godkin S., Lampert B., Painter G. First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2726-34. PMID: 22391537 PMID: PMC3346600 DOI: 10.1128/AAC.05983-11
  34. Wang H., Chhablani J., Freeman W.R., Beadle J.R., Hostetler K.Y., Hartmann K., et al. Intraocular safety and pharmacokinetics of hexadecyloxypropyl-cidofovir (HDP-CDV) as a long-lasting intravitreal antiviral drug. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011; 52(13): 9391-6. DOI: 10.1167/iovs.11-8293
  35. Ma F., Nan K., Lee S., Beadle J.R., Hou H., Freeman W.R., et al. Micelle formulation of hexadecyloxypropyl-cidofovir (HDP-CDV) as an intravitreal long-lasting delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; 89: 271-9. PMID: 25513956 PMID: PMC4355386 DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.12.010
  36. Scott H.J., Price N.B., Hartline C.B., Lanier E.R., Prichard M.N. Selection and Recombinant Phenotyping of a Novel CMX001 and Cidofovir Resistance Mutation in Human Cytomegalovirus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(7): 3321-5. PMID: 23650158 PMID: PMC3697342 DOI: 10.1128/AAC.00062-13
  37. Chou S., Ercolani R.J., Lanier E.R. Novel cytomegalovirus UL54 DNA polymerase gene mutations selected in vitro that confer brincidofovir resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60(6): 3845-8. PMID: 27044553 PMID: PMC4879386 DOI: 10.1128/AAC.00214-16
  38. Marty F.M., Winston D.J., Rowley S.D., Vance E., Papanicolaou G.A., Mullane K.M., et al. CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369(13): 1227-36. PMID: 24066743 DOI: 10.1056/NEJMoa1303688
  39. El-Haddad D., El Chaer F., Vanichanan J., Shan D.P., Ariza-Heredia E.J., Mulanovich V.E., et al. Brincidofovir (CMX-001) for refractory and resistant CMV and HSV infections in immunocompromised cancer patients: A single-center experience. *Antiviral. Res.* 2016; 134: 58-62. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.08.024
  40. Vial R., Zandotti C., Alain S., Decourt A., Jourde-Chiche N., Purgus R., et al. Brincidofovir use after foscarnet crystal nephropathy in a kidney transplant recipient with multiresistant Cytomegalovirus Infection. *Case Rep. Transplant.* 2017; 2017: 3624146. PMID: 28348914 PMID: PMC5350387 DOI: 10.1155/2017/3624146
  41. Brincidofovir clinical research. Available at: <http://www.chimerix.com/research-development/clinical-trials/>
  42. Cheng L., Hostetler K.Y., Lee J., Koh H.J., Beadle J.R., Bessho K., et al. Characterization of a Novel Intraocular Drug-Delivery System Using Crystalline Lipid Antiviral Prodrugs of Ganciclovir and Cyclic Cidofovir. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45(11): 4138-44. PMID: 15505067 PMID: PMC2666013 DOI: 10.1167/iovs.04-0064
  43. Siberry G.K., Abzug M.J., Nachman S. Panel on Guidelines for Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Exposed and HIV-Infected Children — a working group of the Office of AIDS Research (OAR) Advisory Council. Executive Summary: Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Exposed and HIV-Infected Children: Recommendations from the National Institutes of Health, the Centers for Disease Control and Prevention, the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the American Academy of Pediatrics. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* 2013; 2(4): 293-308. PMID: 26619492 DOI: 10.1093/jpids/pit074
  44. Grinsztajn B., Nguyen B.Y., Katlama C., Gatell J.M., Lazzarin A., Vittecoq D., et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet.* 2007; 369(9569): 1261-9. PMID: 17434401 DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60597-2
  45. Summa V., Petrocchi A., Bonelli F., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., et al. Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection. *J. Med. Chem.* 2008; 51(18): 5843-55. PMID: 18763751 DOI: 10.1021/jm800245z
  46. Zhou B., Yang K., Wills E., Tang L., Baines J.D. A mutation in the DNA polymerase accessory factor of herpes simplex virus 1 restores viral DNA replication in the presence of raltegravir. *J. Virol.* 2014; 88(19): 11121-9. DOI: 10.1128/JVI.01540-14
  47. Nodal M., Mas P.J., Blanco A.G., Arnan C., Sola M., Hart D.J., et al. Structure and inhibition of herpesvirus DNA packaging terminase nucleasase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37): 16078-83. PMID: 20805464 PMID: PMC2941324 DOI: 10.1073/pnas.10071441107
  48. Wang Y., Mao L., Kankanala J., Wang Z., Geraghty R.J. Inhibition of Human Cytomegalovirus pUL89 Terminase Subunit Blocks Virus Replication and Genome Cleavage. *J. Virol.* 2017; 91(3): e02152-16. DOI: 10.1128/JVI.02152-16
  49. Gantt S., Carlsson J., Ikoma M., Gachelet E., Gray M., Geballe A.P., et al. The HIV protease inhibitor nelfinavir inhibits Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(6): 2696-703. DOI: 10.1128/AAC.01295-10
  50. Unal A., Pray T.R., Lagunoff M., Pennington M.W., Ganem D., Craik C.S. The protease and the assembly protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J. Virol.* 1997; 71(9): 7030-8. PMID: 9261433 PMID: PMC191989
  51. Kalu N.N., Desai P.J., Shirley C.M., Gibson W., Dennis P.A., Ambinder R.F. Nelfinavir inhibits maturation and export of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* 2014; 88(10): 5455-61. PMID: 24574416 PMID: PMC4019105 DOI: 10.1128/JVI.03790-13
  52. Gantt S., Gachelet E., Carlsson J., Barcy S., Casper C., Lagunoff M. Nelfinavir impairs glycosylation of herpes simplex virus 1 envelope proteins and blocks virus maturation. *Adv. Virol.* 2015; 2015: 687162. PMID: 25709648 PMID: PMC4325974 DOI: 10.1155/2015/687162
  53. Kilewo C., Karlsson K., Ngarina M., Massawe A., Lyamuya E., Swai A., et al. Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breastfeeding by treating mothers with triple antiretroviral therapy in Dar es Salaam, Tanzania: the Mitra Plus study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2009; 52(3): 406-16. PMID: 19730269 DOI: 10.1097/QAI.0b013e3181b323ff
  54. Gantt S., Leister E., Jacobsen D.L., Boucoiran I., Huang M.L., Jerome K.R., et al. Risk of congenital cytomegalovirus infection among HIV-exposed uninfected infants is not decreased by maternal nelfinavir use during pregnancy. *J. Med. Virol.* 2016; 88(6): 1051-8. DOI: 10.1002/jmv.24420
  55. McCormack S.A., Best B.M. Protecting the Fetus Against HIV Infection: A Systematic Review of Placental Transfer of Antiretrovirals. *Clin. Pharmacokinet.* 2014; 53: 989-1004.
  56. HIV/AIDS. Fact sheet. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
  57. Stewart M.W. Optimal management of cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Clin. Ophthalmol.* 2010; 4: 285-99. PMID: 20463796 PMID: PMC2861935

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.281.8.03:616.98:578.828.6]=092:612.017.1.064]=084

*Иванова Э.С.<sup>1</sup>, Воробьева Н.Н.<sup>2</sup>, Шелудько В.С.<sup>2</sup>*

### ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ НИКАВИРА В СХЕМАХ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ХИМИОПРОФИЛАКТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ: ОЦЕНКА ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ

<sup>1</sup>ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 614088, г. Пермь;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России, 614990, г. Пермь

**Цель работы** – изучить иммунологическую и вирусологическую эффективность отечественного антиретровирусного препарата никавир (в оптимальной дозе, доказанной предыдущими клиническими исследованиями) с ламивудином в сравнении с другими препаратами группы нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы в сочетании с калетрой в схемах перинатальной химиопрофилактики (ХП) ВИЧ-инфекции.

**Методы.** Обследованы 658 беременных в возрасте 16–39 лет и дети, рождённые ими. 1-я (281 человек) и 3-я (66 человек) группы получали никавир (производство ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.») с ламивудином в сочетании с калетрой, 2-я (281 человек) и 4-я (30 человек) группы сравнения – стаг и зидовудин соответственно с ламивудином в сочетании с калетрой. Эффективность ХП оценивалась по повышению количества CD4-лимфоцитов, снижению уровня вирусной нагрузки, числу детей, рождённых без ДНК ВИЧ в крови.

**Результаты.** На фоне проведённой терапии у всех обследованных к началу родов зарегистрирована вирусная нагрузка (ВН) ниже определяемого уровня и положительная динамика CD4-лимфоцитов. При применении схемы никавир + ламивудин + калетра выявлено более быстрое уменьшение уровня ВН, наиболее выраженное к 4-й неделе терапии, по сравнению с темпом снижения этого же показателя у беременных групп сравнения.

**Выводы.** Полученные результаты позволяют считать антиретровирусную терапию с включением никавира эффективной и рекомендовать приоритетное её использование в перинатальной профилактике передачи ВИЧ от матери ребенку.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; химиопрофилактика перинатальной передачи ВИЧ; никавир.

**Для цитирования:** Иванова Э.С., Воробьева Н.Н., Шелудько В.С. Опыт применения никавира в схемах перинатальной химиопрофилактики ВИЧ-инфекции: оценка иммунологической и вирусологической эффективности. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(5): 212-217. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-212-217>

*Ivanova E.S.<sup>1</sup>, Vorobeva N.N.<sup>2</sup>, Shelud'ko V.S.<sup>2</sup>*

### THE EXPERIENCE IN THE APPLICATION OF NIKAVIR IN THE SCHEMES OF PERINATAL CHEMOPROPHYLACTICS OF HIV INFECTION: EVALUATION OF THE IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL EFFECTIVENESS

<sup>1</sup>Perm Regional Center for AIDS and Infectious Diseases, Perm, 614088, Russian Federation;<sup>2</sup>Academician Ye. A. Wagner State Medical University, Perm, 614000, Russian Federation

**Objective.** The goal of this work was to study the immunological and virological efficacy of the domestic antiretroviral drug nicavir (at the optimal dose, as proven by previous clinical studies) with lamivudine, in comparison with other drugs of the group of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in combination with kaletra in perinatal HIV chemoprophylaxis regimens.

**Methods.** 658 pregnant women aged 16-39 years and children born to them were examined. The first group (281 people) and the third group (66 people) received the nicavir (manufactured by AZT PHARMA KB LLC) with lamivudine in combination with calyx; the second (281 people) and the fourth (30 people) of the comparison group, stag and zidovudine, respectively, with lamivudine in combination with calyx. The effectiveness of CP was assessed from the increase in the number of CD4 lymphocytes, reduction of the viral load, and the number of children born without HIV DNA in the blood.

**Results.** Against the backdrop of the therapy, the viral load below the detectable level and the positive dynamics of CD4 lymphocytes were registered in all examined women prior to childbirth. When applying the scheme of nicavir + lamivudine + kaletra, a more rapid decrease in the level of VH, most pronounced by week 4 of therapy, was found, as compared with the rate of decline of the same index in pregnant comparison groups.

**Conclusions.** The obtained results allow us to consider ART with the inclusion of nicavir effective and recommend its priority use in perinatal prevention of mother-to-child transmission of HIV.

Keywords: HIV infection; chemoprophylaxis of perinatal HIV transmission; nicavir.

**Для корреспонденции:** Иванова Эльвира Сергеевна, канд. мед. наук, заведующая отделом лечебной помощи, ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 614088, г. Пермь. E-mail: [aids\\_ivanova@mail.ru](mailto:aids_ivanova@mail.ru)

**For citation:** Ivanova E.S., Vorobeva N.N., Shelud'ko V.S. The experience in the application of nikavir in the schemes of perinatal chemoprophylactics of HIV infection: evaluation of the immunological and virological effectiveness. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 212-217. (In Russ.).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-212-217>

**For correspondence:** Elvira S. Ivanova, PhD, Perm Regional Center for AIDS and Infectious Diseases, Perm, 614088, Russian Federation. E-mail: [aids\\_ivanova@mail.ru](mailto:aids_ivanova@mail.ru)

**Information about authors:**

Ivanova E.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-9854>  
Vorobeva N.N., <https://orcid.org/0000-0001-5384-5910>  
Shelud'ko V.S., <https://orcid.org/0000-0002-7080-9142>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

**Contribution.** Ivanova E.S. - concept development, design, data analysis and interpretation; Shelud'ko V.S. - statistical data processing; Ivanova E.S., Vorobeva N.N. - substantiation of the manuscript and verification of critical intellectual content, the final approval for the publication of the manuscript.

Received 13 April 2018

Accepted 26 April 2018

Химиопрофилактика (ХП) передачи ВИЧ от матери ребенку антиретровирусными препаратами (АРП) применяется в мире с первых лет эпидемии ВИЧ-инфекции. В этих случаях при своевременном назначении лечения риск инфицирования ребенка составляет лишь 1–2%. В настоящее время ХП проводится с 14 нед беременности с применением трёх АРП, причём предпочтение отдаётся препаратам с доказанной безопасностью для плода и беременной (Постановление от 21.07.2016 № 95 «О внесении изменений в СП 3.1.5.2826-10 «Профилактика ВИЧ-инфекции») [1].

Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ) составляют самую многочисленную группу АРП для перинатальной профилактики ВИЧ-инфекции. Наиболее известные из них зидовудин и ставудин, механизм действия которых основан на конкурентном подавлении фермента ВИЧ – обратной транскриптазы, обеспечивающей создание ДНК, на основе РНК вируса. Наряду с этим все НИОТ имеют ряд недостатков: низкую эффективность их превращений внутри клетки, фармакологические свойства требующие применения высоких доз препаратов, приводящих к их высокой токсичности, снижение эффективности лечения в результате быстрого развития вирусной резистентности, в том числе к аналогам нуклеозидов. Так, клинические последствия митохондриальной токсичности зидовудина включают многочисленные гематологические реакции, заболевания печени, сердца, нервной системы и др.

Ставудин и его метаболиты, проходя через плаценту, выделяются с грудным молоком, вызывают лактоацидоз, периферическую нейропатию, панкреатит, токсический гепатит, печёночную недостаточность, липоатрофию/липидистрофию и поэтому назначаются как можно более коротким курсом [2, 3]. ВОЗ рекомендовала прекратить использование ставудина для антиретровирусной терапии (АРТ) из-за высокого уровня метаболической токсичности (Руководство по использованию антиретровирусных препаратов для лечения и профилактики ВИЧ-инфекции. ВОЗ: второе издание, 2016).

Несмотря на недостатки, зидовудин и ставудин являлись одними из основных препаратов, используемых в ХП перинатальной передачи ВИЧ в России. При этом часто применялся дженерик ставудина стаг, произведённый в России и имеющий ещё большие побочные эффекты [4, 5].

В результате инновационных разработок перспективных соединений – латентных форм на основе зидовуди-

на – получен отечественный препарат никавир (фосфазид, F-AZT), оказывающий противовирусное действие в отношении ВИЧ при отсутствии эмбриотоксичности и тератогенности [6, 7] (рис. 1).

Никавир® благодаря фосфорсодержащему компоненту характеризуется более медленным формированием резистентности к ВИЧ-1 [8–10]. Он является аналогом тимидина и, конкурируя с ним в виде трифосфата, блокирует ключевой процесс репликации ретровирусов – обратную транскрипцию, на чем и основана терапевтическая эффективность уменьшения концентрации ВИЧ в крови пациента.

В 1999 г. никавир был лицензирован в Российской Федерации как препарат для лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией и профилактики заболевания [11–13].

Эффективность и безопасность никавира, отсутствие эмбриотоксических и тератогенных свойств доказаны в клинических исследованиях по использованию схем монотерапии [14], дитерапии [15] и высокоактивной АРТ [16, 17] в ХП перинатальной передачи ВИЧ от матери ребёнку.

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции широко применяют дженерики – лекарственные препараты с доказанной фармацевтической, биологической и терапевтической эквивалентностью оригиналу. Это средства, имеющие такой же состав действующих веществ, лекарственную форму и эффективность, как и оригинальные препараты, но не обладающие патентной защитой. Они могут отличаться лишь по составу вспомогательных веществ [18].

Для современных схем АРТ в качестве нуклеозидной основы рекомендуется никавир + ламивудин или зидовудин + ламивудин. При наличии анемии, эритропении вместо зидовудина используется дженерик стаг (ставудин). Третьим компонентом схемы АРТ обычно назначают лопинавир/ритонавир (калетра) в таблетках (400/100 мг 2 раза в сутки).

В литературе имеются данные о проведённом сравнительном исследовании терапевтической эффективности дженерического (зидовудин и ламивудин) и оригинального (комбивир) препаратов, применяемых в фиксированных дозах. Результаты исследования свидетельствовали об отсутствии значимых различий в эффективности обоих лекарственных средств [19].

Препарат стаг (дженерик оригинального препарата ставудин) производства «Хетеро Драгс Лимитед», Индия, использовался для проведения ХП перинатальной

передачи ВИЧ. В 2009 г. ВОЗ вывела его из употребления из-за побочных эффектов: «долгосрочных и необратимых» [20]. Вместе с тем в России ставудин (стаг) широко назначался для краткосрочного применения, в частности у беременных на разных сроках гестации без коррекции дозировки вплоть до 2016 г.

### Материал и методы

На базе ГКУЗ Пермского края «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями» в 2010–2017 гг. у 658 беременных проведено сравнительное исследование эффективности трёх схем перинатальной ХП передпчи ВИЧ-инфекции от матери ребёнку, включающих никавир, зидовудин и дженерик – АРП стаг.

Все пациентки отвечали критериям включения/не-включения.

Критерии включения:

- продолжительная желательная беременность у ВИЧ-инфицированной женщины в возрасте старше 18 лет;
- гестационный срок 14–32 нед беременности;
- нормальные показатели лабораторных гематологических и биохимических исследований;
- подписанное информированное согласие, намерение участвовать в исследовании, соблюдать условия протокола в течение периода лечения и наблюдения.

Критерии не-включения:

- возраст ВИЧ-инфицированной беременной менее 18 лет;
- алкогольная или наркотическая зависимость;
- предшествующая противоретровирусная терапия;
- приём миелосупрессоров, нейротоксических, панкреотоксических и цитотоксических препаратов;
- тяжёлая депрессия и другие психические заболевания, судорожные расстройства;
- сахарный диабет;
- тяжёлая степень нейтропении (число нейтрофилов менее  $0,75 \cdot 10^9/\text{л}$ ) или анемии (уровень гемоглобина менее 7,5 г/дл), повышенная чувствительность к эпивиру, никавиру или другим компонентам препаратов.

Все беременные с ВИЧ-инфекцией были разделены на 4 группы: 1-я (281 человек) и 3-я (66) группы получали никавир (производство ООО «АЗТ ФАРМА К.Б.») с ламивудином в сочетании с калетрой, 2-я (281) и 4-я (30) группы сравнения – стаг и зидовудин соответственно в сочетании с ламивудином и калетрой. По возрасту беременных, стадиям заболевания (3 и 4 стадии ВИЧ-инфекции) и путям передачи все группы были сопоставимы.

В исследование были включены дети в возрасте 18 мес, которые получили трехэтапную химиопрофилактику (659 детей, из них 1 двойня).

Отечественный препарат никавир применялся по 800 мг в сутки в 2 приёма. Стаг, зидовудин, ламивудин и калетра были использованы в стандартных дозах.

Диагноз ВИЧ-инфекции у всех беременных установлен методом иммунного блоттинга (ИБ) («NEW LOVE Блот-1» сер. 9G1361, 9H0363) с использованием иммуноферментного анализа для обнаружения антител к ВИЧ 1-го типа («Дженскрин Ультра ВИЧ Аг/Ат»).

Определение показателей клеточного иммунитета проводилось с помощью моноклональных антител фирмы «BD Tritest» (США) методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD «FACS Calibur». Полученные результаты сравнивали с нормой, рекомендованной Федеральным научно-методическим центром по профи-

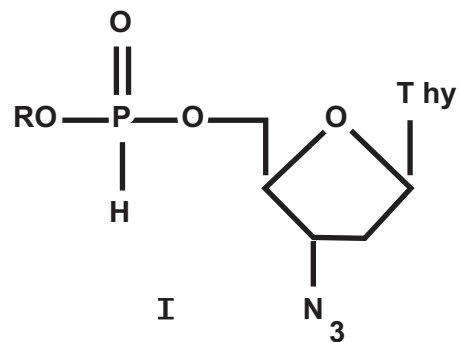


Рис. 1. Формула никавира.

лактике и борьбе со СПИДом (Покровский В.В., 2001), согласно которой количество лимфоцитов CD4 в плазме крови колеблется в пределах 800–1400 мкл<sup>-1</sup>; диапазон в 2 стандартных отклонения составляет приблизительно 500–1400 мкл<sup>-1</sup>. Обращалось внимание на процентное содержание лимфоцитов CD4 (диапазон 28–60%), поскольку этот показатель менее вариабелен.

У ВИЧ-инфицированных беременных определялась концентрация РНК ВИЧ-1 в плазме крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью тест-систем «АмплиСенс RNK ВИЧ-монитор FRT» фирмы «ИнтерЛабСервис» (порог чувствительности менее 500 копий/мл) до назначения АРП, через 4 нед после начала ХП, в срок 36 нед беременности, а также через 1,5 мес после родов.

У детей с целью ранней диагностики ВИЧ-инфекции проводилось исследование концентрации ДНК ВИЧ-1 методом ПЦР с помощью тест-систем «АмплиСенс ДНК ВИЧ-96» фирмы «ИнтерЛабСервис». Анализы делали дважды детям в возрасте 1,5 и 3 мес жизни.

