

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

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

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

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

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

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

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

Сдано в набор 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.

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии*. 2018.
Т. 63. № 5. 241-288.

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

Свидетельство о регистрации № 1170
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

6

Том 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.)

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 • 6 • 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.; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan, Russia)

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Advisory Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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



СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Сизикова Т.Е., Борисевич Г.В., Щебляков Д.В., Бурми-
строва Д.А., Лебедев В.Н.* Использование монокло-
нальных антител для лечения заболевания, вызван-
ного вирусом Эбола 245
- Андропова В.Л.* Современная этиотропная химиотера-
пия цитомегаловирусной инфекции человека: клини-
ческая эффективность, молекулярный механизм дей-
ствия, лекарственная устойчивость, новые тенденции
и перспективы. Часть 2 250

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Ярыгина
Е.И., Куш А.А.* Мезенхимальные стволовые клетки: уси-
ление иммунного ответа и защита мышей от летальной
герпесвирусной инфекции 261
- Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А., Глотов
А.Г., Вяткин Ю.В., Бондарь А.А.* Выделение и филогенетический анализ калицивируса кошек в Сибири 268
- Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Желтухина А.И.* Монокло-
нальные антитела к гемагглютинину вирусов гриппа В
Викторианской эволюционной линии 275

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

- Ботвинкин А.Д., Михайловский Е.М.* М.А. Селимов:
вклад в разработку вопросов профилактики бешен-
ства, личность как учёного и человека (к 100-летию со
дня рождения) 281
- Гурцевич В.Э., Мазуренко Н.Н.* Памяти профессора Нико-
лая Петровича Мазуренко (1919–1984 гг.) 285
- Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопро-
сы вирусологии» в 2018 г.* 288

CONTENTS

REVIEWS

- Sizikova T.E., Borisevich G.V., Shcheblyakov D.V.,
Burmistrova D.A., Lebedev V.N.* The use of mono-
clonal antibodies for the treatment of Ebola virus di-
sease
- Andronova V.L.* Modern ethiotropic chemotherapy of hu-
man cytomegalovirus infection: clinical effectiveness,
molecular mechanism of action, drug resistance, new
trends and prospects. Part 2

ORIGINAL RESEARCH

- Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Yari-
gina E.I., Kushch A.A.* Mesenchymal stem cells en-
hance immune response and protect mice against
lethal herpes viral infection
- Glotova T.I., Semenova O.V., Nikonova A.A., Glotov A.G.,
Vyatkin Y.V., Bondar A.A.* Isolation and phylogenetic
analysis of feline calicivirus in Siberia
- Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I.* Monoclonal
antibodies to hemagglutinin of influenza B viruses Vic-
toria evolutionary lineage

ANNIVERSARY DATES

- Botvinkin A.D., Mikhaylovskiy E.M.* M.A. Selimov: Con-
tribution to prevention of rabies, scale of personality
as scientist and man of dignity (dedicated to 100 years
anniversary, 1918-2001)
- Gurtsevich V.E. Mazurenko N.N.* To memory of professor
Nikolai Petrovich Mazurenko (1919-1984)
- Index of articles published in 2018*

Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки
www.elibrary.ru можно подписаться на электронную версию
нашего журнала и других журналов издательства «Медицина» на 2019 год.

Архив журналов Издательства «Медицина» 2012–2014 гг.
находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах
Научной электронной библиотеки www.elibrary.ru
и Киберленинки www.cyberleninka.ru

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.37.03:616.98:578.833.31=085

*Сизикова Т.Е.¹, Борисевич Г.В.¹, Щебляков Д.В.², Бурмистрова Д.А.², Лебедев В.Н.¹***ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ ЭБОЛА**¹ФГБУ «48 Центральный НИИ» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад-6;²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Изучен ряд препаратов, рассматриваемых в качестве кандидатов для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола, из них наибольшим терапевтическим потенциалом обладают смеси моноклональных антител (МКАт). Преимущества использования МКАт заключаются в низкой токсичности, высокой специфичности и универсальности. Диапазон биологического действия МКАт зависит от Fc-фрагмента антител. Свойства МКАт включают опсонизацию патогена, активацию комплемента, антителозависимую клеточную цитотоксичность и вируснейтрализующие характеристики. Наиболее известной смесью МКАт, используемой для лечения, является ZMapp, производимая фирмой «Leaf Biopharmaceutical» с 2004 г. В статье рассмотрены разработанные смеси МКАт, их структура и свойства, защитная эффективность и создание новых видов МКАт, специфичных для всех представителей рода *Ebolavirus*.

Ключевые слова: обзор; вирус Эбола; геморрагическая лихорадка; лекарственные средства; лечение; моноклональные антитела; низшие приматы.

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Борисевич Г.В., Щебляков Д.В., Бурмистрова Д.А., Лебедев В.Н. Использование моноклональных антител для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6): 245-249. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-245-249>

*Sizikova T.E.¹, Borisevich G.V.¹, Shcheblyakov D.V.², Burmistrova D.A.², Lebedev V.N.¹***THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF EBOLA VIRUS DISEASE**¹48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation;²National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation

Some drugs candidates for treatment of Ebola virus disease (EVD), have been studied, monoclonal antibody (mAb) cocktails have shown great potential as EVD therapeutics.

The advantages of mAb therapy include low toxicity, high specificity and versatility, with the range of biological effects being dependent upon the Fc region. Functions of mAbs include pathogen opsonisation, complement activation, antibody-dependent cell cytotoxicity and virus neutralization characteristics. The most known mAb cocktail, used as therapeutic, is ZMapp, manufactured by «Leaf Biopharmaceutical» from 2004.

The elaborated mAb cocktails, structures and properties of mAbs, the protective characteristics of mAbs and development of new pan-ebolavirus mAbs are reviewed in this article.

Key words: review; Ebola virus; hemorrhagic fever; drugs; current; monoclonal antibodies; nonhuman primates.

For citation: Sizikova T.E., Borisevich G.V., Shcheblyakov D.V., Burmistrova D.A., Lebedev V.N. The use of monoclonal antibodies for the treatment of Ebola virus disease. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6): 245-249. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-245-249>

For correspondence: Sergey V. Borisevich, Doctor of Biology, Professor, corresponding member of RAS, 48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about authors:Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>Borisevich G.V., <http://orcid.org/0000-0002-0843-9427>Shcheblyakov D.V., <http://orcid.org/0000-0002-1289-3411>Burmistrova D.A., <http://orcid.org/0000-0002-3389-697X>Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 06 June 2017
Accepted 20 June 2017

Для корреспонденции: Борисевич Галина Валентиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад-6. E-mail: 48cnii@mil.ru

Представитель рода *Ebolavirus* семейства Filoviridae вирус Эбола является этиологическим агентом одной из особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. После инкубационного периода, продолжительность которого составляет от 3 до 21 сут, у инфицированных людей развивается тяжёлое заболевание, характеризующееся геморрагиями, мультиорганной недостаточностью и заканчивающееся летальным исходом в 50–90% случаев [1, 2].

Вирион содержит нефрагментированную «минус» РНК, содержащую приблизительно 18 900 нуклеотидов, кодирующую 7 структурных и 1 неструктурный белок. Порядок генов на геноме следующий: 3'-концевая лидерная область, гены белков NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, L. Каждый из белков несёт свою функцию: NP – нуклеопротеин, VP35 – кофактор полимеразы, VP40 – основной матричный белок, GP – гликопротеин, VP30 – активатор транскрипции, VP24 – минорный матричный белок, L – РНК-зависимая РНК-полимераза. Нуклеопротеин, белки VP30, VP35 и L ассоциированы с вирусной геномной РНК в рибонуклеопротеиновом комплексе. L-белок и белок VP35 образуют полимеразный комплекс, который транскрибирует и реплицирует вирусный геном [3].

Так как рассматриваемые в обзоре моноклональные антитела (МКАт) вируса Эбола индуцированы эпитопами, расположенными на гликопротеине, рассмотрим более подробно строение именно этого белка. Гликопротеин филовируса относится к классу 1 белков, проникающих через мембрану. Данный белок в процессе репродукции филовируса в клетке формируется из гликопротеина-предшественника (GP_0). При транспорте последнего в аппарат Гольджи происходит преобразование предшественника белка в две субъединицы (поверхностная субъединица GP_1 и трансмембранная субъединица GP_2). Обе субъединицы остаются связанными дисульфидными связями ($GP_{1,2}$), и тримеры гетеродимеров GP_1 - GP_2 образуют шипики на оболочке вириона [4].

Субъединица GP_1 гликопротеина $GP_{1,2}$ позволяет филовirusам проникать в эндосому при условиях, благоприятных для формирования активной формы гликопротеина $GP_{1,2}$. Субъединица GP_2 гликопротеина $GP_{1,2}$ содержит формирующий петлю N-концевой участок из 45 аминокислотных остатков. Данный участок формируется благодаря дисульфидной связи между молекулами цистеина в положениях 511 и 556. Коровая гидрофобная последовательность из 16 аминокислотных участков, расположенная в пределах данного участка, инициирует процесс проникновения филовируса через эндосомальную мембрану чувствительных клеток [5–7]. Рецепторсвязывающий участок осуществляет взаимодействие гликопротеина с хозяйскими клетками [7, 8].

За последние несколько лет разработан ряд средств экстренной профилактики и лечения заболевания, вызываемого вирусом Эбола: химиопрепараты широкого спектра действия [9–12]; вещества, относящиеся к классу аномальных нуклеозидов [8, 13]; малые интерферирующие (small interfering) РНК – миРНК (siRNA) [11, 12, 14]; препараты на основе вирусспецифических гуманизированных МКАт к вирусу Эбола [11, 15].

Только препараты на основе МКАт обеспечивали защиту при введении спустя более 24 ч после инфицирования экспериментальных животных.

Наиболее перспективным в иммунотерапии заболевания, вызванного вирусом Эбола, является использование

смесей МКАт к эпитомам вируса Эбола, расположенным на гликопротеине.

На первых этапах исследований в экспериментах были использованы смеси ZMab и MB-003. В состав смеси ZMab входят 3 мышиных МКАт m1H3, m2G4 и m4G7 [16]. Смесь MB-003 содержит 3 вида МКАт, полученных при иммунизации мышей рекомбинантным вирусом венесуэльского энцефаломелита лошадей (ВЭЛ), содержащим вставку гена гликопротеина вируса Эбола [17–19].

В терапевтических целях для повышения средней продолжительности полураспада МКАт в организме человека применяют либо химерные «человек–мышь», либо гуманизированные МКАт, выращенные в растениях *Nicotiana benthamiana* [18].

В эксперименте выявлена 67% (4/6) защита макаков реузусов после введения смеси MB-003 спустя 24 и 48 ч после инфицирования вирусом Эбола [20].

Рассмотрим некоторые свойства моноклоналных рассматриваемых ранее смесей МКАт к вирусу Эбола. МКАт с13С6 связываются с секретируемым гликопротеином (GPs), нейтрализуют вирус в присутствии комплемента. МКАт с6D8 нейтрализуют вирус в присутствии комплемента. МКАт h13F6 не обладают вируснейтрализующей активностью [17].

В работе E. Davidson и соавт. [21] изучен механизм связывания гликопротеина вируса Эбола с МКАт, входящими в смеси ZMapp, ZMab, MB-003 (2G4, 4G7, 1H3, 13C6, 6D8, 13F6). Чтобы определить, каким образом конкретный вид МКАт взаимодействует с гликопротеином вируса Эбола, использовали аланисканирующей мутагенез, изучение механизмов нейтрализации и связывания с интактным вирионом. Это позволило установить специфические эпитопы для каждого вида МКАт, структуру эпитопов, их консервативность и аффинность. Установлено, что для всех видов изученных МКАт существуют неидентичные эпитопы на молекуле гликопротеина, гликановом кэпе или муциноподобном участке. Данные о структуре эпитопов, их консервативности и аффинности объясняют, почему МКАт 13С6 и 4G7 (специфичные к эпитомам на основном участке гликопротеина) дают существенный защитный эффект по сравнению с МКАт 2G4 и 1H3 (специфичными к эпитомам на гликановом кэпе) и почему МКАт 6D8 и 13F6 (специфичные к эпитомам на муциноподобном участке) обладают выраженным аффинитетом и защитным эффектом, несмотря на отсутствие нейтрализующих свойств [17].

Необходимо отметить, что мутации в эпитопах гликопротеина вируса Эбола, индуцирующие МКАт, входящие в MB-003, могут привести к снижению способности связывания вируса с МКАт, вируснейтрализующей и протективной способности МКАт [17, 22].

В качестве антигена для иммунизации белых мышей при получении гибридом, продуцирующих МКАт, использовали либо репликон (участок РНК, наименьший генетический элемент, способный к самовоспроизведению) вируса ВЭЛ, либо рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, содержащие вставку гена гликопротеина вируса Эбола [19, 23, 24].

X. Qiu и соавт. [15] провели определение оптимальной комбинации MB-003 и ZMab для изучения в последующих экспериментах терапевтической дозы МКАт. В качестве лабораторных животных в экспериментах использованы морские свинки и низшие приматы.

На первом этапе определяли защитную эффективность

Таблица 1

Результаты оценки защитной эффективности препаратов МКАТ к вирусу Эбола при испытании на морских свинках и низших приматах [15]

Вид животных	Состав препарата МКАТ	Время введения препарата, сутки п.и.	Доля выживших животных, %	Средняя продолжительность жизни до гибели, сут, $\bar{X} \pm \sigma$
Морские свинки	c13C6	1	17	8,4 ± 1,7
	h13F6	1	17	10,2 ± 1,8
	c6D8	1	0	10,5 ± 2,2
	ZMAb	3	17	11,6 ± 1,8
	MB-003	3	0	8,2 ± 1,5
	ZMapp1(c13C6 + c2G4 + c4G7)	3	67	9,0 ± 0,0
	ZMapp2(c13C6 + c2G4 + c1H3)	3	50	8,3 ± 0,6
	ZMapp3(c13C6 + c1H3+c4G7)	3	17	8,6 ± 1,1
Низшие приматы (макаки резус)	Контроль (ФСБ)	3	0	7,3 ± 0,5
	c13C6	1	33	9,0 ± 1,4
	h13F6	1	0	9,0 ± 2,0
	c6D8	1	0	9,7 ± 0,6
	MB-003	1	33	14,0 ± 2,8
	Контроль	1	0	8,4 ± 1,9

монокомпонентов, предназначенных для конструирования МКАТ и созданных на их основе смесей. Морским свинкам, инфицированным $1 \cdot 10^3$ ЛД₅₀ адаптированного для данных животных варианта штамма Mayinga вируса Эбола-Заир, через 1 сут (или 3 сут) после инфицирования (п.и.) вводили по 5 мг на животное препаратов МКАТ (монопрепаратов или смесей). Наблюдение за животными, включающее контроль их массы, проводили в течение всех 28 сут.

Испытания индивидуальных препаратов МКАТ на низших приматах (макаки резус массой от 5,1 до 10 кг) проводили по следующей методике. Обезьянам, инфицированным штаммом Киквит вируса Эбола-Заир, через 24 ч п.и. вводили по 50 мг·кг⁻¹ препаратов МКАТ. За животными наблюдали в течение 28 сут. Полученные результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что в качестве основного компонента предполагаемых смесей МКАТ следует рассматривать МКАТ c13C6, наиболее перспективной для дальнейших исследований является смесь МКАТ ZMapp1 (c13C6 + c2G4 + c4G7).

В дальнейших экспериментах на низших приматах были испытаны смеси ZMapp1 (с заменой МКАТ c2G4 на m2G4) и ZMapp2.

Обезьянам, внутримышечно инфицированным штаммом Киквит вируса Эбола-Заир (инфицирующая доза 2512 БОЕ на животное), через 3 сут п.и. вводили по 50 мг·кг⁻¹ ZMapp1 (с заменой МКАТ c2G4 на m2G4) и ZMapp2. Наблюдение за животными проводили в течение

28 сут. У животных выявляли клинические признаки заболевания (лихорадка, сыпь, лейкоцитопения, тромбоцитопения). Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что препараты ZMapp1 и ZMapp2 проявляют выраженную защитную эффективность при испытании на низших приматах, что позволило авторам рекомендовать данные препараты для клинических испытаний [15].

Для большинства видов МКАТ, используемых в клинике, в качестве системы экспрессии, как правило, применяют клеточные линии млекопитающих, в частности, СНО (клетки яичника китайского хомячка). Преимущества экспрессии в таких линиях заключаются в естественной посттрансляционной модификации полученных продуктов, возможности получения стабильных клеточных линий и проведения суспензионного культивирования [20, 25].

В последнее время наиболее перспективным методом наработки биомассы МКАТ считается выращивание последних в растениях *Nicotiana benthamiana*.

Преимущества экспрессии МКАТ в растениях *N. benthamiana* заключаются в более низкой стоимости конечного продукта, создании (при использовании генно-модифицированных растений) характерного для человека профиля гликозилирования МКАТ, возможности масштабирования производства МКАТ [20, 25, 26].

Вследствие антигенных различий между пятью известными представителями рода *Ebolavirus* (вирусы Эбола-Заир, Эбола-Судан, Эбола-Рестон, Эбола-Taï Forest и Эбола-Bundibugyo) используемые в практике для лечения виды МКАТ эффективны только в отношении вируса Эбола-Заир. Несмотря на то, что большинство зарегистрированных случаев заболевания вызваны именно этим возбудителем, отмечены также эпидемические вспышки, вызванные вирусами Эбола-Судан и Эбола-Bundibugyo.

В работе [27] приведены данные о получении МКАТ 6Д6, которые эффективно блокируют процесс проникновения в чувствительные клетки всех известных представителей рода *Ebolavirus*. Специфичный эпитоп для данного вида МКАТ расположен на высококонсервативной области внутренней плавкой петле гликопротеина вируса Эбола в позиции на аминокислотной последовательности 528–533. Первичная структура аминокислотной последовательности данного эпитопа для вирусов Эбола-Заир, Эбола-Рестон, Эбола-Taï Forest и Эбола-Bundibugyo представлена в виде глицин-лейцин-аланин-триптофан-изолейцин-пролин, для вируса Эбола-Судан – в виде глицин-изолейцин-аланин-триптофан-изолейцин-пролин.

Таблица 2

Результаты оценки защитной эффективности смесей МКАТ к вирусу Эбола при испытании на низших приматах [15]

Смесь МКАТ	Клинические признаки заболевания				Доля выживших животных, n/N (%)
	лихорадка n/N (%)	Сыпь, n/N (%)	Лейкоцитопения, n/N (%)	Тромбоцитопения, n/N (%)	
ZMapp1	5/6 (83)	0/6 (0)	3/6 (50)	4/6 (67)	6/6 (100)
ZMapp2	6/6 (100)	1/6 (17)	2/6 (33)	6/6 (100)	5/6 (83)*
Контроль	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)**

Примечание. * – животное погибло на 9-е сутки п.и.; ** – животное погибло на 6-е сутки п.и.

Определение защитной эффективности МКАт 6Д6 при испытании на белых мышах [27]

Вирус Эбола, использованный для инфицирования	Линия белых мышей	Введение МКАт 6Д6	Изменение массы тела на 6-е сутки п.и., %	Доля выживших п/Н (%)	T, сут
Эбола-Заир, вариант, адаптированный для белых мышей	BALB/c	+	+4	8/8 (100)	-
		-	-12	0/8 (0)	6,88
Эбола-Заир	IFNAR ^{-/-}	+	-10	8/8 (100)	-
		-	-25	0/8 (0)	6,12
Эбола-Судан	IFNAR	+	-13	8/8 (100)	-
		-	-23	7/8 (87,5)	6*

Примечание. T – средний срок жизни до гибели; + – введение, -- отсутствие введения животным препаратов МКАт; * – животное погибло на 6-е сутки п.и.

Для получения МКАт 6Д6 самок мышей линии BALB/c (6–8 недельного возраста) трёхкратно (с 2-недельным интервалом) внутримышечно иммунизировали комбинацией фрагментов гликопротеинов (без муциноподобного участка) вирусов Эбола-Заир, Эбола-Судан (по 25 мкг каждого). При получении гибридом, продуцирующих МКАт, проводили скрининг супернатанта на наличие антител к гликопротеинам вирусов Эбола-Заир и Эбола-Судан. В дальнейшей работе использовали клоны гибридом, продуцирующие МКАт, реагирующие с обоими антигенами [28].

Показано, что МКАт 6Д6 эффективно нейтрализуют псевдотипы вируса везикулярного стоматита, содержащие белок GPs всех представителей рода *Ebolavirus*, в том числе варианта, вызвавшего вспышку 2014 г. 50% ингибирующая концентрация МКАт 6Д6 по отношению к представителям рода *Ebolavirus* составляет для вируса Эбола-Заир (1976) – 0,05 мкг·мл⁻¹, для вируса Эбола-Заир (2014) – 0,12 мкг·мл⁻¹, для вируса Эбола-Судан – 0,19 мкг·мл⁻¹, для вируса Эбола-Рестон – 0,62 мкг·мл⁻¹, для вируса Эбола-Tai Forest – 0,33 мкг·мл⁻¹, для вируса Эбола-Bundibugyo – 0,24 мкг·мл⁻¹.

Проведено изучение защитной эффективности МКАт 6Д6 для белых мышей, инфицированных вирусом Эбола. В экспериментах использованы адаптированный для белых мышей вариант вируса Эбола-Заир, а также вирусы Эбола-Заир и Эбола-Судан дикого типа. Испытания выполняли на белых мышах линий BALB/c (самки 6–8-недельного возраста) и IFNAR^{-/-} (линия мышей с дефектом по рецепторам для α- и β-интерферонов, животные обоего пола 6–8 недельного возраста). Мышей заражали внутрибрюшинно в дозе 1·10³ БОЕ. Спустя 1 сут п.и. мышам внутрибрюшинно вводили по 100 мкг МКАт 6Д6 в объеме 200 мкл. Наблюдение за животными проводили в течение 28 сут п.и. Результаты, представленные в табл. 3, свидетельствуют о высокой защитной эффективности МКАт 6Д6 и позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения как в составе монопрепарата, так и для формирования на их основе новых смесей МКАт.

В настоящее время наиболее эффективным терапевтическим средством для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола, является смесь ZMapp, которая представляет собой смесь гуманизированных МКАт с химерными «человек–мышь». В состав смеси входят МКАт с13С6 (из смеси MB-003), производимые фирмой «Mapp Biopharmaceutical» и МКАт с2G4 и с4G7, производимые фирмой «De Pyris», Торонто, Канада [29]. Компоненты ZMapp выращивают в больших количествах в растениях *N. benthamiana*. Данная смесь эффективно защищает низших приматов даже при введении спустя 4–5 суток п.и. [15].

Исходя из исключительных обстоятельств данной эпидемии, ВОЗ приняла решение о возможном использовании экспериментальных лекарственных средств и вакцин [30]. Однако только результаты дальнейших клинических исследований позволят оценить их протективную способность, поскольку результаты доклинических исследований не могут адекватно отразить способность МКАт индуцировать развитие нежелательных иммунных реакций при их использовании для лечения больных.

Препарат ZMapp в 2014 г. проходил испытания на 3 больных, двое из которых выздоровели, а один погиб [13, 31, 32]. Несмотря на малую по численности выборку, вероятность того, что выздоровление больных не связано с лечением препаратом ZMapp, менее 0,1. Для оценки эффективности ZMapp несомненно требуются дальнейшие испытания препарата для лечения больных.

Смесь МКАт ZMapp производит фирма «Leaf Biopharmaceutical» (Сан-Диего, США) с 2014 г.

Лекарственные препараты МКАт в настоящее время по объёму производства занимают на мировом фармацевтическом рынке второе место после вакцин. Правительство США заключило многомиллионные контракты с корпорациями «Mapp Biopharmaceutical» и «US Biomedical Advances Research and Development Authority» (BARDA), направленные на расширение производства ZMapp [29].

Таким образом, разработка новых и совершенствование качества ранее выпускаемых препаратов на основе МКАт к вирусу Эбола является перспективным и успешно реализуемым направлением в профилактике и лечении заболевания. Применение современных достижений генно-инженерных технологий позволяет не только модифицировать свойства МКАт, но и разрабатывать новые препараты модифицированных МКАт с заданной специфичностью к различным эпитомам вируса Эбола.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Feldmann H., Geisbert T.W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*. 2011; 377(9768): 849-62. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60667-8
- Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2006: 1279-304.
- Albarino C.G., Shoemaker T., Khristova M.L., Wamala J.F., Muyembe J.J., Balinandi S., et al. Genomic analysis of filoviruses

- associated with four viral hemorrhagic fever outbreaks in Uganda and the Democratic Republic of the Congo in 2012. *Virology*. 2013; 442(2): 97-100. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.014
4. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of Ebola virus glycoprotein by polyprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Microbiology*. 1998; 95(10): 5762-7.
 5. Lee J.E., Fusco M.L., Hessel A.J., Oswald W.B., Burton D.R., Saphire E.O. Structure of Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor. *Nature*. 2008; 454(7201): 177-82. DOI: 10.1038/nature07082.
 6. Lee J.E., Saphire E.O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry. *Future Virol.* 2009; 4(6): 621-35. DOI: 10.1038/nature07082
 7. Wool-Lewis R.J., Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* 1998; 72(4): 3155-60.
 8. Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., Olinger G.G., Nichols D.K., Pratt W.D., et al. Gene-specific countermeasures against Ebola virus based on antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1): 5-13. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020001
 9. Geisbert T.W., Geisbert T.W., Hensley L.E., Jahrling P.B., Larsen T., Geisbert J.B., et al. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa tissue factor: a study in rhesus monkeys. *Lancet*. 2003; 362(9400): 1953-8. DOI:10.1016/s0140-6736(03)15012-x
 10. Hensley L.E., Stewens E.L., Yan S.B., Geisbert J.B., Macias W.L., Larsen T., et al. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(2): 390-9. DOI: 10.1086/520598
 11. Madelain V., Nguyen T.H., Olivo A., de Lamballerie X., Guedj J., Taburet A.M., et al. Ebola Virus Infection: Review of the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs Considered for Testing in Human Efficacy Trials. *Clin. Pharmacokinet.* 2016; 55(8): 907-23. DOI: 10.1007/s40262-015-0364-1
 12. Olszanecki R., Gawlik G. Pharmacotherapy of Ebola hemorrhagic fever: a brief review of current status and future perspectives. *Folia Med. Craiova*. 2014; 54(3): 67-77.
 13. Sayburn A. WHO gives go ahead for experimental treatments to be used in Ebola outbreak. *BMJ*. 2014; 349: 1. DOI: 10.1136/bmj.g5161
 14. Geisbert T.W., Lee A.C.H., Robbins M., Geisbert J.B., Honko A.N., Sood V., et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet*. 2010; 375(9729): 1896-905. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60357-1
 15. Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*. 2014; 514(7520): 47-53. DOI: 10.1038/nature13777
 16. Choi W.Y., Hong K.J., Hong J.E., Lee W.J. Progress of vaccine and drug development for Ebola preparedness. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015; 4(1): 11-6. DOI: 10.7774/cevr.2015.4.1.11
 17. Murin C.D., Fusco M.L., Bornholdt Z.A., Qiu X., Olinger G.G., Zeitlin L., et al. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(48): 17182-7. DOI: 10.1073/pnas.1414164111
 18. Na W., Park N., Yeom M., Song D. Ebola outbreak in Western Africa 2014: what is going on with Ebola virus? *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2015; 4(1): 17-22. DOI: 10.7774/cevr.2015.4.1.17
 19. Pettitt J., Zeitlin L., Kim do H., Working C., Johnson J.C., Bohorov O., et al. Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(199): 1-6. DOI: 10.1126/scitranslmed.3006608
 20. Olinger G.G., Pettitt J., Kim D., Working C., Bohorov O., Bratcher B., et al. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012; 109(44): 18030-5. DOI: 10.1073/pnas.1213709109
 21. Davidson E., Bryan C., Fong R.H., Barnes T., Pfaff J.M., Mabila M., et al. Mechanism of Binding to Ebola Virus Glycoprotein by the ZMapp, ZMAb, and MB-003 Cocktail Antibodies. *J. Virol.* 2015; 89(21): 10982-92. DOI: 10.1128/jvi.01490-15
 22. Kugelman J.R., Kugelman-Tonos J., Ladner J.T., Pettitt J., Keeton C.M., Nagle E.R., et al. Emergence of Ebola Virus Escape Variants in Infected Nonhuman Primates Treated with the MB-003 Antibody Cocktail. *Cell. Rep.* 2015; 12(12): 2111-20. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.038
 23. Wilson J.A., Hewey M., Bakken R., Guest S., Bray M., Schmaljohn A.L., et al. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science*. 2000; 287(5458): 1664-6.
 24. Yang Z.Y., Duckers H.J., Sullivan N.J., Sanchez A., Nabel E.G., Nabel G.J. Identification of the Ebola virus glycoprotein as main viral determinant of vascular cell cytotoxicity and injury. *Nat. Med.* 2000; 6(8): 886-9. DOI: 10.1038/78645
 25. Jones J.D. Leishmania tarentolae: an alternative approach to the production of monoclonal antibodies to treat emerging viral infections. *Infect. Dis. Poverty*. 2015; 4(8): 1-5. DOI: 10.1186/2049-9957-4-8
 26. Zhang Y., Li D., Jin X., Huang Z. Fighting Ebola with ZMapp: spotlight on plant-made antibody. *Sci. China Life Sci.* 2014; 57(10): 987-8. DOI: 10.1007/s11427-014-4746-7
 27. Furuyama W., Marzi A., Nanbo A., Haddock E., Maruyama J., Miyamoto H., et al. Discovery of an antibody for pan-ebolavirus therapy. *Sci. Rep.* 2016; 6(20514): 1-10. DOI: 10.1038/srep20514
 28. Holtsberg F.W., Shulenin S., Vu H., Howell K.A., Patel S.J., Gunn B., et al. Pan-ebolavirus and Pan-filovirus Mouse Monoclonal Antibodies: Protection against Ebola and Sudan Viruses. *J. Virol.* 2015; 90(1): 266-78. DOI: 10.1128/jvi.02171-15
 29. McCarthy M. US signs contract with ZMapp maker to accelerate development of the Ebola drug. *BMJ*. 2014; 349: 5488. DOI: 10.1136/bmj.g5488
 30. WHO. Ebola situation report – 8 July 2015. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/179196/roadmapsitrep_8Jul2015_eng.pdf
 31. Goodman J.L. Studing “secret serums”-toward safe, effective Ebola treatments. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(12):1086-9. DOI: 10.1056/nejmp1409817
 32. Lyon G.M., Mehta A.K., Varkey J.B., Brantly K., Plyler L., McElroy A.K., et al. Clinical Care of Two Patients with Ebola Virus Disease in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(25): 2402-9. DOI: 10.1056/nejmoa1409838

Поступила 06.06.17

Принята в печать 20.06.17

Андропова В.Л.

СОВРЕМЕННАЯ ЭТИОТРОПНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА: КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ, НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. ЧАСТЬ 2

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

Ряд синтетических соединений, таких как нуклеозидный аналог ганцикловир, его L-валиновый эфир (представляющий собой метаболический предшественник ганцикловира) и пирофосфатный аналог фоскарнет, разрешены ВОЗ для лечения заболеваний, вызываемых цитомегаловирусом (ЦМВ) человека, в европейском регионе. Биомиметизм этих препаратов является вирусная ДНК-полимераза. Однако проведение стандартной анти-ЦМВ-терапии сопровождается тяжёлыми побочными эффектами, а также развитием у вируса лекарственной резистентности, главным образом в условиях иммунодефицита.

