

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Scopus, Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, 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

Зав. редакцией *Т.М. Курушина*
E-mail: vopr.virusol@mail.ru

Вёрстка *Е.М. Архипова*

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

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2019. Т. 64. № 3. 97-144.

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

Учредители: **ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Общероссийская общественная организация «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

3

Том 64 · 2019

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)

Founders: Central Research Institute of Epidemiology,
Russian Scientific Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists

VOPROSY VIROLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 64 • 3 • 2019

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)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan, Russia)

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Advisory Board

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.** Трансгенные комары как средство против распространения арбовирусных инфекций 101

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Останкова Ю.В., Семёнов А.В., Зуева Е.Б., Тотolian Арег А.** Выявление и молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов в Архангельске. 105
- Кирьянов С.А., Левина Т.А., Поляков А.П., Ребрикова И.В., Мурашко Д.А., Коноплева М.В., Семенов Т.А., Суслов А.П.** Выявление геномной ДНК вируса Эпштейна–Барр в тканях рака слизистой оболочки полости рта российских пациентов 112
- Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Тоджибаев У.А., Калашникова А.А.** Аллокин-альфа – новые подходы к лечению хронической вирус Эпштейн-Барр инфекции. 118
- Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И.** Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. 125
- Усольцева П.С., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Новосёлов А.В.** Роль неонатального FC рецептора в депротенизации вирусов ECHO и Коксаки A9 132
- Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.** Идентификация I- и E- генотипов ротавируса А с использованием мультиплексной ПЦР 140

CONTENTS

REVIEWS

- Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisovich S.V.** The use of transgenic mosquitoes for prevention of spread of arboviral diseases

ORIGINAL RESEARCH

- Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian Areg A.** Identification and molecular-genetic characteristics of the hepatitis B virus among HIV-infected patients in Arkhangelsk
- Kiryaynov S.A., Levina T.A., Polyakov A.P., Rebrikova I.V., Murashko D.A., Konopleva M.V., Semenov T.A., Suslov A.P.** Detection of Epstein-Barr virus genome in oral cavity squamous cell carcinoma samples of russian patients
- Rakitiyanskaya I.A., Riabova T.S., Todzhibaev U.A., Kalashnikova A.A.** Allokin-alpha – new approaches in the treatment of chronic virus Epstein-Barr infections
- Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I.** Antiviral effect of «Kagocel» substance *in vitro* on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2
- Usoltseva P.S., Alimov A.V., Rezaykin A.V., Sergeev A.G., Novoselov A.V.** The role of the neonatal FC receptor in the uncoating of echoviruses and coxsackievirus A9
- Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.** Identification of rotavirus I- and E-genotypes by multiplex PCR method

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Онищенко Г.Г.^{1,2}, Сизикова Т.Е.³, Лебедев В.Н.³, Борисевич С.В.^{2,3}

ТРАНСГЕННЫЕ КОМАРЫ КАК СРЕДСТВО ПРОТИВ РАСПРОСТРАНЕНИЯ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), 119435, г. Москва, Россия;

²Российская академия наук, 109240, г. Москва, Россия;

³ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России, 141306, г. Сергиев Посад, Россия

Комары рода *Aedes* являются векторами передачи таких арбовирусных заболеваний, как жёлтая лихорадка, лихорадка денге, Чикунгунья, Западного Нила, Зика. Существуют две основные стратегии генетического контроля популяций комаров: SIT (Sterile Insect Technique) – стерилизация, которая использует главным образом методы супрессии для создания самоподдерживающихся генетических систем, и RIDL (Release of insects carrying of a Dominant Lethal) – создание популяций насекомых, несущих доминантные летальные гены, основанное на методах генного переноса и создания самоограничивающихся генетических систем. Стратегия RIDL более дорогостоящая, но имеет несколько важных преимуществ по сравнению с SIT. Полевые испытания систем генетического контроля проводятся в различных странах начиная с 2009 г.

В обзоре рассмотрены генетический контроль, трансгенные технологии для обеспечения стерилизации, генетическая элиминация и трансформация комаров рода *Aedes*.

Ключевые слова: обзор; комары *Aedes*; трансгенные комары; SIT; RIDL; генетический контроль; трансгенные технологии; стерилизация; генетическая элиминация.

Для цитирования: Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Трансгенные комары как средство против распространения арбовирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 101-104.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-101-104>

Onishchenko G.G.¹, Sizikova T.E.², Lebedev V.N.², Borisevich S.V.²

THE USE OF TRANSGENIC MOSQUITOES FOR PREVENTION OF SPREAD OF ARBOVIRAL DISEASES

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119435, Russian Federation;

²Russian Academy of Sciences, Moscow, 109240, Russian Federation;

³48 Central Scientific Research Institute, Sergiev Posad, 141306, Russian Federation

The mosquitoes of *Aedes* genus are the most important vector such arboviral diseases as dengue, yellow, Chikungunya, West Nile and Zika fevers. Work is currently in progress to control the transmission of agents of these diseases by forming of transgenic mosquitoes in order to altering the capacity of wild mosquitoes to support of virus replication. There are two main strategies of genetic control of mosquitoes population. Sterile Insect Technique (SIT), that mainly uses population suppression methods for making self-sustaining genetic systems and Release of insects carrying of a Dominant Lethal (RIDL) that uses mainly gene transfer methods for making of self-limiting genetic systems. The RIDL is more expensive, but it has some significant preferences, according compares with SIT. The field trials of genetic control methods are conducted in several countries from 2009 to present time. Genetic control, transgenic technologies to induce sterility, genetic elimination and stable transformation of *Aedes* mosquitoes are viewed in this review.

Keywords: review; *Aedes* mosquitoes; transgenic mosquitoes; SIT; RIDL; Genetic control; transgenic technologies; sterility; genetic elimination.

For citation: Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The use of transgenic mosquitoes for prevention of spread of arboviral diseases. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3):101-104. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-101-104>

For correspondence: Sergey V. Borisevich, Doctor of Biology, Professor, 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>

Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 14 October 2018

Accepted 02 April 2019

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

Введение

Арбовирусные инфекции, переносимые комарами, распространены повсеместно и характеризуются различными симптомами, включая лихорадку, воспаление мозговых оболочек, системное поражение слизистых оболочек и лимфаденопатию.

В настоящее время из этой группы инфекций наибольшие проблемы для здравоохранения представляют жёлтая лихорадка, лихорадка денге, Чикунгунья, Западного Нила, Зика. Особую опасность представляет лихорадка денге, в мире ежегодно регистрируют от 50 до 400 млн случаев заболевания [1]. В настоящее время группа риска включает почти 1/3 населения земли. Стоимость ущерба, наносимого лихорадкой денге только в США, ежегодно составляет от 1 до 4 млрд долларов [2].

В последнее время пристальное внимание привлекает расширение ареала распространения лихорадок Зика и Чикунгунья.

Вирус Зика близкородственен другим флавивирусам, представляющим опасность для здравоохранения, в том числе вирусам денге, жёлтой лихорадки и Западного Нила [3, 4]. Вирус Зика – арбовирус, передаваемый комарами рода *Aedes*. Энзоотический цикл вируса включает естественный (низшие приматы как резервуар, комары рода *Aedes*: *A. aegypti*, *A. albopictus*) как вектор) и городской (человек как резервуар, комары как вектор передачи) циклы [5].

С учётом того, что вирус Зика способен передаваться комарами *A. aegypti* и *A. albopictus*, вероятным регионом распространения возбудителя может быть весь тропический, субтропический пояс, а с учётом глобального потепления и регионы, расположенные на более высоких географических широтах.

Вирус Зика отнесён к эмерджентным вирусам [6]. Для последних характерно волнообразное распространение, определяемое изменениями в окружающей среде, трансформацией экосистем, снижением финансируемых систем здравоохранения, спонтанным появлением вирулентных штаммов возбудителей вследствие генетической изменчивости. Данные факторы могут активно воздействовать на расширение ареала распространения возбудителя [7, 8].

Вирус Чикунгунья является возбудителем арбовирусной инфекции (вектор передачи – комары рода *Aedes* [9]), характеризующейся лихорадкой, миалгией, артралгией, сыпью, гипертонией и интенсивной астенией [10]. Возбудитель был выделен в Танзании в 1952 г. из сыворотки крови больного мужчины. В дальнейшем описаны небольшие эпидемические вспышки в отдельных районах Африки и Азии. Ситуация коренным образом изменилась к концу 2004 г., когда началась первая крупная вспышка лихорадки Чикунгунья. С тех пор количество людей, инфицированных вирусом Чикунгунья, исчисляется миллионами. Масштабные эпидемии заболевания отмечены в некоторых регионах Африки, Азии, а также в тропических районах Северной, Центральной и Южной Америки [11]. Таким образом, произошёл пересмотр роли вируса Чикунгунья от возбудителя, вызывающего локальные вспышки в ограниченных регионах, до этиологического агента заболевания, представляющего угрозу для здравоохранения многих стран мира, обуславливающую необходимость разработки современных средств диагностики, профилактики и лечения.

Для рассмотренных арбовирусных заболеваний эффективная вакцина существует только против жёлтой

лихорадки. В отношении других заболеваний эффективные средства профилактики и лечения отсутствуют.

При отсутствии эффективных средств профилактики и лечения основные усилия в борьбе с распространением заболевания направлены на вектор передачи инфекции, комаров вида *A. aegypti*. Однако существующие методы борьбы с распространением насекомых малоэффективны. В этой связи необходима разработка новых эффективных методов, направленных на многочисленные элементы процесса размножения комаров, на которые можно воздействовать естественным или искусственным путём.

Отношения комаров с возбудителями арбовирусных инфекций – специфический вариант симбиоза, закономерности которого выявлены на популяционном уровне.

Генетические методы борьбы с векторами передачи возбудителей инфекционных заболеваний можно условно разделить на 2 группы [12–14].

Первая группа методов предусматривает введение в исходную популяцию переносчиков генетического элемента, нарушающего её идентичность, постепенное повышение частоты этого элемента внутри популяции и распространение модифицированной популяции. Эта генетическая система является самоподдерживающейся.

Вторая группа методов предусматривает создание в исходной популяции переносчиков дополнительных барьеров, препятствующих увеличению её численности. Эта генетическая система является самоограничивающейся.

Наиболее известной стратегией первого направления является стерилизация насекомых (Sterile Insect Technique, SIT), предусматривающая стерилизацию самцов комаров, что приводит к снижению уровня оплодотворения самок и, как следствие, к уменьшению численности популяции переносчиков [15]. На первых этапах использования метода стерилизация достигалась за счёт ионизирующего облучения. Облучённых комаров выпускали в окружающую среду, при скрещивании стерилизованных особей с комарами дикого типа потомства не образуется, в результате численность природной популяции насекомых резко сокращается [16, 17].

Важное преимущество указанного метода – его безопасность для окружающей среды. К недостаткам можно отнести необходимость использования радиоактивных изотопов кобальта, при отсутствии эффективного метода разделения комаров по половому признаку (в окружающую среду выпускают и самцов, и самок). Однако даже стерилизованные самки комаров способны передавать возбудитель в процессе кровососания. Поэтому данный метод наиболее эффективен при выпуске в окружающую среду только самцов комаров.

Другим методическим подходом является снижение численности популяции насекомых за счёт инфицирования последних внутриклеточными бактериями рода *Wolbachia*, индуцирующие форму бесплодия, известную как цитоплазматическая недостаточность, при которой яйца неинфицированных самок, оплодотворённые спермой инфицированных комаров, не развиваются [18–20]. Основанный на этом метод Incompatible Insect Technique (ITT) может быть использован при проведении SIT [15, 17, 21].

Вторую группу методов представляют исследования по созданию самоограничивающихся генетических систем, направленных на создание в исходной популяции переносчиков дополнительных барьеров, препятствующих

Полевые испытания генетических методов снижения численности популяций насекомых [12, 13, 23, 27–29]

Место проведения испытаний	Начало проведения испытаний	Испытуемый объект	Результат испытаний
Каймановы острова	2009–2010 гг.	Штамм OX513A комаров <i>A. aegypti</i>	Снижение численности комаров данного вида в месте проведения испытаний
Малайзия	2010 г.	Штамм OX513A комаров <i>A. aegypti</i>	Снижение численности комаров данного вида в месте проведения испытаний
Французская Полинезия	2010 г.	Самцы комаров <i>A. polynesiensis</i> , инфицированных штаммом <i>Wolbachia</i> из комаров <i>Ae. riversi</i>	Снижение численности комаров <i>A. polynesiensis</i> в месте проведения испытаний
Бразилия	2011 г.	Искусственное поддержание в природе самцов штамма OX513A комаров <i>A. aegypti</i>	Снижение численности комаров данного вида в месте проведения испытаний
Австралия	2011 г.	Ввод в популяцию комаров <i>A. aegypti</i> (самцов и самок), инфицированных штаммом <i>Wolbachia</i>	Влияние на популяцию диких комаров пока не установлено
Вьетнам	2011 г.		

ших увеличению её численности. Одним из таких приёмов является создание популяций насекомых, несущих доминантные летальные гены (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, RIDL) [15].

В настоящее время проводятся исследования по генетической модификации комаров *A. aegypti* с целью изменения их способности участвовать в репликации данных вирусов. Чтобы внедрить в геном насекомого новый генетический материал, обычно используют векторные конструкции, созданные на основе транспозонов (мобильных генетических элементов участка ДНК организма, способных к передвижению и репликации в пределах генома). Эти элементы размером до 5 т.п.н. с двух сторон ограничены концевыми обращёнными повторами (TIR), между которыми находится ген фермента транспозазы, ответственного за перемещения транспозона. При транспозиции происходит транскрипция хозяйской клеткой гена транспозазы и трансляция на его основе белка транспозазы. В искусственных векторных конструкциях между двумя TIR вставляют целевой фрагмент ДНК. Затем векторную конструкцию вводят в эмбрион насекомого вместе с вектором, несущим ген транспозазы [14]. В работе N. Jasinskiene и соавт. [22] проведена стабильная трансформация комаров *A. aegypti* с помощью модифицированного Hermes транспозона, несущего фрагмент геномной ДНК размером 4,7 т.о., который включён в аллель дикого типа гена мух *Drosophila melanogaster cinnabar* (cn). В качестве реципиента использован штамм белоглазых комаров *A. aegypti*. В результате микроинъекции транспозона в пребластомерму эмбрионов комаров у 50% взрослых особей наблюдали изменённый цвет глаз. В результате последующей селекции получены 3 линии комаров, несущих ген *cn⁺*. Данный ген функционирует как полудоминантный трансген и распределяется в потомстве в соответствии с биномиальным законом распределения. Таким образом, показано, что Hermes транспозон может быть использован в качестве вектора для эффективной, наследуемой и стабильной трансформации комаров *A. aegypti* [22].

Изменение структуры популяций насекомых, являющихся векторами передачи инфекционных заболеваний, может быть проведено при использовании молекулярно-биологических методов трансформации зародышевых линий. Эти методы, в частности, позволяют изучить влияние отдельных синтетических генов на развитие насекомых.

Стерилизация насекомых возможна за счёт использования летальных аллелей, интродуцируемых в геном с по-

мощью рекомбинантной ДНК. Эти мутации индуцируют разрыв цепей ДНК в X-хромосоме, что ведёт к снижению доли самок в общей популяции.

Для создания трансгенных насекомых с индуцированной стерильностью разработаны конструкции на основе тетрациклинового оперона *E. coli*. В их состав входит ген чувствительного к тетрациклину белка, приводящего в нормальном состоянии к стерилизации самцов комаров. Это позволяет создать популяцию насекомых, нормально развивающихся только при введении в их рацион питания тетрациклина. В естественных условиях окружающей среды (в отсутствие тетрациклина) такие насекомые становятся стерильными [23, 24].

Для контроля трансмиссии комарами вируса денге посредством супрессии популяций комаров разработан штамм OX3604C комаров *A. aegypti*, имеющий генетические характеристики, необходимые для продукции доминирующей продолжительной элиминации самок комаров. Штамм OX3604C комаров *A. aegypti* получен из генетически различных лабораторных штаммов комаров из смеси популяций потомков комаров, пойманных в 2006 г. в районе Чиापас (Мексика), путём спонтанного отбора самцов с соответствующим генотипом и последующего гибридного скрещивания. Трансгенные комары несут условно-летальные гены, которые обуславливают чувствительность к тетрациклину и неспособность к летанию у самок комаров. Этот штамм освобождает от необходимости стерилизации комаров посредством облучения, позволяет создать искусственную популяцию комаров, состоящую из одних самцов, и оперировать не с взрослыми особями, а с яйцами комаров. Самцов комаров штамма OX3604C еженедельно интродуцируют в больших лабораторных клетках (объемом 0,9–1,8 м³), содержащих комаров штамма OX3604C и комаров дикого типа в соотношении 1 : 8,5–10. При этом в течение 10–20 нед происходит полная элиминация генотипа комаров *A. aegypti* дикого типа. Штамм OX3604C комаров *A. aegypti* рекомендован для проведения полевых испытаний [17].

Наиболее широко в системе RIDL используют штамм OX513A комаров *A. aegypti*. Данный трансгенный штамм обладает доминантной, неспецифичной по отношению к полу, условно-летальной генетической системой, которая подавляется в присутствии тетрациклина. При выходе в окружающую среду трансгенные самцы спариваются с самками дикого типа, в отсутствие тетрациклина их потомство не способно к выживанию [24–26].

При проведении сравнительной оценки эффективности систем SIT и RIDL следует констатировать, что вторая си-

стема в целом является более эффективной. В целом она более эффективная. Кроме того, создание самоподдерживающихся систем всегда несёт определённые экологические риски, несмотря на то, что они менее затратные по сравнению с самоограничивающимися системами [16, 20].

В таблице представлены результаты полевых испытаний генетических методов снижения численности популяций насекомых, проведённых при использовании систем SIT и RIDL. Как следует из представленных данных, при использовании штамма OX513A комаров *A. aegypti* снижается численность комаров данного вида в месте проведения испытаний.

При анализе практической значимости использования трансгенных комаров для предотвращения распространения арбовирусных инфекций, видимо, можно сделать вывод о том, что этот инструмент будет наиболее эффективен для предотвращения расширения ареалов распространения экзотических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Ooi E.E., Goh K.T., Gubler D.J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. *Emerg Infect. Dis.* 2006; 2(6): 887-93. Doi: <https://doi.org/10.3201/10.3201/eid1206.051210>
- Shepard D.S., Coudeville L., Halasa Y.A., Zambrano B., Dayan G.H. Economic Impact of Dengue Illness in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84(2): 200-7. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0503>
- Faye O., Freire C.C., Imarino A., Faye O., Oliveira J.V.C., Diallo M., et al. Molecular evolution of Zika virus during its emerging in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(1): e2636. doi: [10.1371/journal.pntd.0002636](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636)
- Pierson T.C., Diamond M.S. Flaviviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 714-94.
- Musso D., Cao-Lormeau V.M., Gubler D.J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya. *Lancet.* 2015; 386(9990): 243-4. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61273-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61273-9)
- Ioos S., Mallet H.P., Goffart H., Gauthier V., Cardoso T., Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med. Mol. Infect.* 2014; 44(7): 302-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>
- Dash A.P., Bhatia R., Sunyoto T., Mourya D.T. Emerging and re-emerging arboviral diseases in Southeast Asia. *J. Vector Borne Dis.* 2013; 50(2): 77-84.
- Dikid T., Jain S.K., Sharma A., Kumar A., Narain J.P. Emerging and re-emerging arboviral diseases in India: an overview. *Indian J. Med. Res.* 2013; 138: 19-31.
- Zouache K., Failloux A. Insect-pathogen interactions: contribution of viral adaptation to the emergence of vector-borne diseases, the example of Chikungunya. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015; 10: 14-21. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.010>
- Seymour R.L., Adams A.P., Leal G., Alcorn M.D., Weaver S.C. A Rodent Model of Chikungunya Virus Infection in RAG1^{-/-} Mice, with Features of Persistence, for Vaccine Safety Evaluation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6): e0003800. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003800>
- Rougeron V., Sam I.C., Caron M., Nkoghe D., Leroy E., Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J. Clin. Virol.* 2015; 64: 144-52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.032>
- Alphey N., Alphey L., Bonsall M.B. A model framework to estimate impact and cost of genetics-based sterile insect methods for dengue vector control. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25384. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025384>
- Alphey L., McKemey A., Nimmo D., Neira Oviedo M., Lacroix R., Matzen K., et al. Genetic control of Aedes mosquitoes. *Pathog. Glob. Health.* 2013; 107(4): 170-9. Doi: <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000095>
- Nimmo D.D., Alphey L., Meredith J.M., Eggleston P. High efficiency site-specific genetic engineering of the mosquito genome. *Insect Mol. Biol.* 2006; 15(2): 129-36. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00615.x/>
- Winskill P., Harris A.F., Morgan S.A., Stevenson J., Raduan N., Alphey L., et al. Genetic control of Aedes aegypti: data-driven modelling to assess the effect of releasing different life stages and the potential for long-term suppression. *Parasit. Vectors.* 2014; 7: 68. Doi: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-68>
- Juliano S.A. Population Dynamics. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2007; 23(2 Suppl.): 265-75. Doi: [https://doi.org/10.2987/8756-971-X\(2007\)23\[265:PD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2987/8756-971-X(2007)23[265:PD]2.0.CO;2)
- Wise De Valdez M., Nimmo D., Betz J., Gong H., James A.A., Alphey L., et al. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *PNAS.* 2011; 108(12): 4772-5. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1019295108>
- Chambers E.W., Hapairi L., Peel B.A., Bossin H., Dobson S.L. Male mating competitiveness of a Wolbachia-introgressed Aedes polynesiensis strain under semi-field conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(8): 1-6. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001271>
- Xi Z., Khoo C.C., Dobson S.L. Wolbachia establishment and invasion in an Aedes aegypti laboratory population. *Science.* 2005; 310(5746): 326-8. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1117607>
- Xi Z., Khoo C.C., Dobson S.L. Interspecific transfer of Wolbachia into the mosquito disease vector Aedes albopictus. *Pros. Biol. Sci.* 2006; 273(1592): 1317-22. Doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3405>
- Catteruccia F., Crisanti A., Wimmer E.A. Transgenic technologies to induce sterility. *Malar. J.* 2009; 8(Suppl. 2): S7. Doi: <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-S2-S7>
- Jasinskiene N., Coates C.J., Benedict M.Q., Cornel A.J., Rafferty C.S., James A.A., et al. Stable transformation of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti, with the Hermes element from the housefly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(7): 3743-7. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3743>
- Behura S.K., Sarro J., Li P., Mysore K., Severson D.W., Emrich S.J., et al. High-throughput cis-regulatory element discovery in the vector mosquito Aedes aegypti. *BMC Genomics.* 2016; 17: 341. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2468-x>
- Patil P.B., Reddy B.P., Gorman K., Reddy K.V., Barwale S.R., Zehr U.B., et al. Mating competitiveness and life-table comparisons between transgenic and Indian wild-type Aedes aegypti L. *Pest. Manag. Sci.* 2015; 71(7): 957-65. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.3873>
- Massonnet-Bruneel B., Corre-Catelin N., Lacroix R., Lees R.S., Hoang K.P., Nimmo D., et al. Fitness of transgenic mosquito Aedes aegypti males carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS One.* 2013; 8(5): e62711. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062711>
- Phuc H.K., Andreasen M.H., Burton R.S., Vass C., Epton M.J., Pape G., et al. Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol.* 2007; 5: 11. Doi: <https://doi.org/10.1186/1741-7007-5-11>
- de Souza R.P., Rocco I.M., Maeda A.Y., Spenassatto C., Bisordi I., Suzuki A., et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(12): e1439. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001439>
- Facchinelli L., Valerio L., Ramsey J.M., Gould F., Walsh R.K., Bond G., et al. Field cage studies and progressive evaluation of genetically-engineered mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(1): e2001. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002001>
- Lacroix R., McKemey A.R., Raduan N., Kwee Wee L., Hong Ming W., Guat Ney T., et al. Open field release of genetically engineered sterile male Aedes aegypti in Malaysia. *PLoS One.* 2012; 7(8): e42771. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042771>

Поступила 14.10.18

Принята в печать 02.04.19

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Останкова Ю.В.¹, Семёнов А.В.^{1,2,3}, Зуева Е.Б.¹, Тотолян Арег А.^{1,2}***ВЫЯВЛЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В СРЕДИ ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ В АРХАНГЕЛЬСКЕ**¹ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 197101, г. Санкт-Петербург, Россия;²ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия;³ФГБОУ ВО «Северо-Западный Государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Россия

Цель – оценить распространённость и охарактеризовать вирус гепатита В (ВГВ) среди ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии (АРВТ) в Архангельске. **Материал и методы.** В работе были использованы образцы плазмы крови 64 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка >50 МЕ/мл после 6 мес АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса). Для первичного выявления ВГВ экстракцию ДНК из плазмы крови осуществляли с использованием коммерческого набора «АмплиПрим Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Вирус выявляли методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). В дальнейшем использовали разработанную во ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методику, позволяющую выявлять ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке. **Результаты.** HBsAg-негативный (окультный) ГВ был выявлен у 28 (43,8%) ВИЧ-инфицированных пациентов. Обнаружен только ВГВ генотипа D, при этом ВГВ субгенотипа D1 преобладал (39,3%) по сравнению с ВГВ субгенотипов D2 (32,1%) и D3 (28,6%). Серологические маркеры были обнаружены у 42,8% пациентов с выявленной ДНК ВГВ. Выявлены 2 изолята ВГВ с мутациями лекарственной устойчивости в гене полимеразы, приводящими к замещению аминокислот (L180M, M204V), связанному с развитием резистентности к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру. **Заключение.** Высокая распространённость окультного (HBsAg-негативного) ВГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов свидетельствует о необходимости использования молекулярно-биологических методов диагностики как для идентификации ВГВ, так и для выявления мутаций лекарственной устойчивости ВГВ перед началом антиретровирусной терапии ВИЧ.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит В; генотип ВГВ; молекулярная эпидемиология; коинфекция ВИЧ + ВГВ.