#### Статистическая обработка материала

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием встроенного пакета анализа табличного процессора Excel® 2013 MSO (© Microsoft, 2013). При оценке статистической достоверности различий (*p*) использовались: для парных сравнений – двухвыборочный *t*-критерий (гомоскедастический при равенстве дисперсий, гетероскедастический при их неравенстве); для множественных сравнений (динамика по периодам лечения) – критерий Краскела – Уоллиса (ККУ). Различия считались достоверными при уровне значимости *p* < 0,05.

### Результаты

1-я группа наблюдения, получавшая АРТ с включением никавира, состояла из 281 женщины в возрасте 16–38 лет. Во 2-ю группу сравнения, получавшую ХП со стагом, вошла 281 пациентка в возрасте от 17 до 39 лет (средний возраст на момент родов составил 27,8 и 28,8 года в 1-й и 2-й группах соответственно). У всех беременных в группах исследования установлена 3 стадия (233 (83%) в 1-й группе, 222 (74%) в группе сравнения) или 4А стадия ВИЧ-инфекции (48 (17%) и 59 (26%) соответственно).

Большинство женщин (71,9 и 66,5% в 1-й и 2-й группах), состоящих на учёте, были инфицированы половым путем. Внутривенное употребление психоактивных веществ анамнестически установлено у 28,1 и 33,5% беременных в группах исследования соответственно.

Таблица 1

**Вирусная нагрузка РНК ВИЧ в разные периоды лечения**

Группа	ВН	До лечения	4 нед	36 нед	После лечения
Никавир + ламивудин + калетра	копий/мл $M \pm 2m$	41030 ± 11991	942 ± 311	1131 ± 933	23178 ± 11785
	$Ig_{10}$	4,613	2,974	3,053	4,365
Стаг + ламивудин + калетра	копий/мл $M \pm 2m$	41198 ± 11279	2548 ± 2445	464 ± 275	5544 ± 3100
	$Ig_{10}$	4,615	3,406	2,667	3,744

Таблица 2

**Параметры CD4-лимфоцитов у беременных 2-й и 4-й групп ( $M \pm m$ )**

Группа	ВН	До лечения	4 нед	36 нед	После лечения
Никавир + ламивудин + калетра	клеток/мкл <sup>1</sup> $M \pm 2m$	259,4 ± 35,7	394,2 ± 31,7	504,4 ± 69,9	321,9 ± 47,2
	клеток/мкл <sup>1</sup> $M \pm 2m$	376,2 ± 31,7	372,5 ± 37,4	501,4 ± 84,9	484,2 ± 78,9

Через месяц после начала ХП отмечалась тенденция к повышению абсолютного количества CD4-лимфоцитов в крови ВИЧ-инфицированных беременных с  $481,5 \pm 31,9$  до  $519,8 \pm 6,8 \cdot 10^6/л$ , и перед родами оно составило в среднем  $595,9 \pm 47,0 \cdot 10^6/л$  (ККУ 22,44;  $p = 0,000053$ ) у женщин из группы, получавших терапию с включением никавира. В 3-й группе также наблюдалось увеличение количества CD4-лимфоцитов с  $479,4 \pm 32,7$  до  $518,6 \pm 43,1$  и до  $592,2 \pm 60,7 \cdot 10^6/л$  (ККУ 13,92;  $p = 0,003015$ ) соответственно (рис. 2). При этом в обеих группах также наблюдался рост относительной численности CD4-лимфоцитов (в 1-й группе с 28,8 до 31,9 и 33,1%, во 2-й – с 27,0 до 28,7 и 31,1%). Среднее значение абсолютного количества CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в крови беременных на фоне АРТ перед родами достоверно повысилось в среднем более чем на 100 клеток.

Исходный уровень ВН у пациенток 1-й группы составил в среднем  $4,613 \lg_{10}$  (41030 копий/мл), через 4 нед от начала ХП снизился на  $1,6 \lg_{10}$  (почти в 43,5 раза) и

составил  $2,974 \lg_{10}$  копий/мл (942 копий/мл). Перед родами ВН была  $3,053 \lg_{10}$  (1131 копия/мл), а через 1,5 мес после отмены лечения (после родов) увеличилась до 27178 копий/мл ( $4,365 \lg_{10}$ ).

Во 2-й группе перед началом ХП ВН в среднем была  $4,615 \lg_{10}$  (41198 копий/мл), через 4 нед от начала терапии снизилась в 16 раз и составила  $3,406 \lg_{10}$  (2548 копий/мл). На сроке беременности 36 нед ВН РНК ВИЧ достигла неопределяемого уровня (менее 500 копий/мл). После отмены препаратов в послеродовом периоде ВН увеличилась в среднем до 5544 копий/мл ( $3,744 \lg_{10}$ ) (табл. 1).

Сравнительный анализ уровня CD4-лимфоцитов у женщин 3-й группы, получавших никавир + ламивудин + калетра, и 4-й группы, получавших АРТ с включением зидовудина в сочетании с ламивудином и калетрой, показал, что перед назначением препаратов он был в 1,5 раза ниже у беременных 3-й группы, чем 4-й (табл. 2). На фоне полученной ХП показатели CD4-лимфоцитов у беременных 3-й группы увеличились перед родами почти в 2 раза по сравнению с исходными в отличие от беременных 4-й группы, в которой их количество повысилось лишь в 1,3 раза.

Исходный уровень ВН до лечения в 3-й группе был выше, чем во 4-й, в 2,7 раза. Снижение уровня ВН через 4 нед наблюдения у пациенток 3-й группы было более динамично, чем у пациенток 4-й группы. Через 4 нед приёма АРТ уровень ВН у беременных 3-й группы снизился от исходного на  $3 \lg_{10}$ , достигнув неопределяемого перед родами, а через 1,5 мес после родов – увеличился до 27472 копий/мл (рис. 3).

У женщин 4-й группы ВН колебалась от 8010 до 193000 копий/мл (средний показатель 93153), а через 4 нед терапии снизилась лишь в 90 раз, составив перед родами менее 500 копий/мл.

Оценка эффективности ХП перинатальной передачи ВИЧ во всех группах проводилась на основа-

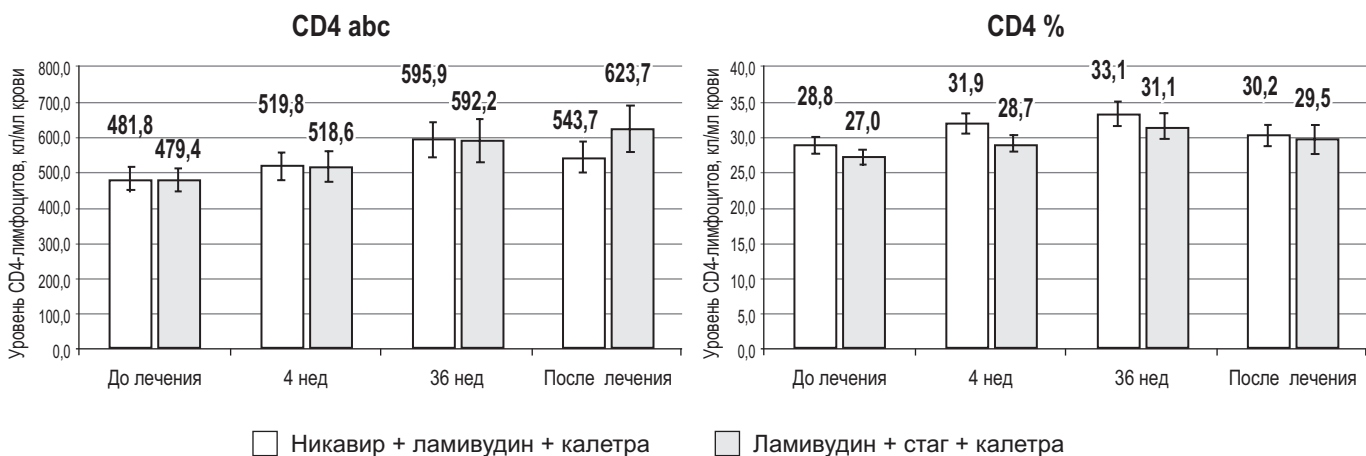


Рис. 2. Динамика CD4-лимфоцитов ( $M$ ) в различные периоды терапии.

По оси абсцисс указаны периоды терапии в неделях, в которые проводилось измерение параметра CD4-лимфоцитов. По оси ординат указан уровень CD4-лимфоцитов в абсолютных цифрах, измеряемый в клетках/мкл<sup>1</sup>. Также указан уровень CD4-лимфоцитов в относительных показателях, измеряемый в %.

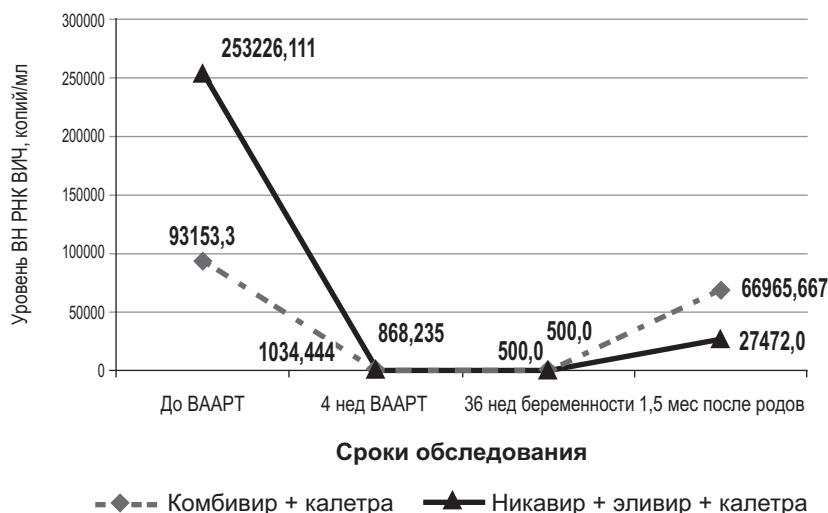


Рис. 3. Динамика уровня ВН РНК ВИЧ в различные периоды лечения.

По оси абсцисс указаны периоды терапии в неделях, в которые проводилось измерение уровня ВН РНК ВИЧ.

По оси ординат указан уровень ВН, измеряемый в копиях/мл.  
ВААРТ – высокоактивная АРТ.

нии исключения ВИЧ-инфекции у детей в возрасте 1,5 и 3 мес жизни. Все дети, рождённые от ВИЧ-инфицированных матерей, сразу были отнесены к категории риска и обследованы на наличие ДНК ВИЧ-1 методом ПЦР в указанные сроки. Все дети, рожденные в 3-й и 4-й группах, были обследованы методом ПЦР на наличие ДНК ВИЧ с отрицательными результатами.

Среди детей, рождённых женщинами 1-й группы, ВИЧ-инфекция в возрасте 18 мес была установлена у 5 (1,8 %) детей, во 2-й группе наблюдения – в 2 случаях (одна двойня) (0,7 %).

### Обсуждение

Все группы были сопоставимы по возрасту, стадиям ВИЧ-инфекции, путям передачи ВИЧ.

Достоверных различий уровня CD4-лимфоцитов между группами в периоды до лечения, 4 и 36 нед выявлено не было.

Скорость снижения ВН через 4 нед от начала лечения была больше у беременных 1-й и 2-й групп наблюдения.

Причиной перинатальной передачи ВИЧ от матери ребёнку во всех случаях установления диагноза ВИЧ-инфекции явилось позднее начало АРТ вследствие несвоевременной постановки беременным на диспансерный учет (16–29 нед беременности в 1-й группе, 28–38 нед – во 2-й), неявка и уклонение от диспансерного наблюдения и обследования, нерегулярный приём препаратов и низкая приверженность АРТ.

### Выводы

1. Положительная динамика уровня CD4-лимфоцитов в течение всего периода лечения свидетельствует о позитивном влиянии схем лечения на иммунный статус ВИЧ-инфицированных беременных.

2. Вирусологическая эффективность исследованных схем АРТ подтверждена достоверным снижением вирусной нагрузки в период терапии, более вы-

раженным к 4-й неделе. При этом у беременных, получавших ХП с никавиром, снижение ВН было более быстрым: на 1,6 lg<sub>10</sub> в 1-й группе, на 3 lg<sub>10</sub> – во 2-й группе наблюдения.

3. Отсутствие ВИЧ к 3-му месяцу жизни у всех детей, матери которых своевременно встали на учет по беременности и были привержены АРТ, свидетельствует о высокой эффективности применённых схем АРТ для перинатальной ХП.

4. Полученные результаты позволяют считать схемы АРТ с включением никавира наиболее эффективными, что делает приоритетным их применение в перинатальной профилактике передачи ВИЧ от матери ребёнку.

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

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

**Участие авторов:** Э.С. Иванова – разработка концепции, дизайна, анализ и интерпретация данных; В.С. Шелудько – статистическая обработка данных; Э.С. Иванова, Н.Н. Воробьева – обоснование рукописи и проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 8, 9, 11, 12, 17 см. REFERENCES)

1. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Беляева В.В., Ермак Т.Н., Канстри В.Г. и др. Национальные рекомендации по диспансерному наблюдению и лечению больных ВИЧ-инфекцией. Клинический протокол. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017; 6.
2. Неблагоприятные и необычные побочные действия лекарственных препаратов. Available at: <http://old-marposad-crb.med.cap.ru/565543/Page.aspx>
3. Фосфазид или Азидотимидин? Available at: [http://aztpharma.ru/fozfazid\\_ili\\_azidotimedin.htm](http://aztpharma.ru/fozfazid_ili_azidotimedin.htm)
4. Журавлева М.В., Прокофьев А.Б., Черных Т.М., Лазаева Н.Б., Бердникова Н.Г., Сереброва С.Ю. Эпоха дженериков: за и против. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; (1): 52-8.
5. Хандажанская А.Л., Широкова Е.А. 5'-Фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции. *Actanaturae*. 2013; 5(3).
6. Широкова Е.А., Хандажинская А.Л., Тарусова Н.Б., Карпенко И.Л. Производные 5'-Н-фосфоната 3'-азидо-3'-дезокситимидина и фармацевтические композиции на их основе. Патент РФ №2187509; 2002.
7. Галегов Г.А. Никавир (фосфазид) – антиретровирусный препарат: анти ВИЧ-активность, токсикология, фармакокинетика и некоторые перспективы клинического применения. *Антибиотики и химиотерапия*. 2004; 49(7): 3-8.
8. Юрин О.Г., Краевский А.А., Афонина Л.Ю., Балаганин В.А., Бузова Н.В., Е.Е. и др. Фосфазид – новый отечественный противоретровирусный препарат. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2001; (1): 43-5.
9. Мошкович Г.Ф., Минаева С.В. Результаты ретроспективного исследования применения фосфазиды и азидотимидина для профилактики передачи ВИЧ-инфекции от матери ребёнку. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2013; 5 (1): 90-6.
10. Иванова Э.С., Воробьева Н.Н., Мышкина О.К., Градобоева Е.Г., Федоренчик О.В. Профилактика вертикального пути передачи ВИЧ-инфекции у наркопотребителей. В кн.: *Материалы юбилейной научной сессии. Том 2*. Пермь; 2006: 284-5.



16. Иванова Э.С., Шмагель Н.Г., Воробьева Н.Н. Никавир в схемах химиопрофилактики вертикальной передачи ВИЧ-инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(2): 31-4.
18. Новости GMP. Дженераки. Available at: <http://gmpnews.ru/terminologiya/generic/>
19. Жуков В.В., Подымова А.С. Опыт применения дженерического НИОТ с фиксированной комбинацией ZDV и ЗТС для лечения больных в ВИЧ-инфекцией на территории Свердловской области – сравнение с оригинальным препаратом. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2014; 6(1): 101-5.
20. Современный Портал о ВИЧ. ВОЗ отзывает ставудин из-за побочных эффектов. Available at: [http://www.u-hiv.ru/news\\_hivlechenie\\_stag.htm](http://www.u-hiv.ru/news_hivlechenie_stag.htm)
10. Galegov G.A. Nicavir (phosphazide) is an antiretroviral drug: anti HIV activity, toxicology, pharmacokinetics and some perspectives of clinical use. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2004; 49(7): 3-8. (in Russian)
11. Khorlin A.A., Tarusova N.B., Dyatkina N.B., Kraevsky A.A., Bibilashvili R.Sh., Galegov G.A., et al. 5'-Phosphonates of 2',3'-dideoxynucleosides. RF1548182, 1992; US5043437, 1991; EP0354246, 1994; Japan 0354246 B1, 1995; Korean 106957, 1996. (in Japan, Korean)
12. Yurin O., Kravtchenko A., Serebrovskaya L., Golochvastova E., Burova N., Voronin E., et al. *The phase 1 of the clinical trial of 'Phosphazid', the new reverse transcriptase inhibitor. 4<sup>th</sup> International Congress on drug therapy in HIV-infection*. Glasgow, UK; 1998.
13. Yurin O.G., Kraevskiy A.A., Afonina L.Yu., Balaganin V.A., Burova N.V., Voronin E.E., et al. Phosphazide - a new domestic antiretroviral drug. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2001; (1): 43-5. (in Russian)
14. Moshkovich G.F., Minaeva S.V. The results of a retrospective study of the use of phosphazide and azidothymidine to prevent the transmission of HIV from mother to child. *VICH-infektsiya i immunosupressiya*. 2013; 5 (1): 90-6. (in Russian)
15. Ivanova E.S., Vorob'eva N.N., Myshkina O.K., Gradoboeva E.G., Fedorenchik O.V. Prevention of vertical transmission of HIV infection in drug users. In: *Materials of the jubilee scientific session. Volume 2 [Materialy yubileynoy nauchnoy sessii. Tom 2]*. Perm'; 2006: 284-5. (in Russian)
16. Ivanova E.S., Shmagel' N.G., Vorob'eva N.N. Nikavir in the schemes of chemoprophylaxis of vertical transmission of HIV infection. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(2): 31-4. (in Russian)
17. Ivanova E.S., Shmagel N.G., Vorobyova N.N. Nikavir in Chemoprevention Regimens of Vertical HIV Transmission. In: Kasenga F., ed. *Understanding HIV/AIDS Management and Care*. Rijeca, Croatia: InTech; 2011: 125-48.
18. *GMPNews. Generics*. Available at: <http://gmpnews.ru/terminologiya/generic/> (in Russian)
19. Zhukov V.V., Podymova A.S. The experience of using a generic NRTI with a fixed combination of ZDV and 3TC for the treatment of patients in HIV infection in the Sverdlovsk Region is a comparison with the original drug. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2014; 6(1): 101-5. (in Russian)
20. Modern Portal on HIV. WHO withdraws stavudine because of side effects. Available at: [http://www.u-hiv.ru/news\\_hivlechenie\\_stag.htm](http://www.u-hiv.ru/news_hivlechenie_stag.htm) (in Russian)

## REFERENCES

1. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Belyaeva V.V., Ermak T.N., Kanestri V.G., et al. National guidelines for dispensary observation and treatment of HIV patients. Clinical protocol. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2017; 6. (in Russian)
2. Stavudine Side Effects by Likelihood and Severity. Available at: [https://health.mail.ru/drug/stavudin/#side\\_effects](https://health.mail.ru/drug/stavudin/#side_effects)
3. Unfavorable and unusual side effects of medications. Available at: <http://old-marposad-crb.med.cap.ru/565543/Page.aspx> (in Russian)
4. Phosphazide or Azidothymidine? Available at: [http://aztpharma.ru/ru/fosfazid\\_ili\\_azidotimedin.htm](http://aztpharma.ru/ru/fosfazid_ili_azidotimedin.htm)
5. Zhuravleva M.V., Prokof'ev A.B., Chernykh T.M., Lazaeva N.B., Berdnikov N.G., Serebrova S.Yu. Age of generics: pro and con. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2016; (1): 52-8. (in Russian)
6. Khandazhanskaya A.L., Shirokova E.A. 5'-Phosphonates AZT: achievements and prospects in the treatment and prevention of HIV infection. *Actanaturae*. 2013; 5(3). (in Russian)
7. Shirokova E.A., Khandazhinskaya A.L., Tarusova N.B., Karpenko I.L. The 3'-azido-3'-deoxythymidine 5'-H-phosphonate derivatives and pharmaceutical compositions thereof. Patent RF №2187509; 2002. (in Russian)
8. Machado J., Tsoukas C., Salomon H., Oliveira M., Krayevsky A.A., Wainberg A.M. Antiviral activity and resistance profile of phosphazid - a novel prodrug of AZT. *Nucleosides Nucleotides*. 1999; 18(4-5): 901-6.
9. Skoblov Y., Karpenko I., Shirokova E., Popov K., Andronova V., Galegov G., et al. Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5'-hydrogenphosphonate of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Antiviral Res*. 2004; 63(2): 107-13.

Поступила 13.04.18

Принята в печать 26.04.18

Мальдов Д.Г.<sup>1</sup>, Андропова В.Л.<sup>2</sup>, Григорян С.С.<sup>2</sup>, Исаева Е.И.<sup>2</sup>, Балакина А.А.<sup>3</sup>, Терентьев А.А.<sup>3</sup>, Ильичёв А.В.<sup>1</sup>, Галегов Г.А.<sup>2</sup>

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ СТИМФОРТЕ НА ГЕРПЕСВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ

<sup>1</sup>ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

<sup>3</sup>ФГБУ «Институт проблем химической физики» РАН, 142432, Московская область

При острой герпесвирусной инфекции в пораженных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) органах мышей при введении Стимфорте (100 или 250 мкг/мышь) наблюдается усиление протеазной активности и появляются значительные количества гранзима В, следовательно, действие препарата направлено на активацию клеток-киллеров, играющих чрезвычайно важную роль в подавлении инфекции ВПГ-1. Несмотря на то что введение Стимфорте (100 мкг/мышь) интактным мышам индуцирует продукцию интерферона β (ИФН-β) и не влияет на продукцию ИФН-λ, у зараженных ВПГ-1 животных после введения Стимфорте продукция ИФН-β в сыворотке крови, головном мозге и лёгких падает, а продукция ИФН-λ при введении 100 мкг/мышь Стимфорте достоверно растёт.