В этом обзоре мы сконцентрировали внимание на вирусных протеинах, представляющих интерес в качестве новых потенциальных мишеней, и их ингибиторах, таких как ингибитор терминазы ЦМВ человека летермовир, показавший высокую активность в III фазе клинических испытаний, ингибиторы вирусной циклин-зависимой киназы (maribavir, cyclopropavir) и целый ряд соединений, проявляющих анти-ЦМВ-активность, проходящих доклинические испытания в эксперименте. Включение в стандартные профилактические и лечебные схемы новых анти-ЦМВ-агентов, активных против резистентных к ганцикловиру/фоскарнету штаммов ЦМВ, позволит значительно повысить эффективность терапии ЦМВ-инфекции, в том числе в случаях, когда стандартная терапия оказывается неэффективной.

Области поиска: международные базы данных MEDLINE, PubMed, eLIBRARY.RU, ClinicalTrials.gov и другие с целью получения информации о соединениях, проявляющих селективное действие в отношении ЦМВ человека, наиболее перспективных для создания лекарственных препаратов.

Ключевые слова: обзор; цитомегаловирус человека; противовирусный 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 2. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6):250-260.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-250-260>

Andronova V.L.

MODERN ETHIOTROPIC CHEMOTHERAPY OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION: CLINICAL EFFECTIVENESS, MOLECULAR MECHANISM OF ACTION, DRUG RESISTANCE, NEW TRENDS AND PROSPECTS. PART 2

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

A number of synthetic compounds, such as the nucleoside analog ganciclovir, its L-valine ester (a metabolic precursor of ganciclovir) and pyrophosphate analog foscarnet, are permitted for the treatment of HCMV-related diseases in the WHO European Region. The viral DNA- polymerase is used by all these drugs as a bio-target. However, the usage of standard anti-CMV therapy is accompanied by severe side effects, as well as the development of drug resistance in the virus, mainly in conditions of immunodeficiency.

In this review, we focused on viral proteins of interest as new potential targets and their inhibitors, such as the inhibitor of human CMV terminase, letermovir, which showed great activity in the third phase of clinical trials, inhibitors of viral cyclin-dependent kinase (maribavir, cyclopropavir) and a number of compounds exhibiting anti-HCMV-activity, undergoing only preclinical trials in the experiment. Inclusion of new anti-CMV agents that are active against GCV/PFA/CDV-resistant strains of CMV into standard prophylactic and therapeutic regimens, will allow to increase the effectiveness of anti-CMV therapy, including in cases when standard therapy is ineffective. Areas covered: the international databases such as MEDLINE, PubMed, eLIBRARY.RU, ClinicalTrials.gov., etc. with the purpose of obtaining information on compounds showing selective action against the human cytomegalovirus, the most promising for the development of drugs.

Key words: review; human cytomegalovirus; antiviral agent; drug.

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 2. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6):250-260. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-250-260>

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

For correspondence: Valeriya L. Andronova, Ph.D., Leading Researcher at the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, “N.F. Gamaleya NRCEM”, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Information about authors:

Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 15 November 2017

Accepted 12 December 2017

Введение

Цитомегаловирус (ЦМВ) человека, или вирус герпеса человека 5-го типа (семейство *Herpesviridae*, подсемейство *Betaherpesvirinae*) широко распространён во всем мире, что объясняется многообразием путей передачи инфекции (контактно-бытовым, половым, перинатальным, трансплацентарным, трансфузионным и т. д.), способностью вируса устанавливать пожизненную латентную инфекцию (вероятно, в миелиоидных клетках костного мозга) со спорадической реактивацией [1] и передаваться не только от больного в период развития острой ЦМВ-инфекции (ЦМВИ), но и от вирусоносителя при бессимптомном её течении. Региональные различия в выявляемых антител к ЦМВ у населения (от 30 до 90%) [2] определяют уровень социально-экономического развития страны, а также условиями проживания (плотность населения, соблюдение санитарно-гигиенических правил и др.).

Обычно первичный эпизод ЦМВИ (цитомегалии) с последующим пожизненным вирусоносительством протекает бессимптомно. Однако у лиц с тяжёлым иммунодефицитом (с числом лимфоцитов CD4 менее 100/мкл), например, у ВИЧ-инфицированных лиц, реципиентов солидных органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), у онкологических больных на фоне проведения курса агрессивной химиотерапии, ЦМВ может вызвать диссеминированную инфекцию с высокой летальностью, а также привести к инвалидизации. Так, даже при своевременном лечении ЦМВ-ретинита сохраняется риск потери зрения, обусловленный необратимыми органическими изменениями в сетчатке глаза [3]. Системному распространению вируса в организме человека способствует широкий клеточный тропизм ЦМВ (способность инфицировать и реплицироваться в различных клетках, включая эпителиальные, эндотелиальные, мышечные, дендритные клетки, фибробласты, макрофаги, гепатоциты) [4]. Возможно поражение мозга, лёгких, печени, поджелудочной железы, почек, надпочечников, кишечника, но наиболее часто встречаются пневмония, язвенный эзофагит, колит и энцефалит. В европейском регионе ЦМВИ признана ВОЗ одной из наиболее распространённых оппортунистических инфекций [5].

ЦМВ человека также является ведущей инфекционной причиной врождённых неврологических заболеваний, передаваемых через плаценту от матери к ребёнку [6]. Инфицирование плода в первой половине беременности при первичном заражении беременной приводит к гибели плода, выкидышам, врождённым уродствам, а внутриутробная ЦМВИ во второй половине беременности или заражение новорождённого при грудном вскармливании – к развитию эпилепсии, церебральному

параличу, нарушению обучаемости, умственной отсталости, потере слуха и зрения [7, 8].

Европейское региональное бюро ВОЗ, членом которого является Российская Федерация, специально для европейского региона разработало протоколы лечения и профилактики ЦМВИ при ВИЧ/СПИДе (2007 г.), в соответствии с которыми этиотропными химиотерапевтическими препаратами (ЭХТП) 1-го ряда являются ганцикловир (ГЦВ, препарат для внутривенного (в/в) введения и глазной имплантат) и его пролекарство – валганцикловир (вал-ГЦВ, пероральный препарат), препаратом 2-го ряда – фоскарнет (ФМК, препарат для в/в введения). Однако эксперты ВОЗ подчёркивают, что все эти препараты могут вызывать нейтропению, анемию и другие нежелательные побочные эффекты, данные об их эффективности в качестве профилактических средств у ЦМВ-серопозитивных лиц с иммунодефицитом (с числом лимфоцитов CD4 < 50/мкл) противоречивы, увеличение выживаемости не доказано. Для достижения максимального лечебного эффекта введение ГЦВ и ФМК необходимо проводить длительно (в течение 2–3 нед и 10–14 дней, соответственно), затем переходить на поддерживающую терапию. Однако в условиях продолжительного курса химиотерапии на фоне иммунодефицита высок риск развития лекарственной устойчивости у вируса. Кроме того, эти препараты имеют высокую стоимость [5].

ГЦВ, относящийся к классу модифицированных нуклеозидов, для проявления биологической активности нуждается в трифосфорилировании. Для фосфорилирования ГЦВ до монофосфата необходима активность вирусной протеинкиназы *pUL97*. Клеточные ферменты катализируют последующие этапы фосфорилирования с образованием ди- и трифосфатов. В форме трифосфата ГЦВ ингибирует активность вирусной ДНК-полимеразы (ДНК-*pol*). ФМК, как аналог пирофосфата, не нуждается в предварительной активации и, связываясь с ДНК-*pol*, ингибирует её активность. Использование ГЦВ и ФМК в качестве биомиметической герпетической ДНК-*pol* обуславливает сходство механизмов формирования резистентности к ним у вируса и в ряде случаев приводит к развитию множественной лекарственной резистентности, что ограничивает выбор или даже делает невозможным применение этих ЭХТП. Поэтому поиск новых соединений, способных эффективно ингибировать ДНК-*pol* ЦМВ независимо от его чувствительности к коммерческим ЭХТП, а также поиск соединений, ингибирующих другие критические для репродукции вируса ферменты и белки с иным функциональным назначением, является одним из приоритетных направлений разработки новых анти-вирусных агентов.

Жизненный цикл цитомегаловируса человека

Понимание процессов, лежащих в основе репродуктивного цикла вируса, позволяет определить потенциальные вирусные мишени. В соответствии с современными представлениями, инфекционные частицы ЦМВ адсорбируются на клеточной поверхности в результате связывания расположенных на наружной поверхности вириона гликопротеинов с клеточными рецепторами и проникают в клетку путём рецепторного эндоцитоза. При слиянии внешней липопротеидной оболочки вириона со стенкой эндоцитарной вакуоли нуклеокапсид и белки тегумента проникают в цитозоль. Нуклеокапсид транспортируется к ядру через систему микротрубочек клетки-хозяина и далее в ядро, вероятно, благодаря белкам тегумента, связанным с капсидом [9, 10]. В ядре осуществляются транскрипция, репликация вирусного генома и инкапсидация геномной ДНК.

Регуляция экспрессии генов ЦМВ осуществляется по упорядоченному во времени каскадному механизму, включающему экспрессию сверххранных (IE), ранних (E) и поздних (L) генов вируса. Белки тегумента инициируют экспрессию IE-генов, IE-белки включают экспрессию E-генов, а E-белки инициируют репликацию вирусного генома и экспрессию L-генов [9]. Сверххранная фаза продолжается первые 24 ч после инфицирования. В этот период синтезируются четыре IE-белка, структура которых кодируется главным IE-геном, – IE-p72 (IE1), IE-p86 (IE2), IE-p55 и IE-p56. IE-белки играют кардинальную роль в инициации цикла транскрипции/репликации вируса и дальнейшем развитии ЦМВИ. Основные регуляторные белки IE1 и IE2 контролируют экспрессию E- и L-генов [11]. Для экспрессии вирусных генов IE не требуется синтез вирусных белков *de novo*. Она индуцируется белками тегумента вируса *pUL82* (pp71) и *pUL69* в комбинации с различными клеточными транскрипционными факторами [9, 12]. Ранняя фаза определяется от начала синтеза вирусной ДНК (спустя 2–4 ч после инфицирования) и длится 24–72 ч. На этом этапе синтезируются кодируемые E-генами белки, которые осуществляют синтез вирусной ДНК, в том числе ДНК-*pol*, в то время как L-гены кодируют белки для компонентов вирионов. Поздняя фаза начинается спустя 24–48 ч после инфицирования и заканчивается гибелью клетки. На этом этапе структурные вирусные белки транспортируются в ядро, где экспрессия L-генов инициирует сборку капсидов. После инкапсидации вновь синтезированных вирусных геномных ДНК нуклеокапсиды выходят из ядра через двойную ядерную мембрану в цитозоль и переносятся в вирусный сборочный комплекс (assembly complex, AC), включающий компоненты эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и эндосомального аппарата [13, 14]. Нуклеокапсиды дополнительно приобретают тегумент и вирусную оболочку во внутриклеточных везикулах в AC. Сформированные инфекционные частицы, а также неинфекционные частицы, так называемые плотные тела, высвобождаются во внутриклеточное пространство.

Анти-ЦМВ-агенты с альтернативным механизмом действия

В настоящее время ведётся активный поиск антивирусных агентов, воздействующих на различные био-

мишени (вирусные и клеточные белки), вовлечённые в жизненный цикл ЦМВ на различных этапах и необходимые для эффективной репродукции вируса. В этой статье представлен ряд новых разработок, особое внимание уделено соединениям, проходящим стадию клинических испытаний.

Ингибиторы ДНК-*pol* герпесвирусов

PNU-182171 и **PNU-183792** – производные 4-гидрокси-хинолин-3-карбоксамиды (4-HQC, см. таблицу) представляют класс ненуклеозидных высокоселективных ингибиторов ДНК-*pol* герпесвирусов. PNU-183792 проявляет активность *in vitro* в отношении ЦМВ человека в концентрации около 0,94 мкМ (ИД₅₀ – концентрация соединения, ингибирующая на 50% развитие индуцированного вирусом цитопатогенного эффекта), что хорошо сопоставимо с ИД₅₀ ГЦВ 3,1–3,5 мкМ на моделях вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2) и вируса герпеса человека 8-го типа (ВГЧ-8), вируса Варицелла-Зостера (ВВЗ, ИД₅₀ 0,34 мкМ), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ, ИД₅₀ 0,17 мкМ), но не влияет на репродукцию ВГЧ-6 в концентрации до 100 мкМ. Соединения этого класса не активны в отношении неродственных ДНК- и РНК-содержащих вирусов, не ингибируют ДНК-*pol* человека α , β , γ и δ даже при использовании высоких концентраций, в 60 раз и более превосходящих концентрации, необходимые для ингибирования вирусных ДНК-*pol*, что указывает на специфичность взаимодействия соединений с ДНК-*pol* герпесвирусов [15, 16].

PNU-182171 и PNU-183792 сохраняют высокую антивирусную активность в отношении ГЦВ-устойчивых штаммов ЦМВ и АЦВ-устойчивых штаммов ВПГ-1 и ВПГ-2 благодаря тому, что механизмы действия производных 4-HQC и модифицированных нуклеозидов различны. Резистентность ЦМВ к PNU-183792 связана с единственной заменой V823A в домене III ДНК-*pol*. Интересно, что V823 консервативен у ВПГ-1, ВПГ-2, ЦМВ, ВВЗ, ВЭБ и ВГЧ-8, а ДНК-*pol* ВГЧ-6 и ВГЧ-7 содержат в положении 823 аланин и резистентны к производным 4-HQC. Однако ВГЧ-6 с заменой A823V в ДНК-*pol* чувствителен к PNU-183792. Очевидно, соединения этого класса связываются с V823 вирусной ДНК-*pol* и нарушают её взаимодействие с праймером матричной ДНК или сдвигают матрицу из активного сайта ДНК-*pol*, нарушая таким образом связывание и/или включение поступающего в репликативный комплекс дезоксиНТФ с ДНК-*pol* [16].

Показана высокая противовирусная активность PNU-183792 при оральном введении мышам на моделях летальных ВПГ- и ЦМВ-инфекций [16]. Сведения о дальнейших доклинических исследованиях производных 4-HQC в доступной литературе отсутствуют.

Создание лекарственных препаратов на базе соединений, в отличие от базовых анти-ЦМВ-ЭХТП, не влияющих на функциональную активность вирусной ДНК-*pol*, а использующих в качестве биомишени иные вирусные или клеточные белки и с более благоприятным профилем безопасности, с большой долей вероятности позволяют контролировать ЦМВИ, резистентную к ГЦВ и ФМК.

Ингибиторы циклин-зависимой Ser/Thr-киназы (cdk) ЦМВ

Все герпесвирусы кодируют собственные cdk семейства HvU_L: у ЦМВ это *pUL97*, у ВПГ – *pUL13*, у ВВЗ

– *pORF47*, у ВЭБ – *pBGLF4*, у ВГЧ-6 и ВГЧ-7 – *pU69*, у ВГЧ-8 – *pORF36* [17]. Герпетические cdk участвуют в фосфорилировании процессивной субъединицы вирусной ДНК-*pol*. Но *pUL13* ВПГ делает это опосредованно, активируя клеточный фермент cdk2, который, в свою очередь, вместе с клеточной cdk25 фосфорилирует *pUL42* [18], а *pUL97* ЦМВ и *pBGLF4* ВЭБ фосфорилируют соответствующие белки напрямую [19, 20]. Герпетические cdk воздействуют также на клеточные ферменты, функции которых регулируются путём фосфорилирования клеточными cdk. *pUL97* ЦМВ, *pUL13* ВПГ и *pBGLF4* ВЭБ фосфорилируют, например, фактор элонгации 1delta (EF-1) [21] и С-концевой домен РНК-*pol* II [22]. Модифицированные таким образом клеточные белки переключаются с клеточного синтеза на вирусный.

Герпетические cdk содержат ряд участков, характеризующихся значительной гомологией, но существенно различаются в других. Несмотря на наличие одинаковых функций, каждая из них имеет и уникальные [17]. Поэтому соединения, супрессирующие активность герпетических cdk, могут обладать как широким спектром действия на герпесвирусы, так и являться высокоселективными ингибиторами того или иного герпесвируса.

Серин-треониновая cdk ЦМВ человека *pUL97* представляет собой многофункциональный фермент, который: 1) обладает тимидинкиназной активностью (способен фосфорилировать ГЦВ; дезокситимидин и дезоксцитидин фосфорилирует в 3,6 и 60 раз хуже, чем ГЦВ, и не фосфорилирует дезоксигуанозин и дезоксиаденозин); 2) выполняет функции, аналогичные cdk2/cdk1, фосфорилирует вирусные белки, участвующие в репликации вирусной ДНК, например, процессивный фактор *pUL44*; 3) автофосфорилируется; 4) регулирует важнейшие этапы вирусной репродукции, например, созревание капсида и приобретение текумента связаны с активностью *pUL97*, который фосфорилирует белок текумента pp65, связывается с ним и в составе этого комплекса включается в вирионы, участвует в упаковке вирусной ДНК в капсид; 5) участвует в модификации клеточного цикла [23]; 6) большой размер капсидов ЦМВ не позволяет им проникать в сетчатую структуру ядерных ламинов в процессе выхода из ядра, поэтому для перераспределения ядерных ламинов требуется активность cdk ЦМВ: *pUL97* фосфорилирует клеточный белок p32, образует с ним комплекс, который связывается с рецептором Ламин В ядерной мембраны [24]. Очевидно, что *pUL97* является перспективной биомишенью для создания ЭХТП.

Маривавир (МБВ, см. таблицу) представляет собой рибонуклеозид, эффективный в отношении ЦМВ человека (ИД₅₀ 0,12–24 мкМ) и ВЭБ (ИД₅₀ 10 мкМ) [25]. В присутствии МБВ супрессируется синтез ДНК ЦМВ, что связано с высокоспецифичным ингибированием киназной активности *pUL97*, фосфорилирующего процессивный фактор *pUL44*, входящий в ДНК-*pol*-комплекс вируса [23].

Мутации в *pUL97*, которые приводят к понижению чувствительности к МБВ в 9–200 раз и более (V353A, L397R, T409M, H411L/N/Y), локализованы вблизи АТФ-связывающего центра фермента или лежат за пределами консервативных доменов и, как правило, отличаются от мутаций, связанных с резистентностью к ГЦВ [26]. Благодаря отсутствию перекрёстной резистентности

ГЦВ-резистентных штаммов к МБВ это соединение может использоваться для лечения ЦМВИ с лекарственной резистентностью. Однако описаны мутации, например, V466G или P521L, обуславливающие перекрёстную резистентность ЦМВ к ГЦВ (снижение величины ИД₅₀ в 11 и 17 раз) и к МБВ (снижение величины ИД₅₀ в 321 и 428 раз) [25]. Необходимо учитывать также, что ингибирование активности киназы *pUL97* в присутствии МБВ может существенно снизить эффективность активации ГЦВ при совместном использовании этих соединений.

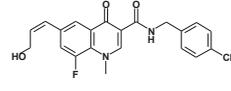
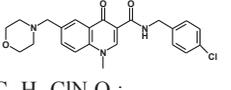
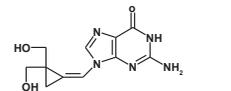
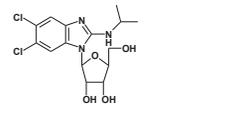
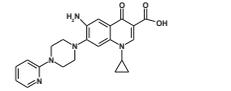
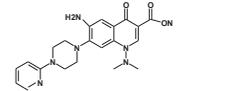
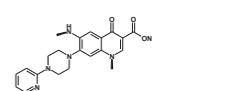
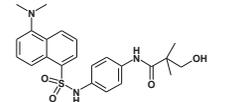
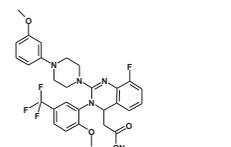
Следует отметить, что большая часть штаммов ЦМВ с низкоуровневой резистентностью к МБВ, полученных в лабораторных условиях, содержит мутации в гене *UL27*, а не в *UL97* [27]. Объяснить это можно тем, что *pUL27* способствует снижению уровня активности клеточных cdk [28], дублирующим некоторые функции *pUL97*, включая кинирование клеточного белка ретинобластомы (Rb) [29] и деградацию ядерной мембраны [24]. При потере функциональной активности мутантного *pUL27* сохранение активности cdk клетки может компенсировать снижение уровня активности киназы *pUL97*. С этим предположением согласуется тот факт, что эффективность МБВ снижается в делящихся клетках, в которых возрастает активность cdk. В покоящихся клетках белок Rb связан с клеточным фактором транскрипции E2F, ингибируя тем самым его активность. Во время клеточного цикла клеточные cdk фосфорилируют Rb, что приводит к высвобождению E2F, который стимулирует транскрипцию факторов, вовлечённых в синтез ДНК, регуляцию клеточного цикла, митоза и апоптоза [30].

МБВ обладает благоприятными фармакокинетическими параметрами и хорошо переносится. Биодоступность при оральном введении крысам превышает 90%, у обезьян – около 50%. ЛД₅₀ при оральном и в/в введении мышам составляют 518 и 39,3 мг/кг, соответственно. Для крыс эти показатели выше и равны 1092 и 100,9 мг/кг.

МБВ успешно прошёл 2 первые фазы клинических испытаний (NCT00002373, NCT02775240, NCT00223925). При оральном приёме ЦМВ-позитивными ВИЧ-инфицированными пациентами с бессимптомным течением ЦМВИ в дозах 100, 200 и 400 мг 3 раза в день или 600, 900 или 1200 мг 2 раза в день в течение 28 дней МБВ быстро абсорбируется из кишечника, достигая С_{max} уже через 1,5–2,5 ч. Показатели С_{max} и АУС не отличаются существенно на протяжении всего срока наблюдения и носят дозозависимый характер (для минимальной и максимальной доз препарата они составляли 3,5–40 мкг/мл и 16–228 г × ч/мл). Период полувыведения из плазмы t_{1/2} = 4,5–7 ч. Метаболит МБВ, N-деалкилированный аналог, по-видимому, не активен. Уровни МБВ в головном мозге, спинномозговой жидкости и стекловидном теле составляют 4–20%, 1–2% и < 1% от концентрации в плазме, соответственно. Уровень связывания МБВ с белками плазмы более 98%. Выводится МБВ главным образом с жёлчью, с мочой элиминируется не более 3%. С приёмом препарата были связаны изменение вкуса (в 82% случаев по сравнению с 19% в группе, получавшей плацебо), диарея – 26% против 12%, тошнота – 23% против 13%, а также сыпь – 19% против 6%, зуд – 19% против 6%, лихорадка – 11% против 0% [31, 32].

К сожалению, в 2 исследованиях III фазы испытаний эффективности МБВ в качестве профилактического

Анти-ЦМВ-агенты, структурно не родственные традиционным противоицицировальным соединениям, использующие в качестве биомимики различные вирусные белки

Структурная формула соединения	Название	Дополнительная информация
Ненуклеозидные ингибиторы герпетической ДНК-полимеразы		
 $C_{27}H_{18}ClFN_2O_3$; Mr 400,83	PNU-182171 ; AC1057HM; YRJSPSHBIUBSBT-IHWYRQMZSA-N; SCHEMBL6697923 и др.; <i>N-[(4-хлорфенил) метил]-8-фтор-6-[(Z)-3-гидроксипроп-1-енил]-1-метил-4-оксо-хинолин-3-карбоновая кислота</i>	Показана активность <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> (при оральном введении на модели летальной инфекции ЦМВ мышей)
 $C_{23}H_{24}ClN_3O_3$; Mr 425,91	PNU-183792 , BDBM50172526, SXLQSQMKOYVAAW-UHFFFAOYSA-N; SCHEMBL194433; SCHEMBL6699690; AC1LAOUP; и др.; <i>N-[(4-хлорфенил) метил]-1-метил-6-(морфолин-4-илметил)-4-оксохинолин-3-карбоксамид</i>	
Ингибиторы герпетической циклин-зависимой киназы		
 $C_{11}H_{13}N_5O_3$; Mr 263,26	Циклопропавир (Филоцикловир, CPV, ZSM-I-62, MBX-400, A-5021; UNII-EA00TD9B13) и др., <i>2-амино-9-[(Z)-[2,2-бис-(гидроксиметил)-цикло-пропилиден]метил]-3H-пурин-6-он</i>	Показана активность <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> на модели ЦМВ человека. Иницирована II фаза клинических испытаний
 $C_{15}H_{19}Cl_2N_3O_4$; Mr 376,23	Маривавир (МБВ, 1263W94, SPH620, UNII-PTV4X93-HE1, Benzimidavir, 176161-24-3, BW1263W94 и др., (2S, 3S, 4R, 5S) -2- [5,6-дихлор-2- (пропан-2-иламино)-бензимидазол-1-ил]-5-(гидрокси-метил)оксолан-3,4-диол	Активен <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> на модели ЦМВ человека. Иницированы клинические испытания III фазы (лечение мультирезистентной ЦМВИ)
Ингибиторы функции сверхранных белков		
 $C_{22}H_{23}N_5O_3$; Mr 405,46	WC5 , WC-5, SCHEMBL127498; AC1LA40A; CTK7D6019; <i>6-амино-1-циклопропил-4-оксо-7- (4-пиридин-2-илтиперазин-1-ил) хинолин-3-карбоновая кислота</i>	Активны <i>in vitro</i> на модели ЦМВ человека.
 $C_{21}H_{24}N_6O_3$; Mr 408,46	Соединение 9; <i>6-амино-1- (диметиламино) -4-оксо-7- (4-пиридин-2-илтиперазин-1-ил) хинолин-3-карбоновая кислота</i>	
 $C_{21}H_{23}N_5O_3$; Mr 393,49	Соединение 14; <i>6-метиламино-1- метил- 4-оксо-7- (4-пиридин-2-илтиперазин-1-ил) хинолин-3-карбоновая кислота</i>	
Ингибиторы герпетической терминазы		
 $C_{23}H_{27}N_3O_4S$; Mr 441,55	BAU 384766 (Tomoglovir; UNII-0YRQ-44B589; 233254-24-5 и др. <i>N-[[4-[[5- (ди-метиламино) нафталин-1-ил] сульфонил-амино]фенил] -3-гидрокси-2,2-диметилпропанамида</i>	Активен <i>in vitro</i> в отношении ЦМВ человека, включая клинические изоляты, резистентные к ГЦВ, ГЦВ+ФМК, ГЦВ +ЦДВ. Подтверждена активность. <i>in vivo</i> на модели ЦМВ мышей
 $C_{29}H_{28}F_4N_4O_4$; Mr 572,56	Летермовир , AIC246, MK-8228, UNII-1H09Y5WO1F; 917389-32-3; 1H09Y5WO1F и др. <i>2-[(4S) -8-фтор-2-[4- (3-метоксифенил) тперазин-1-ил]-3-[2-метокси-5-(трифтор-метил)фенил]-4H-хиназолин-4-ил]-уксусная кислота</i>	Иницирована III фаза клинических испытаний. Принимается <i>per os</i> для предотвращения развития ЦМВИ. Не проявляет гематологической токсичности и нефротоксичности

Примечание. Систематические (ИЮПАК) наименования соединений в таблице даны курсивом.

средства для предотвращения развития ЦМВИ у пациентов после трансплантации аллогенных стволовых клеток и печени (NCT00411645 и NCT00497796) получены негативные результаты, что послужило основанием для остановки его клинических испытаний [33, 34]. Возможно, клиническая неэффективность МБВ была связана с выбором недостаточно высокой дозы (100 мг 2 раза/день в течение 12 нед). Во втором случае при использовании той же дозы МБВ в течение 14 нед профиль безопасности препарата был благоприятен, а полученные результаты эффективности МБВ как профилактического анти-ЦМВ-средства были неоднозначны, и по показателям эффективности МБВ уступал ГЦВ (1000 мг *per os* 3 раза в день).

Позже были опубликованы результаты лечения ЦМВИ у 12 пациентов, перенёсших трансплантацию ГСК или солидных органов, терапевтическое использование у которых ГЦВ/Вал-ГЦВ, ФМК или ЦДВ не привело к снижению вирусемии. В ряде случаев в клинических изолятах ЦМВ были идентифицированы мутации в гене *UL97*, обуславливающие резистентность к ГЦВ (L595S/P/F, M460V, A594V G603W), в *pol*-гене *UL54*, связанные с резистентностью к ФМК (V715V/M) или с множественной лекарственной резистентностью к ГЦВ и ФМК (A809V), ГЦВ и ЦДВ (L545S, P522S). При приёме МБВ (*per os* по 400 мг 2 раза в день) наблюдалось значительное снижение вирусемии у половины пациентов (> 1,5 lg копий/мл), ещё у 4 пациентов вирусная нагрузка также снижалась, но медленнее, у одного эффект оказался слабым. В одном случае лечебный эффект отсутствовал (у серонегативного реципиента почки от серопозитивного донора, у которого после лечения Вал-ГЦВ и ФМК развилась резистентность; обнаружены делеция Del603-605 в *pUL97* и замена A505V в *pUL54*) [35].

Успешно завершена II фаза клинических испытаний МБВ NCT01611974 (400, 800 или 1200 мг 2 раза в день) для лечения ЦМВИ, резистентной к ГЦВ и/или ФМК. Полученные результаты послужили основанием для инициирования ирландской фармацевтической компанией «Shige» (получившей права на дальнейшую разработку МБВ после слияния с ViroPharma) III фазы клинических испытаний МБВ (завершается набор участников) в качестве лечебного средства при ЦМВИ, резистентной к используемым в настоящее время ЭХТП – ГЦВ/Вал-ГЦВ, ФМК или ЦДВ (NCT02931539) и с целью сравнения эффективности и безопасности МБВ с Вал-ГЦВ для лечения ЦМВИ у бессимптомных реципиентов трансплантатов ГСК (NCT02927067). МБВ планируется использовать в форме таблеток по 400 мг 2 раза/день.

Результаты лечения ЦМВИ с использованием последовательно ГЦВ, ФМК, ЦДВ и МБВ (400 мг 2 раза в день *per os*) у 13-летней пациентки, страдающей от рефрактерной цитопении после трансплантации костного мозга, свидетельствуют о том, что высокая вирусная нагрузка способствует быстрой селекции резистентных ЦМВ-мутантов. Соответствующие мутации, приводящие к устойчивости к нуклеотидным и пиррофосфатным аналогам, а затем к МБВ, устанавливались последовательно после каждой замены ЭХТП. Резистентность к МБВ, связанная с множественными мутациями (T409M, H411Y/N), развилась очень быстро, менее чем через 6

нед [36]. По мнению авторов статьи, это необходимо принять во внимание при разработке дизайна исследования лечебной эффективности МБВ.

Следует отметить, что при комбинированном использовании МБВ с ЦДВ или ФМК наблюдается выраженный взаимоусиливающий эффект, а сочетанное использование МБВ и ГЦВ обеспечивает суммирование эффектов препаратов [37], что может иметь практический интерес. Комбинированное использование ЭХТП позволяет не только уменьшить их дозы без потери терапевтического эффекта, но и снижает вероятность развития лекарственной резистентности у вирусов.