Для цитирования: Останкова Ю.В., Семёнов А.В., Зуева Е.Б., Тотолян Арег А. Выявление и молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В среди ВИЧ-инфицированных пациентов в Архангельске. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 105-111.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-105-111>*Ostankova Yu.V.¹, Semenov A.V.^{1,2,3}, Zueva E.B.¹, Totolian Areg A.^{1,2}***IDENTIFICATION AND MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF THE HEPATITIS B VIRUS AMONG HIV-INFECTED PATIENTS IN ARKHANGELSK**¹Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation;²Saint-Petersburg State Medical University n.a. acad. I.P. Pavlov, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation;³North-West State Medical University n.a. I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, 191015, Russian Federation

Aim. To estimate the prevalence and characterize the hepatitis B virus among HIV-infected patients with virological failure of antiretroviral therapy in Arkhangelsk. **Material and methods.** HBV markers determinations (HBsAg, anti-HBs IgG, anti-HBcor IgG, DNA HBV) were performed in isolates from blood plasma samples 64 HIV-infected patients with virological failure of antiretroviral therapy (viral load >50 IU / ml after 6 months of antiretroviral therapy or an increase in viral load after primary suppression of viral replication). For the detection of the hepatitis B virus, nucleic acids were isolated using the commercial kit «AmplePrime Ribo-prep». The virus presence analysis was performing by the polymerase chain reaction (PCR) method with hybridization-fluorescence detection in "real time" using the commercial set of «AmpliSens® HBV-FL». In the future, we used the method developed by the Saint-Petersburg Pasteur Institute, which allows detecting HBV in biological material with a low viral load. **Results.** HBsAg-negative (occult) HBV was detect in 28 (43.8%) HIV-infected patients. Only HBV genotype D was detected, and the HBV subgenotype D1 prevailed (39.3%) compared with the HBV subgenotype D2 (32.1%) and D3 (28.6%). Serological markers in 42.8% of patients with HBV DNA were founding. Two HBV isolates with drug resistance mutations in the polymerase gene, leaded to amino acid substitutions (L180M,

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 197101, г. Санкт-Петербург. E-mail: shenna1@yandex.ru

M204V) associated with the resistance development to lamivudine, entecavir, telbivudine and tenofovir were identifying. **Conclusion.** The occult (HBsAg-negative) HBV high prevalence among HIV-infected patients suggests the need to use molecular-biological diagnostic methods to identify HBV, as well as to analyze the HBV drug resistance mutation before starting antiretroviral therapy for HIV.

Keywords: chronic hepatitis B; HBV genotype; molecular epidemiology; coinfection HIV + HBV.

For citation: Ostankova Yu. V., Semenov A. V., Zueva E. B., Totolian Areg A. Identification and molecular-genetic characteristics of the hepatitis B virus among HIV-infected patients in Arkhangelsk. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 105-111. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-105-111>

For correspondence: Yulia V. Ostankova, PhD, Researcher at the Laboratory of Molecular Immunology Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, 197101, Russian Federation. E-mail: shenna1@yandex.ru

Information about authors:

Ostankova Yu. V. <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Semenov A. V. <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Zueva E. B. <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Totolian Areg A. <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 29 January 2019

Accepted 02 April 2019

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее распространённых гепатотропных вирусов, способных приводить как к острым, так и к хроническим заболеваниям печени [1, 2]. При коинфекции ВГВ с другими возбудителями вирусных гепатитов возможны несколько сценариев развития событий, связанных с реципрокным ингибированием вирусной репликации. Так, ещё в 1998 г. было показано, что репликация ДНК ВГВ подавляет репликацию РНК вируса гепатита С (ВГС) у пациентов с активным хроническим вирусным гепатитом В (ХВГВ) и С (ХВГС), но утяжеляет гистологические поражения. У больных с коинфекцией ХВГВ + ХВГС достоверно более высокий риск развития цирроза печени по сравнению с больными ХВГС, при этом уровень РНК ВГС у первых был значительно ниже, а гистологические повреждения серьёзные и не зависели от способа заражения и длительности заболевания ХВГВ [3].

ВИЧ-инфекцию и парентеральные вирусные гепатиты, наряду с социально значимым характером заболевания, связывают также общность механизмов и путей заражения [4, 5]. Около 10% ВИЧ-инфицированных людей в мире коинфицированы ВГВ. Распространённость коинфекции ВИЧ + ВГВ характеризуется географической вариабельностью и зависит, главным образом, от преобладающих путей заражения. Так, не менее 3 млн людей, коинфицированных ВИЧ + ВГВ, живут в Африке [6]. Хотя влияние ВГВ-инфекции на прогрессирование ВИЧ-инфекции, по-видимому, минимально, ВИЧ-инфекция заметно влияет на прогрессирование фиброза печени и, следовательно, может увеличивать риск развития гепатоцеллюлярной карциномы и цирроза, ускоряя развитие этих серьёзных осложнений у пациентов с коинфекцией [7]. Например, в Танзании была показана значительно более высокая частота развития фиброза и цирроза печени у ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцией ВГВ по сравнению с пациентами без ВГВ [8]. Недавно проведённый метаанализ результатов работ, в которых исследовали общие показатели смертности, продемонстрировал увеличение смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов, которые были коинфицированы ВГВ как до, так и после начала высокоактивной антиретровирусной терапии (АРВТ) [9].

R. Rajbhandari и соавт. исследовали образцы ткани печени: 72 584 с ВГВ, 133 880 с ВИЧ и 8156 с коинфекцией ВГВ+ВИЧ. Было показано, что коинфекция ВГВ + ВИЧ связана с более высокой смертностью по сравнению с ВГВ-моноконфекцией, а наличие ВГВ наряду с циррозом печени или осложнением портальной гипертензии ассоциировано с 3-кратным повышением риска госпитальной смертности у пациентов с ВИЧ-инфекцией по сравнению с пациентами без этих осложнений [10].

Актуальность изучения клинико-патоморфологических особенностей одновременного протекания вирусных гепатитов и ВИЧ-инфекции обусловлена их эпидемиологическим ростом, в том числе среди потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) у которых ВГС и ВГВ нередко сочетаются друг с другом и (или) с ВИЧ-инфекцией [11]. Основным фактором риска заражения при парентеральном применении наркотических веществ является контаминация иглы или шприца кровью в случае группового использования инструмента или применения стерильного (одноразового) шприца, когда раствор наркотика забирают из общей ёмкости [12]. Кроме того, инфицирование препарата заражённой кровью возможно в процессе его кустарного производства. Помимо парентерального пути, заражение может происходить при половых контактах ПИН.

Особой формой естественного течения ХВГВ является occultный ВГВ (ОкГВ), характеризующийся наличием ДНК ВГВ в гепатоцитах при отсутствии HBsAg в периферической крови и крайне низкой вирусной нагрузкой, вплоть до невозможности обнаружения ДНК вируса в крови [13].

Хотя коинфекция ВГВ и ВИЧ – распространённое явление, посвящённые этой проблеме исследования с использованием прежде всего молекулярно-биологических, а не серологических маркеров, сравнительно немногочисленны [14]. Проведённое в Центральной Бразилии исследование с участием ВИЧ-инфицированных пациентов, не подвергавшихся лечению, включало обследование на серологические маркеры и ДНК ВГВ. В целом 25,1% пациентов имели какие-либо маркеры инфицирования ВГВ, связанного с возрастом старше 40 лет, историей употребления инъекционных наркотиков и гомосексуализмом, при этом распространённость HBsAg-негативного ОкГВ составила 3,8%. Кроме того, у пациенты с ОкГВ обнару-

жен значительно более высокий уровень анти-ВГС по сравнению с HBsAg-положительными пациентами [15]. Сходные результаты были показаны при оценке встречаемости ОжГВ у ВИЧ-инфицированных африканских мигрантов в Великобритании, где распространённость ОжГВ составила 4,5% [16] и в Колумбии, где коинфекция ВИЧ + ВГВ составила 12% у ВИЧ-инфицированных пациентов, из них 3,3% имели активную инфекцию ВГВ и 8,7% – ОжГВ, при этом анализ нуклеотидных последовательностей выявил субгенотип F3 у 93,8% больных и генотип А у 6,2% больных [17].

Несколько чаще ОжГВ встречается в Нигерии: у 11,2% ВИЧ-инфицированных HBsAg-негативных пациентов, в то время как РНК ВГС была обнаружена только у 1,6%, при этом вирусная нагрузка ВГВ преимущественно была <50 копий/мл [18]. Еще более высокая встречаемость ОжГВ у ВИЧ-инфицированных HBsAg-негативных пациентов показана в Мексике (49%), при этом была показана связь выявления оккультного ВГВ с высоким уровнем РНК ВИЧ [19].

Из вышесказанного следует, что, несмотря на высокую значимость исследований коинфекции ВИЧ и ОжГВ, работы по этой теме сравнительно немногочисленны и противоречивы, что связано, по всей видимости, с различными методами и маркерами, используемыми для обнаружения ОжГВ [20]. Очевидно, что при использовании более чувствительных методов, в том числе специфических модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР), частота встречаемости ОжГВ в группах риска будет выше, чем при использовании более распространенных, но значительно менее чувствительных серологических маркерах.

Цель данной работы – оценить распространённость и охарактеризовать вирус гепатита В среди HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ в Архангельске.

Материал и методы

В работе были использованы образцы плазмы крови 64 ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ (вирусная нагрузка >50 МЕ/мл после 6 мес АРВТ или повышение вирусной нагрузки после первичного подавления репликации вируса).

Для первичного выявления ВГВ экстрагировали ДНК из плазмы крови с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Для всех образцов проводили предварительное концентрирование вируса ультрацентрифугированием плазмы крови в течение 1 ч при 24000g, +4 °С. Выявление вируса проводили методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

В дальнейшем использовали разработанную во ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методику, позволяющую выявлять ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке [21]. При этом на первом этапе проводили асимметричную ПЦР с использованием протяженных олигонуклеотидов – 3 пмоль/л прямого и 30 пмоль/л обратного праймеров. На втором этапе для повышения чувствительности проводили вторую ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (вложенных, гнездовых) праймеров для 4 регионов ВГВ (гены S, P,

С, X) – по 15 пмоль/л каждого. Для ПЦР в общем виде использовали следующий состав амплификационной смеси: 15 пМ каждого олигопрайма, 1,0 мМ каждого нуклеозидтрифосфата, 6,7 мМ MgCl₂, 1 ед. рекомбинантной Taq ДНК-полимеразы (Fermentas), буфер для Taq ДНК-полимеразы (750 мМ Трис-НСl, (рН 8,8), 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1% (v/v) твин 20), 1 мкг матрицы, вода без нуклеаз до конечного объема 30 мкл. В составе амплификационной смеси для первого этапа дополнительно увеличивали концентрацию MgCl₂ (7,5 ммоль/л), включали формамид и глицерин в количестве 4 и 6% от конечного объема, соответственно, а для второго этапа в смесь добавляли формамид и DMSO в количестве 4 и 10% конечного объема соответственно. Амплификацию в общем виде проводили при следующих условиях: после денатурации при 95 °С в течение 5 мин устанавливали 30–40 циклов амплификации в режиме: 95 °С – 20–40 с, 55–65 °С – 20–30 с, 72 °С – 30–90 с; затем финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. Качество ПЦР определяли визуально в 2% агарозном геле (120 В, 40 мин; 1×TBE), окрашенном бромистым этидием.

Для ПЦР с последующим секвенированием использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 пар оснований, включающий рекомендованную для генотипирования ВГВ регион Pre-S1/Pre-S2/S протяженностью 1169 пар оснований область 2848–3182 ... 1–835 нуклеотид, согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [22]. Для выявления мутаций лекарственной устойчивости проводили секвенирование полной нуклеотидной последовательности гена полимеразы (Pol).

Секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1. (Applied Biosystems, США), в 3 повторах, на прямых и обратных праймерах. Для анализа продукта секвенирующей реакции очищенный осадок денатурировали в формамиде и помещали в генетический анализатор «ABI Prism 3500» (Applied Biosystems, США).

Первичный анализ полученных в ходе секвенирования фрагментов проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA 7.0, используя алгоритм ClustalW [23]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа рассматривали расстояния между последовательностями методом присоединения соседей (Neighbor-joining), позволяющим оптимизацию дерева в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», для оценки достоверности построенных деревьев проведён бутстреп для 500 повторов.

Результаты

Возраст пациентов в группе исследования варьировал от 19 до 58 лет и составил в среднем 38,6±10,8 года. Количество мужчин в группе преобладало по сравнению с женщинами: 67,2 и 32,8% соответственно.

В нашем исследовании в группе HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов при использовании коммерческого набора «АмплиСенс® HBV-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва) ДНК ВГВ выявить не удалось. При использовании предложенного нами метода [21] ВГВ

был выявлен у 28 (43,8%) пациентов. При дальнейшем секвенировании образцов была показана их генетическая индивидуальность, подтверждённая несопадением нуклеотидных последовательностей, что дополнительно свидетельствовало об истинности выявленных случаев ОжГВ.

Таким образом, большинство (51,5%) из 64 ВИЧ-инфицированных пациентов имели коинфекцию ВИЧ + ВГВ, ВИЧ + ВГС или ВИЧ + ВГВ + ВГС. Среди них ВИЧ + ВГС и ВИЧ + ВГВ + ВГС выявлены у 15,2% больных, а ВИЧ+ВГВ – у 84,8%.

Серологические маркеры были обнаружены у 42,9% пациентов с выявленной ДНК ВГВ, при этом в 7,1% случаев обнаружены антитела HBs IgG, в 14,3% случаев – антитела HBsAg IgG и в 21,4% случаев – одновременно антитела HBs IgG и HBsAg IgG. Таким образом, у 57,2% ВИЧ-инфицированных пациентов с ОжГВ ВГВ не мог быть обнаружен серологическими методами. При анализе встречаемости ВГВ в группе в зависимости от пола показали, что заражение чаще происходит у мужчин (53,5%), чем у женщин (23,8%), при этом относительный риск инфицирования ВГВ у лиц мужского пола достоверно выше, чем у женщин (RR=1,479, доверительный интервал 1,053–2,076, $p=0,0328$).

Для всех пациентов была проведена оценка количества CD4+. Достоверных различий при сравнительном анализе количества CD4+-клеток между ВИЧ-инфицированными пациентами с ВГВ и без него не выявлено. При анализе количества CD4+ клеток в зависимости от субгенотипа вируса достоверных различий не выявлено.

Для всех выявленных образцов была получена нуклеотидная последовательность Pre-S1/Pre-S2/S региона удовлетворительного качества, пригодная для дальнейшего анализа. Для всех образцов были определены генотип и субгенотип вируса.

На основании филогенетического анализа показано, что в группе исследования представлен только ВГВ генотипа D. Преобладал ВГВ субгенотипа D1, его встречаемость 39,3%, в то время как встречаемость ВГВ субгенотипов D2 и D3 составила 32,1 и 28,6% соответственно. Филогенетические отношения между исследованными изолятами ОжГВ, полученными от HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью АРВТ из Архангельска и референсными последовательностями из международной базы данных GenBank представлены на рисунке.

Внутригрупповой процент нуклеотидной идентичности среди ВИЧ-инфицированных пациентов с ВГВ субгенотипов D1, D2 и D3 составил 98,25±0,8; 99,3±0,31 и 98,79±0,24 соответственно.

У обследованных выявили 2 изолята (7,1%) ВГВ с мутациями, описанными в литературе, как определяющие развитие лекарственной устойчивости к терапии нуклеотидными/нуклеозидными аналогами – замещение аминокислот в гене полимеразы ВГВ (L180M, M204V), связанное с развитием резистентности к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру.

Нуклеотидные последовательности полных геномов исследованных в данной работе изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MK618418–MK618445.

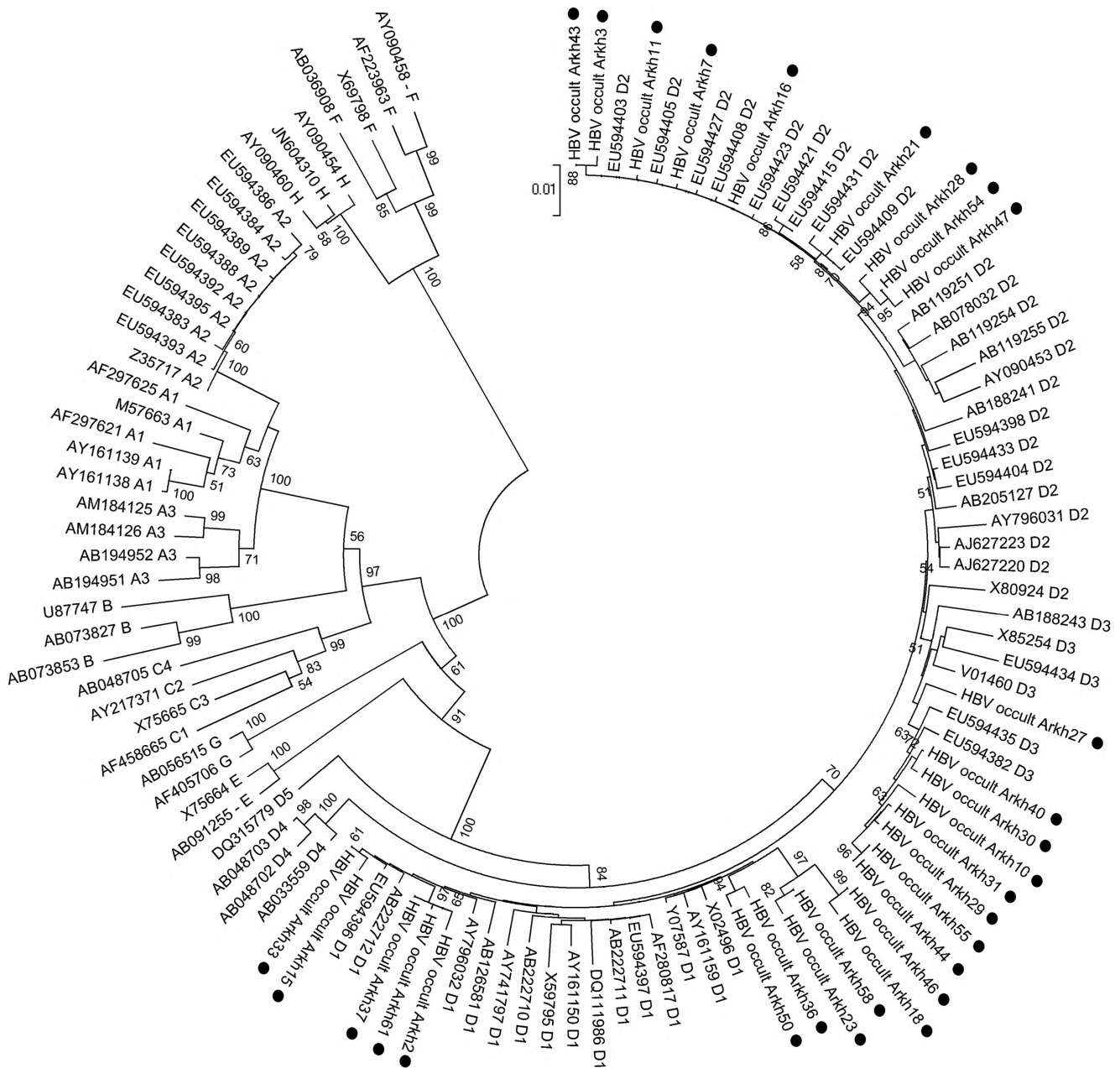
Обсуждение

Следует отметить, что полученные нами высокие показатели распространённости ОжГВ среди ВИЧ-

инфицированных пациентов сходны с данными из других стран. Так, частота коинфекции ВИЧ + ВГВ в Южной Африке составила 30%, в США – 34,7%, в Колумбии – 28,7–38,6%, в Бразилии 30–55,1%, во Франции – до 70% всех пациентов с ВИЧ-инфекцией. При этом распространённость моноинфекции ВГВ в некоторых из указанных регионов крайне невысока [17].

Вероятно, низкая встречаемость ВГВ в группах ВИЧ-инфицированных пациентов, описанных другими исследователями, связана с ограничениями стандартных методов обнаружения вируса. Однако не исключено, что более высокая распространённость ВГВ у включённых в наше исследование пациентов с вирусологически неэффективной АРВТ связана с большей длительностью инфицирования ВИЧ по сравнению с пациентами, обследованными в упомянутых работах. Впрочем, ранее было показано, что среди ВИЧ-инфицированных лиц, проходивших АРВТ, средний уровень вирусной нагрузки ВГВ выше у пациентов с подавленной РНК ВИЧ по сравнению с пациентами с высоким уровнем нагрузки ВИЧ [24], что согласуется с результатами нашей работы, свидетельствующими о высокой распространённости ВГВ с низкой вирусной нагрузкой среди ВИЧ-инфицированных людей с вирусологически неэффективной АРВТ.