Ключевые слова: вирус герпеса простого; Стимфорте; иммуностимулятор; интерферон; натуральные клетки-киллеры; врождённый иммунитет.

Для цитирования: Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Григорян С.С., Исаева Е.И., Балакина А.А., Терентьев А.А., Ильичёв А.В., Галегов Г.А. Механизм действия стимфорте на герпесвирусную инфекцию. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 218-223. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-218-223>

Maldov D.G.<sup>1</sup>, Andronova V.L.<sup>2</sup>, Grigorian S.S.<sup>2</sup>, Isaeva E.I.<sup>2</sup>, Balakina A.A.<sup>3</sup>, Terentyev A.A.<sup>3</sup>, Ilyichev A.V.<sup>1</sup>, Galegov G.A.<sup>2</sup>

## THE MECHANISM OF STIMFORTE ACTION ON HERPESVIRUS INFECTION

<sup>1</sup>SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation;

<sup>2</sup>National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>3</sup>Institute of Problems of Chemical Physics, 142432, Moscow Region, Russian Federation

Increased protease activity and a significant amount of granzyme B were observed in organs of mice infected with acute herpes simplex virus HSV-1 with the introduction of Stimforte (100 or 250 µg/mouse). Thus, this drug activates killer cells, which play an extremely important role in the suppression of HSV-1 infection.

Although the administration of Stimforte (100 µg/mouse) to intact mice results in the activation of IFN-β production and does not activate the production of IFN-λ, Stimforte administration to animals infected with HSV-1 reduces production of IFN-β in serum, brain and lungs, whereas the production of IFN-λ considerably increases as the result of administration of 100 µg/mouse of Stimforte.

Keywords: herpes simplex virus; Stimforte; immunostimulatory; interferon; natural killer cells; natural immunity.

For citation: Maldov D.G., Andronova V.L., Grigorian S.S., Isaeva E.I., Balakina A.A., Terentyev A.A., Ilyichev A.V., Galegov G.A. The mechanism of stimforte action on herpesvirus infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 218-223. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-218-223>

For correspondence: Dmitriy G. Maldov, Ph.D., Head of the Laboratory of pharmacology, SKY LTD, Moscow, 129301, Russian Federation. E-mail: [maldov-dg@yandex.ru](mailto:maldov-dg@yandex.ru)

### Information about authors:

Maldov D.G., <http://orcid.org/0000-0002-8214-0538>  
Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0288>  
Grigorian S.S., <http://orcid.org/0000-0002-2178-0451>  
Ilyichev A.V., <http://orcid.org/0000-0003-4675-0766>

Isaeva E.I., <http://orcid.org/0000-0002-2523-0692>  
Balakina A.A., <http://orcid.org/0000-0002-5952-9211>  
Terentyev A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2259-8184>  
Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 17 October 2017  
Accepted 12 December 2017

## Введение

Инфекции, вызываемые вирусами простого герпеса (ВПГ), чрезвычайно широко распространены во всем мире. Первичное инфицирование может осуществляться различными путями (контактным, половым, воздушно-

капельным, трансплацентарным, трансцервикальным, трансфузионным, а также при трансплантации органов, через инструменты при оперативных вмешательствах и т. д.), после чего ВПГ пожизненно сохраняется в организме и периодически вызывает рецидивы, частота и

Для корреспонденции: Мальдов Дмитрий Григорьевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией фармакологии ЗАО «СКАЙ ЛТД», 129301, г. Москва. E-mail: [maldov-dg@yandex.ru](mailto:maldov-dg@yandex.ru)

тяжесть протекания которых зависят от состояния иммунной системы.

Иммунный ответ организма на герпетическую инфекцию включает неспецифические иммунные реакции, реализующие естественную резистентность организма к патогену (врождённый иммунитет, в том числе продукция комплемента и интерферонов (ИФН)), а также воздействие цитотоксических Т-лимфоцитов (англ. cytolytic T-lymphocytes, CTL) и натуральных киллеров (англ. natural killer cells, NK) на инфицированные ВПГ клетки, и приобретённый иммунитет (выработка специфических антител) [1]. Для связывания со специфическими к ВПГ нейтрализующими антителами доступен только внеклеточный вирус. Однако при развитии герпетической инфекции большая часть новой генерации вирусных частиц не попадает в кровяное русло, распространяясь из клетки в клетку по цитоплазматическим мостикам, и остаётся недоступной для антител. Поэтому гуморальный ответ на герпетическую инфекцию имеет значение для контроля распространения вируса и локализации очага инфекции, протекающей по литическому типу. Одна из ведущих ролей в купировании острой фазы инфекции принадлежит цитокинам (в том числе семейству ИФН), повышающим активность макрофагов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, NK-клеток и инициирующим включение механизмов противовирусного адаптивного иммунитета.

Однако герпесвирусы способны супрессировать большинство реакций врождённого иммунитета, в том числе продукцию ИФН- $\alpha$ , - $\beta$  и - $\gamma$  [2–5]. Показано, что у лиц, страдающих хронической герпетической инфекцией, наблюдаются различные нарушения ИФН-статуса и иммунной системы: снижение продукции ИФН- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  и активности NK-клеток, нарушения Т-клеточного и гуморального звеньев иммунной системы (нейтропения, снижение количества CD3<sup>+</sup>, и/или CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, и/или CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, и/или CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, повышение количества CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов). Важно подчеркнуть, что в большинстве случаев отмечаются комбинированные нарушения иммунного статуса [6, 7]. Кроме того, у этой группы пациентов развивается вторичный (приобретённый) иммунодефицит, что связано с выработкой в процессе репродукции герпесвирусов белков, нарушающих функционирование главного комплекса гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex, MHC) классов I и II путём блокирования рецепторов MHC (системы HLA (англ. human leucocyte antigens)) или связывания транспортёра клеточных антигенов TAP1, предотвращая перенос молекул MHC на поверхность инфицированных клеток [8], в результате чего нарушается каскад передачи сигналов пролиферации и дифференцировки в системе специфического иммунного ответа, взаимодействие CTL с клетками-мишенями, Т-киллеров с антигенпрезентирующими клетками. Вследствие развития вторичного иммунодефицита ВПГ ускользает от обнаружения клетками иммунной системы, что приводит к развитию персистирующей хронической герпесвирусной инфекции [7, 9].

Таким образом, состояние иммунной системы играет существенную роль в реактивации ВПГ, тяжести течения рецидива и продолжительности проведения необходимой противовирусной терапии. Поэтому представляется необходимым включение в комплексную терапию хронических герпетических инфекций препаратов, корректирующих иммунный ответ организма.

Как было показано нами ранее, препарат Стимфорте (лиофилизат хроматографически очищенной водной вытяжки из тушек ужей) в условиях *in vivo* супрессирует репродукцию как ДНК-, так и РНК-содержащих вирусов, стимулируя различные звенья как врождённого, так и адаптивного иммунного ответа организма на вирусную инфекцию, т. е. оказывает комплексное воздействие на иммунную систему [10–15]. Вероятно, основным действующим компонентом препарата являются фрагменты гликозаминогликанов, прежде всего нейтральные фрагменты глюкуроновой кислоты. Однако механизм воздействия Стимфорте на иммунную систему сложен и до конца не изучен.

Целью данного комплексного исследования явилось продолжение ранее начатого детального изучения изменений механизмов противовирусного иммунитета под влиянием иммуностимулирующего препарата Стимфорте на фоне генерализованной герпетической инфекции.

### Материал и методы

**Препарат.** Препарат Стимфорте (лиофилизированный порошок) произведён на опытно-биотехнологическом производстве Института биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (разработан ЗАО «СКАЙ ЛТД»).

**Вирусы и клетки.** Культуру клеток почек зелёной мартышки Vero E6 выращивали в ростовой питательной среде (среда Игла производства ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова») РАМН, соединённая с эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, 5%) производства «ПанЭко» (Россия), с добавлением бензилпенициллина 100 ЕД/мл). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Полученную монослойную культуру клеток использовали для работ с ВПГ.

Эталонный штамм ВПГ 1-го типа L<sub>2</sub> (ВПГ-1/L<sub>2</sub>(ТК<sup>+</sup>)) получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

**Животные.** В исследовании использовали самцов белых линейных мышей BALB/c массой 12 г, полученных из питомника ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, филиал «Столбовая» (Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Все процедуры проводились строго в соответствии с требованиями, изложенными в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977». В опытных и контрольных группах было по 15 животных. Инфекционный материал с титром вируса 1,5 · 10<sup>5</sup> БОЕ/мл (5,18 lg БОЕ/мл) вводили внутрибрюшинно (в/б). Доза вируса 3 · 10<sup>4</sup> БОЕ/0,2 мл на мышью обеспечивала 50% гибель животных в контроле.

**Схема введения препарата инфицированным животным.** Стимфорте растворяли *ex tempore* в стерильном физиологическом растворе и вводили животным в/б в объёме 0,2 мл в разовых дозах 100, 150, 200 или 250 мкг/мышь (3,3, 5, 6,6 или 8,3 мг на 1 кг массы соответственно, по 3 мыши в каждой группе) двукратно по схеме: через 24 ч после заражения, затем вторично через 48 ч.

Для определения влияния препарата на репродукцию ВПГ в органном материале животных забивали через 4 сут после заражения, органнй материал (головной мозг, лёгкие) гомогенизировали при 4°C и готовили 10%

Таблица 1

**Протеазная активность гомогенатов органов заражённых ВПГ-1 мышей, получавших разные дозы Стимфорте**

Исследуемый материал	Доза Стимфорте, мкг/мышь			
	0 (контроль)	50	100	250
	протеазная активность, нг протеаз/мг белка			
Гомогенат мозга	94,6 ± 17,6	398,7 ± 13,8	972,3 ± 125,1	1411,2 ± 177,4
Гомогенат лёгких	116,3 ± 6,8	67,4 ± 21,3	176,0 ± 32,0	655,4 ± 35,4

Примечание. Здесь и в табл. 2: приведены результаты двух независимых опытов.

суспензию в физиологическом растворе. Суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Полученный таким образом супернатант хранили при -25°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли путём титрования в культуре клеток, как описано ниже.

*Инфекционный титр ВПГ* определяли методом бляшкообразования. Для этого монослойные культуры клеток Vero E6, выращенные в 24-луночных пластиковых планшетах («Costar», США), заражали 10-кратными разведениями вируса. Через 1 ч клеточный монослой отмывали от неадсорбировавшегося вируса физиологическим раствором, вносили среду покрытия по 2 мл/лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среда покрытия состояла из сред Игла и 199 (производство ФГБУ «НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН), соединённых в соотношении 1:1, 5% ЭТС, 0,4% агарозы («SIGMA», США). Через 48 ч среду покрытия удаляли, инфицированные культуры фиксировали 10% нейтральным формалином, окрашивали 0,5% раствором генцианвиолета и подсчитывали бляшки [12].

*Вестернблот* проводили по описанной ранее методике [16]. Для определения гранзима В использовали антитела фирмы «BioVision» (кат. № 3073R-100), для контроля – антитела к В-актину производства «R&D Systems». Вестернблот для определения ИФН-γ проводили по той же описанной ранее методике с первичными антителами фирмы «PBL Interferon Source», США.

*Протеазную активность* определяли по гидролизу меченного ФИТЦ-казеина фирмы «Sigma» (кат. № SIC0528) в соответствии с рекомендацией этой фирмы (модифицированный метод Twining).

*Иммуноферментный анализ* для определения ИФН-β и ИФН-λ проводили с использованием наборов фирмы «PBL Interferon Source», США.

**Результаты**

Как видно на рис. 1, двукратное введение Стимфорте мышам, инфицированным ВПГ-1, приводит к снижению инфекционного титра вируса в головном мозге и лёгких. Эффект, оказываемый препаратом, носит выраженный дозозависимый характер.

С целью выявления механизмов, с помощью которых Стимфорте супрессирует репродукцию вируса, мы изучили влияние препарата на протеазную активность в тканях мозга и лёгких инфицированных животных, а также на продукцию ИФН-β и ИФН-λ в условиях экспериментальной острой генерализованной ВПГ-1-инфекции у мышей.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1, в головном мозге мышей, инфицированных ВПГ-1, протеазная активность снижается в 2 раза по сравнению с таковой

в мозге интактных животных – с 195,23 до 94,6 нг условного трипсина (1U). Однако у инфицированных животных, получивших Стимфорте в дозе 50 мкг, соответствующий показатель значительно выше – 398,7 нг, а при увеличении дозы препарата в 2 и 5 раз (100 или 250 мкг) – повышается до 972,3 и 1411,2 нг соответственно. Аналогичные результаты были получены при изучении уровня протеазной активности в лёгких под действием Стимфорте – эффект также носит дозозависимый характер. Методом вестернблота с использованием видоспецифичных антител мы показали, что количество гранзима В в поражённых органах мышей увеличивается пропорционально количеству введённого Стимфорте (рис. 2).

Если в гомогенате мозга инфицированных животных, получавших препарат в дозе 50 мкг/мышь, количество гранзима В составляло 1,67 мг/кг, при использовании препарата в дозе 250 мкг/мышь в тех же экспериментальных условиях количество гранзима В в мозге возросло до 8,3 мг/кг. В гомогенате лёгких данная закономерность выражена слабее.

Известно, что контроль герпесвирусной инфекции в ранней стадии осуществляется почти исключительно системой ИФН. J. Melchjorsen и соавт. [17] установили, что ВПГ-1 индуцирует экспрессию ИФН-α, -β и -λ (интерлейкинов 28 и 29 (ИЛ-28, ИЛ-29)), а также фактора некроза опухоли α и хемокинов CCL5 и CXCL10 в человеческих макрофагах моноцитарного происхождения дендритных клетках (ДК). Ранее нами было показано, что под действием Стимфорте происходит активация макрофагов, а также моноцитов [15] и нейтрофилов [11], причем на все эти виды клеток крови препарат оказывает прямое действие. Поэтому нам представлялось целесообразным исследовать влияние Стимфорте на состояние ИФН-статуса у инфицированных ВПГ-1 мышей в условиях генерализованной инфекции.

Как показывают данные, приведенные в табл. 2, у интактных мышей через 24 ч после введения Стимфорте наблюдается значительное усиление продукции ИФН-β – его вырабатывается в 1,6 раза больше, чем ИФН-α, и

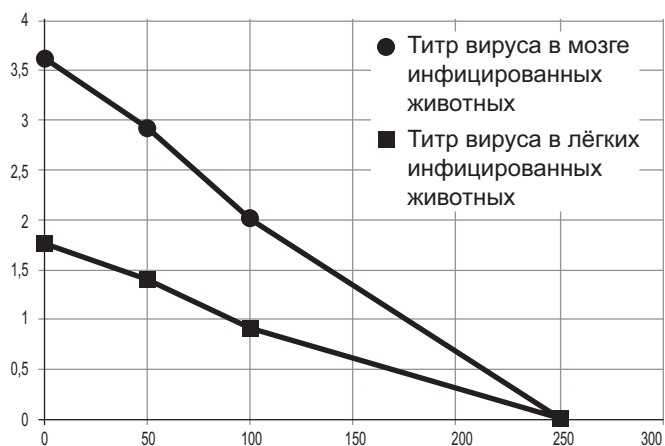


Рис. 1. Ингибирование репродукции ВПГ-1 Стимфорте в мозге и лёгких заражённых животных.

По оси абсцисс – доза Стимфорте (в мкг/мышь); по оси ординат – инфекционный титр вируса (в lg БОЕ/мл). Кривые построены на основании данных, полученных в двух независимых опытах.

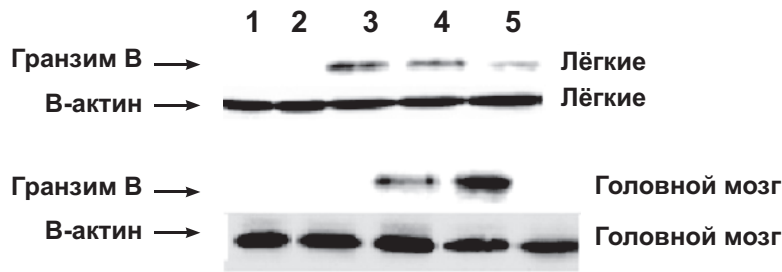


Рис. 2. Индукция гранзима В в поражённых органах заражённых ВПГ-1 мышей.

1 – органнй материал, полученный от контрольных инфицированных животных; 2 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 50 мкг/мышь; 3 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 100 мкг/мышь; 4 – органнй материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 250 мкг/мышь; 5 – органнй материал, полученный от контрольных интактных животных.

почти в 4 раза больше, чем ИФН-γ. Через 72 ч в сыворотке в значительных количествах обнаруживается только ИФН-γ. Продукция ИФН-λ у интактных мышей данным препаратом не стимулируется.

После заражения ВПГ-1 у мышей, не получавших Стимфорте (контрольная группа), в крови, головном мозге и лёгких увеличивается продукция не только ИФН-β (в 2,5 – 3 раза), но и ИФН-λ – в 10 раз (рис. 3). В отличие от контрольных групп животных при введении препарата Стимфорте зараженным ВПГ-1 мышам наблюдается падение содержания ИФН-β в сыворотке крови, тканях мозга и лёгких.

При введении Стимфорте в дозах 100 и 250 мкг/мышь количество ИФН-β в крови и мозге снижается примерно одинаково (в лёгких снижение продукции ИФН-β под влиянием дозы 250 мкг/мышь незначительно). Наоборот, количество ИФН-λ в сыворотке крови инфицированных животных после двукратного введения 100 мкг Стимфорте резко увеличивается до  $852,5 \pm 9,19$  пг/мл, но при введении 250 мг препарата по той же схеме количество ИФН-λ падает до  $400 \pm 43,84$  пг/мл (см. рис. 3). Следовательно, индукция ИФН-λ может играть существенную роль в подавлении герпесвирусной инфекции препаратом Стимфорте, а ИФН-β, вероятно, не является важным звеном в подавлении ВПГ-1-инфекции.

### Обсуждение

Ранее нами было показано, что Стимфорте повышает активность как НК-, так и CTL-клеток [14]. Активность НК-клеток является одним из важнейших показателей

эффективности иммунного ответа на вирусную инфекцию. Так, при изучении иммунного статуса организма пациентов, страдающих хроническим орофациальным герпесом упорно-рецидивирующего течения, было показано, что более чем в 47% случаев наблюдался дефицит НК-клеток [6].

Изменение протеазной активности гомогенатов органов является критерием, позволяющим оценить влияние препарата на активность НК и CTL. Так как их цитотоксическая активность определяется экспрессией сериновых протеаз, среди которых наибольшей активностью обладает гранзим В, синтезирующийся исключительно в НК- и CTL-клетках, увеличение в этих клетках количества гранзима В также позволяет оценить влияние препарата на активность этих клеток.

Нами показано, что введение Стимфорте приводит к существенному дозозависимому повышению протеазной активности и увеличению количества гранзима В в тканях мозга и лёгких инфицированных животных. Полученный результат позволяет заключить, что одним из ключевых механизмов, позволяющих Стимфорте супрессировать репродукцию ВПГ-1, является активация НК-клеток.

Для подавления острой фазы герпесвирусной инфекции большое значение имеет интерфероновый статус организма. В ранней стадии инфекции распространение вируса контролируется ИФН: они оказывают не только выраженное противовирусное, но и иммуномодулирующее действие [18]. Следует принять во внимание, что при острой герпесвирусной инфекции продукция ИФН возрастает, но она может привести к транзиторной супрессии (истощению системы ИФН); герпесвирусы способны ингибировать продукцию ИФН-α, -β и -γ, поэтому при вирусных инфекциях с тяжёлым хроническим течением система ИФН находится в функционально-дефицитном состоянии [2–5, 19].

Мы установили, что после введения Стимфорте у интактных мышей в течение первых суток продукция ИФН-β повышается и к 24 ч количество ИФН-β в сыворотке достигает максимальных значений, а затем снижается, достигая через 48 ч практически нулевых значений, и через 72 ч в значительных количествах обнаруживается только ИФН-γ. Продукция ИФН-λ у интактных мышей данным препаратом не стимулируется. Поэтому мы предположили, что под воздействием Стимфорте в первые 2 сут после его введения зараженным ВПГ-1 мышам ведущую роль в ограничении репродукции вируса в органах и тканях животных играет ИФН-β, а в более поздних стадиях инфекции – ИФН-γ.

Однако при сравнительном изучении действия Стимфорте на интерфероногенез у заражённых и интактных мышей было установлено, что стимулирующее действие препарата на продукцию ИФН у этих групп животных кардинально отличается.