Циклопропанавир (ЦПВ, см. таблицу) представляет собой метиленициклопропановый аналог гуанозина. Не активен в отношении ВПГ-1, ВПГ-2 и ВВЗ, но эффективно ингибирует репродукцию ЦМВ человека (ИД₅₀ 1,2 мкМ) и ВГЧ-6В (ИД₅₀ ~ 0,7 мкМ) при ЦД₅₀ > 380 мкМ, а также проявляет активность *in vitro* против ВГЧ-6А (ИД₅₀ 7,82 мкМ), ВЭБ (ИД₅₀ 45 мкМ) и ВГЧ-8 (ИД₅₀ 6,5 мкМ) [38].

Показана эффективность ЦПВ *in vivo* на модели мышей, инфицированных ЦМВ человека, которым была имплантирована (1) ткань сетчатки плода человека в переднюю камеру глаза или (2) ткань тимуса и печени плода человека под почечную капсулу. В обоих случаях репликация ЦМВ в ткани имплантатов в контроле увеличивалась до 28 дней, затем постепенно снижалась и через 8 нед не определялась. Введение ЦПВ орально в дозе 45 мг/кг 1 раз в день через 24 ч после заражения и затем в течение 28 дней полностью подавляло репликацию вируса. При снижении дозы до 15 мг/кг вирус в незначительном титре удалось изолировать из ткани имплантата только на 21-й день инфекции, к 28-му дню титр вируса снизился до неопределяемого уровня. Эффект препарата был выше, чем у ГЦВ (в/в введение по той же схеме в дозе 45 мг/кг) [39].

Для проявления противовирусной активности ЦПВ требуется киназа *pUL97* ЦМВ, фосфорилирующая ЦПВ до монофосфата. Фосфорилирование до трифосфата катализируется гуанозинмонофосфаткиназой [40]. В форме трифосфата ЦПВ ингибирует вирусную ДНК-*pol*, что приводит к остановке синтеза вирусной ДНК [38].

Но ЦПВ, вероятно, ингибирует активность не только ДНК-*pol pUL54*, но и киназы *pUL97*. Это предположение базируется на следующих результатах. При секвенировании геномов полученных *in vitro* вариантов ЦМВ, резистентных к ЦПВ, была идентифицирована мутация в гене *UL27*, приводящая к сдвигу рамки. В результате синтезировался укороченный белок, у которого отсутствовал концевой карбоксильный домен, важный для функциональной активности белка [41]. Селекция ЦПВ-резистентного мутанта ЦМВ по гену *UL27* в процессе пассирования вируса в присутствии этого соединения свидетельствует о том, что потеря активности *pUL27* может компенсировать вызываемое ЦПВ нарушение киназной функции *pUL97*, как подробно описано на примере МБВ.

Существенным недостатком ЦПВ является то, что он не может использоваться в качестве универсального ингибитора штаммов ЦМВ, резистентных к базовым ЭХТП. Несмотря на то, что большинство ГЦВ-резистентных клинических изолятов сохраняет чувствительность к ЦПВ, установлен ряд мутаций в *pUL97*

(M460I, H520Q, C592G, C603R) и *pUL54* (M844T, E756K, A809V), связанных с резистентностью к ГЦВ, приводящих к кросс-резистентности к ЦПВ. Подобные мутанты формируются в процессе проведения терапии ГЦВ. В *pUL54* установлены также мутации, обуславливающие кросс-резистентность к ЦПВ и ФМК (T700A) и мультирезистентность к ГЦВ, ЦДВ, ФМК и ЦПВ (M844V) [42].

Завершено первое клинические плацебо-контролируемое исследование безопасности и фармакокинетических параметров ЦПВ при однократном пероральном приёме капсулированного препарата в дозах 35, 100, 350, 700, 1000 и 1350 мг здоровыми волонтерами (NCT01433835). Второе клиническое испытание этого соединения в рамках фазы I при пероральном приёме в дозах 100, 350, 750 и 1000 мг по схеме 1 раз в день в течение 7 дней здоровыми волонтерами (NCT02454699) было остановлено. Официальная информация о полученных результатах на сайте фирмы-разработчика («Microbiotix Inc.», США) отсутствует.

Ингибиторы функции сверххраненного белка IE2

Для репликации ДНК ЦМВ требуется целый ряд клеточных ферментов, синтез которых осуществляется только при вступлении клетки в пресинтетическую фазу G1 клеточного цикла. Стратегия вируса заключается в стимулировании перехода клетки-хозяина из состояния покоя (фаза G0) в фазу G1 с последующим блокированием вступления клетки в фазу синтеза ДНК (S), то есть сначала включается процесс подготовки клетки к синтезу ДНК, затем инициация репликации клеточной ДНК блокируется, а репликация вирусной ДНК поддерживается. Ведущая роль в реализации этой стратегии принадлежит сверххраненному белку ЦМВ человека IE2 (продукту гена *UL122*), который активирует клеточные гены циклина E, транскрипционных факторов, в том числе E2F-1 и NF-κB, регуляторных факторов клеточного цикла (p53, p21, Rb), ферментов тимидинкиназы, дигидрофолатредуктазы, рибонуклеотидредуктазы, тимидилаткиназы и др. белков, необходимых для репликации. Кроме того, IE2 регулирует активацию транскрипции ранних генов ЦМВ путём связывания с вирусной ДНК в участках промоторов [11, 43].

Недавно было показано, что соединение *WC5*, относящееся к классу 6-аминохинолинов (см. таблицу), ингибирует репродукцию ЦМВ человека, в том числе клинических изолятов и штаммов вируса, резистентных к ГЦВ, ФМК, ЦДВ (ИД₅₀ 1 мкМ, ХТИ 401), но существенно менее активно на моделях ВГЧ-6 и ВГЧ-8. В комбинации с ГЦВ действует синергидно [44]. Близкую анти-ЦМВ-активность проявили два аналога *WC5* – соединения 9 и 14 (см. таблицу, ИД₅₀ 1,2 и 1,1 мкМ, химиотерапевтический индекс (ХТИ) 305 и > 454, соответственно) [45].

Установлено, что *WC5* не мешает взаимодействию IE2 с ТАТА-связывающим белком и экспрессии стимулируемых IE2 клеточных генов, но влияет на способность IE2 регулировать деятельность чувствительных вирусных промоторов. Действительно, *WC5* блокирует IE2-зависимую отрицательную регуляцию активности промотора главного IE-гена (major immediate-early promoter – MIEP) ЦМВ, предотвращая связывание IE2 с элементом cis (cis-regression sequence), расположенным между блоком ТАТА и сайтом старта транскрипции. Кроме того, *WC5* снижает IE2-

зависимую трансактивацию промотора раннего гена *UL54*, а также ингибирует трансактивацию промотора раннего гена *E1* ЦМВ мышей белком IE3, гомологичным IE2. Можно заключить, что анти-ЦМВ активность *WC5* зависит от его способности специфически мешать IE2-зависимой регуляции вирусных промоторов. Приводимые результаты указывают на целесообразность дальнейшей доклинической оценки *WC5* на животных моделях [46].

Ингибиторы терминазы ЦМВ

В процессе репликации ДНК ЦМВ формирует σ-структуры, «хвостовая» часть которых представляет собой разветвлённые конкатемеры – множественные копии вирусного генома, которые подвергаются сайт-специфическому нарезанию и последующей упаковке полученных отдельных линейных двухнитевых геномов в капсиды [47]. Этот процесс осуществляется терминазным комплексом, состоящим из двух вирус-специфических белков – продуктов генов *UL56* и *UL89*. Большая субъединица терминазы *pUL56* обеспечивает сайт-специфическое связывание с конкатемером вирусной ДНК, а малая субъединица *pUL89* нарезает дуплексную ДНК. *pUL51* является третьим компонентом терминазного комплекса и необходим для нарезания конкатемерной ДНК, хотя механизм его действия до конца не ясен. По крайней мере ещё три вирусных белка вовлечены в этот процесс (продукты генов *UL52*, *UL77* и *UL93*). Кроме того, терминаза взаимодействует с вирусным порталным белком *pUL104*, направляя последовательное специфическое нарезание/укладку вирусного генома [48]. То, что белки, формирующие терминазный комплекс, высококонсервативны в семействе герпесвирусов и уникальны (не существует аналогичных клеточных белков), делает потенциально возможным создание малотоксичных антивирусных агентов – ингибиторов терминазного комплекса с широким спектром антигерпесвирусного действия.

Летермовир (ЛТВ, см. таблицу) относится к новому классу химических соединений – 3',4'-дигидрохинозолинам и является мощным селективным ингибитором репродукции ЦМВ человека с ХТИ > 15 000. Его ИД₅₀ по крайней мере, в 1000 раз меньше, чем у ГЦВ, и лежит в диапазоне 0,0008–0,0061 мкМ. Активность в отношении других герпесвирусов существенно ниже (ИД₅₀ для ВВЗ в 300 раз выше, для ЦМВ мышей – в 1600 раз выше) или не обнаруживается вовсе даже в присутствии ЛТВ в концентрации 10 мкМ (ВПГ-1, ВПГ-2, ВЭБ). Активность в отношении других патогенных для человека вирусов (вирус гриппа А, ВИЧ-1, вирус гепатита В, аденовирусы, флавивирусы) также не выявлена [49].

Определены специфические мутации в открытой рамке считывания гена *UL56*, опосредующие резистентность к ЛТВ, и полученные данные подтверждают, что большая субъединица терминазы ЦМВ человека (*pUL56*) является биомишенью этого соединения. ЛТВ взаимодействует с *pUL56* и ингибирует репродукцию ЦМВ, при этом не нарушается синтез дочерних вирусных ДНК и вирусных белков [50, 51]. Интересно, что резистентные к ЛТВ варианты вируса сохраняют чувствительность к другим ингибиторам терминазы – ВДСРВ (2-бром-5,6-дихлор-1-β-D-рибофуранозилбензимидазолу), GW275175X (2-бром-5,6-дихлор-1-β-D-рибопиранозил-1H-бенз-

имидазолу) и ВАУ 38-4766 (см. ниже). Возможно, это объясняется тем, что сайт связывания *pUL56* с ЛТВ отличается от сайта связывания других соединений с аналогичным механизмом действия [50].

Поскольку механизм действия ЛТВ не связан с протеинкиназой *pUL97* и ДНК-*pol* ЦМВ, это соединение сохраняет активность в отношении вариантов ЦМВ, резистентных к ГЦВ, включая клинические изоляты [49]. Показана эффективность ЛТВ при лечении пациентки, у которой после трансплантации лёгкого развилась мультирезистентная ЦМВИ, не отвечающая на терапию ГЦВ, ФМК и ЦДВ [52].

К настоящему времени завершены I и II фазы клинических испытаний ЛТВ. Установлено, что препарат хорошо переносится, не проявляет гематологической или нефротоксичности. Наиболее часто наблюдаемыми во время лечения ЛТВ побочными эффектами были диарея, тошнота и рвота – у 66% пациентов, в группе плацебо – 61%. У 24% пациентов, леченных ЛТВ, и у 30% пациентов, получавших плацебо, побочные явления в процессе лечения были ярко выраженными. Установлены некоторые фармакокинетические параметры препарата: T_{max} около 1,5 ч, $t_{1/2} = 10$ ч.

В исследовании фазы II (EudraCT Number: 2013-003831-31) 27 реципиентов почек, у которых фиксировалась активная репликация ЦМВ, получили 14-дневный пероральный курс ЛТВ (40 мг 2 раза в день или 80 мг 1 раз в день) или стандартный курс терапии ГЦВ. Во всех группах на фоне проведения терапии наблюдалось статистически значимое снижение вирусной нагрузки, при этом различия в уменьшении числа копий ДНК ЦМВ во всех 3-х группах не были статистически значимыми. Однако элиминация вируса достигнута у 6 (50%) из 12 пациентов, получавших ЛТВ, и лишь у 2 (28,6%) из 7 пациентов в группе, получавшей терапию по стандартному протоколу [53].

Как установлено в другом исследовании в рамках фазы II (NCT01063829), при оральном приёме ЛТВ с профилактической целью в дозах 60, 120 или 240 мг/день (однократное введение) в течение 84 дней в группе из 133 ЦМВ-серопозитивных пациентов, перенёвших трансплантацию костного мозга, частота развития ЦМВИ была значительно ниже, чем в группе, получающей плацебо (48, 32 и 29% против 64%). ЦМВ-антигены или вирусная ДНК в крови пациентов определялись также значительно реже: в 21, 19 или 6% случаев, соответственно, тогда как в группе плацебо – в 36% случаев. В группе исходно ЦМВ-негативных пациентов, получавших ЛТВ в дозе 240 мг, ЦМВ в крови не был обнаружен ни в одном случае [54]. От пациента, получавшего субоптимальную дозу ЛТВ (60 мг/день) изолирован вирус, резистентный к ЛТВ; обнаружена мутация в *pUL56* (V236M), ассоциированная с резистентностью [55].

В октябре 2016 г. завершена III фаза рандомизированных плацебо-контролируемых клинических испытаний ЛТВ (NCT02137772) с целью установления его безопасности и эффективности для предотвращения ЦМВИ у взрослых ЦМВ-серопозитивных реципиентов аллогенных (донорских) гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) при оральном приёме в течение 14 нед после трансплантации (240 мг 1 раз в день для пациентов, получающих циклоспорин А, и 480 мг 1 раз в день для пациентов, не получающих циклоспорин А) или в/в инфузии в группе пациен-

тов, не способных принимать таблетки. Введение препарата начинали в тот же день или не позднее 28 дней после трансплантации. Основным критерием эффективности была доля пациентов с развившейся ЦМВИ через 24 нед после трансплантации. В группе, получавшей ЛТВ, доля таких пациентов снизилась с 60,6% (группа плацебо) до 37,5%, смертность – с 15,9 до 9,8% [56].

Фармакокинетические и фармакодинамические параметры, высокая эффективность и безопасность (прежде всего отсутствие миелосупрессии), а также механизм действия (отсутствие перекрёстной резистентности с другими анти-ЦМВ ЭХТП) делают ЛТВ перспективным для использования с целью лечения и профилактики ЦМВИ у пациентов с ослабленным иммунитетом.

В 2012 г. «Merck Sharp & Dohme Corp.», США (через дочернюю компанию) приобрела права на разработку и коммерциализацию ЛТВ у «AiCuris GmbH & Co KG».

Установлены и изучаются и другие ингибиторы терминазы ЦМВ человека. Например, **ВАУ 38-4766** (см. таблицу), высокоселективный ингибитор ЦМВ человека. ИД₅₀ составляет 0,3 мкМ, ЦД₅₀ 93 мкМ, ХТИ 310. Соединение ингибирует репродукцию ЦМВ человека, включая ГЦВ-резистентные клинические изоляты, штаммы с двойной резистентностью к ГЦВ/ФМК и ГЦВ/ЦДВ, и ряд других ЦМВ обезьян и грызунов. Установлена хорошая переносимость ВАУ 38-4766: ЛД₅₀ для мышей BALB/c > 2000 мг/кг веса при оральном введении. На модели экспериментальной летальной ЦМВИ мышей показано, что противовирусная активность ВАУ 38-4766 хорошо сопоставима с ГЦВ при использовании в равных дозах 3, 10, 30 или 100 мг/кг и введении по схеме 2 раза в день в течение 8 дней, о чём судили по снижению смертности и титра вируса в слюнных железах, почках и печени.

Резистентные к ВАУ 38-4766 штаммы ЦМВ мышей и человека сохраняют чувствительность к нуклеозидным аналогам (ГЦВ и ЦДВ) и пиррофосфатному аналогу ФМК, что объясняется иным механизмом действия. Мутации, связанные с резистентностью к ВАУ 38-4766, локализованы в генах *UL89* и *UL104*, кодирующих малую субъединицу терминазы и портальный белок, вовлечённые в нарезание и упаковку вирусной ДНК [57, 58]. Вариант ЦМВ, резистентный к МБВ, сохраняет чувствительность к ВАУ 38-4766, что также указывает на различия механизмов действия этих соединений. Важно также отметить, что при комбинированном использовании ВАУ 38-4766 и ГЦВ наблюдается антагонистический характер взаимодействия, поэтому совместное использование этих препаратов нецелесообразно [37].

Заключение

ЦМВ является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности у пациентов с ослабленным иммунитетом. Доступные на сегодняшний день ЭХТП имеют неблагоприятный профиль безопасности, характеризующийся тяжёлой, острой и долгосрочной токсичностью. Из-за низкой пероральной биодоступности некоторые ЭХТП вводят в/в, кроме того, их длительное введение сопряжено с высоким риском развития лекарственной (в том числе множественной) резистентности у ЦМВ, особенно на фоне иммунодефицита. Необходимость их использования в клинической практике обусловлена отсутствием альтернативных эффективных и безопасных анти-ЦМВ ЭХТП.

Понимание динамики развития ЦМВИ и идентификация всех основных вирусных белков позволили выявить новые биомишени для ЭХТП. Целый ряд перспективных соединений, активных в отношении ЦМВ, находятся на стадии доклинической оценки или даже клинических испытаний. Многие из них имеют биомишени, отличные от вирусной ДНК-*pol*. Их включение в арсенал анти-ЦМВ-ЭХТП предоставит новые варианты лечения ЦМВИ, особенно необходимые в случаях инфекций, не отвечающих на современную стандартную химиотерапию, в том числе из-за развития лекарственной резистентности у ЦМВ к современным ЭХТП. Сочетанное применение новых и традиционных ЭХТП с перекрывающимися механизмами действия, направленными на различные биомишени, позволит значительно повысить эффективность проводимых терапевтических мероприятий у больных с ЦМВИ, и представляет собой многообещающую стратегию для снижения вероятности появления и распространения лекарственно-устойчивых вирусов и предотвращения реактивации вируса из латентного состояния.

Механизм действия ЛТВ, фармакокинетический и фармакодинамический профили, а также высокая эффективность и безопасность, установленные в ходе клинических испытаний, делают его наиболее перспективным препаратом для создания анти-ЦМВ-ЭХТП как профилактического, так и лечебного назначения, в том числе у пациентов с ослабленным иммунитетом. Отсутствие перекрестной резистентности к другим противовирусным ЭХТП и миелосупрессии являются двумя большими преимуществами ЛТВ перед современными ЭХТП, которые могут обеспечить его широкое использование в дальнейшем. В то же время узкий спектр действия ЛТВ (отсутствие активности против других герпесвирусов, которые обычно реактивируются в условиях иммунодефицита наравне с ЦМВ) – основной недостаток этого агента. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) присвоило ЛТВ статус *Fast Track*, а Европейское агентство лекарственных средств (European Medicines Agency, EMEA) – статус орфанного препарата, способствующие ускоренной разработке и утверждению проходящих клинические исследования препаратов.

Важно, что применение доступных в настоящее время коммерческих анти-ЦМВ-ЭХТП у беременных разрешено только в особо тяжёлых случаях из-за имеющегося риска для плода. Ни один из ЭХТП не одобрен для лечения врождённой ЦМВИ [59]. Учитывая высокий риск внутриутробного инфицирования плода при первичной ЦМВИ у беременной женщины, сопряжённого с различными патологиями течения беременности и с развитием тяжёлых осложнений у новорождённого, создание безвредных и эффективных ЭХТП представляется одной из приоритетных задач. *Ex vivo* получены предварительные данные, позволяющие надеяться, что применение МБВ позволит снизить вероятность трансплацентарного инфицирования плода и развития внутриутробной ЦМВИ [60]. Однако необходимы дальнейшие исследования для оценки эффективности и безопасности МБВ для матери и плода.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6, 9-60 см. REFERENCES)

5. Лечение и помощь при ВИЧ/СПИДе. Клинические протоколы для Европейского региона ВОЗ. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0018/78111/E90840R.pdf?ua=1
7. Микроцефалия. Информационный бюллетень ВОЗ. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/microcephaly/ru/>
8. Кочкина С.С., Ситникова Е.П. Особенности цитомегаловирусной инфекции: обзор литературы. *Доктор.Ру*. 2016; (6): 62-7.

REFERENCES

1. Reeves M., Sinclair J. Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 297-313. PMID: 18637513
2. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20(4): 202-13. PMID: 20564615 DOI:10.1002/rmv.655
3. Thorne J.E., Jabs D.A., Kempen J.H., Holbrook J.T., Nichols C., Meinert C.L., et al. Incidence of and risk factors for visual acuity loss among patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis in the era of highly active antiretroviral therapy. *Ophthalmology.* 2006; 113(8): 1432-40. PMID: 16766032 DOI: 10.1016/j.ophtha.2006.03.021
4. Sinzger C., Digel M., Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 63-83. PMID: 18637500
5. HIV/AIDS treatment and care. Clinical protocols for the WHO European Region. Available at: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/78106/E90840.pdf?ua=1
6. 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. PMID: 24631522 PMID: PMC4829484 DOI: 10.1016/j.ijid.2013.12.010
7. Microcephaly. Fact sheet of WHO. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly>
8. Kochkina S.S., Sitnikova E.P. Specific features of cytomegalovirus infection: literature review. *Doktor.Ru*. 2016; (6): 62-7. (in Russian)
9. Jean Beltran P.M., Cristea I.M. The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics. *Expert. Rev. Proteomics.* 2014; 11(6): 697-711. PMID: 25327590 PMID: PMC4604749 DOI: 10.1586/14789450.2014.971116
10. Kalejta R.F. Functions of human cytomegalovirus tegument proteins prior to immediate early gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 101-15. PMID: 18637502
11. Stinski M.F., Petrik D.T. Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 133-52. PMID: 18637504
12. Winkler M., Rice S.A., Stamminger T. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J. Virol.* 1994; 68(6): 3943-54. PMID: 8189530 PMID: PMC236900
13. Alwine J.C. The human cytomegalovirus assembly compartment: a masterpiece of viral manipulation of cellular processes that facilitates assembly and egress. *PLoS Pathog.* 2012; 8(9): e1002878. PMID: 23028305 PMID: PMC3447744 DOI:10.1371/journal.ppat.1002878
14. Das S., Pellett P.E. Spatial relationships between markers for secretory and endosomal machinery in human cytomegalovirus-infected cells versus those in uninfected cells. *J. Virol.* 2011; 85(12): 5864-79. PMID: 21471245 PMID: PMC3126327 DOI: 10.1128/JVI.00155-11
15. Schnute M.E., Cudahy M.M., Brideau R.J., Homa F.L., Hopkins T.A., Knechtel M.L., et al. 4-Oxo-4,7-dihydrothieno[2,3-b]pyridines as non-nucleoside inhibitors of human cyto-megalovirus and related herpesvirus polymerases. *J. Med. Chem.* 2005; 48(18): 5794-804. PMID: 16134946 DOI: 10.1021/jm050162b
16. Thomsen D.R., Oien N.L., Hopkins T.A., Knechtel M.L., Brideau

- R.J., Wathen M.W., et al. Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to 4-oxo-dihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antiviral agents. *J. Virol.* 2003; 77(3): 1868-76. PMID: 12525621 PMCID: PMC140985
17. Michel D., Mertens T. The UL97 protein kinase of human cytomegalovirus and homologues in other herpesviruses: impact on virus and host. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1697(1-2): 169-80. PMID: 15023359 DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.11.022
 18. Smith-Donald B.A., Durand L.O., Roizman B. Role of cellular phosphatase cdc25C in herpes simplex virus 1 replication. *J. Virol.* 2008; 82(9): 4527-32. PMID: 18272575 PMCID: PMC2293048 DOI: 10.1128/JVI.02021-07
 19. Gershburg E., Pagano J.S. Phosphorylation of the Epstein-Barr virus (EBV) DNA polymerase processivity factor EA-D by the EBV-encoded protein kinase and effects of the L-riboside benzimidazole 1263W94. *J. Virol.* 2002; 76(3): 998-1003. PMID: 11773375 PMCID: PMC135851
 20. Krosky P.M., Baek M.C., Jahng W.J., Barrera I., Harvey R.J., Biron K.K., et al. The human cytomegalovirus UL44 protein is a substrate for the UL97 protein kinase. *J. Virol.* 2003; 77(14): 7720-7. PMID: 12829811 PMCID: PMC161957
 21. Kawaguchi Y., Matsumura T., Roizman B., Hirai K. Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *J. Virol.* 1999; 73(5): 4456-60. PMID: 10196346 PMCID: PMC104232
 22. Baek M.C., Krosky P.M., Pearson A., Coen D.M. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain in human cytomegalovirus-infected cells and in vitro by the viral UL97 protein kinase. *Virology.* 2004; 324(1): 184-93. PMID: 15183065 DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.015
 23. Prichard M.N. Function of human cytomegalovirus UL97 kinase in viral infection and its inhibition by maribavir. *Rev. Med. Virol.* 2009; 19(4): 215-29. PMID: 19434630 PMCID: PMC3777615 DOI: 10.1002/rmv.615
 24. Sharma M., Bender B.J., Kamil J.P., Lye M.F., Pesola J.M., Reim N.I., et al. Human cytomegalovirus UL97 phosphorylates the viral nuclear egress complex. *J. Virol.* 2015; 89(1): 523-34. PMID: 25339763 PMCID: PMC4301116 DOI: 10.1128/JVI.02426-14
 25. Chou S., Ercolani R.J., Marousek G., Bowlin T.L. Cytomegalovirus UL97 kinase catalytic domain mutations that confer multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57(7): 3375-9. PMID: 23650173 PMCID: PMC3697320 DOI: 10.1128/AAC.00511-13
 26. Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(4): 233-46. PMID: 18383425 DOI: 10.1002/rmv.574
 27. Chou S. Diverse cytomegalovirus UL27 mutations adapt to loss of viral UL97 kinase activity under maribavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(1): 81-5. PMID: 18981262 PMCID: PMC2612169 DOI: 10.1128/AAC.01177-08
 28. Reitsma J.M., Savaryn J.P., Faust K., Sato H., Halligan B.D., Terhune S.S. Antiviral inhibition targeting the HCMV kinase pUL97 requires pUL27-dependent degradation of Tip60 acetyltransferase and cell-cycle arrest. *Cell. Host Microbe.* 2011; 9(2): 103-14. PMID: 21320693 DOI: 10.1016/j.chom.2011.01.006
 29. Prichard M.N., Sztul E., Daily S.L., Perry A.L., Frederick S.L., Gill R.B., et al. Human cytomegalovirus UL97 kinase activity is required for the hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and inhibits the formation of nuclear aggregates. *J. Virol.* 2008; 82(10): 5054-67. PMID: 18321963 PMCID: PMC2346732 DOI: 10.1128/JVI.02174-07
 30. Purves F.C., Roizman B. The UL13 gene of herpes simplex virus 1 encodes the functions for posttranslational processing associated with phosphorylation of the regulatory protein alpha 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89(16): 7310-4. PMID: 1323829 PMCID: PMC49699
 31. Lalezari J.P., Aberg J.A., Wang L.H., Wire M.B., Miner R., Snowden W., et al. Phase I dose-escalation trial evaluating the pharmacokinetics, anti-human cytomegalovirus (HCMV) activity, and safety of 1263W94 in human immunodeficiency virus-infected men with asymptomatic HCMV shedding. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(9): 2969-76. PMID: 12183255 PMCID: PMC127448
 32. Ma J.D., Nafziger A.N., Villano S.A., Gaedigk A., Bertino J.S., Maribavir pharmacokinetics and the effects of multiple-dose maribavir on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1130-5. PMID: 16569820 PMCID: PMC1426970 DOI: 10.1128/AAC.50.4.1130-1135.2006
 33. Marty F.M., Ljungman P., Papanicolaou G.A., Winston D.J., Chemaly R.F., Strasfeld L., et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(4): 284-92. PMID: 21414843 DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70024-X
 34. Winston D.J., Saliba F., Blumberg E., Abouljoud M., Garcia-Diaz J.B., Goss J.A., et al. Efficacy and safety of maribavir dosed at 100 mg orally twice daily for the prevention of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients: a randomized, double-blind, multicenter controlled trial. *Am. J. Transplant.* 2012; 12(11): 3021-30. PMID: 22947426 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04231.x
 35. Alain S., Revest M., Veyer D., Essig M., Rerolles J.P., Rawlinson W., et al. Maribavir use in practice for cytomegalovirus infection in French transplantation centers. *Transplant. Proc.* 2013; 45(4): 1603-7. PMID: 23726629 DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.01.082
 36. Schubert A., Ehler K., Schuler-Luettmann S., Gentner E., Mertens T., Michel D. Fast selection of maribavir resistant cytomegalovirus in a bone marrow transplant recipient. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 330. PMID: 23870704 PMCID: PMC3720178 DOI: 10.1186/1471-2334-13-330
 37. Evers D.L., Komazin G., Shin D., Hwang D.D., Townsend L.B., Drach J.C. Interactions among antiviral drugs acting late in the replication cycle of human cytomegalovirus. *Antiviral. Res.* 2002; 56(1): 61-72. PMID: 12323400
 38. Kern E.R., Kushner N.L., Hartline C.B., Williams-Aziz S.L., Harden E.A., Zhou S., et al. In vitro activity and mechanism of action of methylenecyclopropane analogs of nucleosides against herpesvirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3): 1039-45. PMID: 15728900 PMCID: PMC549243 DOI: 10.1128/AAC.49.3.1039-1045.2005
 39. Kern E.R., Bidanset D.J., Hartline C.B., Yan Z., Zemlicka J., Quenelle D.C. Oral activity of a methylenecyclopropane analog, cyclopropavir, in animal models for cytomegalovirus infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(12): 4745-53. PMID: 15561852 PMCID: PMC529216 DOI: 10.1128/AAC.48.12.4745-4753.2004
 40. Gentry B.G., Gentry S.N., Jackson T.L., Zemlicka J., Drach J.C. Phosphorylation of antiviral and endogenous nucleotides to di- and triphosphates by guanosine monophosphate kinase. *Biochem. Pharmacol.* 2011; 81(1): 43-9. PMID: 20846508 DOI: 10.1016/j.bcp.2010.09.005
 41. Hakki M., Drummond C., Houser B., Marousek G., Chou S. Resistance to maribavir is associated with the exclusion of pUL27 from nucleoli during human cytomegalovirus infection. *Antiviral. Res.* 2011; 92(2): 313-8. PMID: 21906628 PMCID: PMC3232008 DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.08.019
 42. Chou S., Komazin-Meredith G., Williams J.D., Bowlin T.L. Cytomegalovirus mutants resistant to ganciclovir and cidofovir differ in susceptibilities to synguanol and its 6-ether and 6-thioether derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(3): 1809-12. PMID: 24379208 PMCID: PMC3957852 DOI: 10.1128/AAC.02544-13
 43. Song Y.J., Stinski M.F. Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(5): 2836-41. DOI: 10.1073/pnas.052010099; PMID 11867723; PMCID PMC122434
 44. Loregian A., Mercorelli B., Muratore G., Sinigaglia E., Pagni S., Mas-sari S., et al. The 6-aminoquinolone WC5 inhibits human cytomegalovirus replication at an early stage by interfering with the transactivating activity of viral immediate-early 2 protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(5): 1930-40. PMID: 20194695 PMCID: PMC2863603 DOI: 10.1128/AAC.01730-09.