Выявление среди ВИЧ-инфицированных пациентов почти исключительно ВГВ генотипа D в противоположность ранее показанному распространению в Российской Федерации не только генотипа D, но также A и C, имеет, вероятно, несколько причин. ВГВ генотипа D способен вызывать более серьёзные заболевания, в том числе коррелирует с более тяжёлыми заболеваниями печени, и более высоким уровнем лекарственной устойчивости по сравнению с другими генотипами вируса [25], что может быть связано с его распространённостью именно в группе пациентов с вирусологически неэффективной АРВТ. При этом известно, что, как и для ВГВ D3, для ВГВ субгенотипа D1, преобладающего в данной группе, характерны более низкая вирусная нагрузка, низкий уровень репликации и низкий уровень HBsAg в периферической крови по сравнению с генотипом A, а также ранняя сероконверсия HBeAg. Это может затруднять своевременное выявление вируса у пациентов и, в свою очередь, приводить к развитию более тяжёлого заболевания печени [26]. Для ВИЧ-инфицированных людей, получающих АРВТ, это особенно актуально, поскольку увеличение продолжительности жизни, а также восстановление иммунитета, может привести к иммуноопосредованному повреждению печени и повышению уровня ферментов печени. В свою очередь, высокие уровни аланинаминотрансферазы в сыворотке крови, в том числе на верхней границе нормы, являются предиктором развития хронического заболевания печени, повышенной заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой и связанной с ней смертности [27]. При низкой вирусной нагрузке ВГВ и, соответственно, незнании о наличии у получающего терапию ВИЧ-инфицированного пациента ВГВ, это может быть оценено как токсическое повреждение печени, связанное с АРВТ. Так, известно о случаях тяжёлой реактивации ВГВ после прерывания АРВТ у HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов, свидетельствующих о способности ВГВ непрерывно развиваться даже при скрытой форме течения заболевания [28]. Мы предполагаем, что существенную роль при этом может играть обладающий гепатопатогенным по-



Филогенетическое дерево исследованных изолятов ВГВ, выделенных от HBsAg-негативных ВИЧ-инфицированных пациентов с вирусологической неэффективностью антиретровирусной терапии, проживающих на территории Архангельска, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями.

● – изоляты, секвенированные в данной работе.

тенциалом не выявленный своевременно скрытый ВГВ, так как существуют данные об увеличении смертности среди ВИЧ-инфицированных пациентов с коинфекцией ВГВ, независимо от того, произошло ли заражение до начала АРВТ, или после неё [9].

Многие обследованные нами ВИЧ-инфицированные пациенты с ОжВВ принадлежали к активным или бывшим ПИН, или являлись половыми партнерами активных или бывших ПИН. В связи с вышесказанным особое внимание следует уделять социальному поведению ВИЧ-инфицированных лиц, особенности которого у ПИН и их партнеров, как известно, могут влиять на рас-

пространённость инфекции и на распределение генотипов в данной группе риска.

На филогенетическом дереве выделяются несколько тесных кластеров, изоляты которых получены преимущественно от мужчин, при этом более чем для половины из них в анамнестических данных указана принадлежность к активным или бывшим ПИН. Таким образом, очевидно, что главную роль в кластеризации играет не столько географическая общность, сколько пути передачи инфекции. Дополнительным подтверждением этого предположения является низкая представленность в группе пациентов с характерным для региона субгенотипом D2, а также высо-

кая встречаемость в группе ВГВ субгенотипа D3, ассоциированного с парентеральным инфицированием, особенно среди ПИН [29], при этом чётко разделяющегося на упомянутый выше специфический кластер близкородственных изолятов и последовательности ВГВ, находящиеся на различных филогенетических отрезках, не имеющих близкого генетического родства. Таким образом, в целом ВГВ распространялся не за счёт значимых эпидемиологических сетей с конкретными единичными прародителями, а преимущественно независимыми путями посредством гетеросексуальных контактов, что подтверждается отсутствием крупных кластеров. Рискованное поведение среди ВИЧ-инфицированных лиц в основном связано с употреблением наркотиков и незащищенными половыми контактами с нерегулярными партнерами.

Эффективная противовирусная терапия снижает репликацию вируса и риск прогрессирования ВГВ [30]. Основные успехи в лечении ХВГВ были достигнуты в последнее десятилетие, благодаря разработке нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы активных против ВГВ, таких как L-нуклеозиды (ламивудин и телбивудин), алкилфосфонаты (адефовир дипивоксил) и тенофовир (диспроксилфумарат) или D-циклопентаны (энтекавир) [31]. Неадекватное подавление репликации ВГВ противовирусными препаратами может привести к развитию устойчивых мутаций в консервативной области гена полимеразы [32]. Некоторые составляющие элементы АРВТ, применяемой у ВИЧ-инфицированных пациентов, могут стать причиной повышенной устойчивости к лекарственным препаратам не только ВИЧ, но и ВГВ, что особенно актуально при наличии ОкГВ, не идентифицируемого стандартными методами.

Среди обследованных нами пациентов только в 2 (7,1%) случаях были выявлены мутации лекарственной устойчивости. Выявленные мутации (L180M, M204V) относятся к наиболее распространённым среди проходивших АРВТ пациентов в европейском многоцентровом исследовании [33]. Вероятнее всего, обнаруженные мутации устойчивости были вызваны перекрёстной резистентностью к ламивудину, поскольку это единственный ВГВ-активный препарат в АРВТ первого и второго ряда у ВИЧ-инфицированных пациентов в группе исследования.

Заключение

Высокая распространённость ОкГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов является серьёзной проблемой, поскольку повышает риск возможных осложнений при ВИЧ-инфекции, таких как острая печёночная недостаточность, цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости использования молекулярно-биологических методов диагностики для идентификации ВГВ, а также для анализа на мутации лекарственной устойчивости ВГВ перед началом антиретровирусной терапии ВИЧ.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3, 5-10, 15-20, 22-33 см. REFERENCES)

2. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999-2009 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(3): 255-62. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262>

4. Покровский В.В. Развитие эпидемии ВИЧ-инфекции в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; (1): 10-5.
11. Шахгильдян В.И., Кравченко А.В., Пархоменко Ю.Г., Тишкевич О.А., Серова В.В., Груздев Б.М. Поражения печени при вторичных заболеваниях у больных ВИЧ-инфекцией. *Терапевтический архив*. 2002; 74(11): 40-3.
12. Шерстюк Б.В., Пиголкин Ю.И. Актуальные проблемы морфологической диагностики соматических нарушений при наркоманиях. *Судебно-медицинская экспертиза*. 1999; 42(2): 29-32.
13. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Буркитбаев Ж.К., Савчук Т.Н., Тотолян Арег А. Результаты генотипирования вируса гепатита В у HBsAg-негативных доноров крови в г. Астана, Казахстан. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(4): 383-92. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392>
14. Кожанова Т.В., Ильченко Л.Ю., Исаева О.В., Алексеева М.Н., Сарыглар А.А., Миронова А.И. и др. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов. *Современные технологии в медицине*. 2013; 5(2): 60-4.
21. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР. Патент РФ №2633755; 2017.

REFERENCES

1. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015; 386(10003): 1546-55. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61412-X)
2. Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999-2009. *Infektsiya i immunitet*. 2011; 1(3): 255-62. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2011-3-255-262> (in Russian)
3. Zarski J.P., Bohn B., Bastie A., Pawlotsky J.M., Baud M., Bost-Bezeaux F., et al. Characteristics of patients with dual infection by hepatitis B and C viruses. *J. Hepatol*. 1998; 28(1): 27-33. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(98\)80198-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(98)80198-0)
4. Pokrovskiy V.V. The development of the HIV epidemic in Russia. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2007; (1): 10-5. (in Russian)
5. Alberti A., Pontisso P., Chemello L., Fattovich G., Benvegnù L., Belussi F., et al. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol*. 2005; 22(1 Suppl.): 38-41.
6. Modi A.A., Feld J.J. Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev*. 2007; 9(1): 25-39.
7. Soriano V., Puoti M., Bonacini M., Brook G., Cargnel A., Rockstroh J., et al. Care of patients with chronic hepatitis B and HIV co-infection: recommendations from an HIV-HBV international panel. *AIDS*. 2005; 19(3): 221-40. Doi: <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000163948.62176.e7>
8. Ramirez-Mena A., Glass T.R., Winter A., Kimera N., Ntamatungiro A., Hatz C., et al. Prevalence and Outcomes of Hepatitis B Coinfection and Associated Liver Disease Among Antiretroviral Therapy-Naive Individuals in a Rural Tanzanian Human Immunodeficiency Virus Cohort. *Open Forum Infect. Dis*. 2016; 3(3): ofw162. Doi: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofw162>
9. Nikolopoulos G.K., Paraskevis D., Hatzitheodorou E., Moschidis Z., Sypsa V., Zavitsanos X., et al. Impact of hepatitis B virus infection on the Progression of AIDS and mortality in HIV-infected individuals: a cohort study and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis*. 2009; 48(12): 1763-71. Doi: <https://doi.org/10.1086/599110>
10. Rajbhandari R., Jun T., Khalili H., Chung R.T., Ananthkrishnan A.N. HBV/HIV coinfection is associated with poorer outcomes in hospitalized patients with HBV or HIV. *J. Viral. Hepat*. 2016; 23(10): 820-9. Doi: <https://doi.org/10.1111/jvh.12555>
11. Shakhgil'dyan V.I., Kravchenko A.V., Parkhomenko Yu.G., Tishkevich O.A., Serova V.V., Gruzdev B.M. Liver lesions in secondary diseases in patients with HIV infection. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2002; 74(11): 40-3. (in Russian)
12. Sherstyuk B.V., Pigolkin Yu.I. Actual problems of morphological diagnosis of somatic disorders in drug addiction. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 1999; 42(2): 29-32. (in Russian)

13. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Burkitbaev Zh.K., Savchuk T.N., Totolyan Areg A. Results of genotyping hepatitis virus B in HBsAg-negative blood donors in Astana, Kazakhstan. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(4): 383-92. Doi: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-4-383-392> (in Russian)
14. Kozhanova T.V., Il'chenko L.Yu., Isaeva O.V., Alekseeva M.N., Saryglar A.A., Mironova N.I., et al. Circulation of hepatitis B virus variants carrying mutations in the polymerase gene among HBV-infected and HBV / HIV-coinfected patients. *Sovremennye tekhnologii v meditsine*. 2013; 5(2): 60-4. (in Russian)
15. Oliveira M.P., Lemes P.S., Matos M.A., Del-Rios N.H., Carneiro M.A., Silva A.M., et al. Overt and occult hepatitis B virus infection among treatment-naïve HIV-infected patients in Brazil. *J. Med. Virol.* 2016; 88(7): 1222-9. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.24462>
16. Chadwick D., Doyle T., Ellis S., Price D., Abbas I., Valappil M., et al. Occult hepatitis B virus coinfection in HIV-positive African migrants to the UK: a point prevalence study. *HIV Med.* 2014; 15(3): 189-92. Doi: <https://doi.org/10.1111/hiv.12093>
17. Bautista-Amorochó H., Castellanos-Dominguez Y.Z., Rodriguez-Villamizar L.A., Velandia-Cruz S.A., Becerra-Pena J.A., Farfan-García A.E. Epidemiology, risk factors and genotypes of HBV in HIV-infected patients in the northeast region of Colombia: high prevalence of occult hepatitis B and F3 subgenotype dominance. *PLoS One*. 2014; 9(12): e114272. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114272>
18. Opaleye O.O., Oluremi A.S., Atiba A.B., Adewumi M.O., Mabayoje O.V., Donbraye E., et al. Occult Hepatitis B Virus Infection among HIV Positive Patients in Nigeria. *J. Trop. Med.* 2014; 2014: 796121. Doi: <https://doi.org/10.1155/2014/796121>
19. Alvarez-Munoz M.T., Maldonado-Rodriguez A., Rojas-Montes O., Torres-Ibarra R., Gutierrez-Escolano F., Vazquez-Rosales G., et al. Occult hepatitis B virus infection among Mexican human immunodeficiency virus-1-infected patients. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(37): 13530-7. Doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i37.13530>
20. Raimondo G., Pollicino T., Cacciola I., Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2007; 46(1): 160-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.10.007>
21. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Totolyan Areg A. A method for detecting hepatitis B virus in biological material with a low viral load based on a two-stage PCR. Patent RF №2633755; 2017. (in Russian)
22. Brichtler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 10): 2318-29. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.055459-0>
23. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
24. Archampong T.N., Boyce C.L., Lartey M., Sagoe K.W., Obo-Akwa A., Kenu E., et al. HBV genotypes and drug resistance mutations in antiretroviral treatment-naïve and treatment-experienced HBV-HIV-coinfected patients. *Antivir. Ther.* 2017; 22(1): 13-20. Doi: <https://doi.org/10.3851/IMP3055>
25. Khedive A., Sane'i-Moghaddam I., Alavian S.M., Saberfar E., Norouzi M., Judaki M., et al. Hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutations are rare but clustered in immune epitopes in chronic carriers from Sistan-Baluchestan Province, Iran. *Arch. Iran. Med.* 2013; 16(7): 385-9. Doi: <https://doi.org/10.13167/AIM.005>
26. Ozaras R., Inanc B.I., Yemisen M., Tabak F. Epidemiology of HBV subgenotypes D. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2015; 39(1): 28-37. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.06.005>
27. Chen J.D., Yang H.I., Iloeje U.H., You S.L., Lu S.N., Wang L.Y. Carriers of inactive hepatitis B virus are still at risk for hepatocellular carcinoma and liver-related death. *Gastroenterology*. 2010; 138(5): 1747-54. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.042>
28. Costantini A., Marinelli K., Biagioni G., Monachetti A., Ferreri M.L., Butini L., et al. Molecular analysis of hepatitis B virus (HBV) in an HIV co-infected patient with reactivation of occult HBV infection following discontinuation of lamivudine-including antiretroviral therapy. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 310. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-310>
29. Maddalena D.C., Giambelli C., Tanzi E., Colzani D., Schiavini M., Milazzo L., et al. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotype D hepatitis B virus. *Virology*. 2007; 365(1): 113-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.015>
30. Hafkin J.S., Osborn M.K., Localio A.R., Amorosa V.K., Kostman J.R., Stern J.J., et al. Incidence and risk factors for incomplete HBV DNA suppression in HIV/HBV-co-infected patients initiating tenofovir-based therapy. *J. Viral. Hepat.* 2014; 21(4): 288-96. Doi: <https://doi.org/10.1111/jvh.12142>
31. Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? *Liver Int.* 2011; 31(1): 111-6. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2010.02399.x>
32. Harrison T.J. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin. Liver Dis.* 2006; 26(2): 87-96. Doi: <https://doi.org/10.1055/s-2006-939754>
33. Hermans L.E., Svicher V., Pas S.D., et al. Combined Analysis of the Prevalence of Drug-Resistant Hepatitis B Virus in Antiviral Therapy-Experienced Patients in Europe (CAPRE). *J. Infect. Dis.* 2016; 213(1): 39-48. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv363>

Поступила 29.01.19

Принята в печать 02.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Кирьянов С.А.¹, Левина Т.А.¹, Поляков А.П.², Ребрикова И.В.², Мурашко Д.А.³,
Коноплева М.В.¹, Семенов Т.А.¹, Сулов А.П.¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОМНОЙ ДНК ВИРУСА ЭПШТЕЙНА–БАРР В ТКАНЯХ РАКА СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА РОССИЙСКИХ ПАЦИЕНТОВ

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 125284, г. Москва, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

Введение. Плоскоклеточная карцинома слизистой оболочки полости рта – одно из наиболее распространённых и агрессивных злокачественных новообразований полости рта. Согласно недавним исследованиям, инфицирование вирусом папилломы человека (ВПЧ) является дополнительным фактором риска развития плоскоклеточного рака полости рта, тогда как роль вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) остается невыясненной. Данные об ассоциации обоих онковирусов с плоскоклеточным раком полости рта довольно противоречивы и существенно варьируют в зависимости от географических регионов и расовой принадлежности. **Цель:** выяснение распространённости ВПЧ и ВЭБ в образцах рака слизистой оболочки ротовой полости пациентов Московского региона России. **Материал и методы.** Исследованы фрагменты свежемороженых тканей злокачественных опухолей ротовой полости от 11 пациентов. Экстрагированную ДНК проверяли на наличие вирусных геномов количественной ПЦР-амплификацией с использованием маркеров, специфичных для ВЭБ и высококанцерогенных типов ВПЧ, с последующим секвенированием. **Результаты.** ВПЧ не выявлен ни в одном из протестированных образцов, тогда как ВЭБ обнаружился в 7 (70,0%) из 10 случаев. Наличие ВЭБ-инфекции и вирусную нагрузку в образцах опухолей определяли методом количественной ПЦР-амплификации ВЭБ-специфичных мишеней: BamHI-W, EBNA1 и C-концевой фрагмент гена LMP1. Секвенированием LMP1-положительных ПЦР-продуктов в большинстве образцов (5/6) выявлены варианты с Cao-делецией в гене LMP1, характеризующиеся повышенным трансформирующим потенциалом. **Заключение.** Высокая частота вируса в проанализированных образцах позволяет предположить ВЭБ-ассоциированную патологию, хотя обнаруженные LMP1-варианты ВЭБ не обязательно связаны с развитием рака полости рта. Для определения потенциальной роли ВЭБ как инфицирующего агента в патогенезе рака слизистой оболочки полости рта необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: рак слизистой оболочки полости рта; вирус Эпштейна–Барр; вирус папилломы человека; BamHI-W; EBNA1; LMP1.

Для цитирования: Кирьянов С.А., Левина Т.А., Поляков А.П., Ребрикова И.В., Мурашко Д.А., Коноплева М.В., Семенов Т.А., Сулов А.П. Выявление геномной ДНК вируса Эпштейна–Барр в тканях рака слизистой оболочки полости рта российских пациентов. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3):112-117.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-112-117>

Kiryayov S.A.¹, Levina T.A.¹, Polyakov A.P.², Rebrikova I.V.², Murashko D.A.³, Konopleva M.V.¹,
Semenov T.A.¹, Suslov A.P.¹

DETECTION OF EPSTEIN-BARR VIRUS GENOME IN ORAL CAVITY SQUAMOUS CELL CARCINOMA SAMPLES OF RUSSIAN PATIENTS

¹N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation;

²P.A. Herten Moscow Oncology Research Center, Moscow, 125284, Russian Federation;

³Federal Scientific and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Moscow, 117997, Russian Federation

Introduction. Oral cavity squamous cell carcinoma (OC-SCC) is the most common and aggressive malignancy of the oral cavity. Recent studies have revealed infections with human papilloma virus (HPV) as an additional risk factor for oral squamous cell carcinoma development, while distinguished role of Epstein-Barr virus (EBV) remains still uncertain. However, the evidence for association between virus infection and risk of oral squamous cell carcinoma is controversially and varies significantly by geographic regions and race.

Purpose. The aim of the present study was to elucidate the prevalence of HPV and EBV in OC-SCC samples of Russian patients from Moscow region. **Material and methods.** We investigated fresh-frozen tumor tissue fragments obtained from 11 patients with OC-SCC. DNA was extracted and the viral genome was examined by quantitative PCR assays with high-risk type-specific HPV and EBV specific markers followed by sequencing-based analysis. **Results.** No HPV infection in analyzed OC-SCC samples was observed, while EBV was identified in 70.0% (7/10) of patients. Further based on Q-PCR amplification of the EBV targets including BamHI-W, EBNA1 and C-terminal fragment of LMP1 gene, EBV infection and measurement of virus load in the tumor samples was assessed. Sequencing LMP1-positive products revealed that the most samples (5/6) contained variants LMP1 with Cao deletion characterized by an increased transforming potential. **Conclusion.** These data suggest that prevalence of EBV infections is common and may influence cancer development, although detected LMP1 variants of EBV are not necessarily associated with the pathogenesis of OC-SCC. Further studies are necessary to determine the potential role of EBV and its possible importance as an infection factor in OC-SCC.

Для корреспонденции. Кирьянов Сергей Альбертович, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета, отдел иммунологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: sergeisashilov@hotmail.com

Keywords: tongue squamous cell carcinoma; Epstein-Barr virus; Human Papilloma virus; BamHI-W; EBNA1; LMP1.

For citation: Kiryanov S.A., Levina T.A., Polyakov A.P., Rebrikova I.V., Murashko D.A., Konopleva M.V., Semenenko T.A., Suslov A.P. Detection of Epstein-Barr virus genome in oral cavity squamous cell carcinoma samples of Russian patients. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3):112-117. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-112-117>

For correspondence: Sergei A. Kiryanov, PhD, Research Scientist, Laboratory of Mediators and Effectors of Immunity, Department of Immunology, N.F. Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: sergeisashilov@hotmail.com; phones

Information about authors:

Kiryanov S.A., <https://orcid.org/0000-0001-7729-9803>

Levina T.A., <https://orcid.org/0000-0002-2490-0834>

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

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

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 07 February 2019

Accepted 02 April 2019

Введение

Рак слизистой оболочки полости рта составляет группу, как правило, агрессивных злокачественных опухолей с быстрым локализованным ростом и региональным метастазированием [1]. Гистологически в 90–95% случаев рак слизистой оболочки полости рта представлен плоскоклеточной карциномой [2]. Несмотря на применение современных терапевтических комплексных и комбинированных протоколов лечения, за последние 20 лет в мире уровень смертности от рака полости рта существенно не снизился, 5-летняя выживаемость даже в развитых странах остаётся на уровне около 50% [3]. В некоторых странах, например в США, повышается заболеваемость раком полости рта среди молодых людей – как мужчин (в среднем на 5,1% в год), так и женщин [4, 5]. Тот факт, что частота встречаемости рака полости рта увеличивается именно у молодых людей, и при этом не зависит от влияния факторов риска (иммуносупрессия, табакокурение, употребление крепкого алкоголя и др.), позволяет предположить его связь с вирусной этиологией [6].

Показано, что такие онкогенные ДНК-вирусы, как вирус папилломы человека (ВПЧ) и вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), являются этиологическими агентами рака ротовой полости и рака носоглотки соответственно [7]. По данным литературы, в эндемичных регионах Восточной Европы ВПЧ чаще обнаруживают в плоскоклеточных опухолях орофарингеального рака, тогда как ВЭБ более ассоциирован с развитием назофарингеальных карцином [8, 9]. На основании того, что ВПЧ и ВЭБ реплицируются в орофарингеальных эпителиальных клетках, выдвигалась гипотеза, что коинфицирование высококанцерогенными типами ВПЧ и ВЭБ может быть причиной инициации или прогрессии рака полости рта [9].

В настоящее время данные о возможной ассоциации онковирусов ВПЧ/ВЭБ и рака полости рта довольно противоречивы и существенно варьируют в зависимости от географических регионов, расовой принадлежности и эндемической ситуации. Частота инфицированности ВПЧ при раке ротовой полости существенно выше на Ближнем Востоке и в Азии. В Иране, например, она составляет около 14% [10], а в Индии – 48% [11]. В эндемичных популяциях, например в Швеции, США, Греции, частота встречаемости ВПЧ в образцах

рака ротовой полости составляет 0, 1,3 и 11,3% соответственно, что подтверждали как ПЦР-детекцией ДНК ВПЧ, так и *in situ* гибридизацией [12–14].

Данные о распространённости ВЭБ при раке ротовой полости ограничены только публикациями шведских и иранских исследователей. Первые не подтверждают наличие вирусов ВПЧ и ВЭБ в образцах рака ротовой полости больных независимо от возраста [12, 15]. Вторые приводят данные о значительной частоте встречаемости ВЭБ при раке ротовой полости иранских больных [16]. Обычно для детектирования ВЭБ даже с низкой вирусной нагрузкой применяют самый чувствительный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием многокопийной мишени BamHI-W [17]. Однако во избежание возможных ложноположительных результатов, а также для проведения количественного анализа по определению вирусной нагрузки предпочтительнее использовать ПЦР в реальном времени на однокопийные ВЭБ-специфичные маркеры, такие как *EBNA1*, *LMP1*, *BZLF1* [18].

Возможно, рак полости рта является гетерогенной группой злокачественных опухолей ротовой полости как ассоциированных, так и не ассоциированных с онковирусами. Следовательно, обнаружение вирусных этиологических факторов, а также молекулярных механизмов канцерогенеза рака полости рта представляет собой дополнительный интерес для последующей риск-адаптированной стратификации, разработки диагностических тест-систем и выбора наиболее оптимальных лечебных стратегий.