Если в условиях ВПГ-1-инфекции у мышей контрольной группы (нелеченных) продукция ИФН-β, и ИФН-λ растёт, при введении зараженным животным Стимфорте на фоне достоверного ингибирующего действия препарата на репродукцию вируса в мозге (см. рис. 1) наблюдается супрессия продук-

Таблица 2

Динамика изменения продукции ИФН в сыворотке незаражённых мышей после введения 100 мкг/мышь Стимфорте

Вид ИФН	Время после введения Стимфорте, ч				
	6	24	48	72	96
Количество ИФН, пг/мл					
Концентрация ИФН-α	22 ± 1,0	250 ± 47	н.и.	31,5 ± 21	н.и.
Концентрация ИФН-β	27,5 ± 1,5	405 ± 42,5	н.и.	29 ± 19,5	н.и.
Концентрация ИФН-γ	12,0 ± 0,5	106,5 ± 11	н.и.	175,5 ± 16,8	н.и.
ИФН-λ2/3	1,5 ± 0,5	3,0 ± 0,0	1,5 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0

Примечание. н.и. – не исследовали.

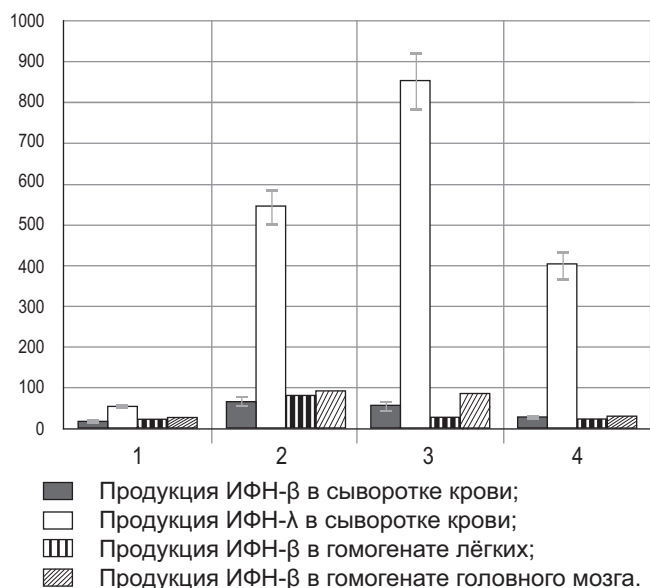


Рис. 3. Влияние Стимфорте на индукцию ИФН-β и ИФН-λ в органах и тканях заражённых ВПГ-1 мышей.

По оси абсцисс: 1 – органный материал, полученный от интактных мышей;

2 – органный материал, полученный от заражённых мышей; 3 – органный материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 100 мкг/мышь; 4 – органный материал, полученный от инфицированных животных, получавших Стимфорте в дозе 250 мкг/мышь. По оси ординат – концентрация ИФН (в пг/г).

ции ИФН-β, а количество ИФН-λ, наоборот, резко увеличивается после двукратного введения 100 мкг Стимфорте (см. рис. 3). Следовательно, индукция ИФН-λ может играть существенную роль в подавлении герпесвирусной инфекции препаратом Стимфорте, а ИФН-β, вероятно, не является важным звеном в подавлении ВПГ-1-инфекции.

Отсутствие стимулирующего действия Стимфорте на продукцию ИФН-β можно объяснить следующим образом. ВПГ-1 в ранней стадии вызывает активацию производства ИФН-β [20]. Однако позже вирусные белки блокируют его продукцию и действие. Как показали G. Melgoc и соавт. [21], сверххранний белок ICP0 ВПГ-1 ингибирует транскрипцию генов ИФН-β хозяина, хотя точный механизм этого процесса неясен. Методом иммунопреципитации инфицированных клеточных лизатов было установлено, что ICP0 образует комплекс, включающий ИФН-регулирующий фактор-3 (IRF-3) и транскрипционные коактиваторы p300 и CBP (англ. CREB-binding protein, белок, связывающий трикарбонные кислоты). Однако в отличие от некоторых других вирусных белков, которые ингибируют активность IRF-3 путем его фосфорилирования и димеризации, ICP0 не оказывает прямого действия на IRF-3. Авторы предполагают, что ICP0 активирует связывание IRF-3 и CBP/p300 с ядерными структурами, следствием чего является инактивация и ускоренная деградация IRF-3, что в свою очередь приводит к снижению продукции ИФН-β. M. Zhang и соавт. [22] показали, что ВПГ-2 также ингибирует транскрипцию генов, способствующих индукции IRF-3, в том числе ИФН-β. Кроме того, продуктивная инфекция ВПГ-2 подавляет продукцию ИФН-β,

индуцированную вирусом Сендай или полиинозитил-полицитидиловой кислотой, путем блокирования связи IRF-3 с IRF-чувствительным промотором. Видимо, Стимфорте не оказывает влияния на процесс блокирования белками ВПГ продукции ИФН-β, поэтому его введение не приводит к стимуляции продукции и действия этого ИФН.

Как описано выше, Стимфорте повышает продукцию ИФН-λ, который, вероятно, является одним из факторов, позволяющих купировать герпетическую инфекцию. Из данных литературы следует, что ИФН-λ ингибирует репродукцию ВПГ-1 и ВПГ-2 в первичных культурах астроцитов и нейронов человека [23], а также в культуре клеток Vero [24]. Кроме того, на модели экспериментальной генерализованной герпетической инфекции мышей показано, что в/б введение животным ИФН-λ перед заражением ВПГ-2 обеспечивает 10-кратное снижение вирусной нагрузки. ИФН-λ является важным медиатором антивирусного ответа в эпителиальных тканях и слизистых оболочках: предварительное введение ИФН-λ во влагалище полностью защищало экспериментальных животных в течение 20 дней после интравагинального заражения ВПГ-2. У мышей, получавших ИФН-α, данного защитного эффекта не наблюдалось. Таким образом, на модели вагинальной инфекции противовирусный эффект ИФН-λ намного превосходит эффект ИФН-α.

Показано, что обработка макрофагов и ДК человека ИФН-λ (ИЛ-29) перед инфицированием ВПГ-1 обеспечивает снижение транскрипции гена сверххранного вирусного белка ICP27 (одного из ключевых белков, блокирующих развитие раннего врождённого иммунного ответа), значительно повышает экспрессию мРНК цитокинов и их продукцию. Аналогичный эффект наблюдается при заражении макрофагов и ДК ВПГ-1, синтезирующим функционально неактивный ICP27, что коррелирует со значительным повышением активации факторов транскрипции IRF-3 и NF-κappa B и ингибированием репродукции вируса [17].

Так как ИФН-λ проявляет низкую активность против ВПГ-2 в ряде клеточных линий (гепатомы человека HepG2, аденокарциномы лёгкого человека A549, лейкоцитарной моноцитарной лимфомы U937, лимфоидных клеток Raji, эпителиоидных клеток рака шейки матки HeLa) [25], можно предположить, что его противовирусное действие *in vivo* реализуется путём стимуляции иммунной системы, а не через индукцию медиаторов антивирусного состояния в клетках-мишенях. Эти данные согласуются с полученными нами результатами – в присутствии Стимфорте количество зараженных клеток Vero снижается не более чем на 15% [14], но *in vivo* в условиях генерализованной ВПГ-1-инфекции мышей наблюдается корреляция повышения продукции ИФН-λ (см. рис. 3) и ингибирования репродукции вируса в головном мозге мышей, получавших Стимфорте (см. рис. 1). Таким образом, можно заключить, что усиление продукции ИФН-λ препаратом Стимфорте является значимым фактором в подавлении ВПГ-инфекции.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, в условиях экспериментальной ВПГ-1-инфекции мышей и у интактных животных Стимфорте стимулирует различные звенья интерфероногенеза. Во-вторых, ИФН-β, по-видимому, не играет существенной роли в подавлении ВПГ-1-инфекции препаратом Стимфорте, а продукция ИФН-λ у инфицированных ВПГ-1 животных и активация NK-клеток в зна-

чительной степени стимулируются Стимфорте и могут участвовать в подавлении ВПГ-1-инфекции этим препаратом.

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

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-5, 8, 17-25 см. REFERENCES)

1. Борисова А.М., Алкеева А.Б., Саидов М.З. Роль системы естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус. *Иммунология*. 1991; 12(6): 60-3.
6. Нестерова И.В., Ковалева С.В., Ломтатидзе Л.В., Кокова Л.Н. Интерферон альфа-2 в комплексной иммунотерапии хронического упорно рецидивирующего орофациального герпеса. *Лечащий врач*. 2011; (4): 22-5.
7. Сухих Г.Т., Ванько Л.В., Кулаков В.И. *Иммунитет и генитальный герпес*. Нижний Новгород, 1997.
9. Хахалин Л.Н. *Герпес: неизвестная эпидемия (патогенез, диагностика, клиника, лечение)*. Смоленск: Фармаграфикс; 1997.
10. Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е., Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Пинегин Б.В. Применение препарата «Стимфорте» в комплексной терапии рецидивирующей герпес-вирусной инфекции. *Герпес*. 2009; (2): 30-6.
11. Ильичев А.В., Бельков А.П., Мальдов Д.Г., Асташкин Е.И. Секрция гранул нейтрофилов человека под действием формилпептида и препарата «Стимфорте». *Иммунология*. 2009; 30(3): 159-61.
12. Мальдов Д.Г., Андропова В.Л., Балакина А.А., Ильичев А.В., Галегов Г.А. Влияние иммуномодулирующего препарата Стимфорте на гуморальный иммунный ответ при экспериментальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 172-5.
13. Мальдов Д.Г., Бельков А.П., Ильичев А.В., Асташкин Е.И. Влияние комплексного гидрофильного низкомолекулярного препарата «Стимфорте» на функциональную активность фагоцитов крови человека. *Иммунология*. 2009; 30(2): 95-7.
14. Мальдов Д.Г., Ильичев А.В., Лебединская Е.А., Фадеева Е.В., Лебединская О.В., Ахматова Н.К. и др. Действие Стимфорте на мононуклеарные лейкоциты и лимфоидные органы мышей на фоне введения циклофосфана. *Медицинская иммунология*. 2011; 13(2-3): 133-8.
15. Мальдов Д.Г., Чирвон Е.А., Ильичев А.В., Бабаян С.С. Активация препаратом «Стимфорте» моноцитов и макрофагов. *Иммунология*. 2011; 32(4): 195-200.
16. Ступина Т.С., Пархоменко И.И., Балалаева И.В., Костюк Г.В., Санина Н.А., Терентьев А.А. Цитотоксические свойства нитрозильного комплекса железа сфенилтиилом. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2011; 60(7): 1464-9.
17. Борисова А.М., Алкеева А.Б., Саидов М.З. The role of the natural cytotoxicity system in the immunopathogenesis of recurrent herpetic infection and the influence of immunomodulators on the clinical and immunological status. *Immunologiya*. 1991; 12(6): 60-3. (in Russian)
2. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*. 2009; 1(3): 737-59.
3. Mossman K.L., Ashkar A.A. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol*. 2005; 18(2): 267-81.
4. Paladino P., Mossman K.L. Mechanisms Employed by Herpes Simplex Virus 1 to Inhibit the Interferon Response. *J. Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(9): 599-608.
5. Su C., Zhan G., Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virology*. 2016; 13(1): 38.
6. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kokova L.N. Interferon alpha-2 in complex immunotherapy of chronic hard-recurrent-herpetic infection. *Lechashchiy vrach*. 2011; (4): 22-5. (in Russian)
7. Sukhikh G.T., Van'ko L.V., Kulakov V.I. *Immunity and Genital Herpes. [Immunitet i genital'nyy herpes]*. Nizhnyy Novgorod; 1997. (in Russian)
8. Ritz U., Seliger B. The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance. *Mol. Med*. 2001; 7(3): 149-58.
9. Khakhalin L.N. *Herpes: an Unknown Epidemic (Pathogenesis, Diagnosis, Clinic, Treatment) [Gerpes: neizvestnaya epidemiya (patogenez, diagnostika, klinika, lechenie)]*. Smolensk: Farmagrafik; 1997. (in Russian)
10. Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E., Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Pinenin B.V. Use of the drug "Stimforte" in the combined treatment of recurrent herpes infections. *Gerpes*. 2009; (2): 30-6. (in Russian)
11. Il'ichev A.V., Bel'kov A.P., Mal'dov D.G., Astashkin E.I. Secretion of human neutrophil granules under effect of formyl peptide and Stimforte. *Immunologiya*. 2009; 30(3): 159-61. (in Russian)
12. Mal'dov D.G., Andronova V.L., Balakina A.A., Il'ichev A.V., Galegov G.A. Influence of the immunomodulatory drug Stimforte on the humoral immune response in the experimental Herpes Simplex Virus infection. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 172-5. (in Russian)
13. Mal'dov D.G., Bel'kov A.P., Il'ichev A.V., Astashkin E.I. Effect of complex hydrophilous low-molecular weight Stimforte on the functional activity of human blood phagocytes. *Immunologiya*. 2009; 30(2): 95-7. (in Russian)
14. Mal'dov D.G., Il'ichev A.V., Lebedinskaya E.A., Fadeeva E.V., Lebedinskaya O.V., Akhmatova N.K., et al. Effect of Stimforte upon murine mononuclear leukocytes and lymphoid organs during Cyclophosphan treatment. *Meditsinskaya immunologiya*. 2011; 13(2-3): 133-8. (in Russian)
15. Mal'dov D.G., Chirvon E.A., Il'ichev A.V., Babayan S.S. Activation of monocytes and macrophages by Stimforte. *Immunologiya*. 2011; 32(4): 195-200. (in Russian)
16. Stupina T.S., Parkhomenko I.I., Balalaeva I.V., Kostyuk G.V., Sanina N.A., Terent'ev A.A. Cytotoxic properties of the nitrosyl iron complex with phenylthiyl. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya*. 2011; 60(7): 1464-9. (in Russian)
17. Melchjorsen J., Sirén J., Julkunen I., Paludan S.R., Matikainen S. Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J. Gen. Virol*. 2006; 87(Pt. 5): 1099-108.
18. Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res*. 2004; 24(8): 439-54.
19. Levin S., Hahn T. Evaluation of the human interferon system in viral disease. *Clin. Exp. Immunol*. 1981; 46(3): 475-83.
20. Zhang X., Ye Z., Pei Y., Qiu G., Wang Q., Xu Y., et al. Neddylation is required for herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced early phase interferon-beta production. *Cell. Mol. Immunol*. 2016; 13(5): 578-83.
21. Melroe G.T., Silva L., Schaffer P.A., Knipe D.M. Recruitment of activated IRF-3 and CBP/p300 to herpes simplex virus ICP0 nuclear foci: Potential role in blocking IFN-beta induction. *Virology*. 2007; 360(2): 305-21.
22. Zhang M., Liu Y., Wang P., Guan X., He S., Luo S., et al. HSV-2 immediate-early protein US1 inhibits IFN-β production by suppressing association of IRF-3 with IFN-β promoter. *J. Immunol*. 2015; 194(7): 3102-15.
23. Li J., Hu Sh., Zhou L., Ye L., Wang X., Ho J., et al. Interferon Lambda Inhibits Herpes Simplex Virus Type 1 Infection of Human Astrocytes and Neurons. *Glia*. 2011; 59(1): 58-67.
24. Lopusná K., Režuchová I., Kabát P., Kúdelová M. Interferon lambda induces antiviral response to herpes simplex virus 1 infection. *Acta Virol*. 2014; 58(4): 325-32.
25. Ank N., West H., Bartholdy C., Eriksson K., Thomsen A.R., Paludan S.R. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol*. 2006; 80(9): 4501-9.

#### REFERENCES

1. Borisova A.M., Alkeeva A.B., Saidov M.Z. The role of the natural cytotoxicity system in the immunopathogenesis of recurrent herpetic infection and the influence of immunomodulators on the clinical and immunological status. *Immunologiya*. 1991; 12(6): 60-3. (in Russian)
2. Melchjorsen J., Matikainen S., Paludan S.R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. *Viruses*. 2009; 1(3): 737-59.
3. Mossman K.L., Ashkar A.A. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol*. 2005; 18(2): 267-81.
4. Paladino P., Mossman K.L. Mechanisms Employed by Herpes Simplex Virus 1 to Inhibit the Interferon Response. *J. Interferon Cytokine Res*. 2009; 29(9): 599-608.
5. Su C., Zhan G., Zheng C. Evasion of host antiviral innate immunity by HSV-1, an update. *Virology*. 2016; 13(1): 38.
6. Nesterova I.V., Kovaleva S.V., Lomtadidze L.V., Kokova L.N. Inter-

Лосич М.А.<sup>1,2</sup>, Зайкова О.Н.<sup>1,2</sup>, Непоклонова И.В.<sup>2</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1,3</sup>,  
Верховский О.А.<sup>2</sup>, Одноров А.И.<sup>3</sup>, Алипер Т.И.<sup>1,2</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИННОГО ШТАММА ERA-CB 20M ВИРУСА БЕШЕНСТВА

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

<sup>2</sup>АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва

В статье представлена молекулярная и биологическая характеристика вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CB 20M, полученного российским рабиологом, доктором медицинских наук С.В. Грибенча путём адаптации и клонирования штамма ERA и SAD в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 С13. Установлен спектр наиболее чувствительных к вирусу бешенства штамм ERA-CB 20M линий клеток, количественно определён уровень гликопротеина. Получена информация о первичной структуре фрагментов генома штамма ERA-CB 20M (гены N и G) и проведён филогенетический анализ. Методами молекулярного анализа установлено, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. При сравнении с референсным штаммом SAD1 выявлено 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена N и 15% – во фрагменте гена G.

Ключевые слова: бешенство; штамм ERA-CB 20M; секвенирование; гликопротеин вируса бешенства; титр вируса.

Для цитирования: Лосич М.А., Зайкова О.Н., Непоклонова И.В., Гребенникова Т.В., Верховский О.А., Одноров А.И., Алипер Т.И. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 224-232. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232>

Losich M.A.<sup>1,2</sup>, Zaykova O.N.<sup>1,2</sup>, Nepoklonova I.V.<sup>2</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1,3</sup>, Verkhovsky O.A.<sup>2</sup>,  
Odnorov A.I.<sup>3</sup>, Aliper T.I.<sup>1,2</sup>

## MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF VACCINARY ERA-CB 20M OF RABIES VIRUS

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

<sup>2</sup>Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>3</sup>Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

The molecular and biological characteristics of the vaccine against rabies virus strain ERA-CB 20M obtained by the Russian rabbiologist, doctor of medical sciences S.V. Gribencha by adapting and cloning the strain ERA and SAD in a transplantable BHK-21 C13 cell culture are presented. The spectrum of the most sensitive strain of rabies ERA-CB 20M cell lines was determined and the level of glycoprotein was quantitatively determined. Primary nucleotide sequences of fragments of the genome of the strain ERA-CB 20M (genes N and G) were obtained and phylogenetic analysis was carried out. Molecular analysis showed that this strain belongs to the group of vaccine strains SAD1. When compared with the reference strain SAD1, 10% of the nucleotide differences were revealed in the gene fragment N; 15%, in the gene fragment G.

Keywords: rabies; strain ERA-CB 20M; sequencing; rabies virus glycoprotein; virus titer.

For citation: Losich M.A., Zaykova O.N., Nepoklonova I.V., Grebennikova T.V., Verkhovsky O.A., Odnorov A.I., Aliper T.I. Molecular and biological characteristics of vaccinary ERA-CB 20M of rabies virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 224-232. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232>

For correspondence: Milana A. Losich, Candidate of Biological Sciences, Researcher scientist, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation. E-mail: [mkohnovich@rambler.ru](mailto:mkohnovich@rambler.ru)

### Information about authors:

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

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

**Acknowledgments.** The publication was prepared with the support of the RUDN University Program 5-100.

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

Received 22 December 2017

Accepted 06 March 2018

Для корреспонденции: Лосич Милана Анатольевна, канд. биол. наук, научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [mkohnovich@rambler.ru](mailto:mkohnovich@rambler.ru)



## Введение

Бешенство – это острое нейроинфекционное заболевание, возбудитель которого – вирус бешенства (ВБ) – передаётся со слюной больного животного через укус или при ослонении повреждённых участков кожи. Вирус бешенства относится к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, и единственный из известных представителей царства *Virae* поражает всех теплокровных животных, в том числе человека, в глобальном масштабе с летальностью 100% [1].

На сегодняшний день род *Lyssavirus* насчитывает 14 видов: вирус бешенства (ВБ, G1), *Lagos bat lyssavirus* (G2), *Mokola lyssavirus* (G3), *Duvenhage lyssavirus* (G4), *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1, G5), *European bat lyssavirus-2* (EBLV-2, G6), *Australian bat lyssavirus* (G7), *Aravan lyssavirus* (G8), *Khujand lyssavirus* (G9), *Irkut lyssavirus* (G10), *West Caucasian bat lyssavirus* (G11), *Shimoni bat lyssavirus* (G12), *Bokeloh bat lyssavirus* (G13), *Ikoma lyssavirus* (G14), 1 неклассифицированный *Lleida bat lyssavirus*. Установлено, что 7 генотипов встречались у людей (*Rabies*, *European*, *Irkut*, *Duvenhage*, *Australian*, *Mokola*) [2].

По форме вирион ВБ пулеобразный, имеет длину в среднем 180 нм, диаметр – 75 нм и состоит из несегментированного генома, представленного одной молекулой спиралеобразно скрученной негативной РНК и пятью структурными белками: нуклеопротеином (N), фосфопротеином (P), матричным белком (M), гликопротеином (G) и РНК-зависимой РНК полимеразой или большим белком (*L-large protein*). Именно гликопротеин, образуя поверхностные пепломеры, участвует в проникновении вируса в клетку (прикрепление к клеточным рецепторам, слияние мембран и эндоцитоз), индуцирует образование вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованного иммунного ответа. Гликопротеин гликозилирован по N-связям, а также отвечает за гемагглютинирующую активность и определяет серотип вируса [3, 4].