45. Massari S., Mercorelli B., Sancineto L., Sabatini S., Cecchetti V., Gribaudo G., et al. Design, synthesis, and evaluation of WC5 analogues as inhibitors of human cytomegalovirus Immediate-Early 2 protein, a promising target for anti-HCMV treatment. *Chem. Med. Chem.* 2013; 8(8): 1403-14. PMID: 23757191 DOI: 10.1002/cmde.201300106
46. Mercorelli B., Luginini A., Muratore G., Massari S., Terlizzi M.E., Tabarrini O., et al. The 6-Aminoquinolone WC5 inhibits different functions of the immediate-early 2 (IE2) protein of human cytomegalovirus that are essential for viral replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(11): 6615-26. DOI: 10.1128/AAC.03309-14. PMID: 25155603 PMCID: PMC4249379
47. Tandon R., Mocarski E.S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol.* 2012; 20(8): 392-401. PMID: 22633075 PMCID: PMC3408842 DOI: 10.1016/j.tim.2012.04.008
48. Neuber S., Wagner K., Goldner T., Lischka P., Steinbrueck L., Mes-serle M., et al. Mutual interplay between the cytomegalovirus terminase subunits pUL51, pUL56 and pUL89 promotes terminase complex formation. *J. Virol.* 2017; 91(12): e02384-16. PMID: 28356534 PMCID: PMC5446633 DOI: 10.1128/JVI.02384-16
49. Marschall M., Stamminger T., Urban A., Wildum S., Ruebsamen-Schaeff H., Zimmermann H., et al. In Vitro Evaluation of the Activities of the Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) against Herpesviruses and Other Human Pathogenic Viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(2): 1135-7. PMID: 22106211 PMCID: PMC3264222 DOI: 10.1128/AAC.05908-11
50. Goldner T., Hewlett G., Ettischer N., Ruebsamen-Schaeff H., Zimmermann H., Lischka P. The Novel Anticytomegalovirus Compound AIC246 (Letermovir) Inhibits Human Cytomegalovirus Replication through a Specific Antiviral Mechanism That Involves the Viral Terminase. *J. Virol.* 2011; 85(20): 10884-93. PMID: 21752907 PMCID: PMC3187483 DOI: 10.1128/JVI.05265-11
51. Goldner T., Zimmermann H., Lischka P. Phenotypic characterization of two naturally occurring human Cytomegalovirus sequence polymorphisms located in a distinct region of ORF UL56 known to be involved in in vitro resistance to letermovir. *Antiviral. Res.* 2015; 116: 48-50. PMID: 25637709 DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.01.006
52. Kaul D.R., Stoelben S., Cober E., Ojo T., Sandusky E., Lischka P., et al. First report to successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246. *Am. J. Transplant.* 2011; 11(5): 1079-84. PMID: 21521474 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03530.x
53. Stoelben S., Arns W., Renders L., Hummel J., Mühlfeld A., Stangl M., et al. Preemptive treatment of Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients with letermovir: results of a Phase 2a study. *Transpl. Int.* 2014; 27(1): 77-86. PMID: 24164420 DOI: 10.1111/tri.12225
54. Chemaly R.F., Ullmann A.J., Stoelben S., Richard M.P., Bornhäuser M., Groth C., et al. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(19): 1781-9. PMID: 24806159 DOI: 10.1056/NEJMoa1309533
55. Lischka P., Michel D., Zimmermann H. Characterization of Cytomegalovirus Breakthrough Events in a Phase 2 Prophylaxis Trial of Letermovir (AIC246, MK 8228). *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1): 23-30. PMID: 26113373 DOI: 10.1093/infdis/jiv352
56. Merck's Letermovir, an investigational antiviral medicine for prevention of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant recipients, highly effective though week 24 post-transplant in pivotal phase 3 study. Available at: <http://www.mrknewsroom.com/news-release/research-and-development-news/mercks-letermovir-investigational-antiviral-medicine-prev>
57. McSharry J.J., McDonough A., Olson B., Hallenberger S., Reefschaelger J., Bender W., et al. Susceptibilities of human cytomegalovirus clinical isolates to BAY38-4766, BAY43-9695, and ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45(10): 2925-7. PMID: 11557492 PMCID: PMC90754 DOI: 10.1128/AAC.45.10.2925-2927.2001
58. Reefschaelger J., Bender W., Hallenberger S., Weber O., Eckenberg P., Goldmann S., et al. Novel non-nucleoside inhibitors of cytomegaloviruses (BAY 38-4766): in vitro and in vivo antiviral activity and mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001; 48(6): 757-67. PMID: 11733458
59. Manicklal S., Emery V.C., Lazzarotto T., Boppana S.B., Gupta R.K. The "silent" global burden of congenital cytomegalovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(1): 86-102. PMID: 23297260 PMCID: PMC3553672 DOI: 10.1128/CMR.00062-12
60. Morère L., Andouard D., Labrousse F., Saade F., Calliste C.A., Cotin S., et al. Ex vivo model of congenital cytomegalovirus infection and new combination therapies. *Placenta.* 2015; 36(1): 41-7. PMID: 25479789 DOI: 10.1016/j.placenta.2014.11.003

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 616.98:578.825.11|092.9

*Климова Р.Р.¹, Момотюк Е.Д.^{1,2}, Демидова Н.А.^{1,2}, Ярыгина Е.И.², Куц А.А.¹***МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: УСИЛЕНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА И ЗАЩИТА МЫШЕЙ ОТ ЛЕТАЛЬНОЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» Минсельхоза России, 109473, г. Москва

Цель настоящей работы состояла в оценке иммунорегуляторных и протективных свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на экспериментальной модели летальной ВПГ-1-инфекции (вирус простого герпеса 1-го типа) мышей.

МСК получали из костного мозга мышей линии DBA и высаживали в культуральные флаконы в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, инсулин, трансферрин, селенит, фактор роста фибробластов, глутамин и гентамицин. Прикрепившиеся клетки пассировали, на каждом пассаже отбирали культуральную жидкость (к/ж) и изучали противовирусную активность на клетках Vero, заражённых ВПГ-1. В опытах *in vivo* использовали 5 групп по 10 мышей DBA: 1-я группа – интактные (naïve); 2-я – внутривенное (в/в) введение МСК; 3-я – заражение 20 полумлетальными дозами (LD₅₀) ВПГ-1 внутривенно с последующим в/в введением МСК; 4-я – заражение ВПГ-1 с последующим введением ацикловира (АЦВ); 5-я – заражение ВПГ-1 и в/в введение физиологического раствора.

Показано, что выделенные клетки по морфологии, адгезивной способности и поверхностным рецепторам соответствовали общепринятым характеристикам МСК. Установлено, что к/ж от МСК на 4–5-м пассажах подавляла ВПГ-1-инфекцию *in vitro* на 64–70%, и в то же время в к/ж были обнаружены ИЛ-6 и ФНО-α, концентрация которых на 3–4-м пассажах в 5 и 20 раз соответственно превышала контрольный уровень. При введении заражённым ВПГ-1 мышам 3-й группы МСК выживаемость составила 70%, ацикловира – 60%, что значительно превышало число выживших животных (10%) в контрольной 5-й группе. У выживших животных 3-й группы обнаружена высокая активность вируснейтрализующих антител к ВПГ-1, а также активация пролиферации Т-клеток. У выживших мышей 3-й группы уровни ИЛ-6 и ФНО-α оказались ниже, а ИФН-γ – значительно выше по сравнению с таковыми у агонизирующих животных этой группы (*p* < 0,05). Таким образом впервые показано, что клеточная терапия МСК является перспективным подходом к разработке новых эффективных методов лечения генерализованной ВПГ-1-инфекции.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК); летальная ВПГ-1-инфекция; клеточная терапия; активация иммунного ответа; защитный эффект МСК.

Для цитирования: Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Ярыгина Е.И., Куц А.А. Мезенхимальные стволовые клетки: усиление иммунного ответа и защита мышей от летальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6):261-267.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-261-267>*Klimova R.R.¹, Momotyuk E.D.^{1,2}, Demidova N.A.^{1,2}, Yarigina E.I.², Kushch A.A.¹***MESENCHYMAL STEM CELLS ENHANCE IMMUNE RESPONSE AND PROTECT MICE AGAINST LETHAL HERPES VIRAL INFECTION**¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology « National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya », Moscow, 123098, Russian Federation;²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after, The Ministry of Agriculture of the Russian Federation; Moscow, 109473, Russian Federation

The objective of this study was to evaluate immunoregulatory and protective potential of mesenchymal stem cells (MSC) in a mouse model of lethal HSV1 infection. MSC were isolated from bone marrow of DBA mice and cultured in flasks with DMEM containing 10% FBS, insulin, transferrin, selenite, fibroblast growth factor, glutamine and gentamicin. Antiviral activity was tested on HSV1-infected Vero cells. *In vivo* experiments were performed on DBA mice divided into 5 groups (10 animals each): group 1, intact (naïve) mice; group 2, intravenous (iv) MSC injection; group 3, intraperitoneal infection with 20 LD₅₀ HSV1 followed by MSC injection; group 4, HSV1 infection followed by acyclovir (ACV) injection; group 5, HSV1 infection and iv injection of saline. Isolated cells were consistent with MSC morphologically, by adhesive ability and surface receptors. Conditioned

Для корреспонденции: Климова Регина Рафаиловна, канд. биол. наук, ст. науч. 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: regi.k@mail.ru

media from MSC collected after 4-5 passages inhibited HSV1 infection in vitro by 64-70% and contained IL-6 and TNF- α , whose concentrations were 5- and 20-fold higher, respectively, than in the control. MSC and ACV injections protected 70% and 60% of DBA mice, respectively, compared with the control (group 5, 10% survival). High activity of virus neutralizing anti-HSV1 antibodies and activation of T cell proliferation were observed in survived mice from group 3. Serum levels of IL-6 and TNF- α in these mice were lower and that of INF- γ much higher than in agonizing animals of this group ($P < 0.05$).

These findings indicate that MSC therapy is a prospective approach to the development of new effective management of generalized HSV1 infection.

Key words: *mesenchymal stem cells; lethal HSV1 infection; cellular therapy; activation of immune response; protective effect of MSC.*

For citation: Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Yarygina E.I., Kushch A.A. Mesenchymal stem cells enhance immune response and protect mice against lethal herpes viral infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6):261-267. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-261-267>

For correspondence: Regina R. Klimova, PhD, lead researcher of the department of Ivanovsky Institute of Virology «N.F. Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology», 123098, Moscow. E-mail: regi.k@mail.ru

Information about authors:

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

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

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

Yarygina E.I., <http://orcid.org/0000-0002-4165-5017>

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

Acknowledgment. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (grant № 17-04-00812).

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

Received 02 April 2018

Accepted 26 April 2018

Введение

Вирус простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) при первичном заражении у взрослых иммунокомпетентных лиц чаще всего вызывает бессимптомную инфекцию. Однако у лиц с ослабленным иммунитетом ВПГ-1 может вызывать заболевания нервной системы и внутренних органов, в том числе в генерализованной форме с тяжёлыми последствиями и смертельным исходом [1, 2]. Большую опасность представляет неонатальный герпес, а также тяжёлые рекуррентные формы ВПГ-1-инфекции [3, 4].

В настоящее время для лечения герпетической инфекции используется ряд патентованных лекарственных препаратов, однако многие из них имеют высокую гемо- и гепатотоксичность. Кроме того, увеличивается количество изолятов, резистентных к действию патентованных препаратов. В связи с этим во всём мире интенсивно идет поиск новых путей борьбы с ВПГ-1-инфекцией.

Новые перспективы открывает развитие клеточной терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК способны модулировать дифференцировку, пролиферацию и иммунорегуляцию, показано, что они способствуют восстановлению тканей и поддержанию иммунного гомеостаза [5]. Сообщается об успешном использовании МСК при регенерации повреждённых тканей, а также в опытах по противоопухолевой и противовоспалительной терапии [6, 7]. Однако работы, посвящённые изучению роли МСК при вирусных инфекциях, единичны, а результаты этих работ противоречивы [8, 9]. Действие МСК при инфекциях, вызванных герпесвирусами человека, пока не изучено.

Цель настоящей работы состояла в оценке иммунорегуляторных и протективных свойств МСК на экспериментальной модели летальной ВПГ-1-инфекции мышей.

Материал и методы

Заявление об этике. Все эксперименты на животных проводились в строгом соответствии с Межгосудар-

ственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными Евразийского совета по стандартизации, метрологии и сертификации (ГОСТ 33216-2014).

Животные. В опытах использовали самок мышей линии DBA(H2^d) массой 18–20 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область.

Вирус. Использовали ВПГ-1, референс-штамм F, полученный из Государственной коллекции вирусов (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Вирус поддерживали путём пассирования на перевиваемой культуре клеток Vero, полученной из коллекции клеточных линий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Культуры клеток. Культуральные среды, сыворотки и компоненты для культивирования клеточных культур, если не указано другое, приобретали в НПП «ПанЭко», Россия. Клетки Vero культивировали в среде Игла MEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Biogenie», Франция), 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина.

Получение первичной культуры МСК. Клетки красного костного мозга получали из бедренных и больших берцовых костей мышей. Полученную суспензию клеток гомогенизировали и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Осадок клеток осторожно ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС («Invitrogen», США), инсулин, трансферрин, селенит, 10 нг/мл фактора роста фибробластов, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина. Клетки высаживали в культуральные флаконы («Costar», США) в концентрации 2×10^6 кл/мл. Через сутки, а также каждые последующие 3–4 дня проводили замену культуральной среды. Полученную адгезивную популяцию клеток пересевали, используя 0,25% раствор Версена с химопсином. МСК культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Характеристика МСК. Морфологию клеток и состояние клеточного монослоя оценивали микроскопически,

используя инвертированный люминесцентный микроскоп AX10 («Zeiss», Германия). Иммунофенотипический анализ МСК проводили методом непрямой иммунофлуоресценции. Для анализа поверхностных CD-маркеров клетки в концентрации 1×10^5 кл/мл вносили в 48-луночные планшеты («Costar», США) и по достижении монослоя в лунки вносили первичные антитела: anti-CD105, anti-CD90, anti-CD45 и anti-CD34 («Abcam», Великобритания) и инкубировали в течение 30 мин при 4°C в темноте. После отмывки наносили вторичные антителовые антитела, меченные FITC («Abcam», Великобритания) и инкубировали 30 мин при 4°C. Проводили количественный анализ окрашенных клеток.

Изучение противовирусной активности in vitro. Клетки Vero высаживали в 96-луночные планшеты («Costar», США). По достижении монослоя клетки заражали ВПГ-1 с инфекционной множественностью (ИМ) 0,01 БОЕ/кл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в присутствии 5% CO₂, затем дважды промывали и наносили кондиционированные культуральные жидкости, отобранные на 1, 3, 4, 5, 6 и 13-м пассажах МСК. Для сравнения использовали ростовую среду, содержащую 10% ЭТС (K2). В качестве положительного контроля использовали ацикловир (АЦВ, Зовиракс®, «ГлаксосмитКляйнВэлком», Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля – необработанные зараженные клетки Vero (K1). Оценку противовирусной активности проводили по ингибированию вирус-специфического бляшкообразования путём подсчёта количества инфицированных клеток (бляшек) в опыте и в контроле, как описано ранее [10].

Группы животных. Мыши линии DBA были разделены на 5 групп: 1-я группа ($n = 5$) – интактные («naïve») мыши; 2-я группа, МСК ($n = 5$) – мыши, которым вводили МСК в концентрации 5×10^5 кл/мышь внутривенно, дважды, с интервалом 24 ч; 3-я группа, ВПГ-1 + МСК ($n = 10$) – мыши, которых заражали ВПГ-1 (20 ЛД₅₀, внутривенно) и через 4 и 24 ч после заражения внутривенно вводили МСК в концентрации 5×10^5 кл/мышь. В качестве положительного контроля использовали 4-ю группу, ВПГ-1 + АЦВ ($n = 10$) – мыши, которым после заражения ВПГ-1 вводили ацикловир (АЦВ) 2 раза в день, внутривенно, в течение 4-х дней. В качестве отрицательного контроля использовали 5-ю группу, ВПГ-1 + ФР ($n = 10$) – мыши, которых заражали ВПГ-1 и через 4 и 24 ч вводили внутривенно физиологический раствор (ФР). Наблюдение за животными вели ежедневно в течение 14 дн. Выживаемость животных представляли в %. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) в каждой группе определяли по формуле: $(\sum Nd)/Nt$, где N – количество животных, проживших d дней, Nt – общее количество животных в группе.

Для анализа противовирусных и вируснейтрализующих антител (АТ), а также для количественного определения уровней провоспалительных цитокинов у инфицированных мышей 3-й и 4-й групп отбирали кровь из хвостовой вены через 7 дн после заражения ВПГ-1, в эти же сроки отбирали кровь у неинфицированных мышей 1-й и 2-й групп. У мышей контрольной 5-й группы кровь отбирали при появлении неврологических признаков ВПГ-1-инфекции.

Активность антител к ВПГ-1 (анти-ВПГ-1 АТ) изучали в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). 96-луночные панели сорбировали антигеном ВПГ-1 (50 мкг/мл) и инкубировали в течение 18

ч при 37°C. После инкубации панели промывали и наносили сыворотки мышей в различных разведениях, инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем панели промывали и наносили антимышинные антитела, меченные пероксидазой хрена («Сорбент», Россия). Оптическую плотность оценивали с использованием анализатора Multiskan («Tekan», Швейцария) при длине волны 450 нм. Об активности АТ судили по максимальному разведению (титру) сывороток, при котором значения ОП в опытных группах в 2 раза превышали средние значения ОП для контрольных мышей 1-й группы.

Реакцию биологической нейтрализации (РБН) проводили на культуре клеток Vero. Сыворотки крови мышей в различных разведениях инкубировали с ВПГ-1, ИМ 0,01 БОЕ/кл в течение 2 ч при 37°C. Затем инкубационную смесь вносили на монослой клеток Vero. Результаты учитывали через 48 ч, когда в инфицированной культуре, не обработанной сыворотками, развивалось максимальное цитопатогенное действие (ЦПД). За активность вируснейтрализующих антител (ВНА) принимали обратные величины максимальных разведений сывороток, при которых наблюдали 50%-ное подавление вирус-специфического ЦПД.

Реакция бласттрансформации (РБТ). О стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов судили по изменению морфологии клеток в РБТ *in vitro* – образованию бластов. Спленоциты мышей каждой группы пулировали и помещали в 24-луночные планшеты по 10^5 кл/мл. Культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС («Invitrogen», США), 4,5 мг/мл глюкозы, 2 мМ глутамин, 0,2 ед/мл инсулина, 50 мкг/мл гентамицина. В лунки вносили 50 мкл инактивированного при 56°C ВПГ-1 и инкубировали 5 дней при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В качестве положительного контроля использовали фитогемагглютинин («ПанЭко», Россия) в концентрации 25 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля – необработанные клетки.

Количественный анализ цитокинов. ИЛ-6, ИНФ-γ и ФНО-α анализировали методом ИФА в к/ж от МСК на разных пассажах, а также в сыворотках крови мышей через 7 сут после заражения ВПГ-1. Использовали тест-системы Mouse IL-6 ELISA development kit (HRP), Mouse INF-γ ELISA development kit (HRP) и Mouse TNF-α ELISA development kit (HRP) («Mabtech», Швеция). Чувствительность определения составляла для ИЛ-6 – 20 пкг/мл, для ИНФ-γ – 4 пкг/мл и для ФНО-α – 6 пкг/мл. Уровни цитокинов установлены по сравнению со стандартной кривой в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPad Prism 7.01. Для сравнения параметрических количественных данных использовали *t*-критерий Стьюдента, непараметрических – *U*-критерий Манна–Уитни. Межгрупповые различия относительных показателей анализировали с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат). Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Морфо- и иммунофенотипическая характеристика выделенных МСК

МСК, выделенные из костного мозга мышей, характеризовали по адгезивной способности и по морфологии. Метод световой микроскопии показал, что МСК

прикреплялись к поверхности культуральных флаконов и представляли собой полиморфные клетки преимущественно веретенновидной фибробластоподобной формы, с множественными, хорошо развитыми разветвленными цитоплазматическими отростками. Клетки активно пролиферировали *in vitro* и образовывали монослой.

На 4-м пассаже анализировали поверхностные рецепторы выделенных клеток. Определяли количество клеток, содержащих «положительные» маркеры МСК – CD105 и CD90, а также «отрицательные» маркеры – CD34 и CD45. Установлено, что 97,3% выделенных клеток экспрессируют CD105, 96,8% – CD90. CD45 обнаружен только в 0,3% клеток, поверхностный маркер CD34 не обнаружен ни в одной клетке. Таким образом, выделенные и размноженные клетки соответствовали общепринятым характеристикам МСК [11].

Противовирусная активность МСК *in vitro*

Опыты по заражению ВПГ-1 клеток Vero показали (рис. 1, а), что количество ВПГ-1-специфических бляшек при обработке ростовой средой, содержащей 10% ЭТС (K2), составило $20,75 \pm 1,8$ и статистически значимо не отличалось от такового в контрольных культурах K1 ($26,75 \pm 1,75$; $p > 0,05$). АЦВ практически полностью подавлял инфекционную активность ВПГ-1 в условиях наших опытов, количество инфицированных клеток (бляшек) составило $0,75 \pm 0,47$; $p < 0,05$. При добавлении к/ж от МСК на 4-м и 5-м пассажах обнаружено $7,5 \pm 0,6$ и $6,25 \pm 0,9$ бляшек соответственно, что указывает на значительное подавление ВПГ-1-инфекции, различия по сравнению с ростовой средой высокосзначимы ($p = 0,001$ и $0,0002$ соответственно). Ингибирование ВПГ-1-инфекции после добавления к/ж от 1, 3, 6 и 13-го пассажей МСК не наблюдалось (рис. 1, б).

Индукция цитокинов в динамике культивирования МСК *in vitro*

В к/ж от МСК изучены уровни 3 провоспалительных цитокинов – ИЛ-6, ИФН- γ и ФНО- α . Установлено, что МСК на 1-м, 3-м и 4-м пассажах продуцируют статистически значимо более высокие уровни ИЛ-6 по сравнению с уровнем цитокина в контроле ($383,3$ пкг/мл против $120,8$ пкг/мл и 460 пкг/мл против $120,8$ пкг/мл на 1-м и 3-м пассажах соответственно, $p < 0,05$), максимальное количество выявлено на 4-м пассаже (680 пкг/мл) (рис. 1, в). ФНО- α выявлен на 3-м и 4-м пассажах в концентрациях $37,5$ пкг/мл и 25 пкг/мл соответственно, что оказалось статистически значимо выше по сравнению с уровнем цитокина в ростовой среде ($1,25$ пкг/мл; $p < 0,05$) (рис. 1, з).

Подавление генерализованной ВПГ-1-инфекции под действием МСК *in vivo*

Для оценки влияния МСК на течение ВПГ-1-инфекции у мышей клетки 4-го пассажа вводили животным 3-й группы после заражения ВПГ-1, как указано выше. Установлено, что в контрольной 5-й группе без введения МСК (ВПГ-1 + ФР) гибель животных отмечалась с 3-х суток после заражения, далее у мышей появлялись тяжёлые неврологические симптомы, и к 7-м суткам 90% животных погибли (см. рис. 1, б). СПЖ в контрольной группе равнялась $6,0 \pm 3,2$ дня. У животных 3-й группы (ВПГ-1 + МСК), которым МСК вводили дважды после заражения ВПГ-1, на 2-е сутки у 3-х животных появились первые симптомы ВПГ-1-инфекции (взъерошенная шерсть и неровная походка), далее они усиливались, и к 8-м суткам после инфицирования эти животные погибли. У выживших 7 из 10 (70%) мышей этой группы

клинические признаки герпетической инфекции отсутствовали во время всего срока наблюдения, СПЖ составила $11,3 \pm 1,3$ дня. В 4-й группе (ВПГ-1 + АЦВ) выживаемость составила 60%, различие с 3-й группой статистически незначимо ($p > 0,05$). Статистический анализ показал, что у животных 3-й и 4-й группы показатели СПЖ и выживаемости были статистически значимо выше по сравнению с таковыми в контрольной 5-й группе. Полученные данные свидетельствуют о том, что МСК, введённые после заражения, способны защищать мышей от гибели при летальной ВПГ-1-инфекции.

Гуморальный ответ мышей 1-й и 2-й групп анализировали через 7 дн после последней инъекции МСК, мышей 3–5-й групп – через 7 дн после заражения ВПГ-1. Анализ вирус-специфических АТ класса IgG1 в сыворотках крови показал, что через 7 дн после заражения наибольшую активность АТ наблюдали у мышей 3-й группы (ВПГ-1 + МСК). Титр анти-ВПГ-1 у этих животных в среднем был статистически значимо выше ($1:11200$) как по сравнению с таковым у контрольных зараженных животных 5-й группы ($1:4267$), так и животных 4-й группы ($1:6533$), которых лечили АЦВ; $p < 0,05$ (рис. 2, а). Изучение вируснейтрализующей активности анти-ВПГ-1 АТ показало (рис. 2, б), что титры АТ, подавляющих ЦПД вируса на 50%, были максимальными также в сыворотках мышей 3-й группы, которым вводили МСК после заражения, по сравнению с таковыми у животных других групп ($1:625$ против $1:50$; $p < 0,05$).

Клеточный ответ у неинфицированных мышей 1-й и 2-й групп анализировали через 7 дн после последней инъекции МСК, у мышей 3–5-й групп – через 7 дн после заражения ВПГ-1 в реакции бласттрансформации спленоцитов *in vitro*, результаты представляли как индекс стимуляции пролиферации (ИСП). Максимальное количество бластов, индуцированных ВПГ1 *in vitro*, выявлено у животных 3-й группы (ВПГ-1 + МСК): 264 ± 60 (ИСП = $28,3$; рис. 2, в, з). В остальных группах количество бластов было статистически значимо меньше ($p < 0,05$). Следует отметить, что у неинфицированных животных 2-й группы, которым МСК вводили дважды с интервалом 24 ч, количество бластов статистически значимо превышало количество бластов в селезёнках мышей контрольной 5-й группы (62 ± 15 против $19,5 \pm 7,6$ соответственно, $p < 0,05$).

Анализ уровней провоспалительных цитокинов в сыворотках мышей исследуемых групп показал (см. таблицу), что у больных и агонизирующих мышей контрольной 5-й группы (ВПГ-1 + ФР) и 3-й группы (ВПГ-1 + МСК) наблюдали максимальные значения ИЛ-6 и ФНО- α . В остальных группах у выживших животных уровни данных цитокинов были статистически значимо ниже или цитокины не определялись ($p < 0,05$). Напротив, уровень ИФН- γ был статистически значимо выше у выживших мышей в 3-й группе (ВПГ-1 + МСК), получавших инъекции МСК после заражения ВПГ-1. Важно отметить, что уровни всех изученных цитокинов у выживших мышей 3-й группы (ВПГ-1 + МСК) статистически значимо отличались от таковых у умирающих (агонизирующих) мышей, заражённых ВПГ-1 в этой же группе: уровни ИЛ-6 и ФНО- α были ниже, а ИФН- γ – выше ($p < 0,05$). У неинфицированных животных 2-й группы, которым вводили МСК дважды с интервалом 24 ч, наблюдали статистически значимое увеличение уровня ИФН- γ по сравнению с ИЛ-6 и ФНО- α .

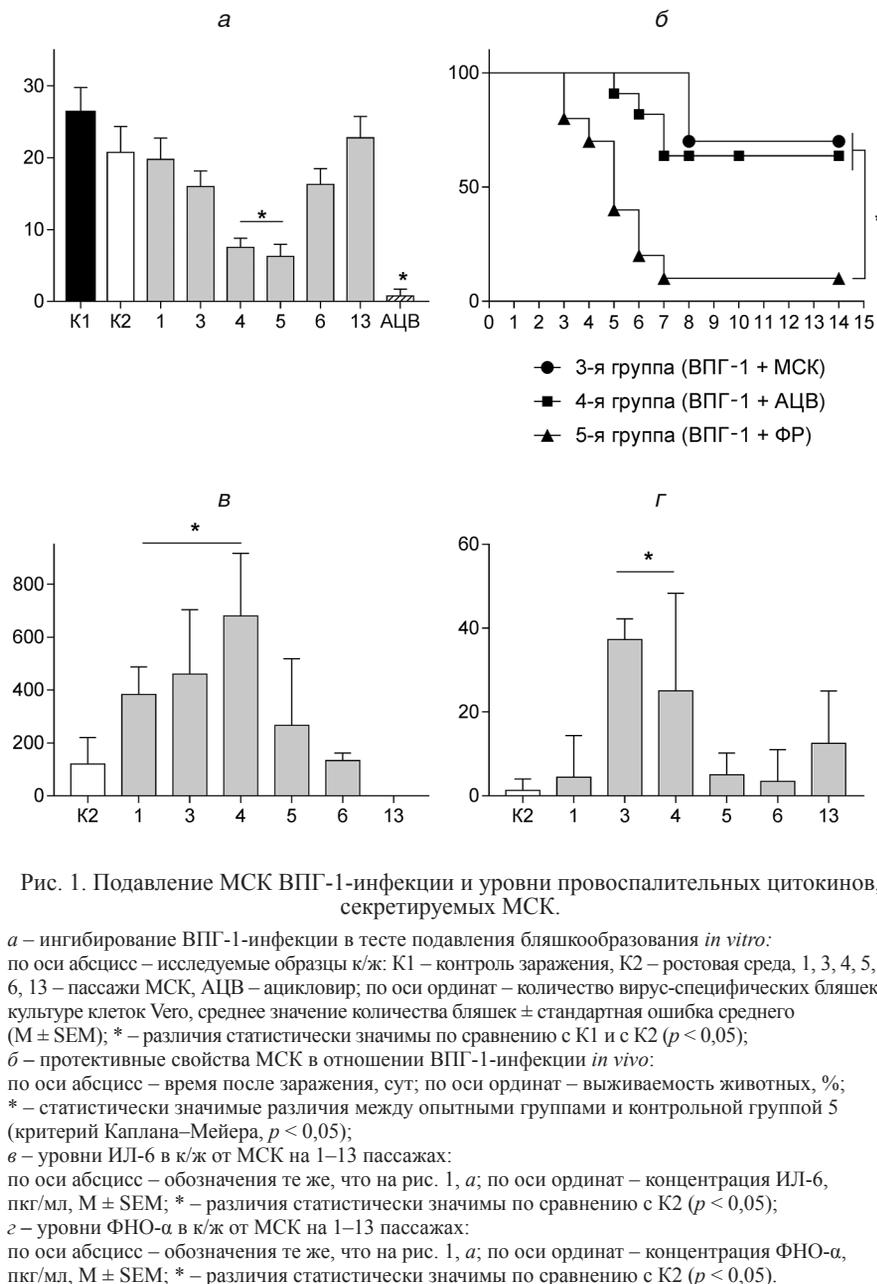


Рис. 1. Подавление МСК ВПП-1-инфекции и уровни провоспалительных цитокинов, секретируемых МСК.

а – ингибирование ВПП-1-инфекции в тесте подавления бляшкообразования *in vitro*: по оси абсцисс – исследуемые образцы к/ж: K1 – контроль заражения, K2 – ростовая среда, 1, 3, 4, 5, 6, 13 – пассажи МСК, АЦВ – ацикловир; по оси ординат – количество вирус-специфических бляшек в культуре клеток Vero, среднее значение количества бляшек ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * – различия статистически значимы по сравнению с K1 и с K2 ($p < 0,05$);

б – протективные свойства МСК в отношении ВПП-1-инфекции *in vivo*: по оси абсцисс – время после заражения, сут; по оси ординат – выживаемость животных, %; * – статистически значимые различия между опытными группами и контрольной группой 5 (критерий Каплана–Мейера, $p < 0,05$);

в – уровни ИЛ-6 в к/ж от МСК на 1–13 пассажах: по оси абсцисс – обозначения те же, что на рис. 1, *а*; по оси ординат – концентрация ИЛ-6, пкг/мл, $M \pm SEM$; * – различия статистически значимы по сравнению с K2 ($p < 0,05$);

г – уровни ФНО-α в к/ж от МСК на 1–13 пассажах: по оси абсцисс – обозначения те же, что на рис. 1, *а*; по оси ординат – концентрация ФНО-α, пкг/мл, $M \pm SEM$; * – различия статистически значимы по сравнению с K2 ($p < 0,05$).