Цель настоящего исследования – оценка возможной представленности онковирусов ВПЧ и ВЭБ в гистологических образцах российских пациентов и их потенциального вклада в качестве инфекционных агентов в развитие рака слизистой оболочки полости рта.

Материал и методы

Пациенты. Образцы получены от 11 российских больных раком слизистой оболочки полости рта, прооперированных в 2017 г. в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена. Выборка больных включала 8 мужчин и 3 женщины в возрасте 42–74 лет (средний возраст – 56 лет). Классификацию злокачественных новообразований по международной системе TNM проводили в соответствии с критериями,

принятыми организацией «Объединение против рака» (Union Against Cancer, UICC) [19].

Образцы опухолей и выделение ДНК. Все исследуемые опухоли полости рта гистологически были представлены плоскоклеточными карциномами языка с локализацией во второй трети языка, с различной дифференцировкой и в стадии T3-4aN0M0. Лишь для 1 образца была определена стадия T4aNxM0. Замороженные образцы опухолей подвергали ручной микродиссекции под гистологическим контролем.

Из каждого образца замороженной ткани рака полости рта вырезали 3 секции размером 10 мкм. ДНК экстрагировали с использованием набора «QIAamp DNA Tissue Mini Kit» (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом изготовителя, и элюировали в 100 мкл воды, свободной от нуклеазы. Общее количество экстрагированной ДНК варьировало от 0,82 до 11,20 мкг.

ПЦР-амплификация для выявления ДНК ВПЧ и ВЭБ. Для выявления и количественного определения ДНК ВПЧ высокого канцерогенного риска типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59 в клиническом материале проводили ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием коммерческого набора «АмплиСенс ВПЧ ВКР скрин-титр-FL» (ООО «Интерлабсервис», РФ). Для достоверного выявления ДНК вирусов ВПЧ амплификацию проводили на 50 нг ДНК, в 2 повторностях, в соответствии с протоколом изготовителя.

Для выявления ДНК ВЭБ проводили ПЦР-амплификацию на таком же количестве ДНК (50 нг) с использованием праймеров и зонда, специфичных для многокопийного фрагмента VamNI-W вируса: прямой 5'-CCCAACACTCCACCACACC-3', обратный 5'-TCTTGGAGCTGTCCGAGGG-3' и зонд 5'-FAM-CACACA STACACACACCCACCCGCTCTC-BHQ1-3'. Чтобы исключить возможные ложноотрицательные результаты, обусловленные возможной деградацией ДНК, интегральность ДНК оценивали путём амплификации фрагмента гена β-глобина человека с использованием пары праймеров (прямой 5'-GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA-3, обратный 5'-CCTTGATACCAACCTGCCAG-3'), и гибридизационного зонда 5'-Hex-AAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGG-bhq1'. Все образцы с отсутствием детекции β-глобина были исключены из дальнейшего анализа. Реакционная смесь содержала 0,4 мкМ праймеров и 5 ЕД ДНК-полимеразы TaqF в общем объеме 20 мкл, циклирование началось с этапа денатурации при 95 °С в течение 8 мин и составляло 45 циклов в следующем режиме ПЦР: 95 °С – 15 с, 60 °С – 15 с и 72 °С – 15 с. Для каждого прогона ПЦР был включён положительный контроль (ДНК из ВЭБ-позитивной клеточной линии В95-8) и отрицательный контроль (вода без нуклеазы). Ожидаемый размер ампликона составлял 86 пар нуклеотидов (п.н.) для VamNI-W ВЭБ и 140 п.н. для ампликона β-глобина. Детекцию ВЭБ мишени *EBNA1* проводили количественной ПЦР в том же температурном режиме с использованием олигонуклеотидов *EBNA1*, представленных в публикации [18]. Ожидаемый размер ампликона *EBNA1* составлял 81 п.н. Амплифицированные продукты визуализировали с помощью электрофореза на 2,5% агарозных гелях с последующим окрашиванием бромистым этидием.

ПЦР-амплификация и секвенирование С-концевого региона гена *LMP1*. Для выявления делеционного полиморфизма С-концевого региона гена латентного мембранного белка 1 (*LMP1*) ВЭБ проводили «гнездовую» ПЦР-амплификацию с использованием пар внешних и

внутренних праймеров, как было предложено в работе J. Ai и соавт. [20]. Ожидаемый размер ампликона (относительно параметров референтного изолята В95-8) при первом раунде ПЦР-амплификации составлял 357 п.н., при втором раунде – 260 п.н. Перед секвенированием амплифицированные продукты визуализировали с помощью электрофореза на 2,5% агарозных гелях с последующим окрашиванием бромистым этидием. Секвенирование ПЦР-продукта, амплифицированного с внешними праймерами, проводили на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100 с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции и обработкой данных в программах Chromas 230 и Vector NTI.

Результаты

Были проанализированы на наличие вирусов ВПЧ и ВЭБ методом ПЦР в режиме реального времени 10 из 11 образцов рака слизистой полости рта, так как 1 образец был признан невалидным из-за непрохождения контрольной реакции на β-глобин.

В данной выборке образцов варианты ВПЧ высокого канцерогенного риска не обнаружены, что было подтверждено в дублированной постановке (результаты не показаны). В то же время методом ПЦР в реальном времени с использованием многокопийной мишени VamNI-W в 7 (70%) из 10 образцов рака слизистой оболочки полости рта была выявлена геномная ДНК ВЭБ.

ПЦР-детекция ВЭБ с использованием VamNI-W – наиболее чувствительный метод выявления ВЭБ, что обусловлено детекцией многокопийной специфичной мишени, представленной примерно в 7–11 копиях на геном ВЭБ. Однако, по данным W. Tang и соавт., в некоторых ВЭБ-инфицированных лимфомах и гастроинтестинальных новообразованиях из-за частичного делегирования или перестановок в геноме ВЭБ количество копий VamNI-W крайне вариабельно, и может оказаться ниже, чем количество однокопийных мишеней *EBNA1* и онкогена *LMP1* [21].

Для подтверждения наличия ВЭБ и определения количества копий ВЭБ в образцах рака полости рта была поставлена ПЦР в реальном времени с детекцией маркера *EBNA1*. Мишень *EBNA1* была детектирована в тех же семи образцах рака полости рта, как показано на рис. 1. Количество копий в пересчете на 100 000 клеток в образцах рака полости рта варьировало от 288 до 17×10^3 . Хотя образец рака полости рта с наибольшей вирусной нагрузкой по этому маркеру соответствовал стадии T4, отсутствие других образцов рака слизистой оболочки полости рта в стадии T4 не позволяет проанализировать наличие корреляции вирусной нагрузки ВЭБ с тяжестью заболевания.

Ещё одним маркером детекции ВЭБ был выбран фрагмент С-концевой области гена *LMP1*, являющегося основным онкогеном ВЭБ. Предполагается, что онкогенный потенциал ВЭБ может быть связан с некоторыми полиморфизмами С-концевой области *LMP1* [22]. Такие полиморфизмы, как вариабельное количество 33 нуклеотидных повторов, 15-нуклеотидная делеция в позициях 272–276 аминокислотных остатков (PHDPLP) и Сао-делеция 10 аминокислот (30 п.н.) в позиции 346–355 аминокислотных остатков, характеризующиеся повышенной трансформирующей активностью, чаще обнаруживали в ВЭБ, выделенных из опухолей носоглотки [22, 23]. Полученные нами данные показали, что

Характеристика инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ) образцов опухолей ротовой полости, полученных от пациентов с диагнозом «плоскоклеточная карцинома второй трети языка»

Образец	Стадия по TNM	Возраст, годы	Пол	β-Глобин/ ПЦР	VamHI-W на 10 ⁵ клеток	EBNA1 на 10 ⁵ клеток	LMP1: С-концевые повторы и делеции/дикий тип	Изоляты ВЭБ по LMP1-классификации**
1-1	T3	52	М	9870	698	520	6,5 + делеции	China1
2-4	T3	54	М	62 630	18 180	10 300	4,5 + дикий тип	B95-8
3-1	T3	51	М	16 028	568	371	4,5 + делеции	Med+
4-2	T3	42	М	7800	267	288	н/д*	н/д
5-6	T3	53	М	17 900	3880	2230	4,5 + делеции	Med+
9-1	T3	74	Ж	40 600	11 540	8800	4,5 + делеции	Med+
10-2	T4	60	М	74 900	16 140	17 300	5,5 + делеции	China1

Примечание. *н/д – нет данных; ** изоляты ВЭБ в соответствии с классификацией [24]; «Med+» – Mediterranean+.

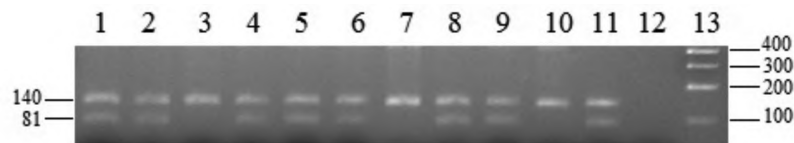


Рис. 1. ПЦР-амплификация EBNA1 и β-глобина в образцах опухолей слизистой оболочки полости рта.

Линии 1–10 – образцы рака слизистой оболочки полости рта; линия 11 – положительный контроль; линия 12 – отрицательный контроль; линия 13 – маркер длин фрагментов, соответствующий 100–400 п.н. Фрагмент β-глобина соответствует длине 140 п.н. Фрагмент EBNA1 соответствует 81 п.н.

полиморфный по длине С-концевой фрагмент LMP1 (в диапазоне размеров 260-300 п.н.) был детектирован ПЦР-амплификацией в 6 из 7 образцов рака полости рта (рис. 2, линии 1–6), так как в образце с минимальной вирусной нагрузкой LMP1 детектировать не удалось (см. рис. 2, линия 7).

Для выявления вариантов изолятов ВЭБ в зависимости от полиморфизмов в С-концевой области провели секвенирование 6 LMP1-положительных образцов рака слизистой оболочки полости рта. Обнаруженные варианты ВЭБ в образцах рака полости рта в зависимости от полиморфизмов LMP1, вирусная нагрузка, рассчитанная по маркерам VamHI-W и EBNA1 относительно β-глобина, представлены в таблице.

Анализ первичной нуклеотидной последовательности секвенированных образцов показал, что в соответствии с классификацией R. Edwards и соавт. [24] среди изоля-

тов ВЭБ рака полости рта выявлены три, относящиеся к Mediterranean, два – к China1, а один соответствовал дикому типу B95-8 (см. таблицу).

Кроме того, изоляты ВЭБ различались между собой по количеству 11 аминокислотных повторов в гене LMP1. В частности, среди вариантов China1 один имел 6,5 повтора, а другой – 5,5 повтора. У всех вариантов Mediterranean было по 4,5 повтора. Вариант B95-8 также содержал 4,5 повтора. Только в образцах с С-делецией были детектированы нуклеотидные замены, вызывающие миссенс-мутацию S309N, тогда как в образце с вариантом B95-8 она отсутствовала. Кроме того, в образцах 1-1, 3-1 и 9-1 были обнаружены дополнительные мутации D293G, Q281R и Q322E, соответственно. Однако нет оснований считать, что наличие данных мутаций в образцах связано с определённым вариантом LMP1. Скорее всего, это отражает процесс накопления мутаций при персистенции ВЭБ в опухоли.

Обсуждение

По результатам исследования, в 70% образцов опухолей российских пациентов, страдающих раком слизистой полости рта, локализованным во второй трети языка, было выявлено инфицирование ВЭБ, но не ВПЧ. Этот результат согласуется с недавно представленными данными иранских исследователей о наличии ВЭБ в 72,3% рака полости рта той же локализации, полученными на выборке из 94 образцов [16]. Однако шведские авторы не обнаружили ВПЧ и ВЭБ в подобных образцах [15]. Отсутствие детекции ВПЧ на выборке из 10 образцов в нашем исследовании выглядит вполне достоверно и согласуется с ранее приведёнными данными о незначительной представленности ВПЧ в раке полости рта в европейских эндемических популяциях [13, 14]. Кроме того, полученные данные о преимущественном инфицировании рака слизистой полости рта ВЭБ в российской популяции интересны в связи с тем, что в североамериканской популяции были обнаружены случаи как ВПЧ-инфекции, так и ВПЧ/ВЭБ-коинфекции [7].

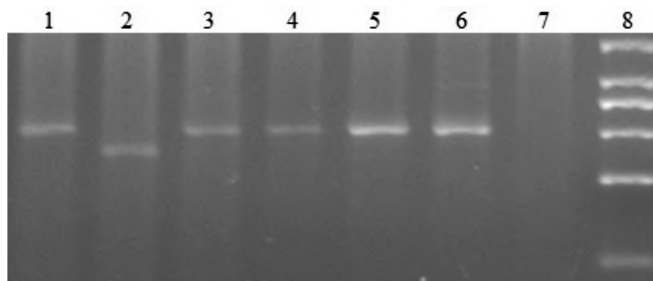


Рис. 2. ПЦР-амплификация С-концевого фрагмента LMP1 в образцах опухолей слизистой оболочки полости рта..

Линии 1–6 – ампликоны размером 260–300 п.н., полученные в результате второго раунда амплификации полиморфного участка гена LMP1 из образцов рака слизистой оболочки полости рта (линия 2 соответствует образцу с длиной фрагмента гена LMP1, равной 260 п.н.); линия 7 – образец опухоли слизистой оболочки полости рта с низкой вирусной нагрузкой ВЭБ, в котором не был детектирован фрагмент гена LMP1; линия 8 – маркер длин фрагментов, соответствующий 100–800 п.н.

Обнаружение в 1 из 6 образцов рака полости рта варианта ВЭБ В95-8, являющегося доминирующим в российской популяции, как у здоровых лиц, так и у больных ВЭБ-ассоциированными заболеваниями [25], не позволяет говорить о специфичной ассоциации определённых вариантов ВЭБ с развитием рака полости рта. В остальных образцах были обнаружены варианты China1 и Mediterranean, которые, в отличие от В95-8, содержали Сао-делеции. В совокупности частота выявления вариантов *LMP1* China1 и Med+, обладающих повышенной трансформирующей активностью, составила 83,3% (5 из 6). Интересно, что подобную частоту этих вариантов *LMP1*-Сао (72,7%) с преобладанием варианта Mediterranean ранее обнаружили российские авторы в ВЭБ-ассоциированных образцах опухолевой ткани [25].

В отличие от исследований образцов рака полости рта, анализ вариантов и варибельности *LMP1* в ВЭБ-ассоциированных образцах рака носоглотки проводили довольно интенсивно. Известно, что в европейских популяциях доминирующими вариантами *LMP1* в изолятах ВЭБ из образцов рака носоглотки являются варианты Mediterranean, однако в России также недавно были обнаружены варианты China1 и North Carolina (NC) [26]. Тем не менее ни один из вариантов *LMP1* не был специфически ассоциирован с раком носоглотки, хотя предполагается, что заражение штаммами ВЭБ с высокоонкогенными мутациями *LMP1*-Сао более предпочтительно для инициации ВЭБ-ассоциированного канцерогенеза [25].

Полученные нами результаты о значительной частоте инфицирования ВЭБ опухолей полости рта у российских пациентов позволяют предположить возможную ассоциацию ВЭБ с риском развития рака полости рта. В литературе этот вопрос остаётся нерешённым. Данные метаанализа по подгруппам, дифференцируемым по географическим регионам, указывают на возможную положительную связь между ВЭБ-инфекцией и риском развития рака полости рта в Азии, Европе и США [27], тогда как другие авторы не подтверждают обнаружения ВЭБ- и ВПЧ-инфицирования в образцах опухолей полости рта [15]. Нельзя исключить, что возможными факторами, приводящими к различной интерпретации результатов, являются различия в диагностической чувствительности методов обнаружения ВЭБ в образцах тканей, используемых разными авторами, неточность в гистологической классификации опухолевых тканей, и, наконец, отсутствие стандартизированной методики определения порога клинической значимости вирусной нагрузки ВЭБ.

Заключение

На данной выборке образцов не обнаружено ассоциации ВПЧ с раком слизистой оболочки ротовой полости. В то же время инфицирование ВЭБ в значительном количестве (70%) проанализированных образцов рака полости рта предполагает потенциальную роль ВЭБ как инфицирующего агента в патогенезе рака слизистой оболочки ротовой полости. Дальнейший анализ на более широкой выборке позволит прояснить частоту вирус-ассоциированных случаев рака слизистой полости рта. Количественной ПЦР-амплификацией с использованием панели из 3 ВЭБ-специфичных маркеров, включающей *VamNI-W*, *EBNA1* и *C*-концевого фрагмента гена *LMP1*, было однозначно подтверждено наличие ВЭБ в образцах рака слизистой оболочки полости рта, а

также определена вирусная нагрузка по маркеру *EBNA1*, которая варьировала от 288 до 17×10^3 копий на 100 000 клеток. Секвенирование ПЦР-продуктов *C*-концевого фрагмента гена *LMP1* 6 образцов рака полости рта выявило существенное преобладание вариантов *LMP1* с делецией Сао, обладающих высокотрансформирующим потенциалом (83,3% (5/6)). Однако среди выявленных вариантов с делецией Сао (Med+, China 1) не было вариантов, специфично ассоциированных с раком полости рта. Для подтверждения возможной ассоциации ВЭБ с развитием рака слизистой оболочки ротовой полости необходимы дальнейшие исследования не только с увеличением числа анализируемых образцов, но и с учётом других географических регионов России.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-24, 27 см. REFERENCES)

2. Федяев И.М., Байриков И.Н., Белова Л.П., Шувалова Т.В. *Злокачественные опухоли челюстно-лицевой области*. М.: Медицинская книга; 2000.
25. Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена *LMP1* у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 11-7.
26. Сенюта Н.Б., Игнатова А.В., Ломая М.В., Гончарова Е.В., Щербак Л.Н., Душенькина Т.Е. и др. Вирус Эпштейна-Барр у больных раком носоглотки и здоровых лиц в двух географически различных регионах России. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(1): 41-50.

REFERENCES

1. Montero P.H., Patel S.G. Cancer of the oral cavity. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2015; 24(3): 491-508. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.006>
2. Fedyaev I.M., Bayrikov I.N., Belova L.P., Shuvalova T.V. *Malignant Tumors of the Maxilla Facial Region [Zlokachestvennye opukholi chelyustno-litsevoy oblasti]*. Moscow: Meditsinskaya kniga; 2000. (in Russian)
3. Mroueh R., Haapaniemi A., Grénman R., Laranne J., Pukkila M., Almagush A., et al. Improved outcomes with oral tongue squamous cell carcinoma in Finland. *Head Neck*. 2017; 39(7): 1306-12. Doi: <https://doi.org/10.1002/hed.24744>
4. Tota J.E., Anderson W.F., Coffey C., Califano J., Cozen W., Ferris R.L., et al. Rising incidence of oral tongue cancer among white men and women in the United States, 1973-2012. *Oral Oncol*. 2017; 67: 146-52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.019>
5. Patel S.C., Carpenter W.R., Tyree S., Couch M.E., Weissler M., Hackman T., et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J. Clin. Oncol*. 2011; 29(11): 1488-94. Doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.7883>
6. Llewellyn C.D., Johnson N.W., Warnakulasuriya K.A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people – a comprehensive literature review. *Oral Oncol*. 2001; 37(5): 401-18.
7. Jiang R., Ekshyyan O., Moore-Medlin T., Rong X., Nathan S., Gu X., et al. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 2015; 44(1): 28-36. Doi: <https://doi.org/10.1111/jop.12221>
8. Svajdler M., Kaspirkova J., Mezencev R., Laco J., Torday T., Dubinsky P., et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a non-endemic eastern European population. *Neoplasma*. 2016; 63(1): 107-14. Doi: https://doi.org/10.4149/neo_2016_013
9. Al Moustafa A.E., Chen D., Ghabreau L., Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med. Hypotheses*. 2009; 73(2): 184-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2009.02.025>

10. Ashraf M.J., Hosseini S., Monabati A., Valibeigi B., Khademi B., Abedi E., et al. The prevalence of human papilloma virus in squamous cell carcinoma of oral tongue. *Iran. J. Pathol.* 2017; 12(2): 144-9.
11. Elango K.J., Suresh A., Erode E.M., Subhadra Devi L., Ravindran H.K., Iyer S.K., et al. Role of human papilloma virus in oral tongue squamous cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2011; 12(4): 889-96.
12. Sgaramella N., Coates P.J., Strindlund K., Loljung L., Colella G., Laurell G., et al. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. *Br. J. Cancer.* 2015; 113(2): 321-6. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.207>
13. Poling J., Ma X.J., Bui S., Luo Y., Li R., Koch W., et al. Human papillomavirus (HPV) status of non-tobacco related squamous cell carcinomas of the lateral tongue. *Oral. Oncol.* 2014; 50(4): 306-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.01.006>
14. Tsimplaki E., Argyri E., Xesfyngi D., Daskalopoulou D., Stravopodis D.J., Panotopoulou E. Prevalence and expression of human papillomavirus in 53 patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014; 34(2): 1021-5.
15. Wilms T., Khan G., Coates P.J., Sgaramella N., Fåhraeus R., Hassani A., et al. No evidence for the presence of Epstein-Barr virus in squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *PLoS One.* 2017; 12(9): e0184201. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184201>
16. Shahrabi-Farahani M., Karimi E., Mostaan L.V., Saba S., Yazdani N., M Amoli M. Association between Epstein Barr virus and tongue squamous cell carcinoma in Iranian patients. *Pathol. Res. Pract.* 2018; 214(1): 130-3. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2017.10.006>
17. Cheung A., Kieff E. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* 1982; 44(1): 286-94.
18. Ryan J.L., Fan H., Glaser S.L., Schichman S.A., Raab-Traub N., Gulley ML. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J. Mol. Diagn.* 2004; 6(4): 378-85. Doi: [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60535-1](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60535-1)
19. Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Washington, DC, USA: Wiley-Blackwell; 2009: 22-45.
20. Ai J., Xie Z., Liu C., Huang Z., Xu J. Analysis of EBNA-1 and LMP-1 variants in diseases associated with EBV infection in Chinese children. *Virol. J.* 2012; 9: 13. Doi: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-13>
21. Tang W., Fan H., Schroeder J., Dunphy C.H., Bryant R.J., Fedoriv Y., et al. Atypical Epstein-Barr viral genomic structure in lymphoma tissue and lymphoid cell lines. *Diagn. Mol. Pathol.* 2013; 22(2): 91-101.
22. Guiretti D.M., Chabay P.A., Valva P., Stefanoff C.G., Barros M.H., De Matteo E., et al. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. *J. Med. Virol.* 2007; 79(11): 1722-30. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.21020>
23. Lorenzetti M.A., Gantuz M., Altcheh J., De Matteo E., Chabay P.A., Preciado M.V. Distinctive Epstein-Barr virus variants associated with benign and malignant pediatric pathologies: *LMP1* sequence characterization and linkage with other viral gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 609-18. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.05778-11>
24. Edwards R., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology.* 1999; 261(1): 79-95. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
25. Goncharova E.V., Senyuta N.B., Smirnova K.V., Shcherbak L.N., Gurtsevich V.E. Epstein-Barr virus (EBV) in Russia: infection of the population and analysis of the *LMP1* gene variants in patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals. *Voprosy virusologii.* 2015; 60(2): 11-7. (in Russian)
26. Senyuta N.B., Ignatova A.V., Lomaya M.V., Goncharova E.V., Shcherbak L.N., Dushen'kina T.E., et al. Epstein-Barr virus in the population of two geographically different regions of Russia. *Infektsiya i immunitet.* 2017; 7(1): 41-50. (in Russian)
27. She Y., Nong X., Zhang M., Wang M. Epstein-Barr virus infection and oral squamous cell carcinoma risk: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0186860. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186860>

Поступила 07.02.2019

Принята в печать 02.04.19

Ракитянская И.А.¹, Рябова Т.С.^{1,2}, Тоджибаев У.А.¹, Калашникова А.А.³

АЛЛОКИН-АЛЬФА – НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ХРОНИЧЕСКОЙ ВИРУС ЭПШТЕЙН-БАРР ИНФЕКЦИИ

¹ Амбулаторное отделение аллергологии-иммунологии и клинической трансфузиологии

ГБУЗ Городская поликлиника 112, 195427, г. Санкт-Петербург, Россия;

² Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России, 194044, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы. Сегодня доказано, что яды насекомых и животных богаты антимикробными веществами (пептидами) и содержат широкий спектр активных биологических соединений. Антимикробные пептиды играют важную роль в иммунном ответе врождённого иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. На основе антимикробных пептидов в России разработан противовирусный препарат аллокин-альфа. Его действующим веществом является цитокиноподобный пептид аллоферон. **Цель исследования** – оценить влияние терапии аллокином-альфа на количество ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинические жалобы у больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр (ХВЭБИ). **Материал и методы.** Обследованы 59 больных ХВЭБИ (45 женщин и 14 мужчин; средний возраст 32,52 ± 1,75 года). У больных определяли количество ДНК ВЭБ в образцах слюны методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл. Больные были рандомизированы на 2 группы: 25 пациентов 1-й группы получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно по 1,0 мг через день); 33 пациента 2-й группы получали валтрекс (по 500 мг 2 раза в сутки, внутрь) в течение 2 мес. **Результаты.** После терапии аллокином-альфа у 59,67% больных были получены отрицательные результаты ПЦР. После 2-месячной терапии валтрексом отрицательные результаты ПЦР были получены только у 27,27% участников исследования. Корреляционный анализ выявил достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб у больных в общей группе ХВЭБИ. **Обсуждение.** Аллокин-альфа улучшает распознавание вирус-инфицированных клеток и способствует подавлению репликации вируса. **Заключение.** Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения ХВЭБИ в дозе 1 мг подкожно через день при курсовой дозе не менее 9 инъекций.