В Российской Федерации и в мире проблема бешенства остаётся актуальной. За последние годы стабильно высокий уровень распространения рабической инфекции наблюдался в Центральном и Приволжском федеральных округах. Наибольшее число неблагополучных пунктов в 2016 г. зарегистрировано в Московской области (274). Всего за 2016 г. выявлен 2151 случай бешенства животных на территории РФ, большая часть заболевших – дикие и домашние плотоядные [5, 6].

На сегодняшний день нет гарантированного 100% лечения бешенства, и основным методом борьбы с распространением инфекции является вакцинопрофилактика. В настоящее время совершенно очевидно, что без углублённого знания природы возбудителя, включая детальное изучение молекулярной организации генома, невозможно создание высокоэффективных средств специфической профилактики.

ВБ штамм ERA-CB 20M был получен д-ром мед. наук, рабиологом Сергеем Васильевичем Грибенча из штамма ERA и SAD. Культуру клеток заражали вирусом ERA в дозах 50, 250, 1250, 6250 и 31250 LD<sub>50</sub>, затем через 5, 7, 10 и 13 дней определяли титр вируса в вирусосодержащей жидкости путём внутримозгового заражения мышей, а также концентрацию гликопротеина методом твердофазного ИФА. В результате проведённых пассажей удалось получить популяцию вируса с относительно стабильной

высокой экспрессией гликопротеина от 500 до 2400 нг/мл. Выделенный биологический вариант прошёл 20 последовательных пассажей в культуре клеток ВНК-21 и получил новое обозначение – ERA-CB 20M (С – селекция, В – вариант, 20 – 20 последовательных пассажей, М – Москва) [7, 8].

В работе исследованы молекулярные и биологические свойства вакцинного штамма ERA-CB 20M ВБ.

## Материал и методы

**Штаммы ВБ.** В работе были использованы следующие штаммы ВБ: ERA-CB 20M, депонированный в государственной коллекции вирусов Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ «ВГНКИ»); референс-штаммы, предоставленные референсной лабораторией ОИЕ по бешенству ANSES (Нанси, Франция): вирус бешенства CVS-11 мозговой (*challenge virus standard*); CVS-11 (фиксированный культуральный штамм).

**Культуры клеток.** Культивирование вируса проводили в стационарном и роллерном монослое клеток ВНК-21 (почка сирийского хомячка), BSR (клон ВНК-21), Vero (почка зеленой мартышки) и ПС (почка сайги), ВНК-О (клон ВНК-21). Культуры клеток получали из лаборатории ANSES и лаборатории культур и тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

**Филогенетический анализ фрагментов генома штамма ERA-CB 20M**

**Выделение РНК.** РНК выделяли с использованием коммерческого препарата TRI ® Reagent («Sigma Aldrich») по методике производителя и ресуспендировали в 30–50 мкл деионизированной H<sub>2</sub>O при 55°C, периодически перемешивая пробы пипетированием.

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).** Обратную транскрипцию и получение кДНК с использованием M-MLV *reverse transcriptase* («Fermentas») проводили согласно инструкции производителя с использованием 5 мкл РНК. Реакционная смесь для ПЦР содержала: 16 mM TrisHCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% Triton x-100; по 10 пМ каждого праймера; 2,5 mM dNTPs; 2 ед. TAQ-полимеразы. В реакционную смесь вносили 5 мкл кДНК. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР и секвенирования участка гена *N* были взяты из работы P. Heaton и соавт. [9]: JW12 (5'-ATGTAACACCCYCTACAATG-3'), JW6 (DPL) (5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3'), JW6 (E) (5'-CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'), JW6 (M) (5'-CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'), JW10 (DLE2) (5'-GTCATCAAAGTGTGRTGCTC-3'), JW10 (ME1) (5'-GTCATCAATGTGTGRTGTTTC-3'), JW10 (P) (5'-GTCATTAGAGTATGGTGTTC-3').

Подбор праймеров для секвенирования гена *G* осуществлялся нами самостоятельно с использованием программного обеспечения Primer Premier 5 («Premier Biosoft») [10]. Праймеры приведены в табл. 1.

**Очистка образцов из геля и секвенирование.** Образцы очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Fermentas») согласно инструкции производителя и секвенировали. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf») с применением BigDye® Terminator v. 3.1 Ready Reaction Kit («Applied Biosystems»), затем продукты амплификации переосаждали для последующего

Таблица 1

**Олигонуклеотиды (праймеры) для ОТ-ПЦР и секвенирования фрагмента гена G ВБ**

Название праймера	Праймеры
F1	CTGCATTTTCATCAAAGTCAA
F2	AGCGGTGTCTTCTACCTACT
R1	TCTACAACAAGGTGCTCAAT
R2	GGAGGACTATTGAACCCA

секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Построение филогенетических дендрограмм и выявление геномных отличий. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR v. 3.12 («Lasergen Inc.», США) и программы Bio Edit 7.0.1. В табл. 2 приведены названия штаммов, использованных для сравнения, и их номера доступа в GenBank.

**Результаты**

**Определение спектра наиболее чувствительной линии клеток для получения вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М**

Для определения чувствительности клеток к вакцинному вирусу штамм ERA-CВ 20М провели серию опытов для наработки культурального вирусосодержащего материала. Для решения этой задачи были выбраны 6 линий клеток ВНК-21-13С, ВНК-ф, BSR, ПС, Vero, любезно предоставленных лабораторией культур и тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Клеточный монослой отобранных линий клеток заражали ВБ штамм ERA-CВ 20М с активностью не менее  $10^{5,0-5,5}$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Титр ВБ в каждой линии клеток определяли по методу Рида и Менча.

Наиболее интенсивная репродукция ВБ штамм ERA-CВ 20М была определена при заражении линии клеток ПС на уровне 3—4-го сбора (пула), и титр вируса состав-

Таблица 2

**Штаммы ВБ, используемые для сравнения [11]**

Штамм ВБ	Номер доступа
SAD1 variant 1	EF206717
SAD1 variant 2	EF206718
CVS-11	GQ918139
RV-97	EF542830
SAD Bern (Sanafox)	EF206720
SAD Bern (Lysvulpen)	EF206708
SAD B19 (Fuchsoral)	EF206709
SAD P5/88 (Rabifox)	EF206715
ERA	EF206707
SAD Vnukovo isolate 9503TCH	GU992319
4aGV7	JN234414
CTN-1V5	JN234418
PV-2061-2	JN234424

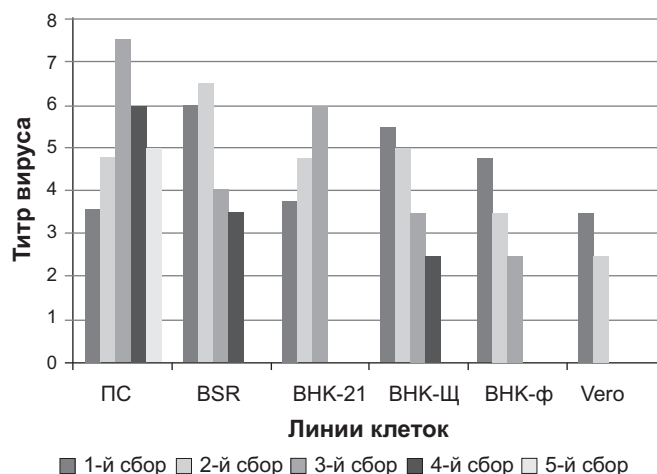


Рис. 1. Зависимость репродукции вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М от линии клеток.

вил  $7,5 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, а также линии клеток BSR на уровне 1—2-го сбора (пула) (титр вируса  $6,5 \pm 0,26$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл) и третьей линии клеток ВНК-21-13С -на уровне 3-го сбора (пула), где титр вируса составил  $6,0 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (рис. 1).

Исходя из полученных данных был сделан вывод о том, что перевиваемые линии клеток ПС, BSR и ВНК-21-13С являются наиболее чувствительными к ВБ штамм ERA-CВ 20М, в культуральной жидкости которых происходит максимальное накопление вируса.

**Количественное определение гликопротеина ВБ**

Поскольку G-белок является основным иммуногеном вакцинного ВБ, следующим этапом исследований было количественное определение гликопротеина при культивировании вакцинного ВБ методом ИФА (Институт полиомиелита им. Чумакова, Москва) на следующих линиях клеток: ВНК-О, ВНК-Ф, ВНК-21 BSR, ПС (рис. 2).

Количественный анализ уровня экспрессии G-белка в линиях клеток, заражённых ВБ штамм ERA-CВ 20М, показал, что наиболее высокий уровень гликопротеина наблюдается в следующих клеточных линиях: BSR (в количестве 285 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор), затем ВНК-21 (275 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор), ВНК-О (270 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор).

**Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генома штамма ERA-CВ 20М ВБ**

Проведён филогенетический анализ вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М. Определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов, кодирующих нуклео- и гликопротеин. Полученные данные о первичных последовательностях генома исследуемого штамма сравнивали с данными о первичной последовательности генома штамма Щёлково-51, а также с последовательностями других вакцинных штаммов ВБ из базы данных NCBI.

Было выполнено множественное выравнивание полученных фрагментов генов N и G по наиболее старому из доступных сиквенсов штаммов вируса бешенства – SAD1, зарегистрированному в двух вариантах. Во фрагменте гена, кодирующего N-белок, были обнаружены в основном однонуклеотидные замены (61-я позиция). Также обнаружены двунонуклеотидные и трёхнуклеотидные замены. При этом выявлено всего 11 аминокислот-

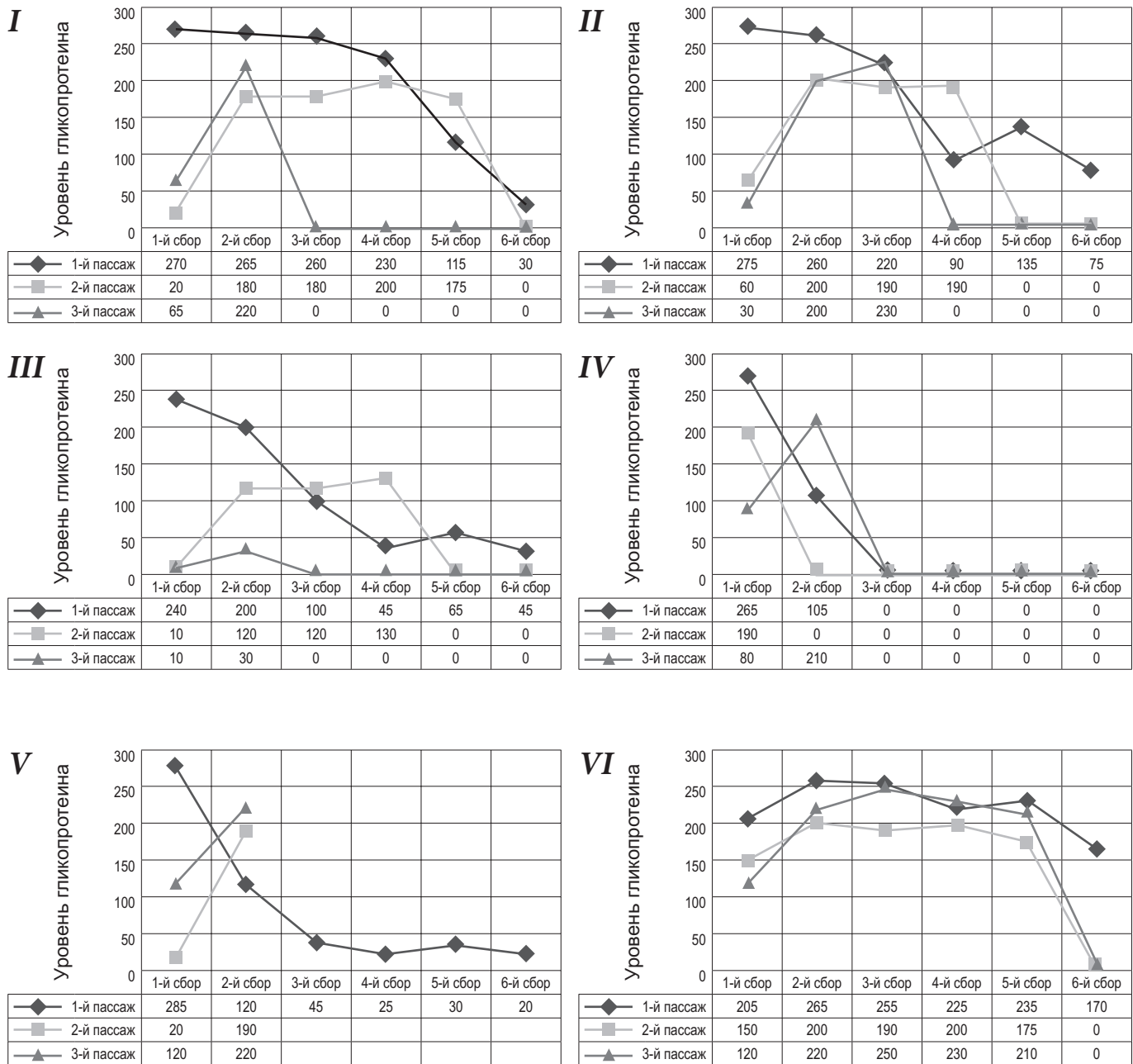


Рис. 2. Зависимость уровня гликопротеина ВВ штамм ERA-CV 20M в культуре клеток от пассажа/сбора (в нг/мл): I – ВНК-О; II – ВНК-21; III – ВНК-ф; IV – BSR; V – ПС.

ных замен (рис. 3). Для исследования был взят фрагмент размером 601 нуклеотид. Сравнение выявило наибольшее количество замен по отношению к SAD1 вариант 1 в штаммах CVS-11, RV-97 и Щёлково.

При сравнении первичной нуклеотидной последовательности гена *G* вышеуказанных штаммов рассматривался участок размером 1572 нуклеотида. Всего было выявлено 250 позиций с нуклеотидными заменами, которые привели к появлению 87 позиций с заменами аминокислот. Как и в случае с участком гена *N*, абсолютное большинство замен в гене *G* (по сравнению с SAD1) содержали штаммы CVS-11 и RV-97. В гене штамма ERA-CV 20M было обнаружено 5 нуклеотидных замен, все

они привели к появлению замен аминокислот (рис. 4).

Выверенные последовательности геномов вакцинных штаммов вируса ВВ были использованы для построения филогенетической дендрограммы с применением программы Mega Align из пакета программного обеспечения Lasergene фирмы DNA-Star (Clustal W Method). Полученные филогенетические дендрограммы представлены на рис. 5 и 6.

Сравнение с референсным штаммом SAD1 выявило 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена *N* и 1 замену в последовательности аминокислот гликопротеина (в позиции 95 аминокислота лейцин вместо валина) и 15% нуклеотидных отличий – во фрагменте гена *G*.

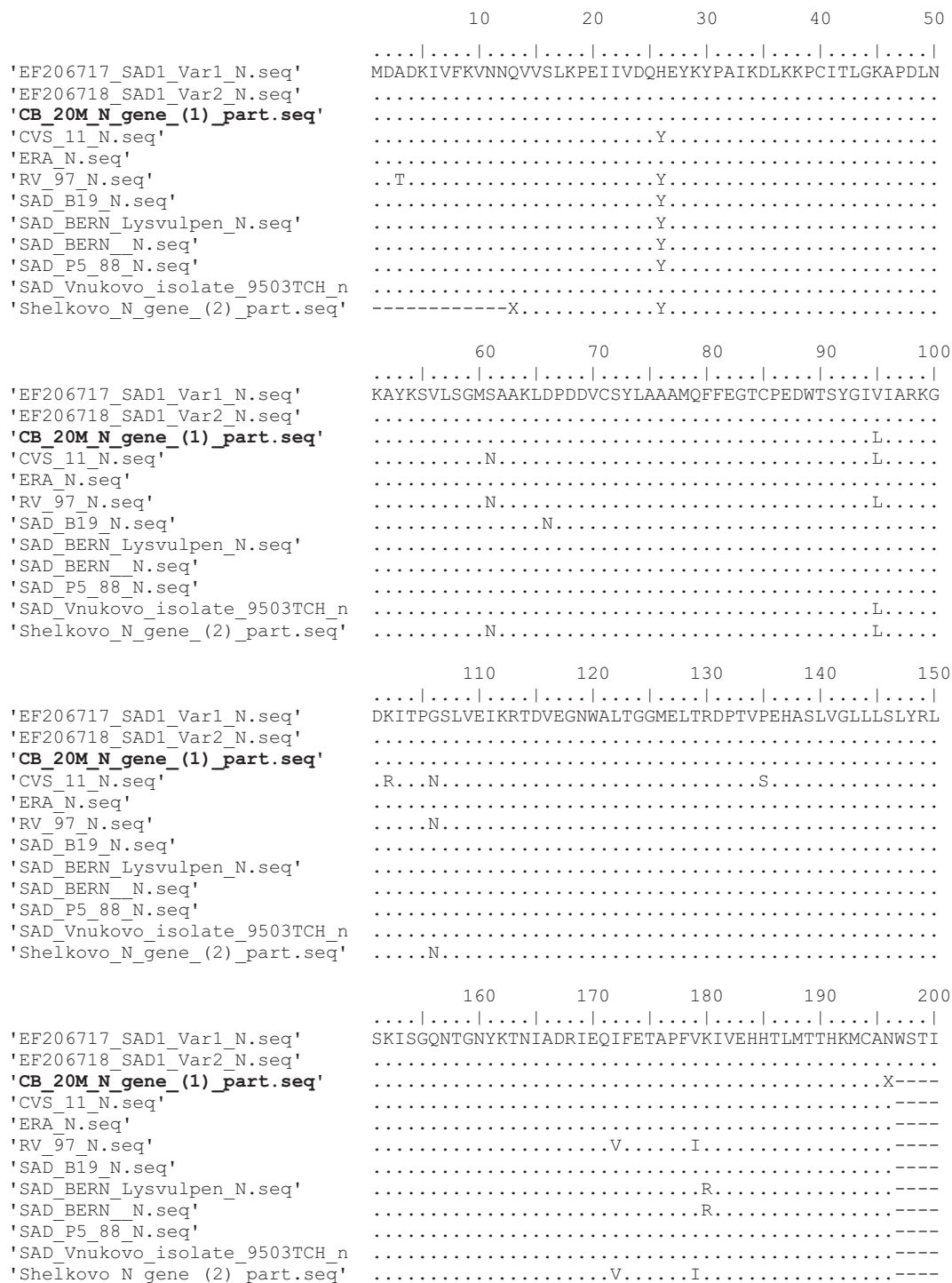


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка N штамма ERA-CB 20M с последовательностями референсных штаммов, представленных в NCBI.

Исследуемый участок предсказанных аминокислотных последовательностей гликопротеина содержал 525 аминокислот, при сравнении выявлено 0,95% различий в последовательности аминокислот, 5 замен в позициях 148 (вместо аргинина серин), 169 (вместо аспарагиновой кислоты валин), 215 (вместо метионина лизин), 455 (вместо валина аланин), 502 (вместо лейцина фенилаланин).

### Обсуждение

Создание высокоэффективных средств специфической профилактики невозможно без углубленного знания природы возбудителя, включая детальное изучение молекулярной организации генома. На рис. 7 представлены штаммы ВБ, применяемые для изготовления антирабических вакцин.

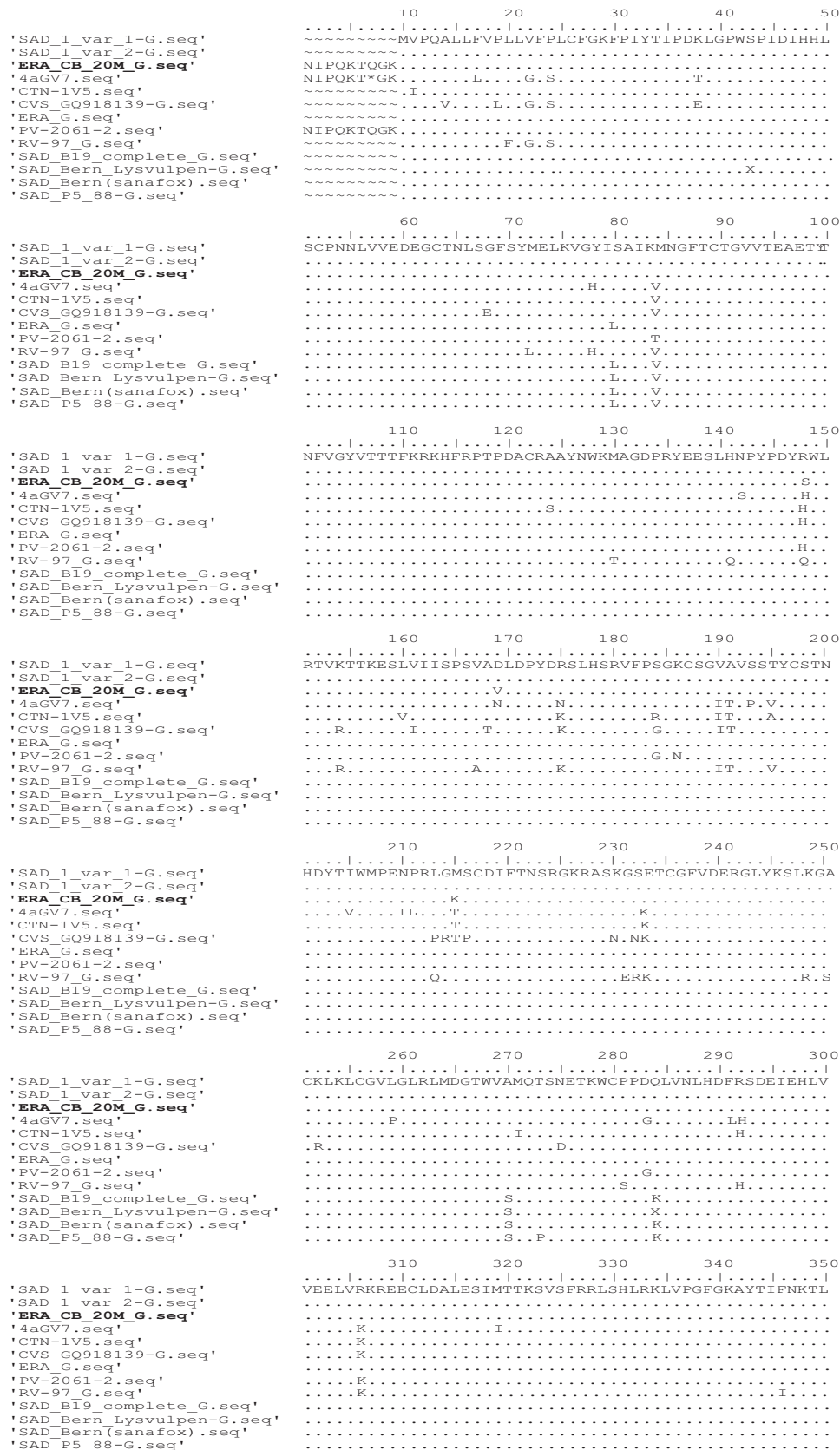


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка G штамма ERA-CB 20M с последовательностями референсных штаммов, представленных в NCBI.