Обсуждение

Заражение ВПП-1 индуцирует реакции врождённого иммунитета, и в то же время вирус воздействует на молекулярные и клеточные пути, подавляющие иммунные реакции [12]. Исход вирусной инфекции определяется балансом между этими процессами, и его нарушение может приводить либо к латенции и персистенции, либо к генерализованной инфекции с летальным исходом. В условиях наших опытов внутрибрюшинное заражение мышей вызывало серьёзные неврологические симптомы и гибель 90% животных. Высокий уровень летальности (около 75%) наблюдается и при острых заболеваниях ВПП-этиологии у людей [13]. Стратегии лечения, направленные на подавление функций вирусных генов, имеют ряд известных ограничений [14]. В связи с этим в данной работе использован новый подход, основанный на клеточной терапии с применением МСК. Представляло интерес

выяснить, способны ли МСК повлиять на развитие ВПП-1-инфекции. Результат априори был неясен, так как во многих работах показано ингибирующее влияние МСК на пролиферацию и функции иммунных клеток [15]. Опыты показали, что на 4-м и 5-м пассажах *in vitro* МСК продуцируют биологически активные соединения, подавляющие инфекционную активность ВПП-1 *in vitro* на 64–70%. Отметим, что при дальнейшем культивировании МСК ингибирующий эффект не был обнаружен, что указывает на транзитный характер спонтанной экспрессии ингибиторов ВПП-1-инфекции. Для оценки противовирусного действия цитокинов, продуцируемых МСК, изучена динамика экспрессии цитокинов, участвующих в защите от вирусных инфекций – ИЛ-6, ФНО-α и ИФН-γ. Оказалось, что в к/ж от МСК ИФН-γ не был обнаружен, в то же время концентрации ИЛ-6 и ФНО-α на 3-м и 4-м пассажах значительно превышали контрольный уровень «чистой» ростовой среды. При продолжении культивирования МСК (на 6–13-м пассажах) продукция цитокинов либо не определялась, либо снижалась до контрольного уровня. Спонтанная продукция МСК цитокинов и хемокинов обнаружена также другими авторами [16], однако выяснение причины снижения продукции на более поздних пассажах МСК требует дальнейших исследований. Совпадение максимальных концентраций ИЛ-6 и ФНО-α в к/ж от МСК с максимальным эффектом подавления ВПП-1 этой же к/ж указывает на участие продуцируемых МСК цитокинов в противовирусном действии.

Наибольший интерес представлял вопрос о действии МСК на ВПП-1-инфекцию *in vivo*. Животных заражали в условиях, которые вызывали генерализованную инфекцию с неврологическими симптомами и гибель 90% животных. Введение МСК дважды после заражения привело к выживанию 70% мышей, что соответствовало действию АЦВ, введенного 7-кратно (выживание 60% мышей). Введение МСК после заражения ВПП-1 более чем в 3 раза усиливало антительный ответ, при этом активность антител, нейтрализующих ВПП-1-активность (ВНА), возрастала в 12,5 раза. Кроме того, ВНА определялись уже через 7 дней, раньше, чем это обычно происходит при заражении ВПП-1 [17].

Следует отметить, что МСК значительно усиливали клеточный ответ, пролиферация Т-клеток возрастала почти в 7 раз по сравнению с контрольными необработанными животными и в 3 раза по сравнению с мышами, заражёнными ВПП-1. Наибольший эффект МСК оказывали при введении после заражения ВПП-1: пролиферация Т-клеток увеличивалась ещё в 4 раза по сравнению с животными, которым вводили только МСК.

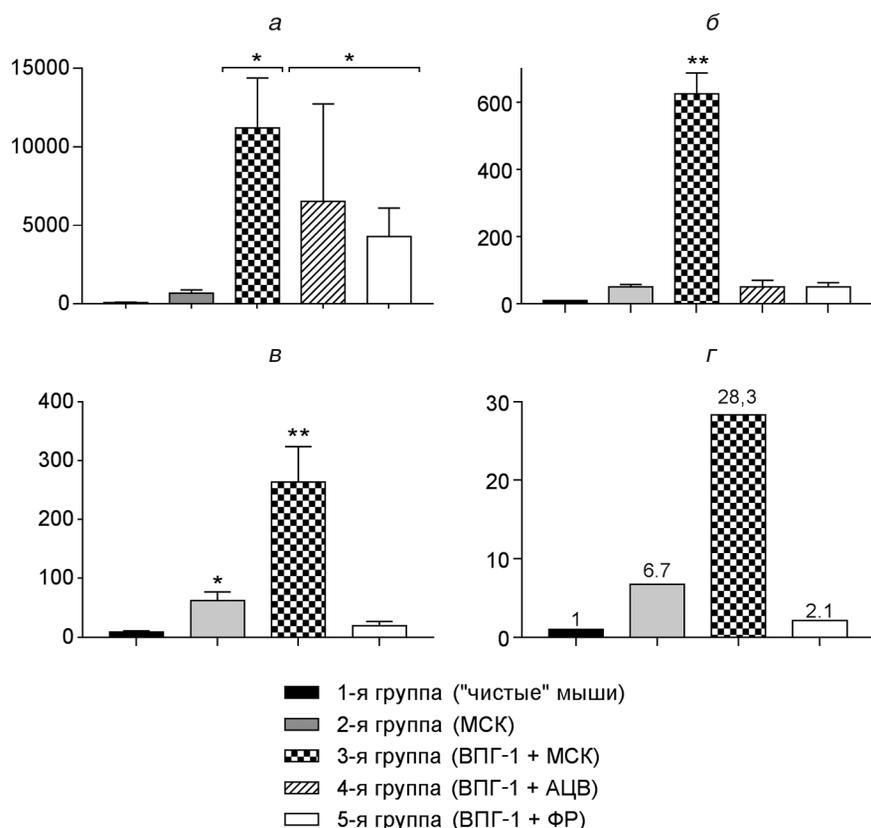


Рис. 2. Иммуномоделирующее действие МСК при генерализованной ВПГ-1-инфекции у мышей.

а, б – усиление активности противовирусных антител в сыворотках крови:

а – по оси абсцисс: группы мышей; по оси ординат: обратные разведения анти-ВПГ-1 IgG1 антител в ИФА, среднее значение ± стандартное отклонение (M ± SD); * – статистически значимые различия (p < 0,05);

б – по оси абсцисс: группы мышей (как на рис. 2, а); по оси ординат: обратные разведения вируснейтрализующих антител, M ± SD; ** – статистически значимые различия по сравнению со всеми группами (p < 0,05);

в, г – стимуляция пролиферации Т-клеток:

в – по оси абсцисс: группы мышей; по оси ординат: количество бластов, индуцированных в реакции бласттрансформации *in vitro*, M ± SD; * – статистически значимые различия по сравнению с контрольной 5-й группой (p < 0,05); ** – статистически значимые различия по сравнению со всеми группами (p < 0,05);

г – по оси абсцисс: группы мышей (как на рис. 2, в); по оси ординат – индекс стимуляции пролиферации (ИСП).

Интересные данные получены при анализе цитокинов в сыворотках мышей. У зараженных ВПГ-1 агонизирующих мышей перед гибелью обнаружены все 3 изученных цитокина: ИЛ-6, ИФН-γ и ФНО-α, но в небольших

количествах. Приблизительно такие же количества данных цитокинов были определены у 3-х агонизирующих мышей, которым после заражения вводили МСК (3-я группа). У 7 выживших мышей этой же группы была в 15 раз повышена концентрация ИФН-γ и статистически значимо снижены концентрации ИЛ-6 и ФНО-α. Повышенная концентрация ИФН-γ зафиксирована также у мышей, которым вводили только МСК (2-я группа).

Таким образом, защитные свойства МСК коррелировали с высокой концентрацией ИФН-γ, тогда как повышенные концентрации ИЛ-6 и ФНО-α в крови ассоциировались с гибелью животных.

Данные настоящей работы не подтверждают выводы многих авторов, полученные на других моделях, о том, что МСК подавляют пролиферацию и функции как Т-клеток [18], так и В-клеток [19]. Разнонаправленные иммуномодулирующие эффекты МСК можно объяснить их пластичностью, которая позволяет индуцировать различные сигнальные пути в зависимости от локальных условий и факторов микроокружения в организме. Супрессорные функции МСК проявляются при подавлении опухолевого роста и аутоиммунных процессов, при восстановлении поврежденных тканей, при пересадках органов. При низких уровнях иммунного ответа, наблюдавшихся нами при заражении мышей ВПГ-1, введение МСК индуцировало пролиферацию иммунных клеток и активацию защитной системы с участием системы интерферона. Разнонаправленное действие МСК может объясняться поляризацией МСК на МСК-1 и МСК-2 с разными молекулярными и клеточными механизмами действия: при высоких уровнях ИФН-γ и ФНО-α – противовоспалительными, при низких уровнях этих цитокинов – провоспалительными [20].

В последнее время появились работы о действии

Влияние МСК на уровни провоспалительных цитокинов в сыворотках мышей, зараженных ВПГ-1

Группы животных	Концентрация цитокинов, медиана [мин; макс], пкг/мл		
	ИЛ-6	ИФН-γ	ФНО-α
1 «Чистые» мыши (n = 5)	н/о	н/о	н/о
2 МСК (n = 5)	0 [0;880]	250 [133;467]	20 [0;133]
3 ВПГ-1 + МСК, выжившие мыши (n = 7) агонизирующие мыши (n = 3)	0 [0;43] P = 0,03 50 [0;670]	1387 [578;42188] P = 0,045 97 [25;4968]	5 [0;159] P = 0,02 247 [0;9245]
4 ВПГ-1 + АЦВ, выжившие мыши (n = 6)	0 [0;279]	90 [0;570]	0 [0;89]
5 Контроль, ВПГ-1 + ФР, агонизирующие мыши (n = 9)	85 [0;309]	45 [0;834]	73 [32;240]

Примечание. Полужирным шрифтом выделены значения, статистически значимо превышающие другие значения в каждом столбце (U-test; P < 0,05); н/о – не определено; < 20 пкг/мл для ИЛ-6, < 4 пкг/мл для ИФН-γ, < 6 пкг/мл для ФНО-α.

МСК на вирусные инфекции. При заражении мышей вирусом японского энцефалита наблюдали уменьшение воспалительных процессов в мозге и снижение гибели нейронов [21]. Положительное действие МСК показано у мышей, заражённых вирусами гриппа птиц H9N2 и H5N1 [9, 22]. Однако другие авторы, введившие МСК мышам, заражённым вирусами гриппа H1N1, не обнаружили уменьшения воспаления и повреждения в лёгких, а также улучшения выживаемости [8]. Обнадёживающие данные получены при трансфузии

МСК из пуповины трудноизлечимым больным ВИЧ-инфекцией, у которых в результате антиретровирусной терапии был полностью подавлен вирус, но не улучшились иммунные показатели. После клеточной терапии у этих пациентов увеличивалось количество CD4+ Т-клеток, восстанавливалась продукция ИФН- γ и ИЛ-2 и уменьшалась системная иммунная активация и воспалительные процессы [23].

Выводы

1. МСК, выделенные из костного мозга мышей, на 4–5-м пассажах культивирования *in vitro* продуцируют провоспалительные цитокины ИЛ-6, ИФН- γ и ФНО- α и подавляют развитие ВПГ-1-инфекции в клеточной культуре.

2. Внутривенная инъекция МСК после заражения мышей летальной дозой ВПГ-1 статистически значимо снижает клинические проявления генерализованной ВПГ-1-инфекции и защищает от гибели 70% мышей, что по крайней мере не меньше, чем ацикловир (60% выживших животных).

3. Протективный эффект МСК ассоциируется с индукцией В-клеточного ответа – выработкой вируснейтрализующих антител, и с активацией клеточного ответа – усилением пролиферации Т-клеток и повышением концентрации ИФН- γ в сыворотках крови заражённых животных.

4. Впервые показано, что при генерализованной ВПГ-1-инфекции клеточная терапия МСК оказывает иммуностимулирующее действие и защищает мышей от летальных доз ВПГ-1.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований, грант № 17-04-00812.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-9, 11-23 см. REFERENCES)

10. Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Чернорыж Я.Ю., Коваль В.С., Иванов А.А. и др. Димерные бисбензимидазолы подавляют инфекции, вызванные вирусом простого герпеса и цитомегаловирусом человека, в клеточных культурах. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(4): 162-8.

REFERENCES

1. Arduino P.G., Porter S.R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinic-pathological features. *J. Oral. Pathol. Med.* 2008; 37(2): 107-21.
2. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765.
3. James S.H., Kimberlin D.W. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection.

4. Ruffner M.A., Sullivan K.E., Henrickson S.E. Recurrent and Sustained Viral Infections in Primary Immunodeficiencies. *Front. Immunol.* 2017; 8: 665.
5. Ma S., Xie N., Li W., Yuan B., Shi Y., Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014; 21(2): 216-25.
6. Rohban R., Pieber T.R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 5173732.
7. Rivera-Cruz C.M., Shearer J.J., Figueiredo Neto M., Figueiredo M.L. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: e4015039.
8. Darwish I., Banner D., Mubareka S., Kim H., Besla R., Kelvin D.J., et al. Mesenchymal stromal (stem) cell therapy fails to improve outcomes in experimental severe influenza. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71761.
9. Li Y., Xu J., Shi W., Chen C., Shao Y., Zhu L., et al. Mesenchymal stromal cell treatment prevents H9N2 avian influenza virus-induced acute lung injury in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7(1): 159.
10. Klimova R.R., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Chernoryzh Ya.Yu., Koval' V.S., Ivanov A.A., et al. Dimeric bisbenzimidazoles suppress the herpes simplex virus and human cytomegalovirus infections in the cells in vitro. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(4): 162-8. (in Russian)
11. Dominici M., LeBlanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
12. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology*. 2005; 2: 59.
13. Riediger C., Sauer P., Matevossian E., Müller M.W., Büchler P., Friess H. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure. *Clin. Transpl.* 2009; 23(Suppl. 21): 37-41.
14. Rozenberg F., Deback C., Agut H. Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2011; 11(3): 235-50.
15. Cagliani J., Grande D., Molmenti E.P., Miller E.J., Rilo H.L.R. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *J. Stem Cell Regen. Biol.* 2017; 3(2).
16. Kyurkchiev D., Bochev I., Ivanova-Todorova E., Mourdjeva M., Oreshkova T., Belemezova K., et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014; 6(5): 552-70.
17. Whitley R. J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology. Volume 2*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001: 2461-509.
18. Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99(10): 3838-43.
19. Rosado M.M., Bernardo M.E., Scarsella M., Conforti A., Giorda E., Biagini S., et al. Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells Dev.* 2015; 24(1): 93-103.
20. Rivera-Cruz C.M., Shearer J.J., Neto M.F., Figueiredo M.L. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cell Polarization within the Tumor Microenvironment Niche. *Stem Cells Int.* 2017; 2017: 4015039.
21. Bian P., Ye C., Zheng X., Yang J., Ye W., Wang Y., et al. Mesenchymal stem cells alleviate Japanese encephalitis virus-induced neuroinflammation and mortality. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 38.
22. Chan M.C., Kuok D.I., Leung C.Y., Hui K.P., Valkenburg S.A., Lau E.H., et al. Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016; 113(13): 3621-6.
23. Zhang Z., Fu J., Xu X., Wang S., Xu R., Zhao M., et al. Safety and immunological responses to human mesenchymal stem cell therapy in difficult-to-treat HIV-1-infected patients. *AIDS*. 2013; 27(8): 1283-93.

Поступила 02.04.18

Принята к печати 26.04.18

Глотова Т.И.¹, Семёнова О.В.¹, Никонова А.А.¹, Глов А.Г.¹, Вяткин Ю.В.²,
Бондарь А.А.³

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛИЦИВИРУСА КОШЕК В СИБИРИ

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

²ООО «АкадемДжин», 630090, г. Новосибирск;

³ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН, 630090, г. Новосибирск

Представлены результаты изучения распространения калицивирусной инфекции в популяции кошек разных пород, содержащихся индивидуально или группами, выделения изолятов вируса в культуре клеток и филогенетического анализа их нуклеотидных последовательностей в сравнении с опубликованными последовательностями референсных эпизоотических и вакцинных штаммов *Feline calicivirus*. Клинические признаки инфекции установлены у 14,3% обследованных животных. В первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка выделили 7 цитопатогенных изолятов вируса: 1 от кошки с острой формой инфекции, 5 от животных с субклинической формой и 1 от кошки с системной формой болезни. Они адаптированы к перевиваемой культуре клеток почки котёнка FK-81, в которой накапливались в титрах $10,0 \pm 1,15 \text{ Ig TCD}_{50} / \text{cm}^3$. На основе анализа последовательностей региона второй открытой рамки считывания вирусного генома установлена высокая степень идентичности сибирского штамма Eshli и китайского штамма KM016908, равная 81,0%. Изоляты, выделенные от животных в Сибири, генетически отличаются от штаммов, входящих в состав импортных вакцин, применяемых для профилактики болезни в нашей стране, а также друг от друга. В питомниках, не имеющих контактов и связей друг с другом, но находящихся в одном географическом регионе, популяции вируса калицивируса кошек (FCV) могут иметь некоторые генетические отличия. Выявлено близкое родство некоторых полевых изолятов со штаммами из других стран, территориально удалённых от региона Сибири. Исследования по молекулярной эпизоотологии калицивирусов важны при разработке тест-систем и мониторинге распространения штаммов на территории РФ.

Ключевые слова: калицивирус кошек; клинические признаки; системная форма болезни; геном; полимеразная цепная реакция; область второй открытой рамки считывания; секвенирование; филогенетический анализ; вакцинация.

Для цитирования: Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А., Глов А.Г., Вяткин Ю.В., Бондарь А.А. Выделение и филогенетический анализ калицивируса кошек в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6):268-274. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-268-274>

Glotova T.I.¹, Semenova O.V.¹, Nikonova A.A.¹, Glotov A.G.¹, Vyatkin Y.V.², Bondar A.A.³

ISOLATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF FELINE CALICIVIRUS IN SIBERIA

¹Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation;

²Ltd. «AkademDzin», Novosibirsk, 630090, Lavrentyeva prospect, 6, Russian Federation;

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Lavrentyeva prospect, 8, Russian Federation

The results of the study of the distribution of calicivirus infection in a population of domestic cats of different breeds, contained individually or the group method, the virus isolation in the cell culture and a comparative phylogenetic analysis of their nucleotide sequences with published sequences of reference field and vaccine strains of *Feline calicivirus* (FCV) from other countries: USA, Germany, Japan, China and Korea are presented. Clinical signs of infection were found in 14.3% of the animals examined. After several passages in the primary kidney cells of the kitten embryo, seven cytopathogenic isolates FCV were isolated: 1 - from a cat with an acute infection, 5 - subclinical infection, 1 - systemic infection. They were adapted to continuous FK-81 cells in which they reached a maximum infectious activity of $10.0 \pm 1.15 \text{ Ig TCD } 50 / \text{cm}^3$. Based on the sequence analysis of the open reading frame 2 region of the viral genome Eshli strain showed a close relationship with strain KM016908 from China with the identity of the nucleotide sequences between them of 81.0%. The results of the investigations showed that FCV isolates obtained from animals on the territory of Siberia are genetically different from strains included to imported vaccines used to prevent disease in Russian Federation and also among themselves. This causes a decrease in the effectiveness of preventive measures. In nurseries that do not have contacts and connections between themselves but located in the same geographic region FCV populations may have some genetic differences. A close relationship of some field isolates with strains from other countries geographically located so far from the Siberian region has been revealed. Studies on the molecular epizootology of caliciviruses are important in the development of test systems and the monitoring of the spread of strains in Russia.

Key words: *feline calicivirus; clinical signs; genome; polymerase chain reaction; the second open reading frame; sequencing; phylogenetic analysis; vaccination.*

Для корреспонденции: Глотова Татьяна Ивановна, д-р биол. наук, заведующая лабораторией вирусологии СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: t-glotova@mail.ru

For citation: Glotova T.I., Semenova O.V., Nikonova A.A., Glotov A.G., Vyatkin Y.V., Bondar A.A. Isolation and phylogenetic analysis of feline calicivirus in Siberia. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6): 268-274. (In Rus.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-268-274>

For correspondence: Tatyana I. Glotova, Dr. Sci. Biol., Head of laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation.
E-mail: t-glotova@mail.ru

Information about authors:

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>
Semenova O.V., <http://orcid.org/0000-0002-1165-5243>
Nikonova A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4554-1612>
Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>
Vyatkin Y.V., <http://orcid.org/0000-0003-3910-335X>
Bondar A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3167-138X>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 27 October 2017

Accepted 27 December 2017

Введение

Вирус калицивируса кошек *Feline calicivirus* (FCV) широко распространён во всём мире и является возбудителем одного из наиболее часто встречаемых вирусных заболеваний у представителей семейства кошачьих [1–8]. Он относится к роду *Vesivirus*, семейству *Caliciviridae*. Геном вируса представлен положительно заряженной РНК размером 7,7 кб, которая кодирует 3 открытые рамки считывания (ORF) [5, 7, 9]. Штаммы вируса характеризуются высокой изменчивостью генома, что объясняет их антигенное разнообразие и способность вызывать у восприимчивых животных заболевания с различными клиническими проявлениями [10]. Инфекция протекает в острой и хронической форме с преимущественным поражением слизистой оболочки ротовой полости и верхних дыхательных путей и характеризуется ринитом, конъюнктивитом, стоматитом и изъязвлением эпителия верхних дыхательных путей и ротовой полости. Болезнь может сопровождаться обильными серозными выделениями из носа и ротовой полости, вялостью, повышением температуры тела, снижением или полным отсутствием аппетита. Реже встречаются язвенный дерматит, хромота, аборт, желтуха, тяжёлая форма пневмонии и внезапный летальный исход [11]. В литературе описана системная форма инфекции, приводящая к гибели до 60% больных животных. Она впервые зарегистрирована в США и Европе [10–15], а впоследствии и в нашей стране [16].

В последние годы многие исследователи обращают внимание на частоту выявления и особенности распространения вирусных инфекций у домашних кошек, в том числе вызванных FCV, отмечая его увеличение. Одной из причин этого является разведение высокопородных племенных животных, завоз их из разных регионов Российской Федерации, стран СНГ и мира [2, 3, 17–18]. Скудное содержание, частые перегруппировки, участие в выставках, племенная работа и другие мероприятия, сопровождающиеся стрессами, способствуют распространению возбудителей вирусных инфекций и росту заболеваемости животных. Кроме того, установлено, что FCV обладает высокой устойчивостью ко многим дезинфицирующим средствам. При недостаточных мерах гигиены в ветеринарной клинике или питомнике возможна косвенная его передача животному через объекты окружающей среды [19].

FCV может вызывать персистентные, длительные инфекции, которые способствуют его сохранению в ор-

ганизме переболевшего животного. Как правило, количество кошек, персистентно инфицированных вирусом, может быть небольшим, но они играют важную роль в его распространении и сохранении в популяции восприимчивых животных [1, 20, 21]. Эти животные выглядят клинически здоровыми, FCV-инфекция у них протекает бессимптомно.

Данные о распространении и результаты филогенетического анализа калицивирусов кошек в России ограничены. Известно, что эффективным методом защиты животных от вирусных инфекций является профилактическая вакцинация. Однако существование генетических вариантов вируса может снижать её эффективность [5–7, 10, 13, 14, 22]. В ветеринарии широко используют вакцины зарубежного производства, изготовленные на основе референсных штаммов F9 и F255. Для объективности оценки эффективности этих препаратов необходимы данные о генетической структуре местных штаммов вируса, циркулирующих среди животных на конкретной территории РФ. Они могут помочь при разработке эффективных схем профилактической вакцинации животных.

Целью работы являлось изучение распространения калицивирусной инфекции кошек на территории Сибири, выделение и филогенетический анализ изолятов вируса от животных с различными клиническими формами болезни в сравнении с опубликованными последовательностями вакцинных и эпизоотических штаммов.

Материал и методы

Эпизоотологические исследования. Всего в период 2011–2016 гг. обследовали 1125 кошек в возрасте от нескольких недель (менее 1 мес) до 18 лет разных пород: курильского бобтейла короткошёрстной, сфинкса (канадского), британской короткошёрстной, корниш рекс, персидской, мейн-кун и ряда других, а также беспородных. Животные содержались индивидуально или группами в частных питомниках, специализирующихся на их разведении, в приютах Томской, Омской и Новосибирской областей.

Для подтверждения клинического диагноза FCV-инфекции исследовали пробы биоматериала (выделения из носа, ротовой полости, конъюнктивы) от больных животных методом ОТ-ПЦР. Для проведения дифференциальной диагностики использовали коммерческие наборы «Калицивир», «Коронавир» и «Риновир», разработанные ФГУ «Всероссийский государственный центр

Таблица 1

Референсные штаммы FCV, использованные в работе для анализа

Номер в GenBank	Страна	Год публикации	Примечание/клинические признаки болезни
U13992	США	1970	Острый респираторный синдром
U07130		1960	Вакцинный штамм F255/пневмония и поражения ротовой полости
U07131		1983	Хромота
JX519212		1995	Пневмония
JX519209		1996	Бессимптомное течение болезни
JX519211		1996	Хронический гингивит/стоматит
JX519213		1996	
M86379		1958	Вакцинный штамм F9/болезнь верхних дыхательных путей
AY560113		1993	Болезнь верхних дыхательных путей
AY560114		1998	
AY560115		2000	
AY560117		2002	Вирулентное системное заболевание
AY560118		2005	Болезнь верхних дыхательных путей
D31836	Япония	1971	То же
D90357		1991	Острый респираторный синдром
AF109465	Великобритания	1990	Хромота
AF479590	Германия	2002	-
X99449		1996	Острый стоматит
KM016908	Китай	2014	Кератит, светобоязнь, выделения из носа
GU214989		2009	-
KM111557		2014	-
KJ572400	Корея	2014	-
KJ572401		2014	-
NC001543		2013	Вирус геморрагической болезни кроликов, штамм RHDFV-FRG
JX886002		2012	Вирус геморрагической болезни кроликов, штамм CB137

качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ВГНКИ) совместно с Центральным НИИ эпидемиологии.

Выделение FCV проводили в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка, которую выращивали в питательной среде Игла MEM с однократным набором аминокислот и витаминов (ООО «БиоЛот») с добавлением 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», lot № ASA28574), 0,06% L-глутамин и 100 мкг/мл канамицина в условиях CO₂ инкубатора (содержание углекислоты 5%) при 37°C и влажности воздуха 90%. Суспензии, приготовленные из проб биологического материала, положительных на FCV при исследовании посредством ОТ-ПЦР, пропускали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и вносили в объёме 100 мкл в монослой культуры

клеток в 24-луночных планшетах или флаконах 25 см³ («TRP», Швейцария). Инфицированную культуру культивировали в условиях, описанных выше, в течение 5–8 сут. Всего проводили не менее 10 «слепых» пассажей до выявления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса в культуре клеток. В последующей работе вирус адаптировали и культивировали в перевиваемой линии клеток почки эмбриона котёнка FK-81.

Подбор праймеров. Праймеры для амплификации фрагмента из области второй открытой рамки считывания (ORF2) геномной РНК FCV (FCV RNA) выбирали при помощи программы Primer Premier 5 («PREMIER Biosoft», США). Вследствие чрезвычайно высокой вариативности генома возбудителя известные последовательности [6] выравнивали при помощи пакета Vector NTI 10 и выбирали те варианты праймеров, которые были локализованы в консервативных участках РНК вируса. В результате наиболее оптимальной оказалась пара FCV_5314F 5'-ATGTGCTCAACCTGCGCTAACG-3' и FCV_7271R 5'-GCCAAATGWATTCCCATGTAGGA-3' с двумя вырожденными позициями. Праймеры использовали в двух вариантах: оригинальных и слитых на 5'-конце с M13-Forward- или M13-Reverse-последовательностями соответственно.

Секвенирование генома FCV. Реакция ПЦР содержала однократный «GC» буфер, смесь по 0,2 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ свободного Mg²⁺ в виде раствора хлорида магния, 0,2 мкМ MM13F_FCV_5314F-праймера, 0,4 мкМ MM13R_FCV_7271R-праймера с двумя вырожденными позициями в структуре, 10% глицерин и 14 МЕ/мл полимеразы Phusion Hot Start II Polymerase («Thermo Scientific Bio», Литва). В качестве матрицы использовали ревертированные с помощью обратной транскриптазы MMuLV-препараты кДНК FCV. Условия амплификации подбирали при помощи градиентной ПЦР на амплификаторе Veriti («Applied Biosystems», США). В итоге использовали следующий температурный профиль: денатурация при 98°C в течение 1 мин, затем 40 циклов – денатурация при 98°C 10 с, отжиг при 66°C 15 с, элонгация при 72°C 1 мин, после этого стадия достройки концов в течение 7 мин при 72°C и хранение реакции при 4°C до дальнейшего использования. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле при напряжении 10–14 В/см.

Наработанные в препаративном количестве фрагменты ДНК FCV очищали от компонентов ПЦР посредством сорбции на магнитных частицах AMPureXP и секвенировали по Сэнгеру со стороны праймера FCV_5314F с помощью набора BigDye v. 3.1 Ready Reaction DNA Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Реакция Сэнгера содержала 0,3–0,5 пмоль ДНК-фрагмента, 2 мкл 10 мкМ праймера для секвенирования, 1 мл реагента BigDye v.3.1, 8 мл 5-кратного буфера для секвенирования и воду квалификации MiliQ до общего объема реакции 40 мл. Температурный профиль реакции Сэнгера состоял из денатурации при 95°C в течение 1 мин, затем 40 циклов плавления при 98°C 10 с, отжига при 50°C 5 с и элонгации при 60°C 4 мин. Продукты реакции Сэнгера очищали от невключившихся флуоресцентных красителей с помощью гель-фильтрации через предварительно замоченный в бидистиллированной воде SephadexG-50 («GE Healthcare») из расчёта 700–800 мл суспензии сорбента (вес 1:20/SephadexG-50: вода) на мини-колонку для одной реакции. Фильтрат с продуктами реакции Сэнгера высушивали на вакуум-концентраторе («Ер-

Таблица 2

Характеристика изолятов FCV, выделенных от домашних кошек

Порода животного	Форма инфекции; клинические признаки	Источник выделения, год	Результаты ОТ-ПЦР			Изоляты FCV
			FCV	FHV-1	FCoV	
Курильский бобтейл короткошёрстный	Острая; выделения из носа и ротовой полости, эрозии на языке и слизистой оболочке носа, кашель, конъюнктивит	Выделения из носа и конъюнктивы, 2013	Положительный	Положительный	Отрицательный	FCV3
Сфинкс (канадский)	Системная; гингивит, ринит, трахеобронхит, хромота, отёки в области подушечек лап	Выделения из носа и полости рта, 2012	«	Отрицательный	«	Eshli
Британская короткошёрстная	Субклиническая; хронический гингивит	Выделения из полости рта, 2011	«	Положительный	«	FCV7
Мейн-кун		Выделения из полости рта, 2012	«	Отрицательный	«	FCV1
Мейн-кун		То же	«	«	«	FCV2
Корниш рекс		« «	«	«	«	FCV6
Беспородное		Выделения из полости рта, 2011	«	«	«	FCV9

pendorf», Германия) и секвенировали на автоматическом геномном анализаторе ABI 3130XL («Applied Biosystems»). Полученные секвенограммы использовали для сравнения нуклеотидных последовательностей исследуемых образцов FCV из сибирского региона с известными референсными и вакцинными штаммами и поиска полиморфных сайтов.