Ключевые слова: вирус Эпштейн-Барр; иммунитет; пептиды; терапия; аллоферон.

Для цитирования: Ракитянская И.А., Рябова Т.С., Тоджибаев У.А., Калашникова А.А. Аллокин-альфа – новые подходы к лечению хронической вирус Эпштейн-Барр инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 118-124.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-118-124>

Rakitiyanskaya I.A.¹, Riabova T.S.^{1,2}, Todzhibaev U.A.¹, Kalashnikova A.A.³

ALLOKIN-ALPHA – NEW APPROACHES IN THE TREATMENT OF CHRONIC VIRUS EPSTEIN-BARR INFECTIONS

¹ Outpatient Department of Allergology-Immunology and Clinical Transfusiology City Ambulant Department №112, St. Petersburg, 195427, Russian Federation;

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov, St. Petersburg, 194044, Russian Federation;

³ The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, 194044, Russian Federation

Introduction. Epstein-Barr virus causes recurrent infectious mononucleosis-like symptoms. Today it is shown that the poisons of insects and animals are rich sources of antimicrobial substances (peptides) and contain a wide range of active biological compounds. Antimicrobial peptides play an important role in the immune response of the innate immunity of the host in the presence of pathogenic microorganisms. Russia has developed an antiviral drug Allokin-alpha on the basis of antimicrobial peptides. The active ingredient of this drug is cytokin-like peptide alloferon. The aim of the study is to evaluate the effect of allokin-alpha therapy on the amount of EBV DNA in saliva samples and clinical complaints in patients with chronic Epstein-Barr infection (ChEBVI). **Material and methods.** 59 patients with ChEBVI were examined (45 women and 14 men; mean age 32.52 ± 1.75 years). Patients were examined quantification of DNA Epstein-Barr virus in saliva samples by the method of polymerase chain reaction (PCR) with hybridization-fluorescence detection in “real time” mode. The analytical sensitivity of the test system is 400 copies / ml. Patients were randomized into two groups: group 1 (25 patients) received Allokin-alpha therapy (9 injections of s / c, 1.0 mg every other day); group 2 (33 patients) received Valtrex (500 mg x 2 times / day, by mouth) for two months. **Results.** 59.67% of patients had negative PCR results after treatment with Allokin-alpha. Only 27.27% of patients had negative PCR results after two months of treatment with Valtrex. In a correlation analysis, a significant effect of the initial number of copies of DNA EBV on the severity of clinical complaints in patients was revealed in the general group ChEBVI. **Discussion.** Allokin-alpha improves the recognition of virus-infected cells and helps suppress viral replication.

Conclusions. Allokin-alpha therapy can be recommended for the treatment of chronic EBVI at a dose of 1 mg subcutaneously every other day with a course dose of at least 9 injections.

Keywords: Epstein-Barr virus; immunity; peptides; therapy; alloferon.

For citation: Rakitianskaya I.A., Riabova T.S., Todzhibaev U.A., Kalashnikova A.A. Allokin-alpha - new approaches in the treatment of chronic virus Epstein-Barr infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 118-124. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-118-124>

For correspondence: Irina A. Rakitianskaya, Doctor of Medical Sciences, Professor of outpatient department of allergology-immunology and clinical transfusiology of the City Polyclinic 112 of St. Petersburg, 195427, Russian Federation.

E-mail: tat-akyla@inbox.ru

Information about authors:

Rakitianskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2524-4602>

Riabova T.S., <https://orcid.org/0000-0001-9543-9646>

Kalashnikova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5338-0866>

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 06 February 2019

Accepted 04 April 2019

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), или вирус инфекционного мононуклеоза, представляет собой прототип персистирующей вирусной инфекции, характеризующейся латентностью. Реактивация скрытой инфекции ассоциируется с возобновлением репликации вируса и в конечном итоге с его выходом (“shedding”) из клетки. В организме хозяина имеются ткани-мишени, специфические для каждого герпес-вируса. В них вирус персистирует с возможностью входа и выхода из ткани с помощью разработанной им стратегии, в результате которой он либо экспрессирует минимальное число вирусных генов в небольшом количестве инфицированных клеток, либо устраняет экспрессию генов на уровне белка. Это приводит к уклонению от иммунного ответа хозяина, в результате вирус в очень маленьком количестве (1 инфицированная клетка на 5 мл крови) с минимальным воздействием сохраняется в организме хозяина. При первичном инфицировании у иммунокомпетентных лиц ВЭБ вызывает рецидивирующие инфекционные мононуклеозоподобные симптомы, которые фактически определяются как идиопатические, характеризуются вирусной персистенцией и сопровождаются повышенной продукцией антител IgG к капсидному и раннему антигену, а также низкой продукцией или отсутствием антител к ядерному антигену (EBNA) [1]. В 1980-х годах наибольший интерес стал вызывать синдром хронической усталости, когда именно за связь с ВЭБ его назвали хроническим мононуклеозом или хронической инфекцией ВЭБ (ХВЭБИ). Ранее, в 1983 г. Hellman D. и соавт. [2] впервые предложили определение для этого синдрома «хроническая активная ВЭБ-инфекция» (Chronic Active EBV infection – CAEBV).

Инфицирование клеток ВЭБ может иметь 2 возможных развития. Литическая инфекция возникает, когда образуются вирионы и клетка лизируется, что характерно для эпителиальных и частично плазматических клеток. Альтернативно, ВЭБ может индуцировать латентную инфекцию путём генерации эписомы – кольцевого генома ВЭБ, который расположен в ядре лимфоцитов хозяина. В этом случае эписома остаётся в латентной форме в В-клетках, а вирусная репликация спонтанно активируется только в небольшом проценте латентно инфицированных клеток [3].

Инфицирование ВЭБ-инфекцией происходит через контакт со слюной, при этом вирус инфицирует эпителиальные клетки кольца Waldeyer’s, реплицирует, далее инфицирует покоящиеся naïve В-клетки в близлежащих областях посредством активации латентных белков, кодируемых программой роста, и в результате клетка становится пролиферирующим лимфобластом (лимфо-

бластный взрыв). В дальнейшем развивается латентная стадия, и вирус сохраняется в ядре покоящихся В-клеток памяти в скрытой эписомальной форме, экспрессируя только ограниченный набор генов, включая ядерный антиген ВЭБ (EBNA-1). Таким образом, В-клетки памяти становятся местом долговременной вирусной персистенции, где ВЭБ сохраняется длительное время, не являясь патогенным для человека, так как не экспрессирует гены, способствующие пролиферации клеток, а иммунологическая память сохраняется на всю жизнь. Для понимания сложной биологии ВЭБ была предложена модель зародышевого центра (GC) [4]. Согласно модели GC предполагается, что ВЭБ персистирует в латентно инфицированных В-клетках лимфоидной ткани кольца Waldeyer’s, которые проходят этапы дифференцировки, каждый из них использует программу дискретной вирусной транскрипции гена. На первом этапе вирус экспрессирует все 9 латентных белков – это называется программой латенции 3, или транскрипция роста (latency 3 or the growth transcription program). Далее эти клетки перемещаются в GC, где вирус экспрессирует более ограниченную структуру скрытых белков, называемую латентностью 2, или программой по умолчанию (latency 2 or the default program), а клетки либо остаются латентно инфицированными В-клетками памяти, либо экспрессируют только вирусный геномный белок EBNA1 (известный как программа EBNA1 или латентность 1), либо вообще не имеют вирусных белков. В дальнейшем развивается латентность 0, или программа латентности. Компаратмент В-клеток памяти – это место длительной персистенции, так как вирус находится в состоянии покоя и невидим для иммунного ответа. Однако небольшая субпопуляция латентно инфицированных В-клеток памяти может инициировать литическую реактивацию в сочетании с терминальными сигналами дифференцировки [5]. Реактивацию вируса можно подразделить на 3 дискретные фазы: 1) немедленная ранняя, когда в период образования белков рано экспрессируются транскрипционные факторы, участвующие в репликации вирусной ДНК; 2) поздняя, когда вирусная ДНК и структурные белки собираются в вирионы [6]; 3) конечная фаза, когда высвобождение вируса приводит к инфицированию новых naïve В-клеток, тем самым завершая цикл. ВЭБ инфицирует клетки посредством взаимодействия вирусных гликопротеинов gp350 / 220 с CD21 и gp42 / gH / gL с HLA II класса в В-клетке. Таким образом, В-клетки памяти являются местом длительной вирусной персистенции, где вирус может оставаться в течение всей жизни пациента, потому что формируется иммунологическая память, а вирус перестаёт быть пато-

генным для хозяина. Показано, что уровень инфицированных клеток аналогичен между периферической кровью и кольцом Waldeyer's, но в 20 раз ниже, чем в другой лимфоидной ткани (селезёнка и брыжеечный лимфатический узел) [7]. Вирус постоянно просачивается в полость рта, где в течение примерно 2 мин он смешивается со слюной перед актом глотания. Таким образом, полость рта является резервуаром потока ВЭБ. Ротовая полость и периферическая кровь представляют собой важные анатомические места локализации и персистенции ВЭБ-инфекции. Находясь в латентной форме, вирус способствует развитию низкоуровневой активации иммунной системы, что сопровождается продукцией интерферона-гамма (IFN- γ) и фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α) в ответ на частую, но субклиническую реактивацию вируса [8]. По-видимому, в этом случае активация иммунной системы может быть обусловлена либо хронической презентацией вирусных антигенов, либо трансактивацией суперантигена, которая зависит от основного транскрибирующего ВЭБ-латентного гена EBNA-2, активирующего большинство других латентных генов ВЭБ [9]. При ХВЭБИ происходит клональная экспансия ВЭБ-инфицированных Т-клеток или естественных киллеров (NK), которые экспрессируют только EBNA-1 и латентный мембранный белок 1 (латентная инфекция типа 2) [10].

В последние годы опубликовано много исследований о том, что яды насекомых и животных богаты источниками антимикробных веществ и содержат широкий спектр активных биологических соединений с чётко выраженной химической структурой. Таким образом, антимикробные пептиды (AMP) – это диверсифицированная группа олигопептидов с различным количеством (от 5 до 100 и более) аминокислот, которые играют важную роль в иммунном ответе врождённого иммунитета хозяина при попадании патогенных микроорганизмов. В настоящее время обнаружено и синтезировано более 5000 AMP [11]. Природные AMP могут быть обнаружены как у прокариот (например, у бактерий), так и у эукариот (например, у простейших, грибов, растений, насекомых и животных) [12].

Противовирусные AMP нейтрализуют вирусы либо путём интеграции в вирусную оболочку, либо нарушая прикрепление вирусных частиц к поверхности клеточной мембраны, т.е. AMP не способны конкурировать с вирусными гликопротеинами за связывание с гепарансульфатными рецепторами на клеточной мембране. Вместо этого антивирусные AMP способны проникнуть через клеточную мембрану и локализоваться в цитоплазме и органеллах, вызывая изменения в профиле экспрессии генов в клетках, что помогает блокировать экспрессию вирусных генов. В том случае, когда AMP вмешиваются в репликацию вируса, они внутриклеточно взаимодействуют с капсидом вириона, предотвращая его декапсидирование. Следовательно, вирусная нуклеиновая кислота не может быть освобождена и транскрибирована [13]. Кроме того, запускаются другие механизмы, которые задействованы в работе врождённой иммунной системы: 1) индукция экспрессии toll-like рецепторов, которые взаимодействуют с вирусной нуклеиновой кислотой; 2) продукция цитокинов, которые стимулируют действие Т-цитотоксических клеток и NK-клеток; 3) экспрессия в инфицированных клетках молекул главного комплекса гистосовместимости с целью презентации вирусных пептидов другим клеткам иммунной системы

[14]; 4) противовирусные соединения могут активировать врождённые факторы рестрикции, кодируемые инфицированной клеткой [15].

Из гемолимфы светлячка *Calliphora vicina* были выделены катионные пептиды аллоферон 1 и 2, состоящие из 12 и 13 аминокислотных остатков (HGVS GHGQHGVNHG и GVS GHGQHGVNHG соответственно). Аллоферон 2 соответствует усечённой на N-конце форме аллоферона 1. Однако неизвестно, является ли присутствие 2 пептидов результатом естественной дегградации аллоферона 1 или молекулы аллоферона кодируются разными генами. Даже если структура аллоферона уникальна среди известных иммуномодулирующих пептидов, поиск в банке данных выявил очень мало идентификаторов с известными крупными функционально значимыми белками [16].

Название «аллоферон» было выбрано, чтобы показать функциональное сходство вещества с интерферонами, нативными регуляторами цитотоксических лимфоцитов у позвоночных (-ферон), и происхождение от разных видов беспозвоночных (алло-). Однако сходные аминокислотные участки были обнаружены в некоторых функционально значимых белках, таких как предшественник гемагглютинаина вируса гриппа В из 583 остатков, некоторое сходство выявлено с двумя бычьими прионными белками I и II на протяжении 13 остатков. Прионные белки в значительной степени экспрессируются в тканях центральной нервной системы и многих тканях экстранейронов, в частности лимфоцитах, участвуя в активации Т-клеток [17]. Некоторые сходства выявлены между аллофероном и двумя короткими доменами высокомолекулярного бычьего кининогена 1 (аминокислоты 452–460) и эндотелиального коллагена человека $\alpha 2$ (аминокислоты 33–44). Структура пептида была модифицирована путём замены His в положении 9 или 12 на природные или не природные аминокислоты. Биологические свойства этих пептидов были определены в противовирусном тесте *in vitro* против штамма McIntrie вируса герпеса человека 1 типа (HNВ-1МС) с использованием клеточной линии Vero. Было обнаружено, что большинство оцениваемых пептидов могут снижать титр HNВ-1 в клетках Vero. Показано, что после экспериментального заражения бактериями *Calliphora vicina* продуцирует ряд сильнодействующих антимикробных веществ с первичными структурами, сходными с описанными для других насекомых, а именно: дефензин (defensin), диптерицины (dipterocins), цекропины (cecropins) и богатые пролином пептиды (proline-rich peptides) [16]. До открытия аллоферона было показано, что сырая гемолимфа *Calliphora vicina* содержит фактор, способный при введении мышам стимулировать противовирусную и противоопухолевую резистентность. Это приводит к увеличению активности NK-клеток, которые играют ключевую роль в противовирусном и противоопухолевом врождённом иммунитете, характерном для позвоночных и некоторых беспозвоночных. Было высказано предположение, что гемолимфа *Calliphora* может содержать цитокин-подобный материал, перекрёстно реагирующий с мышинными NK-клетками и защищающий инфицированных вирусом или привитых опухолью реципиентов. Аллоферон имеет двойные функции: 1) прямое ингибирование репликации герпес-вируса, ассоциированного с саркомой Капоши за счёт подавления активности белка-активатора (AP) 1 и усиления противовирусного иммунитета за счёт усиления цитотоксич-

ности NK-клеток [18]; 2) эффективное уничтожение инфицированных вирусом клеток путём активации NK-клеток. Также показано, что аллоферон оказывает противоопухольевый эффект, опосредованный повышением экспрессии рецептора 2B4, активирующего NK-клетки, и усилением гранулярного экзоцитоза NK-клеток [19]. Кроме того, в экспериментальной работе выявлено противовоспалительное действие аллоферона на линию клеток кератиноцитов HaCaT человека и мыши [20].

Среди анализируемых соединений наиболее активно соединение [3–13]-аллоферон 1, поскольку оно: 1) стимулирует естественную цитотоксичность лимфоцитов периферической крови человека; 2) индуцирует продукцию IFN в эксперименте на мышах и у людей; 3) повышает противовирусную и противоопухольевую резистентность у мышей [21–23].

Аллокин-альфа (BRAND-PHARM, Москва) – российский противовирусный препарат нового типа, разработанный международным коллективом учёных (Reg. № 002829/01 от 22.09.2003). Действующим веществом препарата является цитокиноподобный пептид аллоферон (глистидин-глицин-валин-серин-глицин-гистидин-глицин-глутамин-гистидин-глицин-валин-гистидин-глицин).

Цель настоящего исследования – оценить эффективность терапии аллокином-альфа на динамику количества копий ДНК ВЭБ в образцах слюны методом РВ-ПЦР и клинических жалоб через 1 месяц после окончания терапии у больных ХВЭБИ.

Материал и методы

Обследование было проведено у 59 больных ХВЭБИ (45 женщин и 14 мужчин, средний возраст $32,52 \pm 1,75$ года). Длительность ХВЭБИ от момента появления первых жалоб у больного до лабораторного подтверждения ВЭБ-инфекции и постановки диагноза составила $2,18 \pm 0,20$ года. У всех больных отсутствовали какие-либо иммунологические нарушения или другие инфекции, которые могли бы объяснить жалобы на момент начала исследования, а также любые хронические заболевания, которые могли повлиять на результаты исследования. В исследование не были включены больные, которые последние 3 мес получали противовирусную или иммуномодулирующую терапию.

Для ХВЭБИ характерно длительное течение и частые рецидивы с клиническими и лабораторными признаками вирусной активности [24]. Больных беспокоит длительный субфебрилитет ($37,1 - 37,3$ °C), слабость, немотивируемая утомляемость, повышенная потливость (особенно в ночное время), постоянное чувство дискомфорта и/или боли в горле, у некоторых больных появляется кашель, лимфаденит, отёк слизистой носа с обильным стеканием слизи, стоматит, возможны кожные высыпания, артралгии, боли в мышцах туловища и конечностей. Могут отмечаться конъюнктивит, отит. Часто развиваются неврологические расстройства – головные боли, нарушения памяти и сна, снижение концентрации внимания, раздражительность, плаксивость, склонность к депрессиям, может беспокоить чувство тяжести в правом подреберье. По данным ультразвукового исследования брюшной полости, у части больных увеличена селезёнка и/или печень.

Клинические методы исследования включали сбор анамнеза, данные о ранее проводимой противовирусной терапии, сопутствующих заболеваниях. Клини-

ческое состояние пациентов оценивали по общепринятой методике, включающей объективные данные и жалобы пациента на момент осмотра. Регистрировали жалобы пациента с использованием Шкалы субъективной оценки по 3-балльной системе (0 – отсутствие симптомов, 1 – слабая выраженность симптомов, 2 – умеренная выраженность симптомов, 3 – значительная выраженность симптомов). Больных рандомизировали на 2 группы для проведения разных схем терапии. В 1-ю группу вошли 26 больных в возрасте от 21 до 62 лет, которые получали терапию аллокином-альфа (9 инъекций подкожно по 1,0 мг через день). Больные хорошо переносили подкожное введение аллокина-альфа, не выявлено аллергических реакций, гепатонейротоксического и токсического действия на кровеносные органы. У 3 пациентов отмечалась умеренная слабость (в течение нескольких часов) после 1-й и 2-й инъекций, ещё у 2 больных после 3-й инъекции появились новые высыпания на кожных покровах. Во 2-ю группу были включены 33 больных в возрасте от 22 до 49 лет, получавших пролонгированную схему терапии препаратом из группы ациклических нуклеозидов – валтрексом (по 500 мг 2 раза в сутки, внутрь) в течение 2 мес.

Для оценки эффективности проводимого лечения через 1 мес после окончания курса терапии проанализировали динамику количества ДНК ВЭБ в образцах слюны и клинических жалоб в обеих группах.

Для подтверждения вирусной этиологии заболевания у больных выявляли ДНК вируса методом ПЦР в образцах слюны, так как известно, что при хронических формах инфекции исследование ПЦР в образцах крови не даёт положительного результата и большей информативностью по определению ДНК ВЭБ при хронических и атипичных формах имеет анализ проб слюны. Количество ДНК вируса Эпштейна-Барр в образцах слюны определяли методом ПЦР с гибридацион-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (РВ-ПЦР). Использовали тест-системы «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Единицы измерения, используемые для оценки вирусной нагрузки при экстракции ДНК из слюны, – количество копий ДНК ВЭБ на 1 мл образца. Этот показатель рассчитывают по формуле из инструкции к набору:

$$\text{КПДНК} = \text{КДНК} \cdot 100 \text{ (копий/мл)},$$

где КДНК – количество копий ДНК ВЭБ в пробе. Аналитическая чувствительность тест-системы составляет 400 копий/мл.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью статистического пакета программного обеспечения IBM SPSS Statistics 26. Групповые результаты представлены в виде средней (M) \pm стандартная ошибка от средней (Standard Error). Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических (метод Пирсона) и непараметрических (метод Спирмена, τ Кендалла) критериев. Для определения прогностической значимости количества копий ДНК ВЭБ использовали регрессионный линейный анализ с расчётом коэффициента детерминации (R Square) и критерия Дарбина–Уотсона (Durban–Watson) для проверки соблюдения условия независимости наблюдений, анализ дисперсионный (Analysis of Variance, ANOVA) с расчётом критерия Фишера (F) для проверки значимости модели. Кроме того, рассчитывали стандартизован-

ный коэффициент β с 95% доверительным интервалом. Критический уровень значимости различия показателей принимали равным 0,05.

Результаты

Из анамнеза известно, что у 40 (67,79%) больных в детстве было неоднократное обострение хронического тонзиллита; 20 (33,89%) человек перенесли острый инфекционный мононуклеоз, 43 (72,88%) пациента жаловались на частые ОРВИ (от 5 до 10 раз в год), 49 (83,05%) больных связывали появление клинических жалоб с длительным стрессом. До начала терапии количество копий ДНК ВЭБ на 1 мл образца слюны у всех больных ХВЭБИ ($n = 58$) варьировало от $1,28 \cdot 10^4$ до $3,52 \cdot 10^6$ копий. При анализе динамики количества копий ДНК ВЭБ в группе больных, получавших монотерапию аллокином-альфа, и в группе больных, получавших только валтрекс, через 1 мес были получены следующие результаты (табл. 1).