Продолжение рис. 4 см. на стр. 230

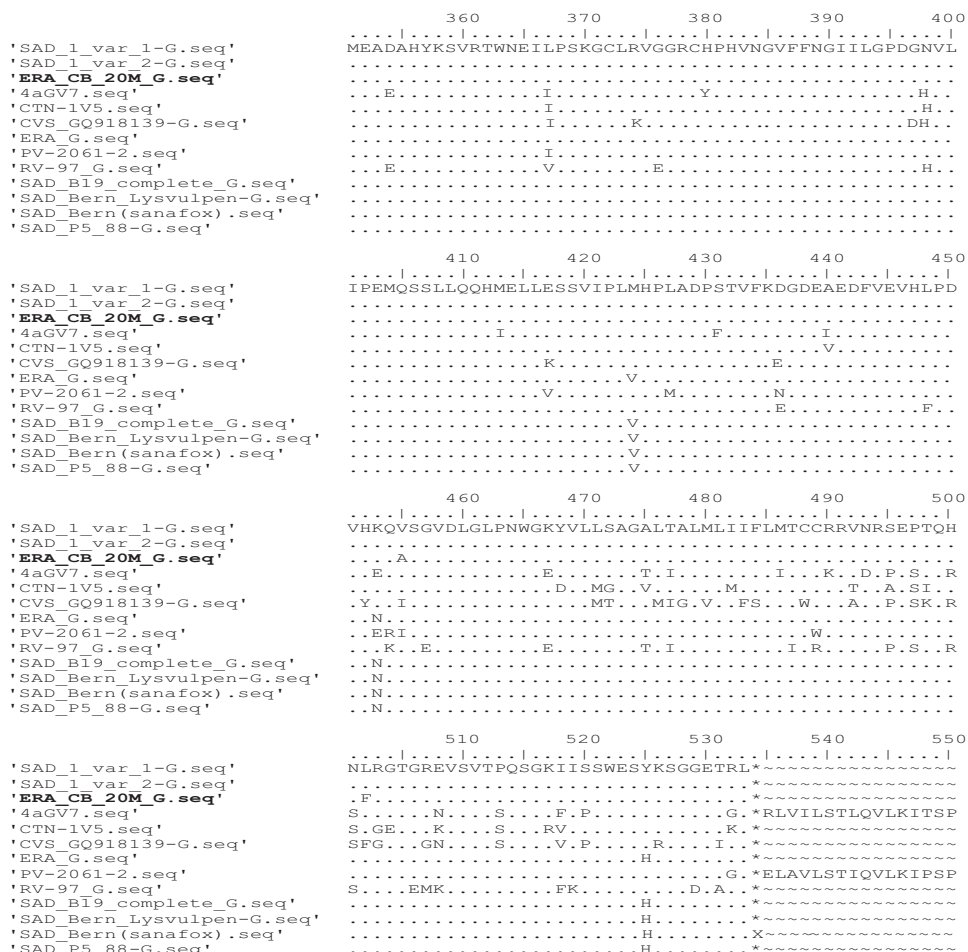


Рис. 4.  
Продолжение со стр. 229.

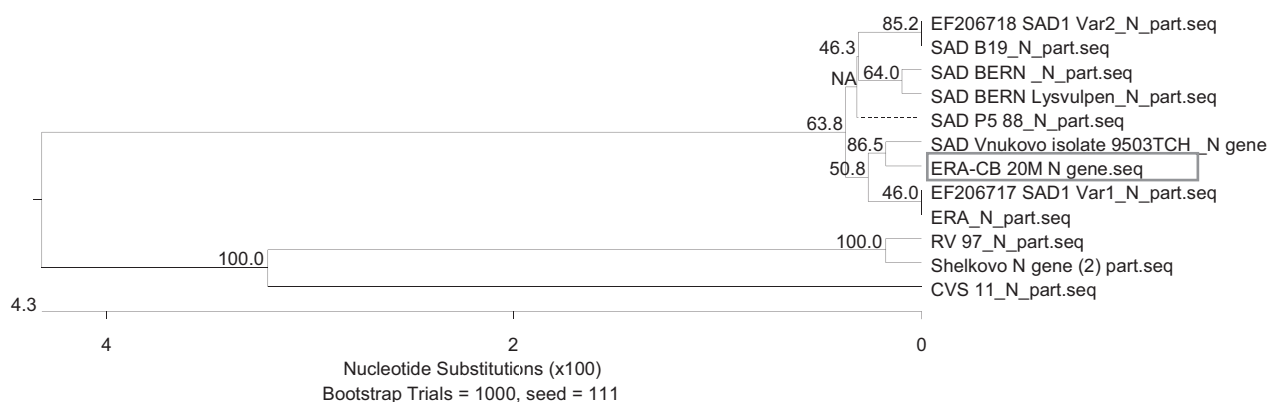


Рис. 5. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе фрагментов гена N вакцинных штаммов ВБ.

С.В. Грибенчай впервые было показано, что популяция штаммов уличного ВБ гетерогенна по составу биологических вариантов, а также установлена возможность выделения биологических вариантов из популяции вируса. Использование нового принципа селекции позволило выделить 16 биологических вариантов, которые прошли

более 20 последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток ВНК-21-13С. Выделенные биологические варианты отличались от родительского вируса штамм ERA более выраженными антигенными свойствами и были обозначены как варианты вируса штамм ERA-CB 20M [7].

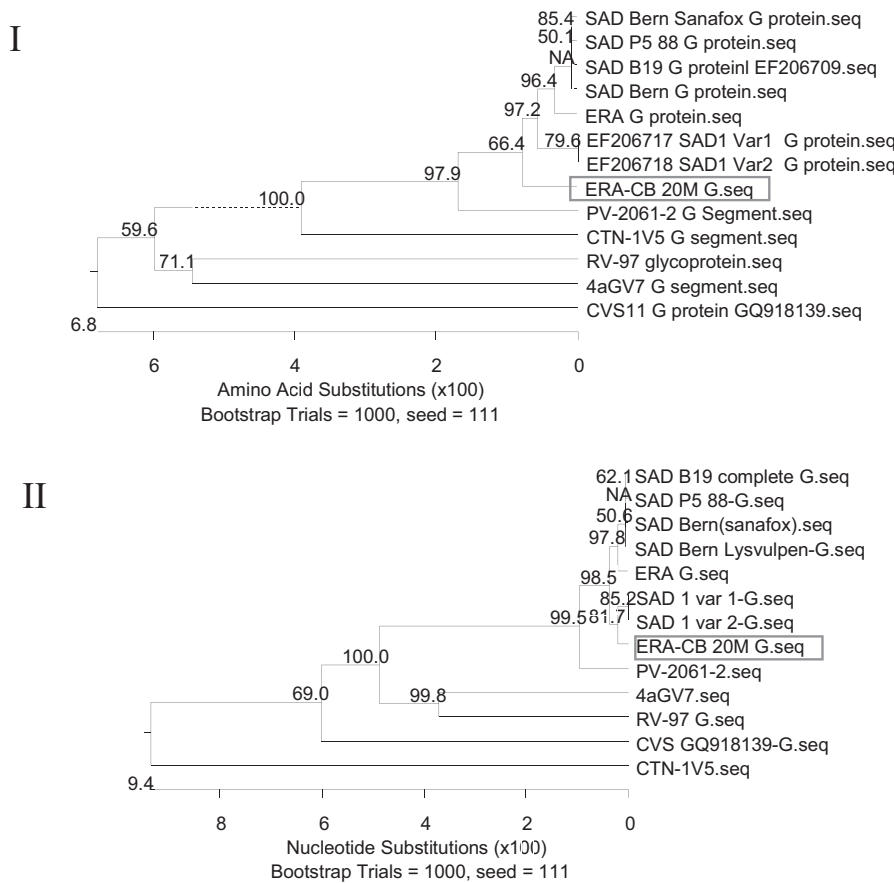


Рис. 6. Филогенетическая дендрограмма вакцинных штаммов ВБ, построенная с использованием аминокислотных последовательностей (I) гликопротеина от начала открытой рамки считывания до позиции 524 (MegAlign v. 7.0., метод Clustal W), и фрагментов гена G (II).

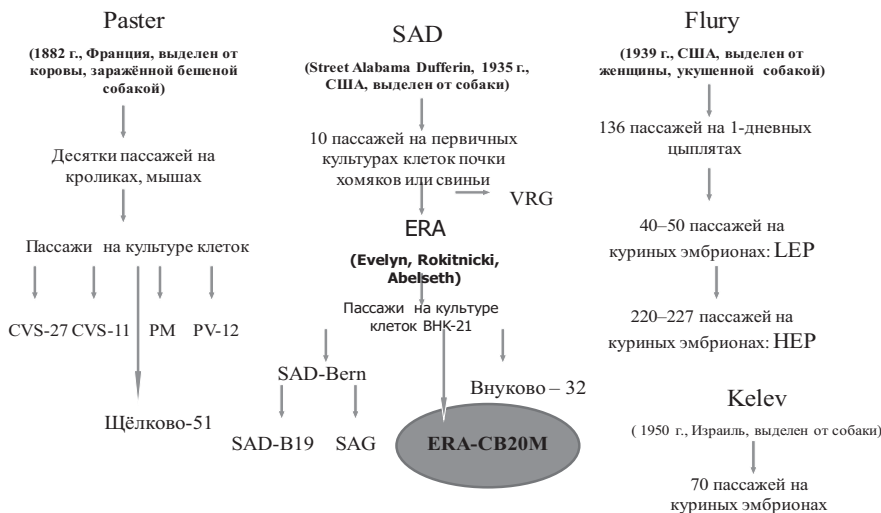


Рис. 7. Штаммы ВБ, применяемые для изготовления антирабических вакцин.

Биологические варианты вируса штамм ERA-CB 20M, как и родительский штамм ERA, размножались без цитопатического действия в перевиваемой культуре клеток ВНК-21-13С и накапливались в головном мозге

молодых мышей в титре до  $8,0 \pm 0,5$  Ig LD<sub>50</sub>/мл [7].  
Ранее было установлено, что вакцинный вирус штамм ERA-CB 20M обладает выраженными антигенными свойствами: в опытах на лабораторных, домашних и диких животных индуцирует выработку вируснейтрализующих антител в титрах, значительно превосходящих защитный пороговый уровень антител ( $\geq 0,50$  МЕ/мл). Так, у мышей (n = 50) средний титр вируснейтрализующих антител варьирует от 1,50 до 2,87 МЕ/мл; у белых крыс (n = 30) средний титр антител варьирует от 0,87 до 2,1 МЕ/мл; у песцов (n = 30) средний титр антител составил 2,87 МЕ/мл; у кошек (n = 20) средний титр антител составил 6,01 МЕ/мл, у собак (n = 20) – 3,46 МЕ/мл [7, 8, 12].  
При изучении патогенности вакцинного вируса штамм ERA-CB 20M установили, что данный штамм является патогенным при интрацеребральном заражении мышей, слабопатогенным при применении периферических методов заражения белых крыс и морских свинок и непатогенным при применении периферических методов заражения кроликов, собак, кошек и песцов [7, 8].  
В ходе предыдущих исследований было установлено, что вакцинный штамм ERA-CB 20M является высокоиммуногенным и индуцирует формирование напряжённого (не менее 1,0 МЕ/мл), стабильного антирабического иммунитета при определении методом НИИ (рекомендованного КЭБ ВОЗ) на белых беспородных мышах. Обеспечивает защиту после внутримозгового заражения референт-штаммом CVS-11 (мозговой) в опытах на белых мышах (иммуногенность составляла от 1,50 до 2,2 МЕ/мл) и сохраняет свои иммуногенные свойства на протяжении 12 мес. [7, 8].  
К ВБ чувствителен целый ряд перевиваемых культур клеток, например Vero, ПС, ВНК и ее клоны (BSR и другие). Результаты, полученные в ходе экспериментов, говорят о том, что культуры клеток существенно различаются по чувствительности к штамму ВБ ERA-CB 20M. Несмотря на то что линии клеток ВНК-О, ВНК-21 и BSR имеют общий источник происхождения – линию клеток почки золотистого хомячка, они существенно отличаются друг от друга, во-первых, по морфологии и, во-вторых, по выходу вирусного гликопротеина после заражения. Необходимо отметить, что наименьший уровень выхода белка наблюдался при использовании линии клеток Vero. Однако учитывая различия по данному параметру между клонами ВНК, можно допустить суще-

ствование и клонов Vero, более чувствительных к ВБ. В частности, антиген вакцины против бешенства на основе штамма Пастер получают именно на клетках Vero.

Ранее мы предполагали, что накопление вируса и уровень гликопротеина коррелируют между собой. Однако полученные результаты демонстрируют более сложную картину. Поскольку в предыдущих исследованиях была установлена исключительно важная корреляционная связь между уровнем патогенности (или апатогенности) и уровнем экспрессии G-белка на модели уличного бешенства и модели вакцинных штаммов (ERA и ERA-CB 20M) [7, 8], для характеристики накопления вакцинного штамма предлагается использовать именно уровень экспрессии гликопротеина.

Одним из важных этапов изучения свойств штамма ERA-CB 20M был молекулярно-генетический анализ фрагментов его генома в сравнении с другими вакцинными штаммами, используемыми в производстве различных антирабических вакцин. Так, ранее А. Метлин и соавт. [13] исследовали российский вакцинный штамм RV-97. Было установлено, что данный штамм образует отдельную филогенетическую ветвь на дендрограмме, имеет уникальные замены и не ревертирует к полевым изолятам.

Филогенетический анализ фрагментов генов N и G вакцинного ВБ штамм ERA-CB 20M показал, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. Сравнение с референсным штаммом SAD1 показало только 1 аминокислотную замену в последовательности аминокислот нуклеопротеина (в позиции 95 аминокислота лейцин вместо валина) и на участке гликопротеина (525 аминокислот); при сравнении выявлено 0,95% различий. Необходимо отметить, что на заданном участке гена N штамм ERA-CB 20M полностью соответствует штамму SAD Vnukovo isolate 9503TCH. Повидимому, это связано с тем, что штамм Внуково, как и штаммы SAD Bern, SAD B19 и SAG, а также штамм ERA-CB 20M берут своё начало от штамма ERA. Как известно, ген ВБ достаточно консервативен, в особенности в пределах одного генотипа.

**Финансирование.** Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100».

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

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 9, 10, 13 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Васильев Д.А., Луговцев В. Ю., ред. *Курс лекций по вирусологии. Часть вторая. Вирусы, вызывающие болезни общие для многих видов сельскохозяйственных животных*. Ульяновск; 2004
3. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Available at: <http://www.fsvps.ru>
4. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>
5. Гривенча С.В., Лосич М.А., Гривенча Л.Ф., Непоклонова И.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка- главного иммуногена вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(2): 44-7.
6. Гривенча С.В., Алипер Т.И., Непоклонова И.В. Происхождение и характеристика вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CB-20M. В кн.: *Труды и материалы XII Международного ветеринарного конгресса*. Москва, Измайлово; 2002.
7. Национальный центр биотехнологической информации. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. Лосич М.А., Непоклонова И.В., Верховский О.А., Гривенча С.В., Мухин А.Н., Раев С.А. и др. Иммунобиологические свойства новой вакцины РАБИКС. *Ветеринария*. 2011; (12): 17-21.

#### REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Guidelines for Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
3. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies Virus Glycoprotein II. Biological and Serological Characterisation. *Infect. Immun.* 1977; 16(3): 754-9.
4. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., eds. *Course of Lectures on Virology. Part II. The Virus Causes Disease Common to Many Species of Animals [Kurs lektiy po virusologii. Chast' vtoraya. Virusy vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh]*. Ul'yanovsk; 2004. (in Russian)
5. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: <http://www.fsvps.ru> (in Russian)
6. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/>
7. Gribencha S.V., Losich M.A., Gribencha L.F., Nepoklonova I.V. A new principle of vaccine virus selection based on the quantitative expression level of G-protein, the main immunogen of the rabies virus. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(2): 44-7. (in Russian)
8. Gribencha S.V., Aliper T.I., Nepoklonova I.V. Origin and characteristics of vaccine rabies virus strain ERA-CB-20M. In: *Proceedings and Materials of XII Veterinary Congress [Trudy i materialy XII Mezhdunarodnogo veterinarnogo kongressa]*. Moscow, Izmaylovo; 2002. (in Russian)
9. Heaton Pr., Johnstone P., Mcelhinney L.M., Cowley R., O'sullivan E., Whitby J. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762-6.
10. PREMIER Biosoft. Available at: <http://www.premierbiosoft.com/>
11. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (in Russian)
12. Losich M.A., Nepoklonova I.V., Verkhovskiy O.A., Gribencha S.V., Mukhin A.N., Raev S.A. Immunobiological properties of the new vaccine RABIX. *Veterinariya*. 2011; (12): 17-21. (in Russian)
13. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., et al. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1-2): 242-7.

Поступила 22.12.17

Принята в печать 06.03.18



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.921.5=02=036.2(470.23=25) «2012-2016»

*Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В., Мусаева Т.Д., Афанасьева В.С., Го А.А., Образцова Е.А.,  
Суховецкая В.Ф., Комиссаров А.Б.*

## ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГРИППА И ДРУГИХ ОРВИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2012–2016 гг.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

В работе изучена этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, установлена их доля в течение 4 эпидемических сезонов. Показана сезонность некоторых респираторных вирусов и обозначены пики циркуляции респираторно-синцитиального (РС) вируса, аденовируса, вирусов парагриппа, риновируса, бокавируса, метапневмовируса и коронавируса. Прослежено взаимовлияние вирусов гриппа А и РС-вирусов, РС-вирусов и риновирусов. Выявлен высокий уровень заболеваемости аденовирусной инфекцией в организованных коллективах и РС-вирусной инфекцией у детей.

**Ключевые слова:** вирусы гриппа; острые респираторные вирусные инфекции; ПЦР-диагностика; эпидемический сезон.

**Для цитирования:** Писарева М.М., Едер В.А., Бузицкая Ж.В., Мусаева Т.Д., Афанасьева В.С., Го А.А., Образцова Е.А., Суховецкая В.Ф., Комиссаров А.Б. Этиологическая структура гриппа и других ОРВИ в Санкт-Петербурге в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 233–239.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-233-239>

*Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., Musaeva T.D., Afanaseva V.S., Go A.A., Obratsova E.A.,  
Sukhovetskaya V.F., Komissarov A.B.*

## ETIOLOGICAL STRUCTURE OF INFLUENZA AND OTHER ARVI IN ST. PETERSBURG DURING EPIDEMIC SEASONS 2012-2016

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

The etiological structure of influenza and other acute respiratory viral infections including their rate of incidence in St. Petersburg and Leningrad region during 4 epidemic seasons has been studied. Seasonality of some respiratory viruses was shown and peaks of circulation of RSV, adenovirus, parainfluenza viruses, rhinovirus, bocavirus, metapneumovirus and coronavirus were marked. The interference of influenza A viruses and RSV, RSV and rhinoviruses was highlighted. A high incidence of adenovirus infection in organized communities and RSV infection in children was revealed.

**Key words:** Influenza viruses; acute respiratory viral infections (ARVI); PCR diagnostics; epidemic season.

**For citation:** Pisareva M.M., Eder V.A., Buzitskaya Zh.V., Musaeva T.D., Afanaseva V.S., Go A.A., Obratsova E.A., Sukhovetskaya V.F., Komissarov A.B. Etiological structure of influenza and other ARVI in St. Petersburg during epidemic seasons 2012–2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 233–239. (In Russ.).  
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-233-239>

**For correspondence:** Maria M. Pisareva, PhD, leading researcher of the Laboratory of molecular virology, Federal State Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: [pisareva@influenza.spb.ru](mailto:pisareva@influenza.spb.ru)

### Information about authors:

Pisareva M.M., <http://orcid.org/0000-0002-1499-9957>  
Buzitskaya Zh.V., <http://orcid.org/0000-0002-8394-102X>  
Afanaseva V.S., <http://orcid.org/0000-0002-2887-0126>  
Komissarov A.B., <http://orcid.org/0000-0003-1733-1255>

Eder V.A., <http://orcid.org/0000-0002-9970-3325>  
Musaeva T.D., <https://orcid.org/0000-0002-3050-1936>  
Sukhovetskaya V.F., <http://orcid.org/0000-0002-1566-7137>

**Acknowledgments.** The team of authors is grateful to all participants of the project "Global Network of Hospital Influenza Surveillance" (Global Influenza Hospital Surveillance Network) with the participation of the French epidemiology Fund for their dedicated work and comprehensive support. The study had no sponsorship.