Биоинформационный анализ. Секвенированные участки кодирующего белок фрагмента генома изолятов были выровнены с нуклеотидными последовательностями генома вакцинных штаммов F9 и F255, а также прочих референсных штаммов FCV, представленных в базе данных GenBank (табл. 1), с помощью пакета программ Muscle (версия 3.8.31) [23].

Из полученных выравненных был извлечён фрагмент длиной 562 пары оснований, присутствующий у всех изолятов этого исследования и штаммов FCV базы данных GenBank. Затем фрагменты геномов указанной длины всех штаммов и изолятов FCV были повторно выровнены друг относительно друга с помощью пакета Muscle. На основе полученных данных выравненных с помощью пакета программ PhyML (версия 3.1, модель нуклеотидных замен НКУ85) [24] было сконструировано филогенетическое дерево образцов. Визуализация дерева выполнена с помощью пакета программ Tree Graph (версия 2.0.54) [25]. Вирус геморрагической болезни кроликов использовали в качестве внешней группы.

Результаты

При клиническом обследовании у 161 (14,3%) животного выявили признаки калицивирусной инфекции, которая была подтверждена ОТ-ПЦР. Преимущественно наблюдали конъюнктивы, риниты, эрозии в ротовой полости и области носа, в редких случаях трахеиты и бронхопневмонии. Острая форма инфекции чаще сопровождалась повышением температуры тела до 40–41°C, отказом от корма, быстрой утомляемостью и вялостью животного, а субклиническая – хроническим гингивитом и стоматитом.

Вирус выявляли чаще всего в моноварианте равномерно на протяжении анализируемого периода у кошек разных пород и половой принадлежности в возрасте от 1 мес до 10 лет и старше, содержащихся как индивидуаль-

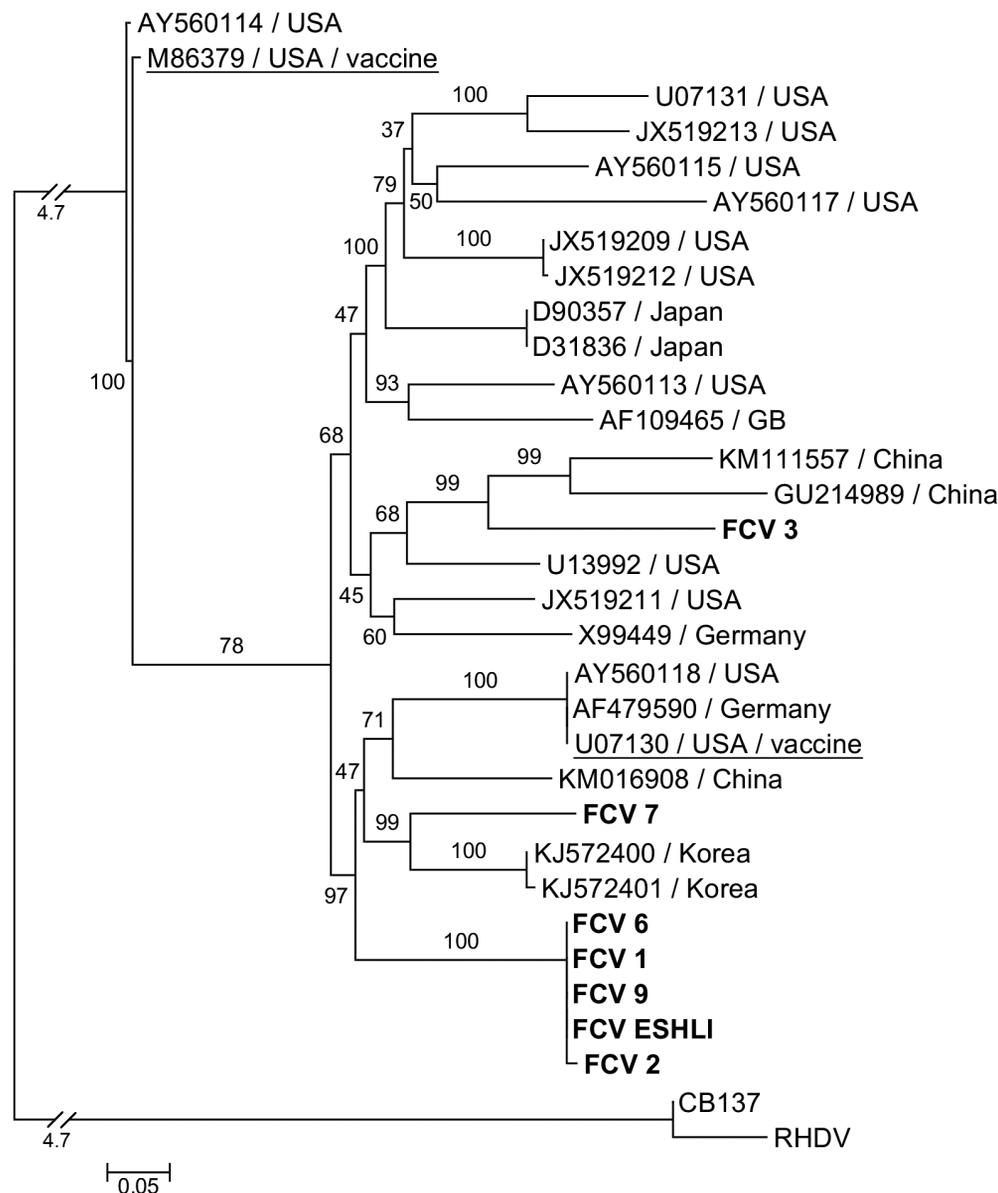
но, так и группами. В 0,7% случаев выявили ассоциации FCV с вирусами инфекционного ринотрахеита (FHV-1) и коронавирусной инфекции кошек (FCoV).

В 2012 г. в одном из частных питомников г. Новосибирска зарегистрировали вспышку системного заболевания у кошек, обусловленного FCV [16]. У 3 из 7 животных питомника в возрасте 4–6 мес выявили клинические признаки, аналогичные описанным ранее у животных в США, Англии, Франции и Германии [4, 12, 13]. В первые дни заболевания у них наблюдали повышение температуры тела до 40,5°C, отёки в области головы и передних лап, эрозии на языке и слизистой оболочке рта, хромоту, риниты и конъюнктивиты, а в более поздние сроки – развитие желтухи и гибель.

Для выделения вируса от больных животных с подтверждённым диагнозом в ОТ-ПЦР отобрали пробы биологического материала. В результате нескольких пассажей в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона котёнка выделили 7 цитопатогенных изолятов FCV: 1 от кошки с признаками острой формы инфекции, 5 от животных с субклинической формой и 1 от кошки с системной формой болезни. Шесть животных были породистыми племенными и одно – беспородным (табл. 2). Они принадлежали разным владельцам и питомникам, территориально удалённым друг от друга.

Выделенные изоляты вируса адаптировали к перевиваемой линии культуры клеток FK-81, в которой ЦПД проявлялось уже через 18 ч после инфицирования монослоя. Оно выражалось в появлении единичных участков разрушения целостности монослоя, количество которых постепенно увеличивалось через 24 ч, приводя к полному разрушению монослоя через 48 ч. После 3 пассажей изоляты FCV накапливались в титрах от $6,75 \pm 0,14$ до $7,5 \pm 0,5$ lg ТЦД₅₀/см³.

Изолят, выделенный от кошек с системной формой инфекции, обозначили как «Eshli». Он оказывал выраженное ЦПД в первичной и перевиваемой культурах клеток через 18 ч после инфицирования и накапливался в титре $10,0 \pm 1,15$ lg ТЦД₅₀/см³. Изолят был устойчив к хлороформу, эфиру, изменениям pH до 4, чувствителен к нагреванию и инактивировался при 50°C в течение 30 мин. По результатам исследований он депонирован в государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН



Дендрограмма, построенная на основе выравнивания аминокислотных последовательностей региона ORF2 генома представленных в базе данных GenBank штаммов FCV и изолятов, выделенных в Сибири.

«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» как штамм Eshli с регистрационным номером V-697.

В научной литературе нет данных о молекулярно-генетических свойствах штаммов FCV, циркулирующих среди кошек на территории РФ, поэтому мы провели сравнительный анализ выделенных нами изолятов FCV со штаммами вируса из других стран (США, Германия, Япония, Китай и Корея), нуклеотидные последовательности которых опубликованы в GenBank. Поскольку в последние годы наметилась тенденция к снижению профилактической эффективности вакцин на основе штаммов вируса F255 и F9, их последовательности также были включены в анализ (см. табл. 2).

Дендрограмма построена на основе анализа последовательностей региона ORF2 генома FCV. В качестве внешней группы использовали родственные FCV штам-

мы вируса геморрагической болезни кроликов RHDV-FRG и CB137 (см. рисунок).

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что штамм Eshli FCV, вызвавший вспышку системного заболевания у кошек в питомнике г. Новосибирска, проявил наиболее близкое родство со штаммом KM016908 из Китая. Идентичность нуклеотидных последовательностей между ними составила 81%. Изолят FCV7 имел близкое родство с корейскими штаммами KJ572400 и KJ572401 с идентичностью последовательностей 82,4 и 82% соответственно. Изоляту FCV3 более близкими оказались штаммы GU214989 (показатель идентичности нуклеотидных последовательностей – 78,8%) и KM111557 (78,1%), выделенные в Китае. Изоляты FCV2, FCV6, FCV9, FCV1 и штамм Eshli были близкородственными китайскому штамму KM016908 с идентичностью последовательностей от 79,3 до 81%.

Обсуждение

В результате исследований установлено, что сибирские изоляты FCV3 и FCV7, а также выделенный нами штамм Eshli имеют более значительные генетические различия между собой, чем с некоторыми зарубежными штаммами. Идентичность нуклеотидных последовательностей изолятов Eshli и FCV7 составила 79,4%, Eshli и FCV3 – 75,4%, FCV7 и FCV3 – 74,3%.

По данным некоторых исследователей, вакцины, изготовленные на основе референсных штаммов F9 и F255, не всегда защищают животных от калицивирусной инфекции, что вызвано генетической вариабельностью вируса и различиями между полевыми и вакцинными штаммами в пределах 21,3–38% [4, 8, 19, 26]. Мутации в геноме вируса затрагивают области, ответственные за репродукцию капсидных белков. Эта стратегия эволюционно сформировалась у многих вирусов для уклонения от иммунной системы организма хозяина. Результаты наших исследований подтвердили эти данные и показали, что генетические различия сибирских изолятов и вакцинных штаммов, входящих в состав импортных вакцин, применяющихся в нашей стране, также имеют место и находятся приблизительно в тех же пределах. Так, идентичность нуклеотидных последовательностей изолята FCV3 и вакцинного штамма F9 (M86379) составила 75,5%, FCV3 и вакцинного штамма F255 (U07130) – 76,1%. Для изолята FCV7 и штамма F9 эти показатели составили 76,5%, а для FCV7 и F255 – 79,7%. Идентичность штаммов Eshli и F9 составила 76,3%, Eshli и F255 – 78,7%.

Полученные данные свидетельствуют о наличии генетических различий между полевыми сибирскими изолятами и вакцинными штаммами, к тому же практический опыт использования вакцин на их основе, рост заболеваемости кошек в регионе указывают на их недостаточную эффективность. В данной работе для секвенирования мы использовали регион второй открытой рамки считывания (ORF2), анализ последовательностей которого, возможно, не полностью отражает уровень мутации генома вируса, поэтому для более глубокого анализа этих различий необходимо проводить сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей полного генома вируса [26].

Очевидно, вакцины, содержащие штаммы вируса, выделенные несколько десятилетий назад, не могут обеспечить полноценную защиту животных от инфицирования генетически измененными штаммами, циркулирующими в настоящее время на конкретной территории [27, 28].

В России вирус впервые был выделен в 1993 г. Он депонирован в коллекцию культур микроорганизмов ВГНКИ как штамм FCV Ларс-30ДЕП [1]. К сожалению, не было возможности включения его в данный анализ.

Нами выделены изоляты FCV от животных с разными клиническими формами заболевания: острой респираторной, субклинической и системной, но не установлена связь клинической формы заболевания с определёнными последовательностями генома FCV. Ряд исследователей также безуспешно пытались определить вариации нуклеотидов генома FCV или аминокислотных последовательностей, уникальных для разных клинических проявлений болезни [5, 6, 20, 29]. Генетическая основа патогенности FCV остается пока неустановленной.

Заключение

В последние годы наблюдается рост заболеваемости домашних кошек вирусными инфекциями, в том числе

вызванными FCV. Одной из причин является массовый, часто неконтролируемый ввоз племенных животных с неизвестным статусом в отношении инфекционных болезней и историей вакцинации из других стран, концентрация их в питомниках и частые перемещения из зоотехнических или коммерческих сооружений. В такой ситуации значительно возрастает риск заноса и распространения возбудителя на конкретной территории. Возможен также обмен генетически различными штаммами между местной и импортированной популяциями животных. В связи с этим сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании новых и высоковирулентных штаммов вирусов.

Результаты наших исследований показали, что калицивироз часто встречается в популяции кошек в Сибири. Вирус выявлен у 14,3% обследованных животных. Выделенные нами изоляты и штамм вируса генетически отличаются друг от друга и от референсных вакцинных и полевых штаммов, последовательности которых опубликованы в базе данных GenBank. Установлено, что в питомниках, расположенных в одном географическом регионе и не имеющих контактов и связей друг с другом, популяции вируса имеют генетические отличия. Выявлено близкое родство некоторых полевых изолятов со штаммами, циркулирующими на территории других стран, территориально удалённых от региона Сибири. Выделено от животных с клиническими признаками калицивирусной инфекции, подтверждённой результатами ОТ-ПЦР, и охарактеризовано 7 изолятов вируса. Нуклеотидные последовательности штамма Eshli опубликованы в GenBank под номером KY858969.

Полученные результаты исследований важны при разработке диагностических тест-систем и мониторинге распространения различных штаммов на территории РФ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-15, 19-29 см. REFERENCES)

1. Рахманина М.М. Калицивирусная инфекция кошек: биологические свойства возбудителя, эпизоотология, специфические средства и методы профилактики: Автореф. дисс. ... д-ра ветеринар. наук. М.; 2005.
2. Савойская Л.С., Клицунова Н.В., Гостева В.В., Гончаров Д.Б., Пенкина Г.А., Титова И.В. и др. Распространенность различных патогенов среди животных-компаньонов в Москве и Московской области. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 5-11.
3. Сочнев В.В., Медова Е.В., Пашкина Ю.В., Грачева Е.А., Параева О.М., Николаева А.С. Смешанные инфекции плотоядных на урбанизированных территориях. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 72-4.
4. Ядренкина Т.Г., Тугунова Т.Б., Глотов А.Г., Глотова Т.И. Вспышка системного калицивироза у кошек. В кн.: *Сборник научных докладов XVI международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Монголии, Сибирского региона, Казахстана и Болгарии»*. Улан-Батор; 2013: 161-2.
5. Рахманина М.М., Уласов В.И. Особенности клинических проявлений калицивирусной инфекции кошек, вызванной различными штаммами вируса. *Ветеринарная патология*. 2006; (3): 22-6.
6. Глотова Т.И., Ядренкина Т.Г., Глотов А.Г., Тугунова Т.Б. Распространение калицивируса среди кошек и его тропность к органам. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние животные*. 2013; (4): 29-1.

REFERENCES

- Rakhmanina M.M. *Calicivirus infection of cats: biological properties of the pathogen, epizootology, specific means and methods of prevention*: Diss. Moscow; 2005. (in Russian)
- Savoyskaya L.S., Klitsunova N.V., Gosteva V.V., Goncharov D.B., Penkina G.A., Titova I.V., et al. The prevalence of various pathogens among companion animals in Moscow and the Moscow Region. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 5-11. (in Russian)
- Sochnev V.V., Medova E.V., Pashkina Yu.V., Gracheva E.A., Paraeva O.M., Nikolaeva A.S. Mixed infections of carnivores in urbanized areas. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 72-4. (in Russian)
- Schorr-Evans E.M., Poland A., Johnson W.E., Pedersen N.C. An epizootic of highly virulent feline calicivirus disease in a hospital setting in New England. *J. Feline Med. Surg.* 2003; 5(4): 217-6.
- Radford A.D., Coyne K.P., Dawson S., Porter C.J., Gaskell R.M. Feline calicivirus. *Vet. Res.* 2007; 38(2): 319-25.
- Prikhodko V.G., Sandoval-Jaime C., Abente E.J., Bok K., Parra G.I., Rogozin I.B., et al. Genetic characterization of feline calicivirus strains associated with varying disease manifestations during an outbreak season in Missouri (1995–1996). *Virus Genes*. 2014; 48(1): 96-110.
- Sosnovtsev S.V., Green K.Y. Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions. *Virology*. 2000; 277(1): 193-3.
- Dawson S., McArdle F., Bennett M., Carter M., Milton I.P., Turner P., et al. Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralization tests. *Vet. Rec.* 1993; 133(1): 13-7.
- Neill J.D., Reardon I.M., Heinrichson R.L. Nucleotide sequence and expression of the capsid protein gene of feline calicivirus. *J. Virol.* 1991; 65(10): 5440-7.
- Pedersen N.C., Elliott J.B., Glasgow A., Poland A., Keel K. An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Vet. Microbiol.* 2000; 73(4): 281-300.
- Greene G.E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier; 2006:145-54.
- Reynolds B.S., Poulet H., Pingret J.L., Jas D., Brunet S., Lemeter C., et al. A nosocomial outbreak of feline calicivirus associated virulent systemic disease in France. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(8): 633-44.
- Hurley K.F., Pesavento P.A., Pedersen N.C., Poland A.M., Wilson E., Foley J.E. An outbreak of virulent systemic feline calicivirus disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004; 224(2): 241-9.
- Coyne K.P., Jones B.R., Kipar A., Chantrey J., Porter J., Barber P.J., et al. Lethal outbreak of disease associated with feline calicivirus infection in cats. *Vet. Rec.* 2006; 158(16): 544-50.
- Pesavento P.A., MacLachlan N.J., Dillard-Telm L., Grant C.K., Hurley K.F. Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Vet. Pathol.* 2004; 41(3): 257-63.
- Yadrenkina T.G., Tugunova T.B., Glotov A.G., Glotova T.I. Outbreak of systemic calicivirus in cats. In: *Collection of scientific reports of the XVI International Scientific and Practical Conference «Agrarian Science - Agricultural Production of Mongolia, Siberian Region, Kazakhstan and Bulgaria» [Sbornik nauchnykh dokladov XVI mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Agrarnaya nauka – sel'skokhozyaystvennomu proizvodstvu Mongolii, Sibirskogo regiona, Kazakhstana i Bolgarii»]*. Ulan-Bator; 2013: 161-2. (in Russian)
- Rakhmanina M.M., Ulasov V.I. Features of clinical manifestations of calicivirus infection of cats caused by various strains of the virus. *Veterinarnaya patologiya*. 2006; (3): 22-6. (in Russian)
- Glotova T.I., Yadrenkina T.G., Glotov A.G., Tugunova T.B. Distribution of calicivirus among cats and its tropism to the organs. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie zhivotnye*. 2013; (4): 29-1. (in Russian)
- Radford A.D., Addie D., Belak S., Boucraut-Baralon C., Egberink H., Frymus T., et al. Feline calicivirus infection. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009; 11(7): 556-64.
- Coyne K.P., Dawson S., Radford A.D., Cripps P.J., Porter C.J., McCracken C.M., et al. Long-term analysis of feline calicivirus prevalence and viral shedding patterns in naturally infected colonies of domestic cats. *Vet. Microbiol.* 2006; 118(1-2): 12-5.
- Wardley R.C., Povey R.C. The clinical disease and patterns of excretion associated with three different strains of feline caliciviruses. *Res. Vet. Sci.* 1977; 23(1): 7-4.
- Wardley R.C. Feline calicivirus carrier state: a study of the host/virus Relationship. *Arch. Virol.* 1976; 52(3): 243-9.
- Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5): 1792-7.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 2010; 59(3): 307-11.
- Stöver B.C., Müller K.F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 7.
- Wensman J.J., Samman A., Lindhe A., Thibault J.C., Berndtsson L.T., Hosie M.J. Ability of vaccine strain induced antibodies to neutralize field isolates of caliciviruses from Swedish cats. *Acta Vet. Scand.* 2015; 57: 86.
- Bittle J.L., York C.J., Newberne J.W., Martin M. Serologic relationship of new feline cytopathogenic viruses. *Am. J. Vet. Res.* 1960; 21: 547-50.
- Kahn D.E., Gillespie J.H. Feline Viruses. X. Characterization of a newly-isolated picornavirus causing interstitial pneumonia and ulcerative stomatitis in the domestic cat. *Cornell Vet.* 1970; 60(4): 669-3.
- Willi B., Spiri A.M., Meli M.L., Samman A., Hoffmann K., Sydler T., et al. Molecular characterization and virus neutralization patterns of severe, non-epizootic forms of feline calicivirus infections resembling virulent systemic disease in cats in Switzerland and in Liechtenstein. *Vet. Microbiol.* 2016; 182: 202-12.

Поступила 27.10.17

Принята в печать 27.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 578.832.1:578.1.083.3

Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Желтухина А.И.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСОВ ГРИППА В ВИКТОРИАНСКОЙ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЛИНИИ

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

Социркуляция двух эволюционных линий (ЭЛ) вируса гриппа В в один эпидемический сезон определяет необходимость создания специфичных реагентов для быстрой идентификации и типирования новых изолятов. С этой целью была разработана панель моноклональных антител (МКА) к гемагглютиниону (ГА) вируса гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Установлено, что все полученные МКА реагировали в иммуноферментном анализе только с вирусами Викторианской ЭЛ при полном отсутствии взаимодействия с гетерологичными вирусами гриппа В Ямагатской группы, сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А. МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью. Показано, что все МКА взаимодействовали в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) только с вирусами Викторианской ветви, но не связывались с В/Ямагата-подобными штаммами. При анализе МКА с вирусами ранних лет выделения было обнаружено, что МКА 6E11, 9G5, 9B5 и 6A4 обладали способностью взаимодействовать с вирусом В/Россия/69, что может быть связано с наличием общего эпитопа у вирусов гриппа В еще до разделения на две независимые филогенетические ветви и современных штаммов гриппа В Викторианской ветви. Показано, что МКА 7C8, 7G9, 7H8 и 8D11 направлены к консервативному эпитопу (или эпитопам), специфичным для ГА вирусов гриппа В Викторианской линии. Наличие различий в эффективности взаимодействия МКА 6A9, 7G9 и 8A8 в РТГА позволяет выявлять и дифференцировать изоляты, выделенные в куриных эмбрионах и культуре клеток MDCK. Таким образом, разработанные МКА могут быть успешно применены для идентификации и антигенного анализа В/Виктория-подобных штаммов.

Ключевые слова: вирус гриппа В; моноклональные антитела; гемагглютинин; антигенный анализ.

Для цитирования: Сорокин Е.В., Царева Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к гемагглютиниону вирусов гриппа В Викторианской эволюционной линии. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(6): 275-280.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>

Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I.

MONOCLONAL ANTIBODIES TO HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA B VIRUSES VICTORIA EVOLUTIONARY LINEAGE

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

Co-circulation of two evolutionary distinct lineages of influenza virus in one epidemic season has led to development specific reagents for rapid identification and typing of new isolates. Panel of MAbs to hemagglutinin of influenza virus B/Brisbane/46/15 belonging to Victoria evolutionary lineage was developed. All MAbs reacted in ELISA with B/Victoria-like strains only. There were no interactions with heterologous influenza viruses of B/Yamagata lineage, seasonal and potentially pandemic influenza A viruses. All MAbs reacted in hemagglutination inhibition and virus neutralization. MAbs interacted in hemagglutination inhibition only with B/Victoria-like viruses, but did not interacted B/Yamagata-like strains. Neutralization and hemagglutination inhibition studies of viruses isolated before 1983 with MAbs revealed that MAbs 6E11, 9G5, 9B5 and 6A4 had the ability to interact with the virus B/ Russia/69 which may evidence that B strains of early isolation period (before lineage separation) have common epitope with recent Victoria lineage viruses. MAbs 7C8, 7G9, 7H8 and 8D11 were directed to a conserved epitope (or epitopes) specific for influenza hemagglutinin viruses of B/Victoria group. The presence of differences in the effectiveness of the interaction of MAbs 6A9, 7G9 and 8A8 in hemagglutination inhibition test allows the identification and differentiation of strains isolated in chicken embryos and MDCK cell culture. Thus, the developed MAbs can be successfully used for identification and antigenic analysis of B/Victoria-like strains.

Key words: influenza B virus; monoclonal antibodies; hemagglutinin; antigenic analysis.

For citation: Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza b viruses victoria evolutionary lineage. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(6): 275-280. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>

For correspondence: Evgeniy V. Sorokin, Head of laboratory of biotechnology of diagnostic preparations of Smorodintsev Research Institute of Influenza, St.-Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: evgeniy.sorokin@influenza.spb.ru

Information about authors:

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

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

Zheltukhina A.I., <http://orcid.org/0000-0001-8674-6097>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 12 February 2018
Accepted 06 March 2018

Для корреспонденции: Сорокин Евгений Валентинович, зав. лабораторией биотехнологии диагностических препаратов «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: evgeniy.sorokin@influenza.spb.ru

Введение

Вирус гриппа В впервые был изолирован в 1940 г. [1]. До 80-х годов XX века основной линией, находящейся в циркуляции, была Ямагатская эволюционная линия (ЭЛ), однако в 70-е годы, вероятно, в Китае появилась отличная от Ямагатской Викторианская ЭЛ вирусов гриппа В, которая возникла в результате постепенной эволюции минорных Ямагатских сублиний [2]. Начиная с 1983 г. наметился дивергентный характер их эволюции с формированием двух ЭЛ, родоначальниками которых были признаны референс-вирусы В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 [3]. Штаммы Викторианской ЭЛ доминировали в циркуляции в 80-е годы прошлого столетия, а вирусы, относящиеся к Ямагатской линии, преобладали по всему миру в 90-е годы [4]. В 2001 г. В/Victoria/2/87-подобные штаммы вновь появились в циркуляции, и с тех пор обе филогенетически различающиеся линии вируса гриппа В социркулируют по всему миру [5].

В отличие от вирусов гриппа А вирусы гриппа В имеют ограниченный резервуар хозяев. Вирусы гриппа А заражают человека, свиней, птиц, лошадей и других млекопитающих, тогда как вирус гриппа типа В затрагивает только людей, хотя его присутствие было подтверждено в мазках, полученных от тюленей [6, 7] и домашних свиней [8]. Это определяет более низкую скорость эволюционной изменчивости вирусов гриппа В. Тем не менее выраженная изменчивость вирусов гриппа В затрудняет создание эффективных лечебных, профилактических и диагностических средств. Несмотря на то что значимость вирусов В продемонстрирована на глобальном уровне [9, 10], большинство научных исследований сосредоточено главным образом на вирусах гриппа А, и знания об антигенной структуре гемагглютинина (ГА) вируса гриппа типа В по-прежнему достаточно ограничены.

Сказанное определяет значимость исследования эволюционной изменчивости и антигенной структуры ГА вирусов гриппа В. Применение специфичных моноклональных антител (МКА) может способствовать решению данных задач. МКА успешно используют для типирования вирусов гриппа в таких простых и доступных методах, как реакция нейтрализации и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). МКА также являются ценным исследовательским инструментом при антигенной характеристике новых изолятов вирусов гриппа, что при сопоставлении с данными генетического анализа позволяет выявить закономерности изменчивости и эволюции данного возбудителя.

В задачу настоящего исследования входила разработка и характеристика панели МКА, направленных к ГА вирусов гриппа В Викторианской линии.

Материал и методы

Получение аллантаической жидкости, содержащей вирусы гриппа

Культивирование вирусов гриппа проводили в аллантаической полости развивающихся куриных эмбрионов согласно Методическим рекомендациям НИИ гриппа. Для получения вирусосодержащей аллантаической жидкости 9—11-дневные куриные эмбрионы стерильно заражали посевным вирусом в дозе от 10 до 100 ЭИД₅₀/0,2 мл. После герметизации парафином эмбрионы помещали в термостат на 48 ч инкубации при $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа А или на 72 ч при $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ для вируса гриппа типа В. Далее эмбрионы охлаждали при 4°C ,

вирусосодержащую аллантаическую жидкость стерильно собирали и проводили контроль гемагглютинирующей активности.

Получение вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ)

Для получения ВКЖ клеточную культуру MDCK в концентрации 200 тыс. кл/мл засеивали в культуральные флаконы и выращивали в течение 1–2 сут до 85–95% состояния монослоя в термостате при $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Перед заражением клеток вирусом из флаконов удаляли ростовую среду и отмывали 2 раза средой RPMI-1640 без сыворотки, после чего вносили поддерживающую среду, содержащую вирус. Инкубацию для вируса гриппа типа В производили при $33 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После развития выраженного цитопатического действия (ЦПД) среду стерильно собирали и использовали как ВКЖ. Все вирусы были получены из коллекции Музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. В работе использовались референс-штаммы вируса гриппа В из Международных центров ВОЗ по гриппу (CDC&P, Атланта, США, и NIMR, Лондон, Англия).

Очистка и концентрация вирусов

После накопления эталонных штаммов вирусные частицы из аллантаической жидкости осаждали ультрацентрифугированием при 50 000 g в течение 2 ч, суспендировали в малом количестве 10 mM трис-ЭДТА буфера, pH 7,2 (STE), и производили очистку вируса через градиент 20–60% сахарозы ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 2,5 ч с последующим осаждением вируса из зоны 36–40% сахарозы на дно при 120 000 g в течение 1 ч. Осадок ресуспендировали в STE. Полученные цельновирионные суспензии хранили до исследования в замороженном состоянии при -75°C .

Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали набор «BCA™ Protein Assay Kit» («Pierce», США). Реакцию проводили в полном соответствии с инструкцией по применению. Учёт результатов проводили при длине волны 560 нм, используя фотометр фирмы «Anthos» (Австрия). Концентрацию белка в исследуемых пробах рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05–2 мг/мл, по белку.

Получение МКА

МКА к вирусу гриппа типа В (штамм В/Брисбен/46/15) были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа по методу, приведённому в работе [11], в следующей модификации. Мышей линии Balb/c иммунизировали путём внутрибрюшинного введения 70 мкг антигена вируса В/Брисбен/46/15, очищенного ультрацентрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Через 8 нед мыши были бустированы очищенным концентратом того же вируса (50 мкг/мышь). Через 3 дня после бустер-иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунных мышей с клетками мышьяной миеломы линии X63Ag8.653 в соотношении 10:1 в присутствии 50% раствора полиэтиленгликоля-2000 в среде Игла DMEM. Клонирование гибридом выполняли методом предельных разведений. Первичное тестирование клонов проводили в иммуноферментном анализе (ИФА). Гибридные клоны с заданным спектром реагирования реклонировали на селективной среде НАТ. Стабильные клоны – продуценты МКА подвергали криоконсервированию, а также использовали для получения асцитов.