Из представленных в таблице данных видно, что на фоне терапии аллокином-альфа у 59,67% больных получены отрицательные результаты ПЦР, а на фоне приема валтрекса – только у 27,27%. Далее была проанализирована динамика клинических жалоб в каждой отдельной группе

больных через 1 мес после окончания терапии (табл. 2).

У больных 1-й группы отмечается достоверное уменьшение таких клинических жалоб, как субфебрильная температура тела, боли в горле, слабость, озноб, потливость, стекание слизи по задней стенке глотки, стоматит, боли в суставах, раздражительность и плаксивость, высыпания на кожных покровах после проведения терапии аллокином-альфа. Остальные жалобы остались без изменения. Во 2-й группе больных, получавших терапию валтрексом, отмечалось достоверное уменьшение жалоб только на боли в горле, озноб и потливость. Остальные жалобы у больных сохранялись через 1 мес после проведения 2-месячного курса терапии.

При проведении корреляционного анализа было выявлено достоверное влияние исходного количества копий ДНК ВЭБ на выраженность клинических жалоб больных ХВЭБИ. Результаты представлены в табл. 3.

Для определения прогностической значимости исходного количества копий ДНК ВЭБ на эффективность проводимой терапии в обеих группах использовали регрессионный линейный анализ с расчетом коэффициента детерминации и критерия Дарбин–Уотсона для проверки соблюдения условия независимости наблюдений. Допустимые значения критерия были от 2,049 до 2,668.

Таблица 1

Динамика количества копий ДНК вируса Эпштейна–Барр через 1 мес после окончания противовирусной терапии у больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

Группа больных	Количество копий/мл до терапии	Количество копий/мл после терапии	<i>p</i>
1-я группа (аллокин-альфа)	320773,75 ± 151893,17 (<i>n</i> = 26)	206589,37 ± 190659,95 (<i>n</i> = 11) 0,00 (<i>n</i> = 15)	0,069
2-я группа (валтрекс)	253837,25 ± 48202,14 (<i>n</i> = 33)	53109,08 ± 28828,32 (<i>n</i> = 24) 0,00 (<i>n</i> = 9)	0,001

Таблица 2

Частота клинических жалоб (%) у больных до начала терапии и через 1 мес после ее окончания в 1-й и 2-й группах больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

Клинические жалобы	1-я группа (<i>n</i> = 26), аллокин-альфа		2-я группа (<i>n</i> = 33), валтрекс	
	до терапии	после терапии	до терапии	после терапии
Субфебрильная температура тела	50,00	23,07	76,75	66,67
<i>p</i>		0,001		0,054
Лимфаденит	23,07	19,23	54,54	45,45
<i>p</i>		0,083		0,082
Боли в горле	50,00	42,30	81,81	57,57
<i>p</i>		0,001		0,001
Слабость	69,23	53,84	81,81	66,67
<i>p</i>		0,001		0,056
Озноб	34,62	15,38	66,67	36,36
<i>p</i>		0,006		0,001
Потливость	65,38	57,69	90,91	54,54
<i>p</i>		0,001		0,001
Стекание слизи	42,30	26,92	69,69	60,60
<i>p</i>		0,001		0,052
Стоматит	23,07	15,38	36,36	33,33
<i>p</i>		0,031		0,054
Боли в суставах	19,23	11,54	33,33	27,27
<i>p</i>		0,036		0,054
Раздражительность и плаксивость	73,08	65,38	69,69	66,67
<i>p</i>		0,001		0,058
Высыпания на коже	69,23	53,85	54,54	45,45
<i>p</i>		0,001		0,058

Таблица 3

Влияние количества копий ДНК вируса Эпштейна–Барр на выраженность клинических жалоб больных хронической инфекцией вируса Эпштейна–Барр

Жалоба	Коэффициент корреляции
Слабость	$\tau = 0,46; p = 0,022$ $r = 0,55; p = 0,026$
Боли в горле	$\tau = 0,63; p = 0,002$ $r = 0,73; p = 0,001$
Боли в суставах	$\tau = -0,41; p = 0,050$ $r = -0,52; p = 0,039$
Субфебрильная температура	$\tau = -0,40; p = 0,050$ $r = -0,55; p = 0,030$

Все возможные полученные значения R^2 оказались меньше 50%, что свидетельствует об отсутствии статистической связи между количеством копий ДНК ВЭБ и клинико-лабораторными показателями, так как регрессионные модели имеют низкое значение. Достоверно значимых результатов критерия F и коэффициента β , свидетельствующих о значимости полученной регрессионной модели, нами не получено. Вероятно, результат обусловлен исходным количеством копий ДНК ВЭБ в пределах 10^5 .

Обсуждение

В настоящее время единого подхода в лечении ХВЭБИ нет, несмотря на то, что существует целый ряд специфических противовирусных препаратов. В частности широко используются ациклические нуклеозиды (ацикловир, валтрекс, фамвир) и синтетический нуклеозидный аналог гуанозина – ганцикловир (цимевен, вальцит). В отдельных работах показано, что противовирусная терапия может быть эффективной при лечении ХВЭБИ, так как нуклеозидные аналоги тимидина могут выраженно ингибировать фосфорилирование тимидина и быть наиболее подходящими нуклеозидными противовирусными препаратами, воздействующими на фермент [10]. Однако *in vitro* показано, что тирозинкиназа ВЭБ имеет варибельное сродство к антигерпетическим противовирусным препаратам и не может фосфорилировать ацикловир или ганцикловир, именно поэтому данные препараты неэффективны при лечении ХВЭБИ [25; 26]. Эти препараты ингибируют вирусную ДНК-полимеразу и, следовательно, ингибируют литическую репликацию ВЭБ в инфицированных клетках. ВЭБ-инфицированные НК- или Т-клетки у пациентов с ХВЭБИ обычно экспрессируют латентный ВЭБ-ядерный антиген

EBNA-1 и латентный мембранный белок LMP2A. Однако репликация латентного ВЭБ в пролиферирующих В-клетках не требует вирусной ДНК-полимеразы, поэтому антивирусная терапия обычно неэффективна [27].

В 2016 г. были опубликованы результаты анализа эффективности лечения инфекционного мононуклеоза по Всемирному реестру клинических испытаний ВОЗ (с 1981 по 2016 г.), которые показали сомнительную эффективность противовирусных препаратов (ацикловир, валацикловир) при остром инфекционном мононуклеозе. На фоне противовирусной терапии наблюдалось подавление вирусного выброса («shedding»), но этот эффект прекращался после окончания терапии [28]. На фоне противовирусной терапии количество инфицированных лимфоцитов практически не меняется, уровень вирусной нагрузки незначительно снижается, но имеет тенденцию возвращаться к исходному значению после прекращения терапии [29]. Показано, что ВЭБ-тимидинкиназа не фосфорилирует ацикловир и ганцикловир, именно поэтому данные препараты неэффективны при лечении ХВЭБИ [26]. В нашем исследовании отрицательные результаты по количеству копий ДНК ВЭБ во 2-й группе после лечения (валтрекс 1000 мг/сут 2 мес) были получены только у 27,7% больных, а у остальных 72,72% больных количество копий ДНК имело тенденцию к снижению. Больные отмечали отсутствие положительной динамики клинических жалоб при приеме валтрекса. Таким образом, наши результаты подтвердили опубликованные ранее данные, свидетельствующие о низкой эффективности препаратов группы ациклических нуклеозидов в лечении ХВЭБИ.

Исследования последних лет способствовали разработке и появлению новых противовирусных препаратов, особенно из натуральных продуктов, поскольку они составляют более 25% новых прототипов лекарств, одобренных в последние десятилетия [30]. Аллокин-альфа улучшает распознавание вирус-инфицированных клеток и способствует подавлению репликации вируса. Противовирусный эффект препарата обусловлен: 1) блокированием и уничтожением вирусов и инфицированных клеток путём локальной продукции интерферона в очаге вирусной инфекции, не индуцируя системную продукцию, что позволяет избежать ненужного иммунного влияния на организм в целом; 2) формированием противовирусного иммунного ответа за счёт усиления цитотоксической активности НК-клеток и В-лимфоцитов, ответственных за продукцию специфических антител [31]. В работе М.Ю. Серебрякова и соавт. [32] показано, что после курса терапии аллокином-альфа в сыворотке больных исчезли маркеры репликации ВЭБ – IgM и IgG к ранним белкам. Методом ПЦР в крови, в биоптатах лимфатических узлов и печени, а также в соскобе со слизистой прямой кишки не обнаружено ДНК ВЭБ. Аналогичные результаты по снижению количества копий ДНК ВЭБ в образцах слюны получены у больных с хроническим воспалительным заболеванием верхних дыхательных путей, обусловленным ВЭБ через 2 нед после 6 инъекций аллокина-альфа. До терапии уровень ПЦР в образцах слюны был $3,39 \pm 1,78$ (Ig ГЭ на 10^5 клеток), а через 2 нед после терапии – $1,79 \pm 2,61$ (Ig ГЭ на 10^5 клеток). Частота выявления вирусной нагрузки до терапии была 30%, а через 2 нед после терапии – 10%. В нашей работе отрицательные результаты ПЦР через 1 мес после терапии аллокином-альфа выявлены у 59,67% больных, из клинических жалоб сохранился только лимфаденит ($p = 0,083$). Таким образом, полученные данные подтверждают опубликованные ранее результаты эффективности препарата в лечении ХВЭБИ.

Выводы

1. Терапия аллокином-альфа оказывает выраженный противовирусный эффект на количество копий ДНК ВЭБ у больных ХВЭБИ.

2. Через 1 мес после окончания терапии аллокином-альфа достоверно уменьшается число клинических жалоб у больных ХВЭБИ.

3. Терапия аллокином-альфа может быть рекомендована для лечения ХВЭБИ в дозе 1 мг подкожно через день при курсовой дозе не менее 9 инъекций.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-25, 27, 28, 30 см. REFERENCES)

26. Хахалин Л.Н., Абазова Ф.И. Ацикловир при лечении острых и рецидивирующих герпесвирусных инфекций. *Клиническая фармакология и терапия*. 1995; 4(4): 78-81.
29. Казмирчук В.Е., Мальцев Д.В. *Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека*. Киев: Феникс; 2009.
31. Коновалова Н.В., Храменко Н.И., Величко Л.Н., Юрченко Л.А. Роль уровня интерферонов α и γ в крови больных увеитами вирусной этиологии под влиянием лечения препаратом аллокин-альфа. *Точка зрения. Восток – Запад*. 2018; (4): 26-9. Doi: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2018-4-26-29>
32. Серебряков М.Ю., Тищенко М.С., Воронов А.В., Салимов А.Г., Сметанина С.Е., Платонова Т.К. и др. *Новые подходы к лечению больных ВЭБ-инфекцией. Сборник научных трудов по препарату Аллокин-альфа*. М.; 2016.

REFERENCES

1. Straus S.E. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis.* 1988; 157(3): 405-12. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/157.3.405>
2. Hellmann D., Cowan M.J., Ammann A.J., Wara D.W., Chudwin D., Chang R.S. Chronic active Epstein-Barr virus infections in two immunodeficient patients. *J. Pediatr.* 1983; 103(4): 585-8.
3. Cohen J.L. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2000; 343(7): 481-92. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>
4. Thorley-Lawson D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2001; 1(1): 75-82. Doi: <https://doi.org/10.1038/35095584>
5. Laichalk L.L., Thorley-Lawson D.A. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 2005; 79(2): 1296-307. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005>
6. Kieff E., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus and its replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
7. Laichalk L.L., Hochberg D., Babcock G.J., Freeman R.B., Thorley-Lawson D.A. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*. 2002; 16(5): 745-54.
8. Amyes E., Hatton C., Montamat-Sicotte D., Gudgeon N., Rickinson A.B., McMichael A.J., et al. Characterization of the CD4+ T Cell Response to Epstein-Barr Virus during Primary and Persistent Infection. *J. Exp. Med.* 2003; 198(6): 903-11. Doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20022058>
9. Marrão G., Habib M., Paiva A., Bicout D., Fallecker C., Franco S., et al. Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immune cell TNF- α /IFN- γ response. *BMC Cancer*. 2014; 14: 665. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-665>
10. Kimura H., Hoshino Y., Kanegane H., Tsuge I., Okamura T., Kawa K., et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*. 2001; 98(2): 280-6. Doi: <https://doi.org/10.1182/blood.v98.2.280>
11. Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Huang Q. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. *PLoS One*. 2013; 8(6): e66557. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066557>
12. Conlon J.M., Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol. Biol.* 2010; 618: 3-14. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1_1
13. Bahar A.A., Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013; 6(12): 1543-75. Doi: <https://doi.org/10.3390/ph6121543>
14. Altfeld M., Gale M. Innate immunity against HIV-1 infection. *Nat. Immunol.* 2015; 16(6): 554-62. Doi: <https://doi.org/10.1038/ni.3157>
15. Meije Y., Tonjes R.R., Fishman J.A. Retroviral restriction factors and infectious risk in xenotransplantation. *Am. J. Transplant.* 2010; 10(7): 1511-6. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03146.x>
16. Chernysh S., Kim S., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., et al. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99(20): 12628-32. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.192301899>
17. Mabbott N.A., Brown K.L., Manson J., Bruce M.E. T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology*. 1997; 92(2): 161-5. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00331.x>
18. Lee N., Bae S., Kim H., Kong J.M., Kim H.R., Cho B.J., et al. Inhibition of lytic reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by alloferon. *Antivir. Ther.* 2011; 16(1): 17-26. Doi: <https://doi.org/10.3851/IMP1709>
19. Bae S., Oh K., Kim H., Kim Y., Kim H.R., Hwang Y.I., et al. The effect of alloferon on the enhancement of NK cell cytotoxicity against cancer via the up-regulation of perforin/granzyme B secretion. *Immunobiology*. 2013; 218(8): 1026-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.12.002>
20. Kim Y., Lee S.K., Bae S., Kim H., Park Y., Chu N.K., et al. The anti-inflammatory effect of alloferon on UVB-induced skin inflammation through the down-regulation of pro-inflammatory cytokines. *Immunol. Lett.* 2013; 149(1-2): 110-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.09.005>
21. Kuczer M., Dziubasik K., Midak-Siewirska A., Zahorska R., Luczak M., Konopińska D. Studies of insect peptides alloferon, Any-GS and their analogues. Synthesis and antiherpes activity. *J. Pept. Sci.* 2010; 16(4): 186-9. Doi: <https://doi.org/10.1002/psc.1219>
22. Kuczer M., Majewska A., Zahorska R. New alloferon analogues: synthesis and antiviral properties. *Chem. Biol. Drug Des.* 2013; 81(2): 302-9. Doi: <https://doi.org/10.1111/cbdd.12020>
23. Kuczer M., Czarniewska E., Majewska A., Różanowska M., Rosiński G., Lisowski M. Novel analogs of alloferon: Synthesis, conformational studies, pro-apoptotic and antiviral activity. *Bioorg. Chem.* 2016; 66: 12-20. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.03.002>
24. Kragstbjerg P. Chronic active mononucleosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997; 29(5): 517-8.
25. Gustafson E.A., Chillemi A.C., Sage D.R., Fingerth J.D. The Epstein-Barr virus thymidine kinase does not phosphorylate ganciclovir or acyclovir and demonstrates a narrow substrate specificity compared to the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42(11): 2923-31.
26. Khakhalin L.N., Abazova F.I. Acyclovir in the treatment of acute and recurrent herpes virus infections. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 1995; 4(4): 78-81. (in Russian)
27. Cohen J.I. Optimal Treatment for Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease. *Pediatr. Transplant.* 2009; 13(4): 393-6. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2008.01095.x>
28. De Paor M., O'Brien K., Fahey T., Smith S.M. Antiviral agents for infectious mononucleosis (glandular fever). *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; 12: CD011487. Doi: <https://doi.org/10.1002/14651858>
29. Kazmirchuk V.E., Mal'tsev D.V. *Clinic, Diagnosis and Treatment of Human Herpesvirus Infections [Klinika, diagnostika i lechenie herpesvirusnykh infektsiy cheloveka]*. Kiev: Feniks; 2009. (in Russian)
30. Martínez J.P., Sasse F., Brönstrup M., Diez J., Meyerhans A. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Nat. Prod. Rep.* 2015; 32(1): 29-48. Doi: <https://doi.org/10.1039/C4NP00085D>
31. Konovalova N.V., Khramenko N.I., Velichko L.N., Yurchenko L.A. The role of interferon α and γ in the blood of patients with viral uveitis during treatment with the drug allokina-alpha. *Tochka zreniya. Vostok – Zapad*. 2018; (4): 26-9. Doi: <https://doi.org/10.25276/2410-1257-2018-4-26-29> (in Russian)
32. Serebryakov M.Yu., Tishchenko M.S., Voronov A.V., Salimov A.G., Smetanina S.E., Platonova T.K., et al. *New Approaches to the Treatment of Patients with EBV Infection. Collection of Scientific Papers on the Drug Allokina-alpha [Novye podkhody k lecheniyu bol'nykh VEB-infektsiyey. Sbornik nauchnykh трудов по препарату Allokina-alpha]*. Moscow; 2016. (in Russian)

Поступила 06.02.19

Принята в печать 02.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И.

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ СУБСТАНЦИИ «КАГОЦЕЛ» *IN VITRO* В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА H1N1, H1N1pdm09 И H3N2

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

Введение. Активная циркуляция пандемического гриппа и новых вариантов гриппа H3N2 требует мониторинга противовирусной эффективности лекарственных препаратов, разрешенных для лечения гриппа на территории РФ. **Цель:** оценка противовирусного действия субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. **Материал и методы.** Цитотоксическое действие субстанции «Кагоцел» в культуре клеток MDCK определяли с помощью красителя MTS. Противовирусную эффективность субстанции «Кагоцел» в отношении гриппозной инфекции изучали *in vitro* для культуры клеток MDCK, инфицированных штаммами вирусов гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Антивирусную активность субстанции «Кагоцел» проверяли по её действию на инфекционный титр вируса гриппа и по влиянию на уровень экспрессии вирусных антигенов в иммуноферментной тест-системе. **Результаты.** Субстанция «Кагоцел» была малотоксичной для культуры клеток MDCK. Кагоцел одинаково эффективно подавлял инфекционный титр вирусов гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 в культуре клеток MDCK. Исследование влияния субстанции «Кагоцел» на уровень экспрессии вирусных антигенов в ИФА тест-системе также показало его противовирусную эффективность в отношении всех тестируемых штаммов. Наблюдалась дозозависимость от концентрации субстанции и заражающей дозы вируса. **Обсуждение.** Эффективное подавление «Кагоцелом» репродукции штаммов вируса гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) в разных сублиниях культур клеток MDCK было показано различными методами. Результаты работы позволяют предположить, что наряду со способностью индуцировать интерфероны, Кагоцел может действовать на репродукцию вируса гриппа, но это требует дальнейших исследований. **Заключение.** Субстанция «Кагоцел» эффективно подавляет репродукцию штаммов вируса гриппа А(H1N1), А(H1N1)pdm09 и А(H3N2) *in vitro*. При этом индекс селективности достаточно высок.

Ключевые слова: Кагоцел; грипп; вирус; *in vitro*.

Для цитирования: Федякина И.Т., Коноплева М.В., Прошина Е.С., Линник Е.В., Никитина Н.И. Противовирусное действие субстанции «Кагоцел» *in vitro* в отношении вирусов гриппа H1N1, H1N1pdm09 и H3N2. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 125-131.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131>

Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I.

ANTIVIRAL EFFECT OF «KAGOCHEL» SUBSTANCE *IN VITRO* ON INFLUENZA VIRUSES H1N1, H1N1pdm09 AND H3N2

N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098, Russian Federation

Introduction. Active circulation of pandemic influenza and new variants of influenza H3N2 strains requires monitoring of antiviral efficacy of drugs permitted for influenza therapy in the Russian Federation. **Purpose.** Assessment of antiviral efficacy of «Kagocel» substance against influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2 *in vitro*. **Material and methods.** Cytotoxic effect of «Kagocel» substance on MDCK cells had been determined by stained with MTS. Antiviral efficacy of «Kagocel» substance against influenza infection has been studied *in vitro* in the culture of MDCK cells infected with influenza virus strains: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) and A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2). The antiviral activity of «Kagocel» substance was tested by its effect on the infectious titer of the influenza viruses and on its impact on the expression level of viral antigens in the enzyme immunoassay test system. **Results.** «Kagocel» substance had low toxicity for MDCK cells. «Kagocel» inhibited the infection titer of influenza virus strains A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Hong Kong/1/68 (H3N2) and A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) in the MDCK cell culture with equal efficacy. Study of the impact of «Kagocel» substance on the expression level of viral antigens by ELISA also revealed its antiviral efficacy for all tested strains. Dose dependence was observed from concentration of substance and from infective dose of virus. **Discussion.** Effective suppression of the reproduction of influenza virus strains A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) in the different sublines of MDCK cells with «Kagocel» was shown by the different methods. These results give the possibility to suggest that along with the ability to induce interferons, «Kagocel» can impact on the reproduction of influenza virus, but the further research is needed. **Conclusion.** «Kagocel» substance effectively inhibits the reproduction of influenza virus strains A(H1N1), A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) *in vitro*. At the same time, the selectivity index is quite high.

Keywords: Kagocel; influenza; virus; *in vitro*.

For citation: Fediakina I.T., Konopleva M.V., Proshina E.S., Linnik E.V., Nikitina N.I. Antiviral effect of «Kagocel» substance *in vitro* on influenza viruses H1N1, H1N1pdm09 and H3N2. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 125-131. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-125-131>

For correspondence: Irina T. Fediakina, Lead Researcher of laboratory of Viral Ecology of D.I. Ivanovsky Institute of Virology of «N.F. Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: irfed2@mail.ru

Для корреспонденции: Федякина Ирина Тимофеевна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией экологии вирусов, ведущий научный сотрудник отдела экологии вирусов, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098 г. Москва. E-mail: irfed2@mail.ru

Information about authors:Konopleva M.V., <http://orcid.org/0000-0002-9724-695X>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20 March 2019

Accepted 02 April 2019

Введение

Грипп – острая респираторная инфекция, представляющая серьезную проблему для общественного здравоохранения. По степени тяжести болезнь варьирует от легкой до тяжелой, возможны летальные исходы. Госпитализация и смерть происходят главным образом в группах высокого риска. Ежегодно в эпидемический сезон гриппа регистрируется 3–5 млн случаев тяжелой болезни и 250 000–500 000 случаев смерти во всем мире [1]. При этом известно, что пандемии вызывали лишь вирусы гриппа типа А. В настоящее время среди людей циркулируют подтипы гриппа А(Н1N1), в частности вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, вызвавший пандемию 2009 г., и А(Н3N2).

В эпидемических сезонах 2014–2015 и 2016–2017 гг. наибольшую активность проявил вирус гриппа А(Н3N2). Эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н3N2) принадлежали к генетической группе 3С.2а, представленной А/Гонконг/4801/2014, и его подгруппе 3С.2а1, представленной А/Болзано/7/2016, которые имели близкое родство по антигенным свойствам [1–3]. Обращает на себя внимание то, что современные штаммы вируса гриппа А(Н3N2) полностью утратили антигенное родство с родоначальником пандемического цикла – А/Гонконг/1/68. Кроме того, в отличие от других вирусов гриппа, его эволюционная изменчивость имела линейный, поступательный характер, хотя в отдельные периоды были выявлены реверсии некоторых его дрейф-вариантов, примерами которых могут служить штаммы, выделенные в Австралии в 1979 г. и на Кубе в 1985 г. [4, 5]. Одной из наиболее сложных проблем применения противовирусных препаратов является резистентность вирусов к уже известным препаратам. Например, популяция вируса гриппа А(Н3N2) резистентна к препаратам адамантанового ряда, но сохранила чувствительность к умифеновиру и препаратам с антинейраминидазной активностью [2, 6]. В связи с этим представляется важным оценить способность различных препаратов оказывать противовирусное действие в отношении актуальных штаммов вируса гриппа. Одним из наиболее интересных препаратов, представленных на отечественном рынке, является Кагоцел.