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

Received 25 January 2018

Accepted 06 March 2018

### Введение

В настоящее время описано более 200 респираторных вирусов, способных вызывать острые инфекции дыхательных путей. Среди основных возбудителей ОРВИ преобладают вирусы гриппа, возбудители парагриппа, респираторно-синцитиальной (РС) и риновирусной инфекции, важную роль играют аденовирусы [1, 2].

Изменения в структуре заболеваний ОРВИ за последнее десятилетие таковы, что менее четверти респираторных заболеваний приходится на грипп, а основную часть ОРВИ (до 85%) составляют респираторные инфекции негриппозной этиологии [3, 4].

Эпидемический надзор за гриппом является обычной практикой в России и большинстве европейских стран

**Для корреспонденции:** Писарева Мария Михайловна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: [pisareva@influenza.spb.ru](mailto:pisareva@influenza.spb.ru)

[5], но рутинный надзор за другими респираторными вирусами повсеместно не проводится, что затрудняет мониторинг эпидемиологической ситуации по ОРВИ как во время эпидемии гриппа, так и в межэпидемический период.

Клиническая диагностика заболеваний, вызванных различными этиологическими агентами, нередко представляет серьёзные трудности. Если речь идет о спорадических случаях ОРВИ, этиология болезни, как правило, остается нераскрытой [1]. Лабораторная диагностика заболеваний, вызванных такими агентами, как РС-вирусы, риновирусы, коронавирусы, и некоторыми другими возбудителями, доступна только специализированным лабораториям.

Мониторинг возбудителей инфекций дыхательных путей на основе лабораторных данных позволяет оценить заболеваемость ОРВИ с учётом этиологических факторов, что крайне необходимо для правильной оценки эпидемической ситуации, в частности и эпидемиологического надзора, в целом. Использование методов этиологической лабораторной диагностики позволяет оптимизировать терапевтическое лечение и эпидемиологические мероприятия, направленные на ограничение распространения инфекции.

ПЦР-технология, рекомендованная CDC для диагностики гриппа и ОРВИ, даёт возможность расшифровывать этиологию возбудителя в режиме реального времени и обобщать полученные данные в еженедельных сводках, которые помогают отслеживать распространение респираторных вирусных инфекций и гриппа, а также распознавать начало эпидемии гриппа в ранней стадии. В данной работе изучена этиологическая структура гриппа и ОРВИ в Санкт-Петербурге, установлена доля гриппа и других актуальных возбудителей ОРВИ в динамике 4 эпидемических сезонов 2012–2013, 2013–2014, 2014–2015 и 2015–2016 гг.

### Материал и методы

С целью изучения этиологической структуры гриппа и ОРВИ в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. у больных, госпитализированных в клиники Санкт-Петербурга и Ленинградской области, брали носоглоточные мазки с последующим исследованием на обнаружение генетического материала респираторных вирусов. Обследовано 6760 детей и 4712 взрослых пациентов. Носоглоточные мазки собирали в пробирки, содержащие 3 мл универсальной транспортной среды для вирусов (транспортные системы СОРАН, Италия). Взятие образцов проводилось в первые сутки госпитализации, но не позднее 7-го дня заболевания.

Экстракцию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей проводили с применением набора «Рибо-преп», реакцию обратной транскрипции – набора реагентов «Реверта-Л». Для выявления НК вирусов гриппа А и В и ОРВИ использовали тест-системы «АмплиСенс® Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A/H1-swine-FL», «АмплиСенс® Influenza virus A-тип-FL», «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производства ООО «ИнтерЛабСервис», Москва, основанные на методе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени на приборах Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) и Rotor-Gene Q («QIAGEN», Германия). Для определения генетической линии вируса гриппа В использовали праймеры

Таблица 1

Доля вирусов гриппа А(H1N1)pdm09, А(H3N2) и В (Викторианской (Vic) и Ямагатской (Yam) линий) в эпидемические сезоны 2012–2016 гг. (в % от числа обследованных)

Эпидсезоны	А(H1N1)pdm09	А(H3N2)	В/Vic	В/Yam
2012–2013	13,9	7,6	1,2	10,5
2013–2014	2,0	12,3	0,3	1,1
2014–2015	1,4	10,4	0,0	8,8
2015–2016	25,2	0,8	5,3	0,1

и зонды, любезно предоставленные отделом обеспечения реагентами по гриппу Центров по контролю и предотвращению заболеваний (IRR CDC, Influenza Reagent Resource, Influenza Division, WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza, Centers for Disease Control and Prevention, Атланта, США), и набор реагентов для одноступенчатой ПЦР AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kit (Ambion, «Thermo Fisher», США).

### Результаты

Надзор за гриппом традиционно осуществляется в соответствии с рекомендациями ВОЗ по эпидемическим сезонам, которые в Северном полушарии длятся с 40-й недели года до 20-й недели следующего года. По данным лабораторной ПЦР-диагностики был проведен анализ заболеваемости гриппом и ОРВИ в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в течение 4 эпидемических сезонов по месяцам с сентября по май. Данные эпидемические сезоны различались по интенсивности, подтипу преобладающего вируса гриппа А и генетической линии вируса гриппа В.

В табл. 1 показано распределение вирусов гриппа А и В в течение 4 эпидемических сезонов. Наибольшая активность вирусов гриппа (33,2%) была отмечена в эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. за счёт коциркуляции вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и В (Ямагатской линии), а в 2015–2016 гг. – в основном за счёт вклада вируса гриппа А(H1N1)pdm09, активность вирусов гриппа составила 31,4%.

На рис. 1 и 2 представлена доля каждого выявленного типа/подтипа вирусов гриппа по месяцам.

В эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. пик заболеваемости, вызванный вирусом гриппа А, пришёлся на февраль, доля лабораторно подтвержденных случаев составила 50,2 и 42% среди взрослых и детей соответственно. При этом наблюдалась одновременная циркуляция вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) с небольшим преобладанием первого. Вирус гриппа В активно циркулировал с февраля по апрель 2013 г., причем подъём заболеваемости среди взрослого населения пришёлся на март, доля положительных случаев составила 24,2%, а большая часть детей перенесла заболевание, вызванное вирусом гриппа В, в апреле (28%). Наблюдали циркуляцию двух генетических линий вируса гриппа В с преобладанием Ямагатской линии. В течение данного сезона нами были обследованы 1114 взрослых и 1402 ребёнка.

Эпидемический сезон 2013–2014 гг., в течение которого обследовано 875 взрослых и 1001 ребёнок, характеризовался меньшей интенсивностью заболеваемости гриппом по сравнению с другими анализируемыми сезонами, а рост заболеваемости гриппом начался раньше – с конца ноября 2013 г. Среди вирусов гриппа А зна-

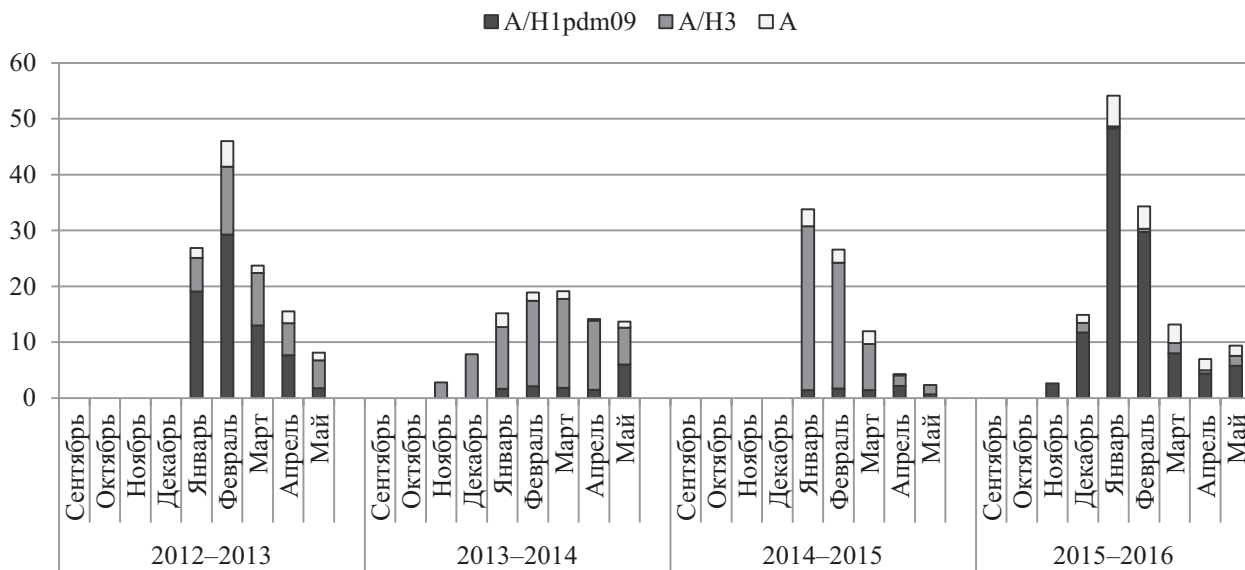


Рис. 1. Доля образцов, положительных в ПЦР на вирусы гриппа А двух подтипов и с неопределенным подтипом, по месяцам (в % от числа обследованных).

чительно доминировал вирус гриппа А(Н3N2), который был выявлен в 18% случаев у взрослых и 8,6% случаев у детей, а вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 – лишь в 2,5% случаев у взрослых и 1,5% – у детей. Вирус гриппа В преимущественно Ямагатской линии встречался у взрослых в 2,4% случаев, у детей – в 1,1%.

Для следующего эпидемического сезона, в течение которого обследовано 1024 взрослых и 2585 детей, было также характерно преобладание вирусов гриппа А(Н3N2) с пиком заболеваемости на 3-й неделе января 2015 г. (доля лабораторно подтвержденных случаев составила 36,4% у взрослых и 28,3% у детей).

В 2015 г. была отмечена циркуляция вирусов гриппа В только Ямагатской линии, пик заболеваемости пришелся на февраль 2015 г. Доля случаев выявления вирусов гриппа В у взрослых и детей практически не различалась и составила 8,9 и 8,3% у взрослых и детей соответственно.

В эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. в России была зарегистрирована тяжёлая эпидемия гриппа, интенсивность которой превысила показатель предыдущих 4 сезонов и достигла пика заболеваемости, зарегистрированной во время пандемии 2009 г. За данный сезон нами был обследован 3471 пациент (1772 ребёнка и 1699 взрослых). В отличие от предыдущих сезонов для дан-

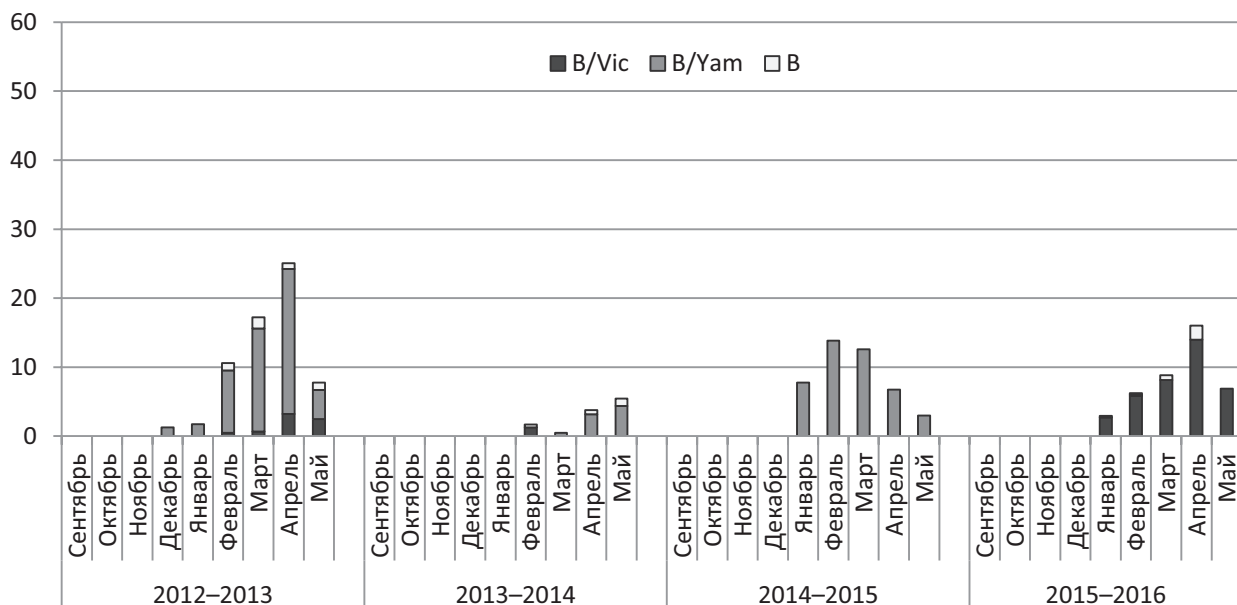


Рис. 2. Доля образцов, положительных в ПЦР на вирусы гриппа В двух генетических линий (В/Ямагата (B/Yam) и В/Виктория (B/Vic)) и с неопределенной линией, по месяцам (в % от числа обследованных).

Таблица 2

**Частота выявления респираторных вирусов (в % каждого этиологического агента от числа обследованных больных) в различные эпидемические сезоны**

Эпидсезоны	РС-вирус	Рино-вирус	Адено-вирус	Вирусы пара-гриппа	Метапневмо-вирус	Бока-вирус	Корона-вирус, %
2012–2013	9,5	5,9	6,9	2,8	0,7	0,4	0,7
2013–2014	16,6	13,6	6,3	5,8	1,4	0,9	2,6
2014–2015	17,0	21,4	10,6	3,6	2,2	3,0	0,9
2015–2016	22,6	8,0	4,7	2,5	0,5	1,4	1,2

ного сезона было характерно абсолютное преобладание вируса гриппа А(H1N1)pdm09 с появлением первых случаев заболевания, вызванных этим вирусом, уже в ноябре и пиком заболеваемости на 3-й неделе января. В целом за сезон доля взрослых больных с подтверждённым вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 составила 25,8%, а детей – 24,4%, при этом наибольший уровень заболеваемости, вызванной данным патогеном, был отмечен у детей от 0 до 2 лет (28,6%), а наименьший – у курсантов Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и Военно-космической академии им. А.Ф. Можайского в возрасте 17–19 лет (13,8%). Известно, что 96% этих курсантов были вакцинированы от гриппа в сентябре–октябре 2015 г.

По данным ПЦР-диагностики в Санкт-Петербурге и Ленинградской области пик числа случаев с подтверждённым вирусом гриппа В пришелся на апрель 2016 г. Доля пациентов с диагностированным гриппом В за сезон составила 7,5% для взрослых и 5,4% для детей.

Для всех образцов, полученных от 11472 больных с симптомами ОРВИ в течение 4 эпидемических сезонов 2012–2016 гг., была также проведена ПЦР диагностика РС-вируса, риновируса, аденовируса, вирусов парагриппа 1–4-го типов, метапневмовируса, бокавируса и коронавируса. Результаты диагностики по годам представлены в табл. 2.

По результатам исследования основными этиологическими агентами ОРВИ являются РС-вирус, риновирус и аденовирус. В последние годы РС-вирус представляется наиболее значимым из них. Ранее в эпидемические сезоны 2010–2012 гг. доля РС-вирусов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, по данным ПЦР-диагностики, проводившейся в лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, составляла не более 10% от числа обследованных за сезон. Начиная с сезона 2012–2013 гг. наблюдается постоянный рост количества случаев выявления РС-вирусной инфекции: если в данном сезоне доля лабораторно подтверждённых случаев составила 9,5%, в 2015–2016 гг. – 22,6% от числа обследованных. От инфекции, вызванной данным вирусом, наиболее страдает детская часть населения. Среди обследованных нами в анализируемый период больных, положительных на РС-вирус, 92,5% составляли дети до 6 лет, а частота выявления РС-вирусной инфекции у детей за сезон 2015–2016 гг. была 42,6% от общего числа обследованных детей.

Отмечена сезонная активность РС-вируса. Исследования последних лет позволили обозначить пики в циркуляции вируса, которые за период наблюдения в Санкт-Петербурге и Ленинградской области приходились на февраль–апрель. Исключение составляет сезон 2015–2016 гг., когда наибольшая частота выявления РС-вируса была зарегистрирована в декабре 2015 г. и апреле 2016 г. (рис. 3).

В целом увеличение, пик и снижение количества образцов, положительных на РС-вирус, и, следовательно, подъём, пик и снижение заболеваемости, вызванной данным патогеном, происходило на 2–3 недели позже, чем развитие эпидемии гриппа А, кроме сезона 2015–2016 гг.

Хотя доля выявленных случаев риновирусной инфекции была несколько ниже, чем РС-вируса, риновирус играл немаловажную роль в структуре ОРВИ. Риновирусы циркулировали на протяжении всех

анализируемых эпидемических сезонов, и уровень заболеваемости риновирусом был высоким в целом за сезон, что сравнимо с долей положительных случаев инфицирования вирусами гриппа и РС. В эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. пик числа случаев заболеваний риновирусной инфекцией в Санкт-Петербурге и Ленинградской области был зарегистрирован в самом начале (октябрь) и в конце (май) эпидемического сезона и составил 21,1% в октябре и 30,4% в мае. В целом за сезон уровень выявления риновирусов составил 5,9%.

Эпидемический сезон 2013–2014 гг. характеризовался интенсивной циркуляцией риновирусов на протяжении всего сезона, и доля положительных случаев в целом за сезон составила 13,6% с максимальным выявлением в январе (18,4%) и мае (17,5%). С этого сезона наблюдается высокий уровень циркуляции риновирусов начиная с сентября по май включительно. Так, в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. выявление риновируса имело пиковые значения в сентябре (39,8%), октябре (32,2%) и декабре (30,5%), а в мае доля положительных на риновирус образцов составила 22,9%. На протяжении всего сезона наблюдался значительный подъём доли положительных на риновирус образцов, и в целом за сезон уровень выявления риновирусов составил 21,4%. Данный сезон отличался относительно невысокой интенсивностью заболеваемости гриппом, длительностью и преобладанием вируса гриппа А(H3N2), что, вероятно, привело к увеличению уровня циркуляции риновирусов в популяции.

В эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. уровень циркуляции риновируса был ниже, доля положительных случаев составила всего 8%. Пиковые значения были зарегистрированы в сентябре (23%) и мае (24,1%).

Аденовирусы, как и риновирусы, циркулировали в Санкт-Петербурге и Ленинградской области на протяжении всех анализируемых эпидемических сезонов с тенденцией увеличения заболеваемости аденовирусной инфекцией до начала сезонных эпидемий гриппа. Так, в эпидемическом сезоне 2012–2013 гг. было зарегистрировано увеличение уровня заболеваемости аденовирусной инфекцией по лабораторным данным с октября 2012 г. (22,8%) по январь 2013 г. (29,0%) с максимальными значениями в декабре (31,3%). В период сезонной эпидемии гриппа (февраль–май) при высокой выявляемости вирусов гриппа количество случаев аденовирусной инфекции было низким и колебалось в пределах 0,8–5,7%, а доля положительных случаев аденовирусной инфекции в целом за сезон составила 6,9%. Эпидемический сезон 2013–2014 гг. характеризовался низким уровнем циркуляции аденовирусов с пиками ПЦР-детекции в сентябре (10,2%) и мае (20,2%), доля больных аденовирусной инфекцией в целом за сезон составила 6,3%. В период эпидемического сезона 2014–2015 гг. пики числа случаев заболеваний адено-

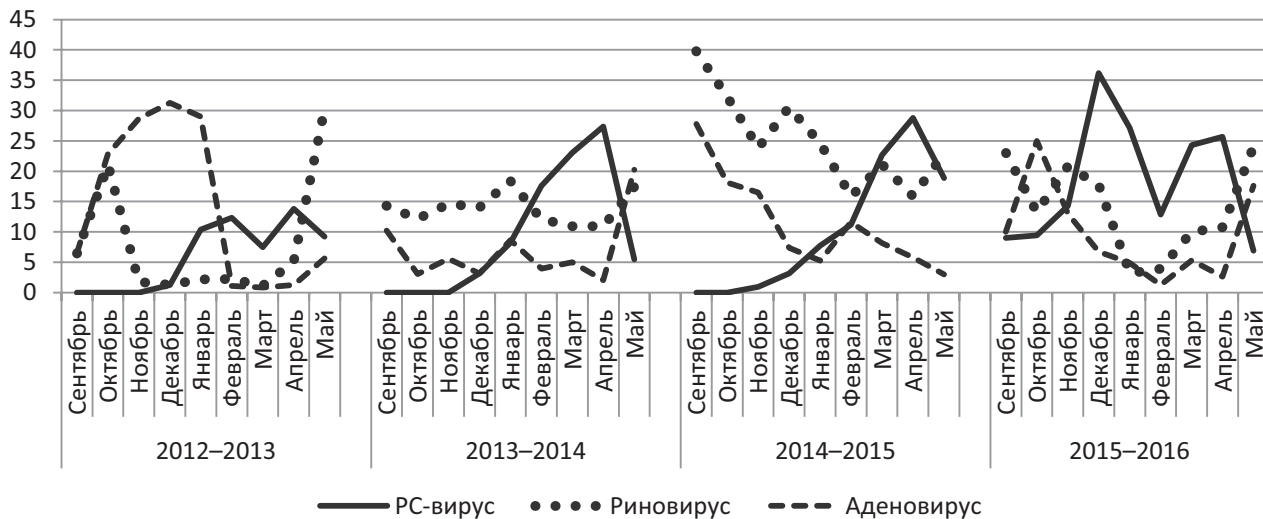


Рис. 3. Частота выявления РС, рино- и аденовирусов (доля в % каждого этиологического агента от числа обследованных больных) по месяцам.