Получение асцитных жидкостей

Мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном (0,5 мл/мышь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3–5 млн клеток на мышь. Спустя 2–3 нед асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. Исследования выполнены согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ № 266 МЗ РФ от 19.06.2003).

Реакция гемагглютинации (РГА) и РТГА

РГА и РТГА ставили общепринятым методом в соответствии с Практическими рекомендациями [12]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 4 ГАЕ вируса.

Оценка свойств полученных МКА в непрямом ИФА

Планшеты сенсibiliзирова-ли в течение 18 ч при 4°C очищенным концентратом вируса, разведённым карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ) до концентрации 2–4 мкг/мл. После отмывания несвязавшегося антигенного материала 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с добавлением 0,05% твина -20 (ФСБ-Т)₂, рН 7,2, вносили МКА в ФСБ-Т в разведениях 10⁻³–10⁻⁷ и инкубировали 1 ч при 37°C. Связавшиеся с антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазных конъюгатов к IgG мыши («Sigma», США) в ФСБ-Т в течение 1 ч при 37°C. Пероксидазную реакцию проявляли добавлением субстратной смеси, содержащей 0,1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и 0,02% H₂O₂, в ацетат-цитратном буфере, рН 5,0. После остановки реакции 2N H₂SO₄ оптическую плотность измеряли на фотометре Anthos-2010 (Австрия) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Изоотипы МКА определяли в ИФА с использованием коммерческого набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» («Sigma») в соответствии с инструкциями фирмы-изготовителя.

Оценка нейтрализующей активности МКА в микрокультуральном ИФА

Двукратные разведения МКА (50 мкл) соединяли с равными объёмами вирусосодержащего материала, содержащего 100 ТЦД₅₀ вируса. 100 мкл смеси вирус/МКА инкубировали 1 ч при 37°C, после чего её наносили на отмытый 0,01М ФСБ, рН 7,2, монослой культуры клеток MDCK, выращенных в 96-луночных планшетах для культуральных работ («Nunc», Дания). Планшеты выдерживали в CO₂-инкубаторе до развития ЦПД в контрольных лунках (контроль репродукции 100 ТЦД₅₀ вируса в отсутствие МКА). Культуральную жидкость полностью удаляли, клетки фиксировали в течение 10 мин 80% холодным ацетоном и промывали. Ингибирование синтеза вирусных белков в присутствии МКА учитывали в микрокультуральном ИФА. Для этого в лунки с фиксированными клетками вносили по 100 мкл конъюгата вирусспецифичных МКА с пероксидазой хрена (инкубация 1ч при 37°C). Результаты ИФА учитывали, как описано выше. Нейтрализующим титром МКА считали последнее разведение МКА, при котором наблюдалось двукратное и большее снижение ОП₄₅₀ по сравнению с контролем репродукции вируса.

Результаты

В результате отбора положительных клонов была получена панель из 12 новых МКА (6А9, 7С8, 7D9, 7G9, 8А8, 6Е11, 9G5, 10D3, 7Н8, 8D11, 9В5 и 6А4), специфически взаимодействующих в ИФА с очищенным концентратом

вируса-иммуногена В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Данный штамм является В/Брисбен/60/08-подобным вирусом, рекомендованным для включения в состав вакцин в Северном полушарии в сезоны 2016—2017 гг. [13] и 2017–2018 гг. [14]. Установлено, что все полученные МКА реагировали до высоких титров в ИФА (10⁻⁶–10⁻⁷) только с вирусами Викторианской ЭЛ при полном отсутствии взаимодействия с гетерологичными вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ, сезонными и потенциально пандемическими вирусами гриппа А субтипов (H1N1) pdm09, H3N2, H2N2, H5N1, H7N9 и H9N2. Согласно данным вестер-блоттинга все МКА были направлены к молекуле ГА. МКА относились к различным изотипам IgG, в частности МКА 6А9, 8А8, 9В5 к IgG1, МКА 7С8 и 7G9 к IgG2a, МКА 7D9 к IgG2b и МКА 6Е11, 9G5, 10D3, 7Н8, 8D11 и 6А4 к IgG3. Для характеристики антигенных свойств штаммов используют РТГА и реакцию нейтрализации. Известно, что при типировании изолятов «золотым стандартом» является реакция нейтрализации. Было установлено, что все разработанные МКА обладали выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении штамма-иммуногена В/Брисбен/46/15 до концентраций от 28 нг/мл до 120 мкг/мл для разных клонов МКА. Это позволяет использовать данные МКА для эпитопного картирования ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ. Однако наибольшее распространение для типирования и антигенного анализа изолятов имеет РТГА. МКА были исследованы в РТГА с набором штаммов разных лет выделения, относящихся к различным ЭЛ (табл. 1). Установлено, что все МКА обладали выраженной антигемагглютинирующей активностью в отношении вируса-иммуногена В/Брисбен/46/15. По степени интенсивности взаимодействия в РТГА МКА были условно разделены на 2 группы: 1) МКА (6А9, 7С8, 7D9, 7G9 и 8А8) с невысокой активностью (титры 1/80–1/320); 2) МКА (6Е11, 9G5, 10D3, 7Н8, 8D11, 9В5 и 6А4) с высокими титрами (1/81920–1/163840). Ни одно из МКА не взаимодействовало в РТГА с вирусами гриппа В Ямагатской ЭЛ. Отмечено, что МКА 6Е11, 9G5, 9В5 и 6А4 обладали способностью связываться с вирусом В/Россия/69, не взаимодействуя при этом со штаммами более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83. Все МКА взаимодействовали в РТГА в эталонным штаммом В/Брисбен/60/08. Однако по степени реагирования с другими референс-штаммами гриппа В Викторианской ветви разработанные МКА были гетерогенны. Так, МКА 6А9, 7D9, 8А8, 9G5 и 9В5 были активны только в отношении генетической группы, представленной штаммом В/Брисбен/60/08. МКА 6Е11, 10D3 и 6А4 не взаимодействовали с референс-штаммом В/Гонконг/330/01, при этом они реагировали с вирусами, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04. МКА 7С8, 7G9, 7Н8 и 8D11 проявляли антигемагглютинирующую активность в отношении всех протестированных в РТГА эталонных вирусов Викторианской ЭЛ.

Для оценки способности полученных МКА взаимодействовать с современными штаммами вируса гриппа В Викторианской филогенетической ветви было проведено тестирование МКА в РТГА с отечественными изолятами 2016–2017 гг. выделения. Были проанализированы вирусы, выделенные в двух различных системах – в куриных эмбрионах (КЭ) и культуре клеток MDCK. Установлено, что МКА 7С8, 7G9, 6Е11, 9G5, 10D3, 7Н8, 8D11, 9В5 и 6А4 реагировали в РТГА до высоких титров со всеми исследованными вирусами независимо от систе-

Взаимодействие МКА с эталонными штаммами вируса гриппа В разных лет выделения в РТГА

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
Штаммы ранних лет выделения:												
В/Россия/69	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	1280	20 480	< 20	< 20	< 20	10 240	1280
В/Гонконг/5/72	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Сингапур/222/79	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/СССР/100/83	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Штаммы Ямагатской ЭЛ:												
В/Ямагата/16/88	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Панама/45/90	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Харбин/07/94	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Яманаша/166/98	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Виктория/504/00	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Флорида/07/04	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Массачусетс/2/12	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
В/Пхукет/3073/13	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
Штаммы Викторианской ЭЛ												
В/Шандонг/7/97	< 20	40	< 20	80	< 20	10 240	< 160	10 240	40 960	40 960	< 160	5120
В/Шига/51/98	< 20	160	< 20	80	< 20	5120	< 160	2560	40 960	20 480	< 160	10 240
В/Токио/53/99	≤ 20	160	< 20	160	< 20	5120	< 160	640	20 480	40 960	< 160	2560
В/Гонконг/330/01	< 20	320	< 20	160	< 20	< 160	< 160	< 160	40 960	40 960	< 160	< 160
В/Малайзия/2506/04	< 20	160	< 20	80	< 20	10 240	< 160	1280	81 920	40 960	< 160	20 480
В/Брисбен/60/08	20	320	160	160	80	40 960	40 960	81 920	20 480	20 480	81 920	40 960
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920

мы выделения (табл. 2). МКА 7С8 и 7G9 также взаимодействовали как с вирусами, выделенными в КЭ, так и с МДСК-вариантами, при этом, как правило, титры МКА при реагировании с «клеточными» изолятами были выше. Совершенно другая картина наблюдалась при взаимодействии вирусов, выделенных в разных системах, с МКА 6А9, 7D9 и 8А8. МКА 6А9 и 8А8 практически не взаимодействовали с вирусами, выделенными в КЭ (титр в РТГА < 20–1/20), но при этом МКА 8А8 реагировали до более высоких титров со штаммами, выделенными в клетках МДСК, по сравнению со штаммом-иммуногеном В/Брисбен/46/15, а МКА 6А9 имели сходный уровень взаимодействия. МКА 7G9 также не взаимодействовали с большинством КЭ-вариантов вирусов, но при этом хорошо реагировали с МДСК-вариантами. С целью проверки предположения, что МКА отличаются по уровню взаимодействия в РТГА с вирусами, изолированными в различных системах выделения, было проведено сравнение штаммов, выделенных параллельно в КЭ и культуре клеток МДСК (табл. 3). Действительно, оказалось, что МКА 6А9, 7G9 и 8А8 практически не выявляли варианты вирусов, выделенных в КЭ, тогда как те же вирусы, но выделенные в клетках МДСК, реагировали с МКА в РТГА до высоких титров. МКА 7С8, 7D9, 6Е11, 9G5, 10D3, 7H8, 8D11, 9B5 и 6А4 выявляли в РТГА оба варианта изолятов, но при этом титр МКА с МДСК-вариантами был выше по сравнению с КЭ-вариантами вирусов.

Обсуждение

Социркуляция двух ЭЛ вируса гриппа В в один эпидемический сезон определяет необходимость создания специфичных реагентов для быстрой идентификации и типирования новых изолятов. С этой целью была разра-

ботана панель МКА к ГА вируса гриппа В/Брисбен/46/15 Викторианской ЭЛ. Показано, что все МКА взаимодействовали в РТГА только с вирусами Викторианской ветви при отсутствии неспецифического взаимодействия с В/Ямагата-подобными штаммами. При анализе МКА с вирусами ранних лет выделения было обнаружено, что МКА 6Е11, 9G5, 9B5 и 6А4 обладали способностью связываться с вирусом В/Россия/69, не взаимодействуя при этом со штаммами более поздних лет выделения – В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83. Предполагается, что штаммы Ямагатской линии эволюционировали от В/СССР/100/83-подобных штаммов [15, 16]. Было показано, что вирусы Ямагатской разновидности отличались от штамма В/СССР/100/83 на 16–18 аминокислотных замен, а от эталонного представителя В/Виктория/2/87 – на 25–27 аминокислотных замен [15]. Кроме того, у штаммов В/Гонконг/5/72, В/Сингапур/222/79 и В/СССР/100/83 показано наличие делеций в гене ГА, что характерно для В/Ямагата-подобных вирусов. Так как МКА 6Е11 и 6А4 реагировали в РТГА со всеми протестированными штаммами Викторианской ЭЛ за исключением В/Гонконг/330/01, можно предполагать, что эти МКА направлены к консервативному эпитопу, который имелся у вирусов гриппа В ещё до разделения на две независимые филогенетические ветви. Однако этот эпитоп впоследствии был утрачен у В/Ямагата-подобных штаммов, но сохранился у большинства современных представителей Викторианской линии. С другой стороны, МКА 9G5 и 9B5, также взаимодействующие со штаммом В/Россия/69 как в РТГА, так и в реакции нейтрализации, не реагировали с изолятами Викторианской группы, подобными В/Шандонг/7/97 и В/Малайзия/2506/04, до появления генетической группы, представленной эталоном В/Брисбен/60/08. Вероятнее все-

Таблица 2

Взаимодействие МКА со штаммами вируса гриппа В Викторианской линии 2016–2017 гг. выделения в РТГА

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/44/17*	< 20	160	80	80	< 20	20 480	81 920	163 840	81 920	40 960	81 920	40 960
В/Санкт-Петербург/79/17*	20	160	20	160	20	81 920	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	81 920
В/Санкт-Петербург/80/17*	< 20	160	160	80	20	20 480	81 920	81 920	40 960	20 480	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/83/17*	20	80	≤ 20	80	< 20	81 920	327 680	163 840	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/104/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	40 960	20 480	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/106/17*	< 20	160	< 20	160	< 20	40 960	81 920	81 920	40 960	20 480	81 920	40 960
В/Санкт-Петербург/114/17*	< 20	80	80	40	< 20	20 480	40 960	40 960	40 960	20 480	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/156/17*	≤ 20	80	< 20	80	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	40 960	81 920	81 920
В/Санкт-Петербург/174/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	40 960	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/187/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	40 960	20 480	10 240	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/201/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	40 960	20 480	20 480	5120	20 480	40 960
В/Санкт-Петербург/203/17*	< 20	40	< 20	40	< 20	20 480	20 480	20 480	10 240	5120	20 480	20 480
В/Санкт-Петербург/209/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	20 480	10 240	40 960	81 920
В/Санкт-Петербург/225/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	81 920	163 840	327 680	81 920	81 920	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/225/16**	160	5120	320	1280	640	163 840	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	327 680
В/Санкт-Петербург/230/16**	160	10 240	160	640	2560	40 960	163 840	163 840	40 960	20 480	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/292/16**	160	2560	160	640	320	40 960	81 920	81 920	40 960	40 960	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/323/16**	80	2560	160	320	320	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/324/16**	160	2560	320	640	640	40 960	163 840	163 840	81 920	40 960	163 840	40 960
В/Иркутск/2/16**	160	10 240	320	2560	5120	40 960	327 680	81 920	81 920	40 960	40 960	40 960
В/Иркутск/4/16**	160	20 480	640	2560	1280	163 840	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	163 840
В/Астрахань/2/17**	< 20	160	160	80	≤ 20	40 960	163 840	81 920	81 920	40 960	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/148/17**	160	20 480	640	2560	2560	163 840	327 680	327 680	327 680	163 840	163 840	327 680

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – штаммы, изолированные в КЭ; ** – штаммы, изолированные в культуре клеток MDCK.

Таблица 3

Сравнение взаимодействия МКА со штаммами вируса гриппа В Викторианской линии в РТГА, изолированными параллельно в КЭ и культуре клеток MDCK

Штамм	Титр ¹ МКА в РТГА											
	6A9	7C8	7D9	7G9	8A8	6E11	9G5	10D3	7H8	8D11	9B5	6A4
В/Брисбен/46/15	80	320	160	160	80	81 920	163 840	163 840	163 840	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/176/17*	< 20	80	< 20	20	< 20	40 960	40 960	20 480	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/176/17**	320	10 240	640	5120	5120	163 840	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/204/17*	< 20	160	≤ 20	80	< 20	40960	81 920	40 960	20 480	20 480	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/204/17**	320	10 240	2560	5120	10240	81 920	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/210/17*	≤ 20	160	≤ 20	160	20	81 920	163 840	327 680	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/210/17**	640	10 240	640	1280	5120	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/234/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	20 480	40 960	20 480	20 480	10 240	40 960	20 480
В/Санкт-Петербург/234/17**	320	20 480	1280	5120	10 240	163 840	163 840	163 840	327 680	163 840	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/235/17*	20	160	< 20	160	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	81 920	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/235/17**	320	5120	320	1280	1280	81 920	327 680	327 680	327 680	163 840	327 680	81 920
В/Санкт-Петербург/236/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	20 480	40 960	20 480	20 480	10 240	20 480	20 480
В/Санкт-Петербург/236/17**	160	2560	320	640	640	81 920	163 840	327 680	163 840	163 840	327 680	163 840
В/Санкт-Петербург/238/17*	< 20	80	< 20	80	< 20	40 960	81 920	40 960	20 480	10 240	40 960	40 960
В/Санкт-Петербург/238/17**	80	1280	320	640	640	81 920	163 840	327 680	327 680	81 920	163 840	163 840
В/Санкт-Петербург/257/17*	20	160	20	160	< 20	81 920	163 840	163 840	81 920	40960	163 840	81 920
В/Санкт-Петербург/257/17**	320	20 480	640	5120	10 240	163 840	327 680	327 680	327 680	163840	163 840	81 920

го это связано с появлением реверсивной аминокислотной замены по отношению к эталонному штамму В/Россия/69. Ранее было показано, что у российских изолятов 2009–2012 гг. выделения, относящихся к группе В/Брисбен/60/08-подобных штаммов, зафиксированы 4 аминокислотные за-

мены, 3 из которых расположены в антигенных сайтах ВЕ, ВА (петля 150), ВВ2 (петля 160), и аминокислотная замена S172P, которая расположена вне антигенно-значимой области, но сопровождается приобретением пролина – аминокислоты с крупным радикалом, которая несовместима с

α -спиралью молекулы ГА, что характерно для эталонного штамма В/Брисбен/60/08 [17].

МКА 7С8, 7G9, 7Н8 и 8D11 взаимодействовали в РТГА со всеми штаммами вируса гриппа В Викторианской линии (В/Шандонг/7/97-, В/Гонконг/330/01-, В/Малайзия/2506/04- и В/Брисбен/60/08-подобные штаммы), что позволяет предполагать, что данные МКА направлены к консервативному эпитопу (или эпитопам), специфичному для ГА вирусов гриппа В Викторианской ветви.

В ходе анализа вирусов гриппа В Викторианской линии в РТГА было обнаружено, что ряд МКА (6А9, 7G9 и 8А8) отличаются по уровню взаимодействия в РТГА от вирусов, изолированных в различных системах выделения. Известно, что вирусы гриппа В, адаптированные к размножению в КЭ, отличаются по антигенной структуре ГА от вирусов, выращенных в культуре клеток МДСК. Было показано, что культивирование вирусов в различных системах приводит к ряду специфических замен в большой субъединице ГА. В частности, было обнаружено, что адаптация вирусов гриппа В к КЭ приводит к потере сайта гликозилирования (N-X-T) в позициях 194–196 в молекуле ГА1 [18]. Кроме того, показано, что некоторые лабораторные варианты вируса гриппа В, выращенные на КЭ, проявляли альтернативные антигенные свойства благодаря единичной замене глицина в положении 141 [18, 19]. Установлено, что адаптированный к КЭ вирус В/Люон/1271/96, несущий замену 141Gly→Arg, показал увеличение сродства к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе), в то время как связывание с 6'-сиалил(N-ацетиллактозамин) было ослаблено. В то же время МДСК-адаптированный вариант того же вируса с Gly141 отображал улучшенное сродство к 6'-сиалил(N-ацетиллактозамину) и значительно меньшее сродство к 3'-сиалил(N-ацетиллактозе) [20]. Вероятно, МКА 6А9, 7G9 и 8А8 распознают антигенные области ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ, которые подвержены изменениям в результате культивирования в различных клеточных системах. Этим можно объяснить отсутствие взаимодействия этих МКА с эталонными В/Виктория-подобными штаммами, так как все эти вирусы выращивались в КЭ.

Выводы

1. Получены и охарактеризованы новые МКА к ГА вирусам гриппа В Викторианской ЭЛ.

2. Установлено, что созданные МКА могут быть успешно применены для идентификации и антигенного анализа В/Виктория-подобных штаммов. Полученные МКА позволяют выявлять и дифференцировать изоляты, выделенные в КЭ и культуре клеток МДСК.

3. Наличие вируснейтрализующей активности у МКА позволяет использовать их для эпитопного картирования ГА вирусов гриппа В Викторианской ЭЛ и установления эволюционных связей с вирусами ранних лет выделения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-11, 13-16, 18-20 см. REFERENCES)

12. Соминина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И., Гудкова Т.М., Литвинова О.М. и др. МР «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация». М.; 2006.

17. Лобова Т.Г., Прокопец А.В., Комиссаров А.Б., Даниленко Д.М., Паянкова В.Ф., Суховецкая В.Ф. и др. Эволюционная изменчивость вирусов гриппа В, циркулировавших в Российской Федерации с 2005 по 2012 г. *Вопросы вирусологии*. 2012; 54(6): 22-6.

REFERENCES

- Nerome R., Hiromoto Y., Sugita S., Tanabe N., Ishida M., Matsumoto M., et al. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch. Virol.* 1998; 143(8): 1569-83.
- Chen J.M., Guo Y.J., Wu K.Y., Guo J.F., Wang M., Dong J., et al. Exploration of the emergence of the Victoria lineage of influenza B virus. *Arch. Virol.* 2007; 152(2): 415-22.
- Kanegae Y., Sugita S., Endo A., Ishida M., Senya S., Osako K., et al. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* 1990; 64(6): 2860-5.
- Lin Y.P., Gregory V., Bennett M., Hay A. Recent changes among human influenza viruses. *Virus Res.* 2004; 103(1-2): 47-52.
- Paiva T.M., Benega M.A., Silva D.B., Santos K.C., Cruz A.S., Hortenci M.F., et al. Evolutionary pattern of reemerging influenza B/Victoria lineage viruses in São Paulo, Brazil, 1996-2012: Implications for vaccine composition strategy. *J. Med. Virol.* 2013; 85(11): 1983-9.
- Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A. Influenza B virus in seals. *Science*. 2000; 288(5468): 1051-3.
- Bodewes R., Morick D., de Mutsert G., Osinga N., Bestebroer T., van der Vliet S., et al. Recurring influenza B virus infections in seals. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3): 511-2.
- Ran Z., Shen H., Lang Y., Kolb E.A., Turan N., Zhu L., et al. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses. *J. Virol.* 2015; 89(9): 4818-26.
- Glezen W., Schmier J.K., Kuehn C.M., Ryan K.J., Oxford J. The burden of influenza B: a structured literature review. *Am. J. Public Health.* 2013; 103(3): e43-5. doi: 10.2105/AJPH.2012.301137.
- Caini S., Huang Q.S., Ciblak M.A., Kuszniarz G., Owen R., Wangchuk S., et al. Epidemiological and virological characteristics of influenza B: results of the Global Influenza B Study. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2015; 9(Suppl. 1): 3-12.
- Kohler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 1976; 6(7): 511-9.
- Sominina A.A., Burtseva E.I., Lobova T.G., Konovalova N.I., Gudkova T.M., Litvinova O.M., et al. MR «Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification». Moscow; 2006. (in Russian)
- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016–2017 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2016; 91(10): 121-32.
- Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017–2018 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2017; 92(11): 117-28.
- Rota P.A., Wallis T.R., Harmon M.W., Rota J.S., Kendal A.P., Nerome K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology.* 1990; 175(1): 65-8.
- Ambrose C.S., Levin M.J. The rationale for quadrivalent influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012; 8(1): 81-8.
- Lobova T.G., Prokopets A.V., Komissarov A.B., Danilenko D.M., Payankova V.F., Sukhovetskaya V.F., et al. Evolutionary variability of influenza B viruses in Russian Federation in 2005-2012. *Voprosy virusologii.* 2012; 54(6): 22-6. (in Russian)
- Lugovtsev V.Y., Vodeiko G.M., Strupczewski C.M., Ye Z., Levandowski R.A. Generation of the influenza B viruses with improved growth phenotype by substitution of specific amino acids of Hemagglutinin. *Virology.* 2007; 365(2): 315-23.
- Lugovtsev V.Y., Vodeiko G.M., Levandowski R.A. Mutational pattern of influenza B viruses adapted to high growth replication in embryonated eggs. *Virus Res.* 2005; 109(2): 149-57.
- Govorkova E.A., Matrosovich M.N., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Gerdil C., Fang et al. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells. *Virology.* 1999; 262(1): 31-8.

Поступила 12.02.18

Принята в печать 06.03.18

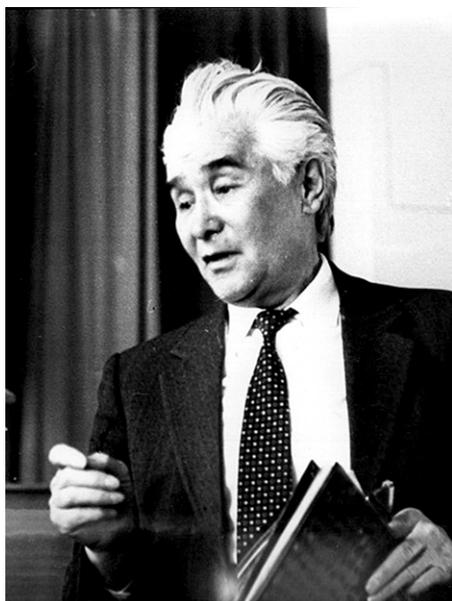
ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 616.98:578.824.11]-084:92 Селимов

Ботвинкин А.Д., Михайловский Е.М.

М.А. СЕЛИМОВ: ВКЛАД В РАЗРАБОТКУ ВОПРОСОВ ПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА, ЛИЧНОСТЬ КАК УЧЁНОГО И ЧЕЛОВЕКА (к 100-летию со дня рождения, 1918-2001)

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, г. Иркутск



13 декабря 2018 г. исполняется 100 лет со дня рождения профессора Мидата Абдурахимовича Селимова – известного специалиста в области изучения и профилактики бешенства. С именем М.А. Селимова связан важный этап в совершенствовании специфической профилактики бешенства в середине XX века, итогом которого стало значительное повышение эффективности и безопасности пастеровских прививок. Он был в числе мировых лидеров, участвовавших в разработке и внедрении в медицинскую практику антирабического гамма-глобулина и комбинированной схемы прививок. Разработка и внедрение в практику безопасных культуральных антирабических вакцин, которые успешно используются до настоящего времени, относятся к числу важнейших достижений отечественной вирусологии [1, 2].

М.А. Селимов родился в Крыму, недалеко от г. Феодосия. В 1940 г. он закончил Крымский медицинский ин-

ститут в г. Симферополе и в годы Великой Отечественной войны был военным хирургом и главным врачом госпиталя в Забайкальском военном округе. Награждён орденами и медалями. После демобилизации в 1948 г. майор медицинской службы М.А. Селимов поступил в аспирантуру Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, где в 1952 г. защитил кандидатскую диссертацию по эпидемическому паротиту. Начало 50-х годов прошлого века характеризовалось резким подъёмом заболеваемости бешенством: в то время в СССР ежегодно погибало от гидрофобии от 400 до 600 человек. М.А. Селимов, имея за плечами опыт практического врача и исследователя-вирусолога, занялся этой актуальной проблемой и добился выдающихся успехов.

Первые научные работы М.А. Селимова по бешенству, опубликованные в 1957 г., были посвящены разработке технологии получения и изучению эффективности антирабического гамма-глобулина в опытах на животных [3, 4]. В этом же году на базе Московского НИИ вакцин и сывороток (НИИВС) им. И.И. Мечникова на основе оригинальных разработок впервые был организован производственный выпуск лошадиного антирабического гамма-глобулина, подготовлено и утверждено Министерством здравоохранения СССР первое наставление по применению препарата для пассивной иммунизации людей в сочетании с вакциной. Полевые испытания комбинированных прививок с использованием гипериммунной сыворотки для специфической профилактики бешенства у людей, укушенных бешеными волками, впервые в мире были проведены в Иране в 1954 г. по программе ВОЗ. В 1957 г. в СССР с этой же целью впервые был использован очищенный антирабический гамма-глобулин. В районе г. Миоры (Республика Беларусь) в 1957 г. бешеным волком были укушены 25 человек, большинство из них имели обширные и множественные травмы лица, головы и кистей рук. До применения комбинированных прививок укушенные бешеными волками погибали в 16-70% случаев, несмотря на вакцинацию, так как инкубационный период во многих случаях был коротким, и поствакцинальный иммунитет не успевал формироваться. В Миорах была достигнута 100% защита пострадавших. Это было выдающееся достижение, получив-

шее мировое признание. Издательство «Знание» в 1967 г. выпустило книгу «Битва в Миорах» [5] об успешном использовании гамма-глобулина - только что созданного препарата для лечения бешенства, а тремя годами ранее был снят одноименный научно-документальный фильм.

В дальнейшем под руководством М.А. Селимова были проведены исследования по совершенствованию схемы прививок и подбору дозировки препарата. Эти материалы легли в основу докторской диссертации «Материалы к ликвидации заболеваемости гидрофобией», защищенной М.А. Селимовым в 1962 г. В своей первой монографии, подготовленной по материалам диссертации, он приводит результаты комбинированной иммунизации 236 человек, укушенных бешеными волками; из них погибли только двое (0,8%) [6]. Способ производства лошадиного антирабического гамма-глобулина, используемый в СССР, был опубликован в руководстве ВОЗ по бешенству. В 1957 г. серийное производство препарата было налажено в Харькове, затем в Томске и уже в XXI веке в Саратове. Потребность страны в антирабическом гамма-глобулине составляет 550 л в год [7]. Комбинированные прививки иммуноглобулином и вакциной при тяжёлых укусах используются в большинстве стран и рекомендованы Комитетом экспертов ВОЗ по бешенству [8].

Как известно, первые вакцины для профилактики бешенства, приготовленные на основе ткани мозга заражённых животных, нередко давали тяжёлые нейропаралитические осложнения, в том числе с летальными исходами. Альтернативой могли стать культуральные антирабические вакцины (КАВ), разработка которых началась в конце 50-х годов XX века в нескольких странах мира. Сообщения о первых лабораторных образцах вакцины, приготовленной в культуре клеток, были опубликованы в 1960 г. P. Fenje [9]. В 1963-1965 гг. под руководством М.А. Селимова в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов (ИПВЭ) АМН СССР были изготовлены и испытаны на животных и добровольцах первые лабораторные серии отечественной вакцины [10], а вслед за этим организовано экспериментальное и серийное производство КАВ. Приказом Министра здравоохранения СССР от 29.12.1976 вакцина Рабивак-Внуково-32 была передана в практику здравоохранения и в течение многих лет успешно применялась в СССР. Были созданы дочерние предприятия по производству КАВ в Уфе и Одессе. КАВ экспортировалась в ГДР, Чехословакию, Болгарию, несколько стран Азии, Африки и Латинской Америки. Внедрение КАВ позволило избавиться от риска тяжёлых неврологических осложнений, но оставалась проблема продолжительного курса прививок (старшее поколение ещё помнит о «пятидесяти уколах в живот»). С 1977 г. под руководством М.А. Селимова совместно с Л.Б. Эльбертом, Т.А. Аксёновой, Е.В. Ключевой, Л.Ф. Гребенча и другими сотрудниками ИПВЭ начались испытания первых серий отечественной концентрированной и очищенной культуральной антирабической вакцины (КОКАВ) из штамма Внуково-32-107 для вакцинации людей. Первые опыты показали, что по иммуногенности КОКАВ в десятки раз превосходила мозговую референс-вакцину и КАВ, сохраняя высокую иммунологическую эффективность при 5-кратной инокуляции. История разработки и результаты применения КАВ и КОКАВ представлены в монографии и ряде научных статей [11-17]. В настоящее время КОКАВ служит основным препаратом для профилактической и постэк-

спозиционной вакцинации населения против бешенства в России с потребностью около 1,5 млн доз в год [7].