Действующее вещество противовирусного препарата «Кагоцел» – уникальное соединение, полученное методом химического синтеза, в результате которого к полимерным молекулам окисленной перйодатным методом карбоксиметилцеллюлозы ковалентно присоединены молекулы госсипола [7]. В ходе многочисленных зарубежных исследований доказано, что госсипол оказывает выраженное фармакологическое действие, проявляя противовирусную, противоопухолевую, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность [7, 8]. В результате образования конъюгатов с различными соединениями или полимерными носителями госсипол утрачивает токсические свойства [7, 9]. Технология по-

лучения субстанции «Кагоцел» включает химический синтез, при котором применяется именно такой приём. Методом ВЭЖХ показано, что свободный госсипол в Кагоцеле обнаруживается лишь в следовых количествах (<0,005%) [7].

Цель настоящего исследования – изучение противовирусной активности субстанции «Кагоцел» в отношении вирусов гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1), А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2).

Материал и методы

Тестируемые вещества. Навески субстанции «Кагоцел» растворяли в поддерживающей среде (см. ниже) в течение 2 ч при постоянном перемешивании на шейкере, в случае необходимости доводили рН до 7,0–7,5 с помощью 1н НСl. Подготовленные растворы стерилизовали, пропуская через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм и PES-мембраной (Sartorius, кат. № 16541-К). Для каждого эксперимента готовили новый раствор субстанции «Кагоцел».

В качестве препарата сравнения использовали разведённый на поддерживающей среде озельтамивира карбоксилат (Sigma Algrich, кат. № Y0001340).

Культуры клеток. В экспериментальной работе использовали культуру клеток MDCK, предоставленную из Всероссийской коллекции клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Культивирование этих клеток осуществляли на среде Игла МЕМ (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») с двойным набором аминокислот и 5% фетальной телячьей сыворотки крови (HyClone, США), 10 мМ глутамина и 4% гентамицином.

Также использовали клеточную линию MDCK ECACC (Sigma, кат. № 85011435), на 68–69 пассажах. Данную линию культивировали в среде Игла МЕМ (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамина и 0,1 мг/мл нормоцина.

Вирусы. В исследованиях использовали вирусы гриппа А человека: А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1) и А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, а также штаммы А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2). Штаммы были получены из Государственной коллекции вирусов при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Вирусы культивировали в аллантоисной полости 9–10-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36 °С. Инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса определяли согласно методам, рекомендованным ВОЗ [10].

Определение цитотоксического действия Кагоцела в культуре клеток. Клетки MDCK вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 10000 кл/луночку в среде Игла МЕМ (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова» РАН) с

добавлением 5% фетальной сыворотки телят (HyClone, США), 10 мМ глутамин и антибиотиков и культивировали в течение 72 ч. Затем, после 2-кратной промывки культуры клеток бессывороточной средой Игла MEM, вносили предварительно подготовленные на поддерживающей среде (см. ниже) разведения субстанции «Кагоцел», начиная с 60–80 мг/мл.

В исследованиях с использованием линии MDCK ECACC клетки вносили в 96-луночные планшеты в среде Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин и 0,1 мг/мл нормоцина из расчёта 18 000 кл/лунку, культивировали 24 ч и промывали бессывороточной средой 1 раз перед внесением субстанции.

Для разведения тестируемых веществ использовали 2 варианта поддерживающей среды, в зависимости от дальнейших вирусологических исследований: среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и среду Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина.

Каждую точку тестировали в 4 параллельных лунках. Последнее разведение помещали в первые 2 лунки из 4, в две последние лунки из 4 вносили поддерживающую среду (контроль среды культивирования).

В зависимости от постановки эксперимента клетки инкубировали с тестируемыми веществами в течение 18, 48 или 66 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С, после чего удаляли культуральную среду и в каждую лунку добавляли по 100 мкл поддерживающей среды и 20 мкл раствора MTS (Promega, США, кат. № G3581). После инкубации в течение 3 ч при 37 °С определяли оптическую плотность при длине волны 492 нм и референсной длине волны 620 нм при помощи планшетного спектрофотометра BIO-RAD. Концентрацию тестируемого вещества, уменьшающую значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем клеток, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC₅₀).

Изучение действия препаратов на инфекционный титр вируса в культуре клеток MDCK. Исследовали действие нетоксичных для клеток MDCK концентраций субстанции «Кагоцел» и озельтамивира карбоксилата на репродукцию вирусов гриппа человека А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Каждую концентрацию препарата испытывали в 2 параллельных лунках. Противовирусную активность тестируемых веществ учитывали по снижению инфекционного титра вируса гриппа в культуре клеток MDCK по цитопатическому действию (ЦПД) и в реакции гемагглютинации (РГА).

Для исследования вирусспецифического действия препаратов в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) в качестве поддерживающей среды использовали среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и трипсина (TPCK treated, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл. Культуру клеток MDCK подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия тестируемых веществ. Перед заражением вирусом клетки MDCK 2 раза промывали бессывороточной средой Игла MEM, добавляли изучаемые вещества в необходимой концентрации в 100 мкл поддерживающей

среды и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем добавляли по 100 мкл предварительно приготовленные 10-кратные разведения вируса. Контроли вирусов и клеток культивировали в этой же среде. Учёт результатов проводили через 66 ч по ЦПД и в РГА. В РГА использовали 0,5% взвесь эритроцитов, которую получали из 14-дневных куриных эмбрионов. Представлены результаты 2–3 опытов по каждому вирусу.

Исследования вирусспецифического действия тестируемых веществ в отношении штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) проводили на клетках MDCK ECACC, используя в качестве поддерживающей среду Игла MEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 2% фетальной сыворотки (HyClone, США), 300 мкг/мл L-глутамин, 12 мкг/мл химопсин-трипсина и 0,1 мг/мл нормоцина. Культуру клеток MDCK ECACC подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия изучаемых веществ. Перед заражением вирусом клетки MDCK 1 раз промывали бессывороточной средой Игла MEM, добавляли предварительно подготовленные разведения препаратов в 100 мкл поддерживающей среды (однократной концентрации) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем добавляли по 10 мкл предварительно приготовленных 10-кратных разведений вируса. Контроли вирусов и клеток культивировали в той же среде. Учёт результатов проводили через 48 ч по ЦПД и в РГА. В РГА использовали 0,75% взвесь эритроцитов человека (I группа) в физиологическом растворе.

Изучение противовирусной активности препаратов в культуре клеток MDCK в тест-системе ИФА. Исследовали вирусспецифическое действие препаратов в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2). Противовирусную активность исследуемых соединений в отношении вируса гриппа А учитывали по уровню экспрессии вирусных антигенов в тест-системе на основе иммуоферментного анализа (ИФА), модифицированного для определения противовирусной активности соединений в культуре клеток. Каждую концентрацию тестируемого вещества испытывали в 4 параллельных лунках.

Культуру клеток MDCK подготавливали так же, как и в опытах по определению цитотоксического действия изучаемых веществ. В качестве поддерживающей среды использовали среду Игла MEM с двойным набором аминокислот и добавлением 0,2% раствора альбумина и трипсина (TPCK treated, Sigma, США) в концентрации 2 мкг/мл.

Перед внесением вируса клетки MDCK 2 раза промывали средой без сыворотки для снижения возможной неспецифической реакции. Исследуемые вещества добавляли к клеткам в необходимой концентрации в 100 мкл поддерживающей среды за 1 ч до инфицирования. В лунку с вирусным контролем добавляли 100 мкл, а с контролем клеток – 200 мкл поддерживающей среды. Через 1 ч после инкубации клеток с исследуемыми веществами при 37 °С в лунки, исключая контроль клеток, добавляли по 100 мкл вируса на поддерживающей среде. Действие веществ было испытано при разной множественности заражения клеток вирусом: 0,1 и 0,01 ТЦИД₅₀/кл. Далее планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 18 ч при 37 °С. После инкубации клетки исследовали в инвертированном микроскопе для регистрации отсутствия цитотоксических и цитопатических изменений. Среду удаляли, а клетки фиксировали 80% ацетоном в PBS в

Таблица 1

Цитотоксическое действие субстанции «Кагоцел» для клеточной линии MDCK при разных условиях культивирования

Культура клеток	Время инкубации, ч	Цитотоксичность (CC ₅₀), мг/мл
MDCK (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)	18	45,28
	66	24,18
MDCK ECACC	48	10,67

течение 15 мин, хорошо высушивали и затем отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (PBS с 0,05% твин-20). Эти и все дальнейшие процедуры отмывки проводили указанным раствором. Затем, для устранения сайтов неспецифического связывания, к клеткам добавляли по 100 мкл раствора PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. После удаления раствора к клеткам добавляли 100 мкл раствора моноклональных антител мыши к вирусу гриппа А (моноклональные антитела к М и NP белку; CDC, США) в концентрации 10 мкг/мл в буфере PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20. После инкубации с антителами в течение 1 ч при 37 °С и 3-кратной отмывки в лунки вносили по 100 мкл IgG кролика против IgG мыши (Sigma, США), меченных пероксидазой хрена (конъюгат), в разведении 1:5000 в буфере PBS с 1% FBS и 0,1% твин-20 и инкубировали 1 ч. Затем проводили 4-кратную отмывку и конъюгат пероксидазы выявляли добавлением в лунки 100 мкл ТМБ. Реакцию учитывали по оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) при помощи планшетного спектрофотометра «БИО-RAD» (iMark™, Microplate Reader). Относительное содержание вирусных белков М и NP в супернатантах определяли, как отношение ОП₄₅₀ опыта/ОП₄₅₀ вирусного контроля, умноженное на 100%, затем рассчитывали процент ингибирования вируса испытуемыми веществами [11]. Представлены результаты 2 опытов по каждому вирусу.

Обработка и анализ данных. Рассчитывали CC₅₀ и 50% эффективную концентрацию (IC₅₀) для каждого из изученных соединений при помощи пакета программ Excel и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой, пункты меню «Нелинейная регрессия» – «Sigmoidal dose-response (variable slope)». Для анализа IC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой, пункты меню «Нелинейная регрессия» – «log (inhibitor) vs. response (variable slope)».

На основании полученных данных для соединений рассчитывали индекс селективности (SI) по уравнению:

$$SI = CC_{50} / IC_{50}$$

Результаты*Изучение цитотоксического действия препаратов.*

В ходе исследований обнаружено, что субстанция «Кагоцел» малотоксична для различных сублиний MDCK. Показатель CC₅₀ варьировал от 10,67 до 45,28 мг/мл в зависимости от разновидности клеточной линии, состава среды культивирования, времени инкубирования с тестируемыми веществами и других методических особенностей (рис. 1 и табл. 1).

Было также установлено, что субстанция «Кагоцел» в высоких концентрациях обладает спонтанной агглютинирующей способностью в отношении куриных и человеческих эритроцитов. Проагглютинирующее действие Кагоцела на куриные эритроциты проявляется, начиная с концентрации 26,6 мг/мл и выше, а на человеческие – с 10,0 мг/мл и выше. Поэтому для исследований вирусспецифического действия этой субстанции использовали её растворы с концентрацией, не превышающей 5–10 мг/мл, т.е. в диапазоне, где отсутствовали не только цитотоксические проявления, но и спонтанная агглютинация.

В данной серии экспериментов не определяли цитотоксическое действие озельтамивира карбоксилата, однако, согласно данным литературы, она близка цито-

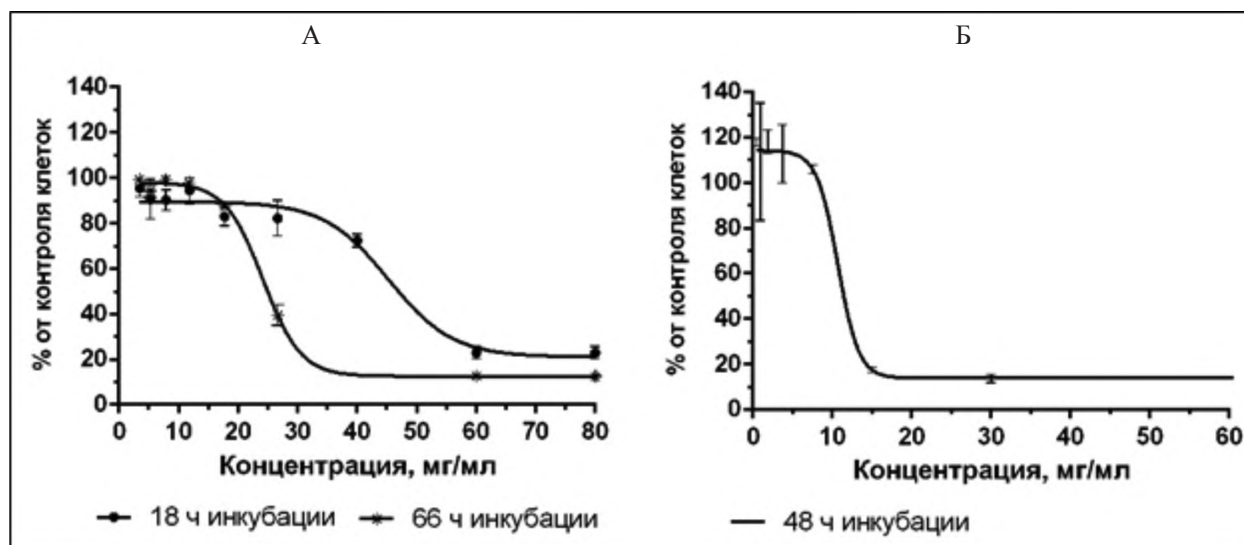


Рис. 1. Цитотоксичность субстанции «Кагоцел» для линии MDCK при различных условиях культивирования.

А – для линии MDCK ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России,

Б – для линии MDCK ECACC. Данные представлены как среднее (*Mean*) ± стандартное отклонение (SD).

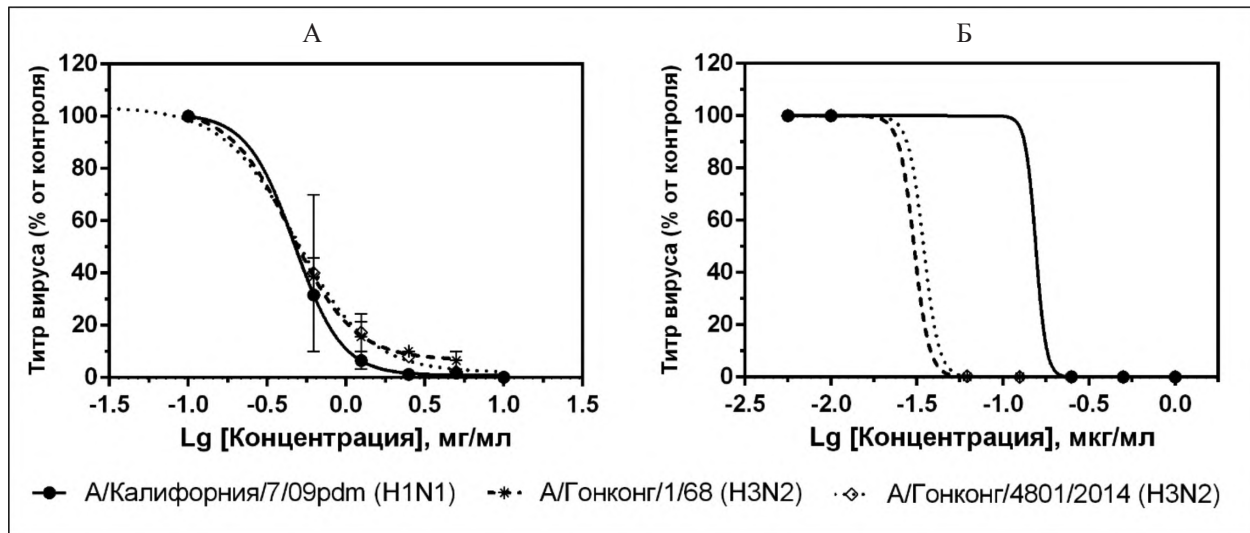


Рис. 2. Ингибирование инфекционного титра вируса гриппа А в культуре клеток MDCK.

Инкубирование проводили в течение 66 ч. Репродукцию вирусов гриппа определяли с помощью реакции гемагглютинации: А – «Кагоцел», Б – озельтамивира карбоксилат. Здесь и на рис. 3 данные представлены как среднее (*Mean*) ± стандартная ошибка среднего (*SEM*).

токсичности озельтамивира фосфата и находится в диапазоне 500–700 мкг/мл [12, 13].

Изучение противовирусной активности препаратов. Известно, что противовирусная эффективность препаратов обычно пропорциональна их концентрации. Эксперименты показали, что эффективность субстанции «Кагоцел» концентрационно зависима. На основании данных, полученных при изучении действия нетоксичных концентраций на репродукцию вирусов гриппа А, были построены кривые «доза–ответ», из которых были определены IC_{50} (рис. 2 и 3).

Изучение действия субстанции «Кагоцел» на инфекционный титр вируса в культуре клеток MDCK показало, что Кагоцел одинаково эффективен в отношении штаммов А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) (см. рис. 2 и табл. 2), эффективная доза колеблется в диапазоне 0,45–0,48 мг/мл, а подавление инфекционного титра – в диапазоне 1,4–2,0 lg. При этом за счёт низкой токсичности субстанции достигается SI 50–54. В отношении эталонного штамма вируса гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) субстанция «Кагоцел» также была эффективна, IC_{50} составила 0,17 мг/мл, а SI – 63. Хотя строгое сопоставление полученных данных с ре-

зультатами по остальным 3 штаммам можно провести с осторожностью, в силу разных условий проведения эксперимента, тем не менее можно утверждать, что противовирусная активность субстанции «Кагоцел» в отношении штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) находится приблизительно в том же диапазоне. В отличие от Кагоцела, озельтамивира карбоксилат проявил большую эффективность в отношении штаммов H3N2, нежели H1N1pdm09. Так, эффективная доза озельтамивира для обоих гонконгских штаммов составила 0,03 мкг/мл, в то время как для А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 – 0,15 мкг/мл.

Исследование влияния субстанции «Кагоцел» на уровень экспрессии вирусных антигенов в ИФА тест-системе также показало его противовирусную эффективность в отношении всех тестируемых штаммов (рис. 3 и табл. 2). Наблюдалась дозозависимость не только от концентрации субстанции, но и от заражающей дозы вируса. Субстанция «Кагоцел» эффективно подавляла размножение вирусов гриппа штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2), А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) и А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09. При заражающей дозе 0,01 ТЦИД₅₀/кл эффективная доза субстанции «Кагоцел» составила около 1,01–2,69 мг/мл и SI 17–45. Активность субстанции

Таблица 2

Противовирусная активность субстанции «Кагоцел»

Культура клеток	Вирус	Метод РГА			Метод ИФА при дозе вируса			
		Δlg_{max}	IC_{50} , мг/мл	SI	0,1 ТЦИД ₅₀ /кл		0,01 ТЦИД ₅₀ /кл	
					IC_{50} , мг/мл	SI	IC_{50} , мг/мл	SI
MDCK (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)	А/Гонконг/4801/2014 (H3N2)	1,5	0,48	50	–	–	2,69	17
	А/Гонконг/1/68 (H3N2)	1,4	0,45	54	4,60	10	1,10	41
	А/Калифорния/7/09 pdm (H1N1)	2,0	0,47	51	2,13	21	1,01	45
MDCK ECACC	А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1)	1,0	0,17	63	н/о*	н/о	н/о	н/о

Примечание. * не определяли; РГА – реакция гемагглютинации; ИФА – иммуноферментный анализ; ТЦИД₅₀/кл – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя; SI – индекс селективности; IC_{50} – 50% ингибирующая концентрация Δlg_{max} – максимальное снижение значения заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженное в десятичных логарифмах.

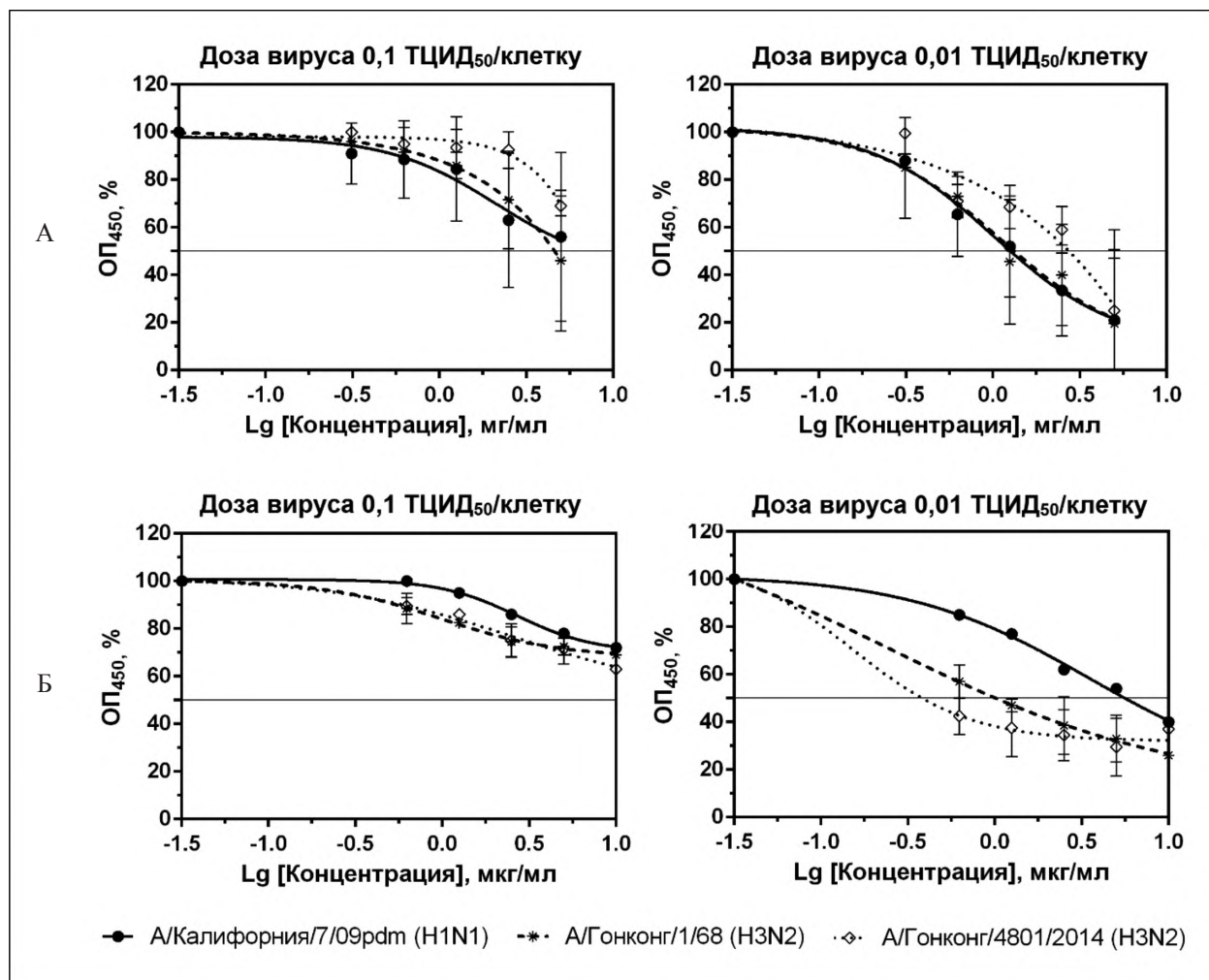


Рис. 3. Дозозависимый эффект ингибирования Кагоцелом инфекционной активности вирусов гриппа А, взятых в разных заражающих дозах, в линии MDCK.