вирусной инфекцией пришлось на сентябрь (27,8%), октябрь (18,1%) и ноябрь (16,5%), повышение уровня детекции аденовирусов было также зарегистрировано в феврале 2015 г. (11,6%). В сравнении с остальными анализируемыми эпидемическими сезонами доля положительных случаев аденовирусной инфекции была велика и в целом за сезон 2014–2015 гг. составила 10,6%. Следует отметить, что в эпидемическом сезоне 2015–2016 гг. наблюдалась практически такая же картина циркуляции аденовирусов, как и в предыдущем сезоне 2014–2015 гг., с повышенным уровнем детекции в сентябре (10%), октябре (25%), ноябре (13%) и в конце сезона в мае (17,6%). Доля в целом за сезон была ниже в 2,3 раза в сравнении с предыдущим эпидемическим сезоном и составила 4,7%.

Вирусы парагриппа также циркулировали в Санкт-Петербурге и Ленинградской области на протяжении всех

анализируемых эпидемических сезонов (рис. 4). Уровень их циркуляции был невысок, и доля выявленных вирусов парагриппа составила максимум в октябре и декабре 2012 г. 17,5 и 10%, соответственно. В октябре, ноябре 2014 г. и ноябре 2015 г. доля положительных случаев составила 14,1, 11,9 и 10,4% соответственно. Единственным исключением за исследуемый период стал эпидемический сезон 2013–2014 гг., когда значительное повышение заболеваемости парагриппом наблюдалось с октября 2013 г. (10%) по январь 2014 г. (10,3%) с максимальными значениями в декабре (26,6%) 2012 г. Доля больных с лабораторно подтвержденной инфекцией парагриппа в целом за данный сезон составила 5,8%, что в сравнении с другими сезонами в среднем в 2 раза больше.

На протяжении всех анализируемых сезонов циркуляция метапневмовируса, бокавируса и коронавируса была на низком уровне с наименьшей выявляемостью корона-

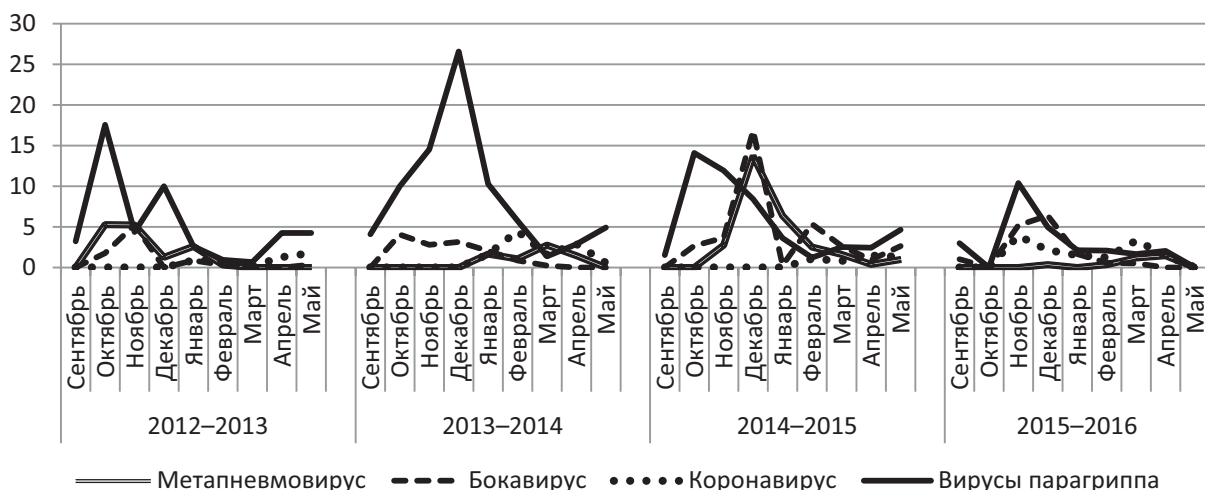


Рис. 4. Частота выявления вирусов парагриппа, метапневмо- и бокавирусов (доля каждого этиологического агента от числа обследованных больных в %) по месяцам.

вируса (4,5% в феврале 2014 г. и 2,6% в целом за сезон 2013–2014 гг.). Примечательно, что прослеживаемая коциркуляция метапневмовируса и бокавируса была особенно значительной в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг., когда пики выявляемости как метапневмовируса, так и бокавируса пришлось на декабрь 2014 г. и составили 13,7 и 16,8% соответственно. Доля положительных лабораторно подтверждённых случаев метапневмовирусной и бокавирусной инфекций за данный сезон составила 2,2 и 3% соответственно, что в среднем в 3,2 и 4,3 раза выше по сравнению с остальными эпидемическими сезонами.

Метапневмовирусы и бокавирусы диагностировали в основном у детей в возрасте до 5 лет. За анализируемый период 2012–2016 гг. выраженной сезонности в циркуляции вирусов парагриппа, метапневмовируса, бокавируса и коронавируса обнаружено не было.

### Обсуждение

Эпидемические сезоны по гриппу 2012–2016 гг. отличались как по интенсивности процесса, так и по встречаемости подтипа вируса гриппа А и генетической линии вируса гриппа В. Следует отметить, что в сезон 2014–2015 гг. на эпидемической арене появились вирусы гриппа А(Н3N2), обладающие антигенными свойствами, отличными от свойств, характерных для вирусов предыдущих сезонов. Большинство циркулирующих в Северо-Западном регионе вирусов гриппа А(Н3N2) принадлежали к субкладе 3С.2а и не соответствовали по своим антигенным и генетическим свойствам Н3-компоненту гриппозных вакцин, рекомендованному экспертами ВОЗ для Северного полушария на сезон 2015–2016 гг., поэтому нами было отмечено более частое выявление вируса гриппа А(Н3N2) у привитых пациентов. Так, в организованных коллективах (курсанты Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и Военно-космической академии им. А.Ф. Можайского), где доля привитых достигает 100%, частота выявления вируса гриппа А в целом за сезон 2014–2015 гг. составила 25,6% в отличие от аналогичного показателя в другие сезоны: 12,6% – 2012–2013, 16,0% – 2013–2014 и 18,8% – 2015–2016 гг.

Относительно низкий процент заболеваемости гриппом в организованных коллективах в течение достаточно тяжёлого для России эпидемического сезона 2015–2016 гг. можно объяснить большим количеством привитых от гриппа и соответствием компонента Н1 вакцины циркулирующим вирусам гриппа А(Н1N1)pdm09. Необходимо отметить, что доля привитых от гриппа пациентов с подтверждённым диагнозом гриппа В за 2015–2016 гг. более чем в 3 раза превышала средний показатель и составила 21,2%. Данный факт, возможно, объясняется тем, что в эпидемический сезон 2015–2016 гг. произошла смена генетической линии циркулирующего вируса гриппа В с Ямагатской на Викторианскую, а компонент В трехвалентной противогриппозной вакцины, рекомендованной на этот сезон, не соответствовал циркулирующим вирусам гриппа В.

Второй по значимости в структуре заболеваемости ОРВИ как в России, так и в мире является РС-вирусная инфекция. Ранее анализируемого в статье периода в эпидемические сезоны 2010–2012 гг. доля РС-вирусов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области, по данным ПЦР-диагностики, составляла не более 10% от числа обследованных за сезон. Начиная с сезона 2012–2013 гг. наблюдается постоянный рост количества выявленных случаев РС-вирусной инфекции: если в данном сезоне доля лабораторно подтверждённых случаев составила

9,5%, то в 2015–2016 гг. – 22,6% от числа обследованных. Такая высокая частота выявления РС-вирусной инфекции сравнима с данными по диагностике гриппа и даже превышает их. Увеличение заболеваемости, вызванной РС-вирусом, возможно, связано с появлением в популяции новых РС-вирусов А генотипа ON1/GA2 (согласно классификации по G-гену), которые с 2013 г. преобладают в циркуляции практически во всех странах [6–8].

Нами было отмечено, что в целом подъём, пик и снижение заболеваемости, вызванной РС-вирусом, происходило на 2–3 нед позже, чем развитие эпидемии гриппа А, кроме сезона 2015–2016 гг. По данным L. van Asten и соавт. [9], существует корреляция между началом эпидемии гриппа и подъёмом заболеваемости РС-вирусной инфекцией, однако за 10 лет наблюдений (2003–2012) подъём заболеваемости РС-вирусной инфекцией наблюдался на 2–3 нед раньше эпидемии гриппа. Авторами было показано, что в случае ранней эпидемии гриппа А (как в сезон 2015–2016 гг.) эпидемия, вызванная РС-вирусом, практически совпадает во времени [9]. Недостаточный объём выборки и длительность наблюдения не позволили нам провести подробный метаанализ и сделать статистически достоверные выводы.

В последнее время риновирусная инфекция, часто характеризующаяся тяжёлым течением, стала одной из наиболее распространённых респираторных инфекций, одинаково поражающей как взрослых, так и детей. Риновирус часто диагностировался одновременно с другим респираторным патогеном негриппозной этиологии. Следует отметить, что снижение уровня циркуляции риновирусов совпадало с ростом циркуляции вирусов гриппа А (см. рис. 2 и 3). В литературе имеется много данных о влиянии респираторных патогенов друг на друга. Инфицирование одним вирусным агентом вызывает в клетках продукцию интерферонов и других цитокинов, сходных с теми, которые вырабатываются в ответ на другой респираторный вирус. Данная иммунная реакция приводит рецепторные клетки в «антивирусное состояние». Показано влияние вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 на циркуляцию РС-вирусов, приводящее к смещению пиков или интенсивности циркуляции последних, а также взаимодействие риновируса и вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 [10–12]. Однако остаётся непонятным, почему подобное взаимодействие отмечается для риновируса и вируса гриппа А и нехарактерно для риновируса и РС-вируса (высокий % коинфекции) или РС-вируса и вируса гриппа А (коциркуляция). Чтобы сделать достоверные выводы, необходимо провести более масштабные или когортные исследования с лабораторными и вирусологическими данными по каждому вирусу, полученными для различных возрастных групп в течение большого количества сезонов [9].

Аденовирусы являются общепризнанной причиной острых респираторных инфекций, характерных для организованных коллективов. Повышенные риски развития аденовирусной инфекции наблюдаются, в частности, у военных и часто приводят к тяжёлым заболеваниям, в некоторых случаях со смертельным исходом [13]. В нашем исследовании мы также наблюдали высокий уровень заболеваемости аденовирусной инфекцией в организованных коллективах: так, в эпидемическом сезоне 2014–2015 гг. доля положительных случаев аденовирусной инфекции у курсантов Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и Военно-космической академии им. А.Ф. Можайского составила 38,6%, при этом

среди всех обследованных с лабораторно подтверждённой аденовирусной инфекцией 38,9% составляли больные из организованных коллективов.

По данным многих авторов, метапневмовирусная и бокавирусная инфекции наиболее часто встречаются у детей в возрасте до 5 лет [14–16]. В наших исследованиях также была отмечена высокая частота встречаемости этих инфекций у детей.

### Выводы

1. Эпидемические сезоны 2012–2016 гг. отличались по интенсивности и длительности циркуляции различных вирусов гриппа и других ОРВИ.

2. Была выявлена сезонность циркуляции РС-вируса, при этом увеличение заболеваемости РС-вирусной инфекцией происходило на 2–3 нед позже, чем развитие эпидемии гриппа А. Также отмечена сезонность циркуляции вирусов парагриппа, частота выявления которых увеличивалась за 2–3 мес до сезонных эпидемий гриппа.

3. Наблюдался постоянный рост заболеваемости РС-вирусной инфекцией, частота которой была сравнима с данными по диагностике гриппа и даже превышала их. РС-вирус поражал преимущественно детей в возрасте до 6 лет (92,5% от общего количества больных с подтверждённой РС-вирусной инфекцией).

4. Снижение уровня циркуляции риновирусов совпало с ростом циркуляции вирусов гриппа А. Было показано, что риновирус наиболее часто являлся составляющей частью микстинфекций.

5. Отмечен высокий уровень заболеваемости аденовирусной инфекцией в организованных коллективах. Среди всех обследованных с лабораторно подтверждённой аденовирусной инфекцией 38,9% составляли больные из таких коллективов.

Длительный лабораторный надзор за гриппом и другими респираторными инфекциями имеет решающее значение для определения этиологической структуры заболеваемости ОРВИ, тенденций в циркуляции вирусов, сроков активности и взаимовлияния вирусных агентов и эпидемиологической картины в целом.

Полученные лабораторные данные в системе надзора за гриппом и ОРВИ являются важными для общественного здравоохранения, особенно во время эпидемически значимых событий, таких как Олимпийские игры, фестивали или другие мероприятия мирового уровня. Выявление ранних признаков повышенной активности вирусов, скорости их распространения, интенсивности и длительности циркуляции даёт возможность оперативно реагировать и предпринимать соответствующие действия для организации эпидемиологических мероприятий и предотвращения распространения респираторных вирусных инфекций.

**Благодарность.** Коллектив авторов приносит благодарность всем участникам проекта «Глобальная сеть госпитального надзора за гриппом» (Global Influenza Hospital Surveillance Network) при участии Фонда эпидемиологии Франции за самоотверженную работу и всестороннюю поддержку.

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

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

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 5–16 см. REFERENCES)

1. Дриневский В.П., Осидак Л.В., Цыбалова Л.М. *Острые респираторные инфекции у детей и подростков*. СПб.; 2003.
3. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2012 году». М.; 2013.
4. Яцышина С.Б., Коновалов А.В., Магкоева З.Г., Прадед М.Н., Шелковская Л.П., Переvozчикова Л.А. и др. Лабораторная диагностика в оценке заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями в эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; (1): 34–8.

### REFERENCES

1. Drinevskiy V.P., Osidak L.V., Tsybalova L.M. *Acute Respiratory Infections in Children and Teenagers [Ostrye respiratornyye infektsii u detey i podrostkov]*. St. Petersburg; 2003. (in Russian)
2. Nichols W.G., Peck Campbell A.J., Boeckh M. Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21(2): 274–90.
3. State report «Regarding the condition of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2012». Moscow; 2013. (in Russian)
4. Yatsyshina S.B., Kononov A.V., Magkoeva Z.G., Praded M.N., Shelkovskaya L.P., Perevozchikova L.A., et al. Laboratory diagnostics in evaluation of acute respiratory viral infection morbidity in 2010–2011 epidemic season. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2013; (1): 34–8. (in Russian)
5. ECDC and WHO Europe Weekly Influenza Update. Flu News Europe. Archives. Available at: <https://flunewseurope.org>
6. Eshaghi A., Duvvuri V.R., Lai R., Nadarajah J.T., Li A., Patel S.N., et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus A strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS One*. 2012; 7(3): e32807.
7. Tapia L.I., Shaw C.A., Aideyan L.O., Jewell A.M., Dawson B.C., Haq T.R., et al. Gene sequence variability of the three surface proteins of human respiratory syncytial virus (HRSV) in Texas. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90786.
8. Trento A., Abrego L., Rodriguez-Fernandez R., González-Sánchez M.I., González-Martínez F., Delfraro A., et al. Conservation of G-Protein Epitopes in Respiratory Syncytial Virus (Group A) Despite Broad Genetic Diversity: Is Antibody Selection Involved in Virus Evolution? *J. Virol.* 2015; 89(15): 7776–85.
9. van Asten L., Bijkerk P., Fanoy E., van Ginkel A., Suijkerbuijk A., van der Hoek W., et al. Early occurrence of influenza A epidemics coincided with changes in occurrence of other respiratory virus infections. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2016; 10(1): 14–26.
10. Linde A., Rotzén-Ostlund M., Zwegberg-Wirgart B., Rubinova S., Brytting M. Does viral interference affect spread of influenza? *Euro Surveill.* 2009; 14(40).
11. Pascalis H., Temmam S., Turpin M., Rollot O., Flahault A., Carrat F., et al. Intense co-circulation of non-influenza respiratory viruses during the first wave of pandemic influenza pH1N1/2009: a cohort study in Reunion Island. *PLoS One*. 2012; 7(9): e44755.
12. Mak G.C., Wong A.H., Ho W.Y., Lim W. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009–2011. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2012; 6(3): e6–10.
13. Koren M.A., Arnold J.C., Fairchok M.P., Lalani T., Danaher P.J., Schofield C.M., et al. Type-specific clinical characteristics of adenovirus-associated influenza-like illness at five US military medical centers, 2009–2014. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2016; 10(5): 414–20.
14. Aberle J.H., Aberle S.W., Redlberger-Fritz M., Sandhofer M.J., Popow-Kraupp T. Human metapneumovirus subgroup changes and seasonality during epidemics. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2010; 29(11): 1016–8.
15. Mahalingam S., Schwarze J., Zaid A., Nissen M., Sloots T., Tauro S., et al. Perspective on the host response to human metapneumovirus infection: what can we learn from respiratory syncytial virus infections? *Microbes Infect.* 2006; 8(1): 285–93.
16. Manoha C., Espinosa S., Ahob S.L., Huet F., Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J. Clin. Virol.* 2007; 38(3): 221–6.

Поступила 25.01.18

Принята в печать 06.03.18

## НЕКРОЛОГ

### ПАМЯТИ ВАСИЛИЯ АНДРЕЕВИЧА ЛАШКЕВИЧА



Медицинская наука понесла тяжёлую утрату. На 92-м году жизни скончался выдающийся учёный, организатор медицинской науки, доктор медицинских наук, профессор, лауреат премии им. М.П. Чумакова, академик Российской академии медицинских наук Василий Андреевич Лашкевич.

Василий Андреевич Лашкевич – ученик М.П. Чумакова, основателя Института полиомиелита и вирусных энцефалитов (ИПВЭ) и один из первых научных сотрудников, которые обеспечили успех исследований и разработок уже в первые годы работы института.

Яркий и содержательный жизненный путь Василия Андреевича Лашкевича всегда был прочно связан с ИПВЭ, в стенах которого сформировались и получили развитие его научные интересы.

Василий Андреевич Лашкевич внёс крупный вклад во многие разделы вирусологической науки. Ещё будучи аспирантом, он одним из первых выявил очаги Кулихорадки на территории нашей страны и изучил основные особенности эпидемиологии этой инфекции, а также внёс большой вклад в научную разработку, создание технологии и организацию производства инактивированной вакцины против полиомиелита. Существенным вкладом в борьбу с полиомиелитом явилось активное участие В.А. Лашкевича в научной и экспериментальной разработке технологии производства живой полиомиелитной вакцины и в организации первого в мире промышленного производства этого препарата (1958–1967 гг.). Результаты этой работы позволили получать безопасную и высокоэффективную вакцину, с помощью которой полиомиелит был практически ликвидирован в нашей стране и во многих других странах мира.

На основе разработанной В.А. Лашкевичем в сотрудничестве с другими специалистами ИПВЭ РАМН технологии производства живой полиомиелитной вакцины были сформулированы первые требования ВОЗ к живой полиомиелитной вакцине (1962 г.). По предложенной технологии вакцина производится и в настоящее время.

В.А. Лашкевичем создана технология промышленного производства культуральной инактивированной вакцины против клещевого энцефалита (1958 г.). Основы разработанной технологии используются в настоящее время.

Под руководством В.А. Лашкевича были выполнены важнейшие исследования по внедрению статистических методов для стандартизации качества вирусных вакцин.

Результаты генетических исследований энтеровирусов и флавивирусов, изучения их биофизических, биохимических и антигенных характеристик являются существенным вкладом в общую вирусологию и служат основой для совершенствования вирусных вакцин и диагностикумов.

Значительный интерес представляют выполненные под руководством В.А. Лашкевича в 1981–2003 гг. исследования по выявлению и изучению новых нозологических форм энтеровирусных инфекций, таких как острый энтеровирусный увеит и острое мультисистемное геморрагическое заболевание у детей раннего возраста.

Результаты исследований В.А. Лашкевича опубликованы в 290 работах, в том числе в единственной в мировой литературе монографии «Научные основы производства полиомиелитных вакцин». Под руководством В.А. Лашкевича выполнены восемь кандидатских диссертаций и при его консультативной помощи защищены четыре докторские диссертации.

В течение многих лет В.А. Лашкевич был экспертом ВОЗ по вирусным инфекциям, членом бюро ОПМ РАМН, членом экспертной группы ВАК по вирусологии, председателем Комиссии вирусных препаратов Комитета по медицинским иммунобиологическим препаратам, председателем проблемной комиссии «Клещевой и другие вирусные энцефалиты», заместителем главного редактора журнала «Вопросы вирусологии».

Труд В.А. Лашкевича отмечен орденом Дружбы, медалями, Почётной грамотой президиума РАМН, нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения».

Василий Андреевич Лашкевич останется в памяти своих коллег и учеников разносторонне образованным учёным, человеком исключительной порядочности и доброты, отдавшим все свои силы и знания делу развития науки.

*Коллектив ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»*