Разработка препаратов для специфической профилактики бешенства была тесно связана с совершенствованием диагностики бешенства. В 1958 г. R. Goldwaser и R. Kissling [18] описали метод флюоресцирующих антител (МФА), который оказался намного эффективнее традиционных методов обнаружения теллец Бабеша - Негри. Внедрением этого метода в отечественную практику по инициативе М.А. Селимова занялась Е.В. Ключева. Уже в 1963-1967 гг. были опубликованы первые результаты и организовано экспериментальное производство флюоресцирующего гамма-глобулина [19]. В дальнейшем эти результаты были использованы при организации промышленного выпуска отечественного диагностикума для МФА в Казани, что обеспечило потребности ветеринарных лабораторий страны. В лаборатории М.А. Селимова оперативно внедрялись и совершенствовались многие другие лабораторные методы индикации, культивирования и титрования вируса. На базе лаборатории профилактики бешенства в ИПВЭ функционировал сотрудничающий с ВОЗ центр по надзору и профилактике бешенства, директором которого на протяжении многих лет был М.А. Селимов. В лаборатории проводились исследования в области эпидемиологии и природной очаговости бешенства. На основе обширной коллекции полевых изолятов лиссавирусов, накопленной за многие годы, были выполнены первые исследования по молекулярной эпидемиологии бешенства в СССР с помощью панелей моноклональных антител, переданных М.А. Селимову из США (T. Wiktor), Германии (L. Schneider) и Великобритании (A. King) [20]. В итоге были получены приоритетные результаты, подтверждённые в последующем с помощью современных методов генотипирования. Например, впервые на территории Евразии был идентифицирован летальный для человека лиссавирус, связанный с летучими мышами, сегодня известный как EBLV-1 [21, 22].

Наряду с огромным вкладом проф. М.А. Селимова в развитие отечественной рабиологии самой высокой оценки заслуживают личные качества его как учёного. Для нас, его учеников, это был человек, беззаветно преданный своему делу, уникальный специалист-рабиолог. Его отличало особое отношение к науке, более того - государственное. Он неоднократно подчёркивал: «Мы все выполняем государственный план. Это же бешенство, особо опасная инфекция, потому и изучать его нужно особенно тщательно». Такого же отношения к исследованиям он требовал и от сотрудников, что обеспечивало слаженный, чёткий рабочий режим выполнявшихся под его руководством работ. Как учёного М.А. Селимова отличали тщательность, вдумчивость, исключительная добросовестность в работе. Главное внимание уделял он новой аттенуированной антирабической вакцине, полученной в культуре экстраневральных клеток, более эффективной и безопасной, чем традиционные мозговые вакцины. При этом успевал уделять внимание всем прочим направлениям, и это обеспечивало многоплановость руководимых им исследований и их успешное выполнение.

Мидату Абдурахимовичу делала честь и его твёрдая убежденность в правильности поставленной научно-практической задачи, выбранной стратегии и тактики для её достижения. В дискуссиях с оппонентами он всегда

умел отстоять перспективность проводимых его коллективом исследований. Столь же принципиально относился он и к вопросам организации антирабической помощи населению, неустанно боролся против передачи антирабических прививок в руки некомпетентных лиц.

Итоги научно-исследовательской и организационно-методической деятельности Мидата Абдурахимовича в государственном масштабе можно оценить мудрыми словами великого азербайджанца Низами Гянджеви: «Кто дело своё начинает добром, к тому добро повернётся лицом». Он посвятил жизнь благому делу, и жизнь вознаградила его. Это многочисленные публикации М.А. Селимова, его сотрудников и учеников, выполненные на высоком научном уровне. Каждая представляет собой новое слово в отечественной рабиологии. Это уважение и благодарность сотрудников, успешно работавших под его руководством и ставших высокопрофессиональными специалистами. Они с полным правом называют его Учителем. Все они достойные и талантливые люди. Это заслуженная репутация выдающегося рабиолога нашей страны, внёсшего огромный вклад в изучение эпидемиологии рабической инфекции, разработку методов диагностики и профилактики бешенства, а также наставника и руководителя, воспитавшего целую плеяду исследователей, работающих в разных направлениях рабиологии по всей стране. Это уважение и благодарность его коллег-пастеровцев, которые получали от него ценные консультации. Это благодарность тысяч и тысяч людей, укушенных бешеными животными и спасённых от гидрофобии благодаря схемам прививок, разработанных под его руководством. За выдающиеся достижения в отечественной рабиологии профессору М.А. Селимову было присвоено почётное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Лаборатория М.А. Селимова была кузницей специалистов по бешенству для Российской Федерации и республик бывшего СССР. Под его руководством успешно защищены 4 докторских и 25 кандидатских диссертаций, систематически проводились семинары и симпозиумы, посвящённые эпидемиологии и профилактики бешенства. М.А. Селимов оставил большое научное наследие: 5 монографий, около 500 научных публикаций и большое количество нормативных и организационно-методических документов, не потерявших своей актуальности. Как специалист с колоссальным опытом он вёл большую консультативную работу с практическими врачами и уделял большое внимание вопросам организации антирабической помощи населению на государственном уровне, принципиально отстаивая взвешенный подход к назначению прививок людям, пострадавшим от укусов животных.

Необходимо время, чтобы оценить вклад учёного в развитие научного направления и практический результат его деятельности. Труды М.А. Селимова получили высокую оценку на международном уровне. Он входил в число экспертов ВОЗ по бешенству и представлял научные достижения своей страны на многих международных форумах. Его деловые связи с ведущими учёными в своей области и производителями биопрепаратов – Н. Koprowski, P. Merieux, T. Wiktor, P. Atanasiu, L. Schneider и многими другими - способствовали развитию научных исследований по бешенству в России. Впечатляют темпы и результаты внедрения науч-

ных разработок в практику здравоохранения. Сегодня отечественная промышленность обеспечивает потребность страны в антирабических препаратах на основе технологий, созданных под руководством профессора М.А. Селимова. Заболеваемость людей бешенством в СССР и Российской Федерации с 1950 по 1970 г. сократилась на порядок и поддерживается на низком уровне, несмотря на напряжённую эпизоотологическую обстановку. Следовательно, применение этих препаратов сохранило тысячи человеческих жизней. М.А. Селимов оставил о себе добрую память как врач, учитель, наставник и преданный своему делу учёный. Посвятив свою жизнь борьбе со страшной неизлечимой болезнью, он успел сделать многое для успешного развития идей Луи Пастера и по праву стал достойным продолжателем его великого дела в нашей стране. Отмечая 100-летний юбилей Мидата Абдурахимовича Селимова, хочется пожелать, чтобы его исследования были успешно продолжены.

Светлый образ Мидата Абдурахимовича Селимова – учёного, гражданина и человека навсегда останется в памяти всех, кто его знал и работал под его руководством.

Благодарность. Авторы благодарны Л.М. Селимовой за автобиографические сведения.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 8, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 22 см. REFERENCES)

- Альтштейн А.Д. Вирусология. В кн.: *Большая Российская энциклопедия. Том 5*. М.: Научное издательство; 2013.
- Селимов М.А., Дурасова М.Н., Рогозина Е.Н., Раггауз В.Г., Майорова Л.И. Об антирабическом гамма-глобулине. Сообщение I. Получение и фракционирование иммунной антирабической сыворотки. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1957; 34(7): 28-32.
- Селимов М.А., Ковалевский М.Ф., Семёнова Е.В. Об антирабическом гамма-глобулине. Сообщение II. Изучение эффективности антирабического гамма-глобулина в опытах на животных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1957; 34(9): 35-41.
- Лин А. *Битва в Миорах*. М.: Знание; 1967.
- Селимов М.А. Пути ликвидации гидрофобии. М.: Медгиз; 1963.
- Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Писцов М.Н. и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период с 2002-2015 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (3): 27-32.
- Селимов М.А., Аксенова Т.А., Семенова Е.В. Изучение антигенной активности и безвредности культуральной антирабической вакцины в опытах на добровольцах. *Вопросы вирусологии*. 1967; 12(1): 36-41.
- Селимов М.А., Эльберт Л.В., Аксенова Т.А., Ключева Е.В., Грибенча Л.Ф., Кондратьева Н.А. Антигенная активность концентрированной и очищенной культуральной антирабической вакцины из штамма Внуково-32-107. *Вопросы вирусологии*. 1977; 22(5): 581-5.
- Селимов М.А., Ключева Е.В., Аксенова Т.А., Лебедева И.Р., Грибенча Л.Ф., Любимова Г.В. и др. Лечение инактивированной вакциной и антирабическим гамма-глобулином людей, укушенных бешеными или подозрительными на бешенство волками. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1978; 55(12): 105-12.
- Селимов М.А. Прошлое, настоящее и будущее специфической профилактики гидрофобии (к 100-летию первой пастеровской антирабической прививки). *Вопросы вирусологии*. 1986; 31(3): 370-3.
- Селимов М.А. *Бешенство*. М.: Медицина; 1978.
- Ключева Е.В., Семёнова Е.В., Селимов М.А. О диагностической ценности метода флуоресцирующих антител при бешенстве. *Вопросы вирусологии*. 1966; 11(3): 278-82.
- Селимов М.А., Ботвинкин А.Д., Татаров А.Г. Идентификация

штаммов сивлятического и арктического бешенства с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии*. 1983; 28(3): 243-4.

REFERENCES

1. Lvov D.K. Centenary of Virology. In: Mahy B.W.J., D.K. Lvov., eds. *Concept in Virology from Ivanovsky to the Present*. Amsterdam.: Harwood Academic Publishers; 1993.
2. Altstein A.D. Virology. In: *The Great Russian Encyclopedia. Volume 5 [Bol'shaya Rossiyskaya entsiklopediya. Tom 5]*. Moscow: Nauchnoe izdatel'stvo; 2013. (in Russian)
3. Selimov M.A., Durasova M.N., Rogozina E.N., Ratgauz V.G., Mayorova L.I. Anti-rabies gamma globulin. I. Obtaining and fractionation of immune antirabies serum. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1957; 34(7): 28-32. (in Russian)
4. Selimov M.A., Kovalevskii M.F., Semenova E.V. Anti-rabies gamma globulin. II. Studies on the effectiveness of anti-rabies gamma globulin in experimental animals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1957; 34(9): 35-41. (in Russian)
5. Lin A. Battle in the Miors. Moscow: Znanie; 1967. (in Russian)
6. Selimov M.A. *The Ways to Elimination of Hydrophobia [Puti likvidatsii gidrofobii]*. Moscow: Medgiz; 1963. (in Russian)
7. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Pistsov M.N., et al. Epidemiological situation and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2017; (3): 27-32. (in Russian)
8. WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO technical report series 982. Available at: http://www.arriah.ru/sites/default/files/private/books/who-expert-consultation-rabies-2013/who_technical_report_2nd_on_rabies_2012_eng.pdf
9. Fenje P. A rabies vaccine from hamster kidney tissue cultures: preparation and evaluation in animals. *Can. J. Microbiol.* 1960; 6: 605-9.
10. Selimov M.A., Aksenova T.A., Semenova E.V. Study of the antigenic activity and harmlessness of cultured rabies vaccine in experiments on volunteers. *Voprosy virusologii*. 1967; 12(1): 36-41. (in Russian)
11. Mikhailovsky E.M., Selimov M.A. Adaptation of street rabies virus to primary Syrian hamster kidney cell culture. *Acta Virol.* 1966; 10(4): 373.
12. Selimov M.A., El'bert L.V., Aksenova T.A., Klyueva E.V., Gribencha L.F., Kondrat'eva N.A. Antigenic activity of a concentrated and purified cultured antirabies vaccine from the Vnukovo-32-107 strain. *Voprosy virusologii*. 1977; 22(5): 581-5. (in Russian)
13. Selimov M.A., Klyueva E.V., Aksenova T.A., Lebedeva I.R., Gribencha L.F., Lyubimova G.V. Treatment of inactivated cultured antirabies vaccine and antirabies gamma-globulin of persons bitten by rabid wolves or those suspected of being rabid. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1978; 55(12): 105-12. (in Russian)
14. Klueva E.V., Frolova M.P., Kulikova L.G., Krapivina M.N. Antigenic comparison of Yuli and Vnukovo-32 virus strains in monkeys: specific protection by commercial anti-rabies preparations. *Acta Virol.* 1991; 35(5): 423-9.
15. Selimov M.A. Past, present and future of the specific prophylaxis of hydrophobia (on the Centenary of the 1st Pasteur antirabies inoculation). *Voprosy virusologii*. 1986; 31(3): 370-4. (in Russian)
16. Selimov M.A., Toigombaeva V.S., Zgurskaya G.N., Kulikova L.G., Kodkind G.Kh. Specific activity of tissue culture rabies vaccine Rabivak-Vnukovo-32 with short intramuscular vaccination schedule. *Acta Virol.* 1988; 32(3): 217-26.
17. Selimov M.A. *Rabies [Beshenstvo]*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
18. Goldwaser R.A., Kissling R.E. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958; 98(2): 219-23.
19. Klyueva E.V., Semenova E.V., Selimov M.A. On the diagnostic value of the fluorescent antibody technique in rabies. *Voprosy virusologii*. 1966; 3:278-82. (in Russian)
20. Selimov M.A., Botvinkin A.D., Tatarov A.G. Identification of strains of sylvatic and arctic rabies using monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii*. 1966; 11(3): 278-82. (in Russian)
21. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khristmatullina N.A. Rabies-related Yuli virus: identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33(6): 542-6.
22. Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623-5.

Гурцевич В.Э., Мазуренко Н.Н.

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА НИКОЛАЯ ПЕТРОВИЧА МАЗУРЕНКО (1919–1984 гг.)

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478,
г. Москва



6 января 2019 г. исполняется 100 лет со дня рождения одного из основоположников онковирусологии в нашей стране, выдающегося онковирусолога своего времени, учёного с мировым именем Николая Петровича Мазуренко. Более 60 лет назад, в 1957 г. Н.П. Мазуренко открыл способность некоторых инфекционных вирусов активировать у млекопитающих онкогенный вирус, находящийся в латентном состоянии, и выделил один из первых в мире онкогенных ретровирусов. Позже это открытие было зарегистрировано под названием «Явление индукции опухолей у млекопитающих неонкогенными вирусами (вирусо-вирусный ко-канцерогенез)».

В 1936 г. после окончания средней школы в г. Кировограде (Украина) Н.П. Мазуренко поступил в Военно-медицинскую академию им. С.М. Кирова, где рано проявил интерес к научным исследованиям в области инфекционной патологии на кафедре микробиологии под руководством проф. В.М. Аристовского. Первые научные работы по микробиологии, написанные им в 1938–1939 гг., оказались актуальными и были опубликованы в 1943 г., когда автор считался без вести пропавшим. В 1939 г. Н.П. Мазуренко участвовал во второй дальневосточной

экспедиции по изучению вируса весенне-летнего клещевого энцефалита в отряде академика Е.Н. Павловского. В 1940 г. он впервые начал изучать действие ультрафиолетовых лучей на вирус дальневосточного энцефалита (штамм «Софьин», выделенный Л.А. Зильбером) и показал возможность приготовления вакцины. В феврале 1941 г. результаты этих пионерских исследований были доложены на заседании научного общества ВМА, работа была готова к публикации, но началась война.

В июне 1941 г. военврач Н.П. Мазуренко направлен на Западный фронт в качестве командира медсанроты 57-й дивизии 20 танковой армии и участвовал в обороне Смоленска. В августе 1941 г. под Вязмой раненым попал в плен и находился в лагерях для военнопленных на территории Польши и Румынии до освобождения частями Советской Армии в 1944 г. В экстремальных условиях фашистского плена проявились такие черты его характера, как мужество, стойкость духа, он постоянно оказывал врачебную помощь военнопленным. Рискуя жизнью, собрал данные о заболеваемости и смертности от голода и инфекций 80% советских солдат в немецком плену зимой 1941–1942 гг. Эти данные позже были переданы в Государственную комиссию по расследованию преступлений фашистов. В 1944–1946 гг. Н.П. Мазуренко работал в Молдавии главным врачом районной больницы, которую поднял из руин и сделал одной из лучших в республике, за что бывший военнопленный был награждён медалью «За доблестный труд в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.» и представлен к награждению знаком «Отличник здравоохранения».

Н.П. Мазуренко удалось вернуться к научной работе лишь осенью 1946 г. в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского в лаборатории профессора Л.А. Зильбера, где он продолжил изучение свойств ранее созданных им ультрафиолетовых вакцин против вирусов дальневосточного и шотландского энцефалитов. В частности, он доказал «факт специфического действия монохроматического света с длиной волны 2537Å, который, избирательно действуя на нуклеиновые кислоты, приводит к инактивации вируса в таких дозах, которые не ведут к денатурации белка». Эффективность полученных ультрафиолетовых вакцин в десятки раз превышала эффективность формолвакцин и вакцин, полученных нагреванием. Эти результаты легли в основу кандидатской диссертации «О действии ультрафиолетовых лучей на вирусы энцефалитов», которую Н.П. Мазуренко блестяще защитил в апреле 1948 г.

В 1948–1953 гг. Н.П. Мазуренко руководил лабораторией биотерапии рака в Харьковском рентгенорадиоло-

гическом институте, а в 1953–1961 гг. – лабораторией вирусологии в Киевском научно-исследовательском институте эпидемиологии, микробиологии и паразитологии. Все эти годы Н.П. Мазуренко вёл поиски направленных исследований, имеющих практическое применение в онкологии. В 1948–1949 гг. он предложил «биофизическую реакцию для диагностики злокачественных опухолей на основе изучения нуклеопротеидов», а в 1951–1957 гг. проводил работы, нацеленные на получение противоопухолевых препаратов.

В 1956 г. Н.П. Мазуренко впервые вызвал лейкоз у 20% мышей низкорактовой линии СС57Вг путём введения им в раннем возрасте вирусов осповакцины и гриппа. В этих экспериментах Н.П. Мазуренко исследовал высказанную им ранее гипотезу, согласно которой «специфические опухолеродные вирусы могут быть активированы не только бластомогенными веществами, лучистой энергией, но и при определённых условиях инфекционными вирусами». Выделенный из лейкозной ткани мышей вирус был подробно изучен и охарактеризован. Он представлял собой специфический вирус, вызывавший у мышей гемоцитобластоз-ретикулёз и оказался первым, открытым в нашей стране, и одним из первых в мире онкогенных ретровирусов.

В 1961 г. в Москве на заседании Учёного совета АМН СССР Н.П. Мазуренко блестяще защитил докторскую диссертацию «Вирусный гемоцитобластоз-ретикулёз мышей, индуцированный некоторыми инфекционными вирусами» и по приглашению академика Н.Н. Блохина в 1962 г. возглавил лабораторию вирусологии лейкозов в Институте экспериментальной и клинической онкологии. После доклада на VIII съезде Международного противоракового союза (UICC) в Москве в 1962 г. новый вирус получил международное признание и был назван именем автора.

В последующие годы в возглавляемой Н.П. Мазуренко лаборатории продолжалось сравнительное изучение свойств ряда лейкоэмических вирусов мышей и лейкозов, ими вызываемых. В ходе этих исследований показано, что вирус Мазуренко чётко отличается от вирусов Гросса, Граффи, Френд, Раушера и Молони. Подтверждая справедливость своего открытия на других моделях, Н.П. Мазуренко с сотрудниками показали возможность существенной активации *in vitro* вируса лейкоза мышей Френд и Молони вирусами гриппа, Сендай и простого герпеса. Обнаружено также трёхкратное увеличение частоты возникновения лимфомы Марека у цыплят, контактно инфицированных вирусом герпеса болезни Марека и одновременно или предварительно инфицированных внутримышечно слабоонкогенным ретровирусом RAV-49.

В 1967 г. Н.П. Мазуренко с коллегами впервые описали возможность фенотипического смешивания вирусов лейкозно-саркоматозного комплекса, принадлежащих животным разных видов – млекопитающим и птицам. Используя оригинальную методику, была показана возможность приобретения дефектным вирусом саркомы кур (RVA-2) оболочки вируса лейкоза мышей Мазуренко и приобретения первым вирусом онкогенных потенций, позволяющих ему вызывать развитие саркомы у мышей, в то время как вирус Мазуренко таким свойством не обладал. Таким образом, была показана возможность преодоления онкорнавирусами видоспецифического барьера резистентности и открыт феномен «спасения» дефектных саркоматозных вирусов. Эти исследования

оказались пионерскими и только через 10 лет были повторены в США.

В начале 1970-х годов в сферу интересов Н.П. Мазуренко попал высокоинфекционный и высокопатогенный вирус герпеса кур, открытый в 1967 г. и названный вирусом болезни Марека (ВБМ). Последний вызывал у кур развитие лимфом в виде эпизоотий, причиняя ежегодно огромный материальный ущерб птицеводствам многих стран мира, включая СССР. Для онковирусологов ВБМ и индуцируемая им злокачественная опухоль представляют особый интерес, являясь удобной естественной моделью для изучения механизмов канцерогенеза, ассоциированного с герпесвирусами. Кроме того, появилась возможность приготовить высокоспецифичную и высокоактивную вакцину против лимфомы Марека как возможный прообраз вакцины против опухолей человека, индуцированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Для изучения этой проблемы на базе Всесоюзного онкологического научного центра в начале 1970-х гг. создано единственное в СССР хозяйство безлейкозных кур, эмбрионы которых были необходимым субстратом для приготовления безлейкозной вакцины против лимфомы Марека. В результате проведённых исследований получены 2 типа отечественной вакцины против лимфомы Марека. Одна из них – на основе штамма FC-126 вируса герпеса индеек, показала высокую (50–90%) эффективность при испытании на сотнях тысяч цыплят в 7 птицеводствах. Вторая вакцина получена путём аттенуации *in vitro* патогенного штамма ВБМ-Кекава, который стал не патогенен для цыплят (штамм депонирован во Всесоюзном государственном научном контрольном институте). В отличие от вакцины, приготовленной из вируса герпеса индеек, аттенуированная вакцина препятствовала репродукции патогенного ВБМ в эпителии перьевых фолликул. К сожалению, из-за нездоровых конкурентных межведомственных отношений созданные под руководством профессора Н.П. Мазуренко вакцины не были запущены в промышленное производство.

Начиная с 1974 г. в лаборатории стали проводиться интенсивные исследования по изучению ассоциации герпесвируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) со злокачественными новообразованиями человека. В СССР эти исследования проводились впервые. Была подтверждена этиологическая роль ВЭБ в возникновении инфекционного мононуклеоза и недифференцированного гистологического варианта рака носоглотки (НРНГ), выявлена высокая степень ассоциации вируса с определёнными гистологическими вариантами лимфомы Ходжкина (ЛХ). Был разработан и внедрён в клиническую практику метод дифференциальной диагностики рака носоглотки, основанный на иммунофлуоресцентном анализе титров и спектра ВЭБ-специфических антител. Метод оказался чрезвычайно полезным для ранней диагностики НРНГ, а также дифференциальной диагностики НРНГ у больных с метастазами в лимфатические узлы шеи без первично выявленного очага опухоли.

Исследования по изучению ВЭБ, инициированные Николаем Петровичем, активно продолжают в лаборатории вирусного канцерогенеза ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и в настоящее время, но уже на молекулярном уровне. Для совершенствования диагностики патологий, ассоциированных с ВЭБ, в дополнение к серологическому тестированию был применён так называемый метод жидкостной биопсии, основанный на многократном ПЦР-тестировании уровней ДНК ВЭБ

в плазме крови больных, позволяющий кроме ранней диагностики своевременно оценивать эффективность терапии и предсказывать прогноз. Но основное внимание уделяется изучению структурно-функциональных особенностей вариантов латентного мембранного белка 1 (LMP-1), основного онкогена ВЭБ, у больных с ВЭБ-ассоциированными новообразованиями, такими как нРНГ, ЛХ, ВЭБ-ассоциированная форма рака желудка и др. Анализируется возможная ассоциация определённых мутаций этого гена с клиническими проявлениями болезни, например рецидивом, метастазированием. Исследуется также влияние LMP-1 на сигнальные пути, участвующие в процессе канцерогенеза. Изучаются варианты LMP-1 и у здорового населения страны, в частности у представителей различных этнических групп, с целью выявления доминирования варианта онкогена, влияющего на уровни заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями. Кроме работ, посвящённых ВЭБ, в лаборатории проведены циклы исследований, посвящённые изучению вируса Т-клеточного лейкоза, вируса саркомы Капоши, эндогенных ретровирусов человека и их ассоциации с герминогенными опухолями человека и т.д.

Профессор Николай Петрович Мазуренко более 40 лет своей жизни посвятил вирусологии опухолей и был одним из крупнейших вирусологов-онкологов своего времени. Он являлся национальным куратором международной программы «Вирусный канцерогенез» и был председателем Всесоюзной проблемной комиссии по вирусологии и иммунологии опухолей. Н.П. Мазуренко опубликовал свыше 230 научных работ, подготовил большое число кандидатов и докторов наук. Он был энтузиастом и романтиком науки, отличался широтой и независимостью научного мышления, стремился к проведению поисковых исследований, старался привлекать

к этому молодых и энергичных учёных, владеющих современными методами. По его инициативе на основе лаборатории вирусного канцерогенеза в 1978 г. создана лаборатория молекулярной биологии вирусов, которую возглавил проф. Ф.Л. Киселёв. В дальнейшем от неё «отпочковалась» лаборатория регуляции вирусных и клеточных онкогенов, которую возглавил доктор биологических наук А.Г. Татосян.

Научная деятельность Николая Петровича Мазуренко получила широкое признание как у нас в стране, так и за рубежом. В 1964 г. его монография «Роль вирусов в этиологии лейкозов» была удостоена премии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, ему присвоено звание заслуженного деятеля науки РСФСР. Научные заслуги Николая Петровича Мазуренко отмечены высшей наградой Академии наук Чехословакии – почётной золотой медалью им. Пуркинье «За выдающиеся заслуги перед наукой и человечеством».

Привлекательной чертой Николая Петровича как личности было повышенное чувство справедливости, принципиальности, которое неизменно присутствовало при решении любых вопросов и на любом уровне. В жизни Николай Петрович был сердечным и отзывчивым человеком, любил жизнь и природу, был страстным охотником и рыбаком, прекрасным шахматистом, хорошо знал и любил историю и литературу. Николай Петрович был оптимистом и, несмотря на нелёгкий жизненный путь, не без основания считал себя счастливым человеком. Жизнь Николая Петровича Мазуренко может служить примером стойкости, принципиальности и бескомпромиссности большого учёного, его исследования внесли большой вклад в онковирусологию и значительно обогатили наши знания об опухолях и вирусах, их вызывающих.

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ «ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ» в 2018 г.

ОБЗОРЫ

Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (часть I) 3, 106-114

Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (Часть 2) 4, 149-159

Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия цитомегаловирусной инфекции человека: клиническая эффективность, молекулярный механизм действия, лекарственная устойчивость, новые тенденции и перспективы. Часть 1. 5, 202-211

Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия цитомегаловирусной инфекции человека: клиническая эффективность, молекулярный механизм действия, лекарственная устойчивость, новые тенденции и перспективы. Часть 2. 6, 250-260

Борисевич С.В., Стовба Л.Ф., Павельев Д.И. Оспа белок (Poxviridae, Chordopoxvirinae, SQPV – squirrel poxvirus) 2, 53-57

Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов 1, 10-18

Костюшев Д.С., Зуева А.П., Брезгин С.А., Липатников А.Д., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. Роль ДНК-метилтрансфераз в жизненном цикле вируса гепатита В и патогенезе хронического гепатита В 1, 19-29
Лашкевич В.А., Карганова Г.Г. О современных подходах к созданию одноразовой вакцины против клещевого энцефалита 3, 101-105

Львов Д.К., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Гигантские вирусы: происхождение, распространение, таксономические, структурно-морфологические и молекулярно-биологические характеристики 1, 5-10

Львов Д.К., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Плазмиды архей как возможные предки ДНК-содержащих вирусов 5, 197-201

Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Василева А.Д., Еропкин М.Ю. Проблемы выделения, идентификации и антигенного анализа современных вирусов гриппа А(Н3N2) 4, 160-164

Сизикова Т.Е., Борисевич Г.В., Щепляков Д.В., Бурмистрова Д.А., Лебедев В.Н. Использование моноклональных антител для лечения заболевания, вызванного вирусом Эбола 6, 245-249

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Карулина Н.В., Борисевич С.В. Вирус Ллови – новый филовирин, эндемичный для Европы 2, 58-61

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Блохина Е.А., Равин Н.В. Конструирование мозаичных НВс-частиц, несущих консервативные участки М2-белка и гемагглютинина вируса гриппа А 3, 130-135

Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири 4, 185-191

Глотова Т.И., Семенова О.В., Никонова А.А., Глотов А.Г., Вяткин Ю.В., Бондарь А.А. Выделение и филогенетический анализ калицивируса кошек в Сибири 6, 268-274

Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Макаров В.В., Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Забережный А.Д., Полякова И.В., Южаков А.Г. Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области 3, 115-123

Дёмина Т.В., Козлова И.В., Ткачёв С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Савинова Ю.С., Сунцова О.В., Верховина М.М., Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., Киселёв Д.О., Злобин В.И. Определение и сравнительный анализ геномной структуры сибирских штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа 1, 29-36

Иванова Э.С., Воробьёва Н.Н., Шелудько В.С. Опыт применения никавира в схемах перинатальной химиопрофилактики ВИЧ-инфекции: оценка иммунологической и вирусологической эффективности 5, 212-217

Карпова Л.С., Волик К.М., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Соминина А.А., Бурцева Е.И. Особенности эпидемического процесса при гриппе А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2) в России с 2009 по 2017 годы 4, 177-184

Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Ярыгина Е.И., Куц А.А. Мезенхимальные стволовые клетки: усиление иммунного ответа и защита мышей от летальной герпесвирусной инфекции 6, 261-267

Кондратова В.Н., Ломаев М.В., Игнатова А.В., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В., Мудунов А.М., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Сенюта Н.Б. Вирус Эпштейна-Барр и рак носоглотки: вирусные маркеры для диагностики и оценки клинического статуса больных 2, 77-84

Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Костюшева А.П., Липатников А.Д., Смирский В.Н., Мамонова Н.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. Усиление образования фокусов фосфорилированного гистона H2AX в ядрах клеток при инфекции вирусами гепатита В и D 4, 165-170

Криворотченко Ю.Л., Носик Д.Н., Малыгина В.Ю., Лобач О.А., Андроновская И.Б., Кирсанова М.А., Гришковец В.И. Цитотоксические свойства тритерпенового сапонина таурозиды Sx1 и его воздействие на ВИЧ-1 и гриппозную инфекцию у мышей 3, 123-129

Куприянов В.В., Николаева Л.И., Зыкова А.А., Махновский П.И., Котляров Р.Ю., Васильев А.В., Равин Н.В. Иммуногенные свойства рекомбинантных мозаичных белков на основе антигенов NS4A и NS4B вируса гепатита С 3, 138-143

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 - СВ 20М вируса бешенства 5, 224-232

Львов Д.К., Бурцева Е.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., Мукашева Е.А., Трушаква С.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Гарина Е.О., Федякина И.Т., Аристова В.А., Вартамян Р.В., Кистенёва Л.Б., Дерябин П.Г., Прилипов А.Г., Росаткевич А.Г., Бреслав Н.В., Кружкова И.С., Белая А.Л., Аксельрод Э.В., Садыкова Г.К., Шляпкина О.В., Базарова М.В., Десяткин А.В. Дрейфовая изменчивость вируса гриппа А(Н3N2): биологические, антигенные и генетические свойства в эпидемическом сезоне 2016-2017 гг. в России и странах Северного полушария 2, 61-68