Инкубирование проводили в течение 18 ч. Репродукцию вирусов гриппа определяли методом иммуноферментного анализа: А – Кагоцел, Б – озельтамивира карбоксилат. По оси абсцисс – концентрации исследуемых веществ (lg); по оси ординат – величина оптической плотности (OP₄₅₀), в %. Горизонтальная линия – 50% ингибирование репродукции вируса.

«Кагоцел» в отношении штамма А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) была ниже примерно в 2,5 раза.

Озельтамивира карбоксилат, напротив, был наиболее активен в отношении штаммов вируса гриппа А (H3N2), в частности, его эффективные дозы при множественности заражения 0,01 ТЦИД₅₀/кл были 0,24 и 0,15 мкг/мл для штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (H3N2) соответственно. Однако для штамма А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09 его активность была ниже, IC₅₀ составила 3,5 мкг/мл. При множественности заражения 0,1 ТЦИД₅₀/кл 50% ингибирующую концентрацию озельтамивира карбоксилата определить не удалось. В то же время при этой множественности заражения эффективная доза для «Кагоцела» определялась и составляла 4,60 мг/мл для вируса А/Гонконг/1/68 (H3N2) и 2,13 мг/мл для штамма А/Калифорния/7/2009 (H1N1)pdm09.

Обсуждение

Каким бы высоким ни был уровень профилактических мероприятий против гриппа, наступает момент,

когда ситуация выходит из-под контроля, поскольку современные вакцины не способны решить проблемы антигенного дрейфа вируса гриппа в процессе эволюции и антигенного шифта вируса гриппа, связанного с механизмом реассортации фрагментов генома [14, 15]. Поэтому в период циркуляции вируса, не соответствующего вакцинному штамму, заболеваемость среди населения увеличивается и применение противогриппозных препаратов становится одним из основных средств в борьбе с гриппозной инфекцией. Однако количество эффективных препаратов чрезвычайно ограничено.

Одним из препаратов, входящих в Стандарты Минздрава России по оказанию специализированной медицинской помощи при гриппе средней и тяжелой степени тяжести, является «Кагоцел». В работе Ф.И. Ершова [16], а также в инструкции по применению «Кагоцела», отмечено, что основным механизмом его действия является способность индуцировать продукцию интерферонов.

В данной работе изучалось действие субстанции «Кагоцел» на репродукцию разных штаммов вируса гриппа

в культуре клеток MDCK, которые широко используются во всём мире для изоляции вирусов гриппа и изучения их биологических свойств, в частности противовирусной активности коммерческих препаратов и новых химических веществ. Исследования проведены в соответствии с нормативными документами, действующими на территории РФ [11], а также с учётом рекомендаций международных разрешительных органов [17].

Результаты показали, что субстанция «Кагоцел» обладала выраженной противовирусной активностью в условиях *in vitro*. Эффективное подавление репродукции разных штаммов вируса гриппа (А/Н1N1, А/Н1N1pdm09 и А/Н3N2), продемонстрированное на разных сублиниях культур клеток MDCK, при различных методах определения противовирусной активности, позволяет высказать предположение, что «Кагоцел», наряду со способностью индуцировать интерфероны, указанной в публикации [16], может действовать и на репродукцию вируса гриппа, но это требует дальнейшего углублённого изучения.

Заключение

Результаты изучения противовирусной активности показали, что субстанция «Кагоцел» в культуре клеток MDCK в нетоксичных для клеток дозах эффективно подавляла репродукцию вирусов гриппа А – А/Пуэрто-Рико/8/34 (Н1N1), А/Калифорния/7/2009 (Н1N1)pdm09, А/Гонконг/1/68 (Н3N2) и А/Гонконг/4801/2014 (Н3N2). При этом она малотоксична для культуры клеток, поэтому индекс селективности был достаточно высок.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 6, 8, 10, 12-15, 17 см. REFERENCES)

- ВОЗ. Грипп. Информационный бюллетень. Available at: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Дерябин П.Г., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В. и др. Особенности эпидемического сезона 2014/2015 гг. по гриппу в разных регионах России. *Инфекционные болезни*. 2015; (4): 59-67.
- Литвинова О.М., Смородинцева Е.А., Деева Э.Г., Лобова Т.Г., Коновалова Н.И. Этиология современного гриппа. В кн.: *Грипп и другие респираторные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия*. СПб.; 2003: 55-69.
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушаклова С.В. и др. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015-2016 гг. Доминирование вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 159-66.
- Киселева И.В., Рудой Б.А., Пирогов А.В., Толмачева Н.Г. Валидация ВЭЖХ-методики определения госсипола в субстанции «Кагоцел». *Фармация*. 2016; 65(8): 18-24.
- Тылябаев К.З., Камаев Ф.Г., Выпова Н.Л., Юлдашев А.М., Ибрагимов Б.Т., Талипов С.А. Синтез, структура и «острая» токсичность несимметричных альдегидных производных госсипола. *Биоорганическая химия*. 2010; 36(3): 423-8.
- Методические указания по изучению специфической противовирусной активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005: 532-57.
- Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.

REFERENCES

- WHO. Influenza (Seasonal). Fact Sheet. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Deryabin P.G., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. The peculiarities of influenza epidemic season 2014/2015 in different regions of Russia. *Infektsionnye bolezni*. 2015; (4): 59-67. (in Russian)
- Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Thompson C., von Wissmann B., et al. Low effectiveness of seasonal influenza vaccine in preventing laboratory confirmed influenza in primary care in the United Kingdom: 2014/2015 mid-season results. *Euro Surveill*. 2015; 20(5): 21025.
- Litvinova O.M., Smorodintseva E.A., Deeva E.G., Lobova T.G., Konovalova N.I. Etiology of modern influenza. In: *Influenza and Other Respiratory Infections: Epidemiology, Prevention, Diagnostics and Therapy [Gripp i drugie respiratornye infektsii: epidemiologiya, profilaktika, diagnostika i terapiya]*. St. Petersburg; 2003: 55-69. (in Russian)
- L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159-66. (in Russian)
- Leneva I.A., Burtseva E.I., Yatsyshina S.B., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Selkova E.P., et al. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010-2011 influenza season in Russia. *Int. J. Infect. Dis*. 2016; 43: 77-84. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.01.001>
- Kiseleva I.V., Rudoy B.A., Pirogov A.V., Tolmacheva N.G. Validation of HPLC procedure for detection of gossypol in the substance Kagocel. *Farmatsiya*. 2016; 65(8): 18-24. (in Russian)
- Keshmiri-Neghab H., Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: an overview. *Pharm. Biol*. 2014; 52(1): 124-8. Doi: <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.832776>
- Tilyabaev K.Z., Kamaev F.G., Vypova N.L., Yuldashev A.M., Ibragimov B.T., Talipov S.A. Synthesis, Structures, and Acute Toxicity of Gossypol Nonsymmetrical Aldehyde Derivatives. Synthesis, Structures, and Acute Toxicity of Gossypol Nonsymmetrical Aldehyde Derivatives. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2010; 36(3): 423-8. (in Russian)
- WHO. Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
- Methodological guidelines for the study of specific antiviral activity of pharmacological substances: Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. Moscow: Meditsina; 2005: 532-57. (in Russian)
- Kocik J., Kolodziej M., Joniec J., Kwiatek M., Bartoszcz M. Antiviral activity of novel oseltamivir derivatives against some influenza virus strains. *Acta Biochim. Pol*. 2014; 61(3): 509-13.
- Cai W., Li Y., Chen S., Wang M., Zhang A., Zhou H., et al. 14-Deoxy-11,12-dehydroandrographolide exerts anti-influenza A virus activity and inhibits replication of H5N1 virus by restraining nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes. *Antiviral Res*. 2015; 118: 82-92. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.008>
- Garten R.J., Davis C.T., Russel C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009; 325(5937): 197-201. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1176225>
- Skowronski D.M., Chambers C., Sabaiduc S., De Serres G., Dickinson J.A., Winter A.L., et al. Interim estimates of 2014/2015 vaccine effectiveness against influenza A(H3N2) from Canada's Sentinel Physician Surveillance network, January 2015. *Euro Surveill*. 2015; 20(4): 21022. Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.4.21022>
- Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferones and their Inducers (from Molecules to Pharmaceuticals) [Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
- Guidance for Industry. Antiviral Product Development-Conducting and Submitting Virology Studies to the Agency. Available at: <https://www.fda.gov/media/71223/download>

Поступила 20.03.19

Принята в печать 02.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Усольтцева П.С.¹, Алимов А.В.¹, Резайкин А.В.¹, Сергеев А.Г.^{1,2}, Новосёлов А.В.¹

РОЛЬ НЕОНАТАЛЬНОГО FC РЕЦЕПТОРА В ДЕПРОТЕИНИЗАЦИИ ВИРУСОВ ЕСНО И КОКСАКИ А9

¹ ФБУН «Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург, Россия;² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 620028, г. Екатеринбург, Россия

Цель настоящей работы – определение функции человеческого неонатального рецептора для Fc фрагмента IgG (hFcRn) в качестве общего депротеинизирующего клеточного рецептора для вирусов ЕСНО (эховирусов) и Коксаки А9 при заражении культуры клеток рабдомиосаркомы человека (RD). **Материал и методы.** Исследовали протективный эффект человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов (HSA-GF) и антител к hFcRn, при заражении культур клеток RD штаммами и клонами энтеровирусов вида В с разной рецепторной специфичностью (эховирусы 3, 9, 11, 30-го типов и вирусы Коксаки А9, В4, В5). **Результаты.** Было показано, что HSA-GF при концентрациях 4% и менее защищал клетки RD от инфицирования эховирусами 3, 9, 11-го типов и вирусом Коксаки А9. Аналогичный спектр протективной активности проявляли антитела к hFcRn в концентрациях $\geq 2,5$ мкг/мл, защищавшие клетки RD от инфицирования эховирусами 3, 9, 11, 30-го типов и вирусом Коксаки А9. Протективный эффект HSA-GF и антител к hFcRn не наблюдался при заражении клеток RD вирусами Коксаки В4 и В5, депротеинизация которых требует участия коксакивирусного-аденовирусного рецептора. **Обсуждение.** Использование ранее охарактеризованных клонов эховируса 11-го типа с разной рецепторной специфичностью позволило определить функцию hFcRn как каньон-связывающего и депротеинизирующего рецептора в культуре клеток RD. Корреляция величины и динамики наблюдавшихся протективных эффектов с рецепторной специфичностью использованных в работе энтеровирусов указывала на двухэтапность взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами клеток. **Заключение.** Определена роль hFcRn как каньон-связывающего и депротеинизирующего рецептора для эховирусов и вируса Коксаки А9 при репродукции в клетках RD. Подтверждена двухэтапная схема взаимодействия с рецепторами DAF-зависимых эховирусов при входе в клетку: сначала со связывающим рецептором (DAF), затем – с депротеинизирующим (hFcRn).

Ключевые слова: эховирус; вирус Коксаки; депротеинизирующий рецептор; FcRn; DAF; альбумин.

Для цитирования: Усольтцева П.С., Алимов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г., Новосёлов А.В. Роль неонатального FC рецептора в депротеинизации вирусов ЕСНО и Коксаки А9. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(3): 132-139.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-132-139>Usoltseva P.S.¹, Alimov A.V.¹, Rezaykin A.V.¹, Sergeev A.G.^{1,2}, Novoselov A.V.¹

THE ROLE OF THE NEONATAL FC RECEPTOR IN THE UNCOATING OF ECHOVIRUSES AND COXSACKIEVIRUS A9

¹ Yekaterinburg Scientific Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620028, Russian Federation;² Urals State Medical University, Yekaterinburg, 620019, Russian Federation

The aim of this study was to determine the role of the human neonatal receptor for the Fc fragment of IgG (hFcRn) as a common uncoating cellular receptor for echoviruses and coxsackievirus A9 during infection of human rhabdomyosarcoma (RD) cells. **Material and methods.** The protective effect of the human serum albumin, purified from globulins, (HSA-GF) and antibodies to hFcRn was studied in RD cells infected with several strains and clones of species B enteroviruses possessing different receptor specificity (echoviruses 3, 9, 11, 30 and coxsackieviruses A9, B4, B5). **Results.** It was shown that HSA-GF at concentrations of 4% or less protected RD cells from infection with echoviruses 3, 9, 11 and coxsackievirus A9. The antibodies to hFcRn at concentrations of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or less demonstrated the similar spectrum of protective activity in RD cells against infection with echoviruses 3, 9, 11, 30 and coxsackievirus A9. The protective effect of HSA-GF or the antibodies to hFcRn was not observed in RD cells infected with coxsackieviruses B4 and B5 that need coxsackievirus-adenovirus receptor for uncoating. **Discussion.** The usage of the previously characterized echovirus 11 clonal variants with different receptor specificity allowed us to define the function of hFcRn as a canyon-binding uncoating receptor in RD cells. The kinetics and magnitude of the observed protective effects correlated with receptor specificity of the enteroviruses used in this work supporting the two-step interaction of DAF-dependent echoviruses with the cellular receptors. **Conclusions.** In this study, the function of hFcRn was defined in RD cells as a canyon-binding and uncoating receptor for echoviruses and coxsackievirus A9. The two-step interaction of DAF-dependent echoviruses during entry into the cells was confirmed: initially with the binding receptor DAF and subsequently with the uncoating receptor hFcRn.

Keywords: echovirus; coxsackievirus; uncoating cellular receptor; FcRn; DAF; albumin.

For citation: Usoltseva P.S., Alimov A.V., Rezaykin A.V., Sergeev A.G., Novoselov A.V. The role of the neonatal FC receptor in the uncoating of echoviruses and coxsackievirus A9. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2019; 64(3): 132-139. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-132-139>

For correspondence: Alexey V. Rezaykin, Laboratory of Enteric Viral Infections, Yekaterinburg Research Institute of Viral Infections, Yekaterinburg, 620030, Russian Federation. E-mail: alexrez@yandex.ru

Для корреспонденции: Резайкин Алексей Васильевич, канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией энтеральных вирусных инфекций, ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора, 620030, г. Екатеринбург. E-mail: alexrez@yandex.ru

Information about authors:Usoltseva P.S., <http://orcid.org/0000-0002-2247-2776>Alimov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-0511-9409>Rezaykin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-8665-5299>Sergeev A.G., <http://orcid.org/0000-0002-5784-8673>Novoselov A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1450-8246>**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 29 July 2019

Accepted 20 August 2019

Введение

Согласно современной классификации, все типы вирусов ЕСНО (эховирусов) и вирус Коксаки А9 (CVA9), относятся к виду *Enterovirus B* рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae* порядка *Picornavirales* [1]. Для отдельных представителей рода *Enterovirus* (вирусов Коксаки В3 [2–4] и А21 [5]) экспериментально доказано двухэтапное взаимодействие с различными клеточными рецепторами при входе вируса в клетку. На первом этапе *связывающие рецепторы (рецепторы прикрепления)* обеспечивают взаимодействие вирионов с плазматической мембраной клеток, кластеризацию вирус-рецепторных комплексов, активацию путей трансмембранной передачи сигнала, а в поляризованных клетках – латеральное перемещение вирус-рецепторных комплексов по апикальной поверхности в область плотных межклеточных контактов. На втором этапе происходит взаимодействие эховирусов с *депротеинизирующими рецепторами*, которое вызывает необратимую трансформацию 160S вирионов в 135S А-частицы за счёт потери капсидного белка VP4 и структурной реорганизации капсидного белка VP1 [6]. Сайт связывания депротеинизирующих рецепторов с поверхностью вирионов находится в области *каньона*, который окружает возвышенность на поверхности капсида вблизи каждой из осей симметрии 5-го порядка. Последующее событие депротеинизации (освобождения) вирусной геномной РНК приводит к появлению пустых 80S капсидов. Если депротеинизирующий рецептор экспрессирован на плазматической мембране клеток, он может выполнять функции как связывающего, так и депротеинизирующего рецептора, включая формирование А-частиц.

Эховирусы могут использовать в качестве связывающих клеточных рецепторов фактор, ускоряющий распад комплемента (DAF, UniProt: P08174) [7, 8], протеогликан гепарансульфата (HSPG, UniProt: P98160) [9–11], интегрин $\alpha 2\beta 1$ и $\alpha V\beta 3$ [12, 13]. Описаны варианты эховирусов, взаимодействующие только с рецептором DAF, только с HSPG, с DAF и с HSPG, наряду с вариантами, не использующими ни один из них [9]. Известны субтипичные варианты эховируса 9 (E9) с различным тропизмом к интегрину $\alpha V\beta 3$ [14]. Изменение тропизма эховирусов к связывающему рецептору DAF или к HSPG может быть обусловлено единичной аминокислотной заменой в капсидном белке [11, 15, 16]. Селекция субтипичных вариантов с изменённым тропизмом к связывающим рецепторам способствует адаптации эховирусов к различным культурам клеток.

Связывающие рецепторы для CVA9 также представлены несколькими типами молекул. Интегрин $\alpha V\beta 3$ является связывающим рецептором для CVA9 на клетках рабдомиосаркомы человека (RD) и GMK [17]. Описаны варианты CVA9, использующие интегрин $\alpha V\beta 6$ для свя-

зывания с клетками A549 [18], и варианты, связывающиеся с HSPG на клетках GMK [11]. В культуре клеток SW480 молекулярный шаперон HSPA5 (UniProt: P11021) с участием бета-2-микроглобулина (B2M, UniProt: P61769) обеспечивали независимую от интегрин $\alpha V\beta 6$ интернализацию CVA9 [19].

Все известные депротеинизирующие рецепторы для представителей рода *Enterovirus* относятся к суперсемейству иммуноглобулинов: 1) полиовирусный рецептор (PVR, UniProt: P15151) – рецептор для 3 типов полиовирусов; 2) коксакивирусный-аденовирусный рецептор (CAR, UniProt: P78310) – рецептор для 6 типов вирусов Коксаки В; 3) молекула межклеточной адгезии типа 1 (ICAM-1, UniProt: P05362) – рецептор для всех типов риновирусов, входящих в мажорную группу вида *Rhinovirus A*, всех типов вида *Rhinovirus B* и 5 типов вирусов Коксаки А: CVA13, CVA15, CVA18, CVA20 и CVA21 [20, 21].

Гликопротеин с молекулярной массой 44 кДа (gp44) был выделен и предварительно охарактеризован в качестве предполагаемого клеточного рецептора для эховирусов [22]. Моноклональные антитела (MAb) к gp44 защищали культуру клеток P2002 от инфицирования практически всеми типами эховирусов и вирусом CVA9 [23]. Однако сообщения о дальнейших исследованиях gp44 в доступных поисковых системах отсутствуют.

T. Ward и соавт. [24] обнаружили защитный эффект MAb к B2M при заражении клеток RD широким спектром типов эховирусов и CAV9. Также было показано, что добавление бычьего (BSA) или человеческого (HSA) сывороточного альбумина в среду поддержания культуры клеток RD ингибировало их инфицирование вирусом E7, подавляло образование А-частиц, но не препятствовало связыванию вируса с клетками [25]. Был установлен механизм инактивации вирусов E7 и E12 с помощью BSA, очищенного от глобулинов и жирных кислот, связанный с трансформацией вирионов в А-частицы в результате извлечения гидрофобного покет-фактора из вирионов [26]. Механизм протективного эффекта HSA, свободного от глобулинов, но не очищенного от жирных кислот, остался неизвестным, хотя предполагалось его блокирующее действие либо на вирионы эховирусов, либо на вторичный по отношению к DAF клеточный рецептор [25].

Человеческий неонатальный рецептор для Fc фрагмента IgG человека (hFcRn) является трансмембранным гетеродимером, состоящим из альфа-цепи FCGR2 (UniProt: P55899) и нековалентно связанным с ней B2M [27]. Молекула FCGR2 у человека представлена гликопротеином, относящимся к суперсемейству иммуноглобулинов (UniProt: P55899). В клетках человеческого происхождения она имеет молекулярную массу 45 кДа [28], близкую к молекулярной массе gp44, описанного ранее

[22]. На поверхности клеток FcRn выполняет функцию рецептора альбумина, а внутри клеток – функцию рецептора IgG и транспортного белка, обеспечивающего защиту IgG и альбумина от протеолитической деградации в лизосомах за счёт рециркуляции связанного лиганда к плазматической мембране или за счёт трансцитоза лиганда в поляризованных клетках [29].

Целью настоящей работы было определение роли hFcRn в качестве депротеинизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 в культуре клеток RD. В экспериментальной части работы решались следующие задачи: 1) показать отсутствие вирус-инактивирующего действия человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов, на клонированные варианты вируса E11 с различным тропизмом к рецептору DAF; 2) проверить спектр протективной активности человеческого сывороточного альбумина, очищенного от глобулинов, при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В, имеющими различную рецепторную специфичность; 3) исследовать протективную активность поликлональных антител (РАb) к hFcRn при заражении культур клеток RD энтеровирусами вида В с различной рецепторной специфичностью.

Материал и методы

Перевиваемые клеточные культуры. Перевиваемая линия клеток RD была получена из ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Свердловской области» Роспотребнадзора. Для проведения экспериментов клетки RD выращивали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ до образования плотного монослоя в культуральных пластиковых 96-луночных планшетах (Corning, США). В качестве ростовой среды использовали среду Игла MEM («ПанЭко», РФ) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biosera, Франция). При пересевах клетки снимали с пластика раствором трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко», РФ). В качестве среды поддержания при репродукции вирусов использовали среду 199 («ПанЭко», РФ) без добавления сыворотки.

Вирусы. Штаммы и клоны энтеровирусов вида В, использованные в работе, представлены в табл. 1. Гемагглютинирующий (Daf+) клон 431-1 вируса E11, использующий DAF в качестве первичного клеточного рецептора, и негемагглютинирующий (Daf-) клон 431-6 вируса E11, использующий другой, не идентифицированный клеточный рецептор, были получены и охарактеризованы ранее [16].

Все остальные штаммы, перечисленные в табл. 1, являлись клиническими изолятами, выделенными на клет-

ках RD в лаборатории энтеральных вирусных инфекций ФБУН «ЕНИИВИ» Роспотребнадзора из ликвора больных энтеровирусным менингитом. Генотипирование изолятов проводили по 2 фрагментам структурной части генома энтеровирусов, кодирующим капсидные белки VP1 и VP4-VP2, согласно описанным ранее методикам [30, 31].

Препараты альбумина и антитела к hFcRn. В экспериментах по изучению протективного эффекта при заражении клеток энтеровирусами использовали следующие коммерчески доступные реагенты: 1) HSA, очищенный от глобулинов (A8763 – Human serum albumin essentially globulin free, Merck/Sigma-Aldrich, Германия) (HSA-GF), получен в лиофилизированном виде; 2) кроличьи поликлональные антитела класса IgG к гетеродимеру человеческого FCGRT и B2M, (СТ009-T08, Sino Biological, Китай), полученные иммунизацией кроликов рекомбинантным человеческим гетеродимером FCGRT с B2M и очищенные аффинной хроматографией, получены в стерильной жидкой форме, без консерванта (hFcRn-PAb).

Исследование вирусинактивирующего действия растворов человеческого сывороточного альбумина. Для исследования вирусинактивирующего действия HSA-GF в растворе, к 100 мкл вирусосодержащей жидкости (ВСЖ), содержащей 200 ТЦД₅₀ соответствующего вируса, добавляли 100 мкл 8% (вес / объём) раствора альбумина в среде 199 для получения конечной концентрации 4%, перемешивали и инкубировали 60 мин при 37 °С. Контрольные пробы ВСЖ инкубировали в тех же условиях, но к ВСЖ добавляли 100 мкл среды 199 без альбумина. После инкубации остаточные инфекционные титры вирусов определяли методом конечных разведений на клетках RD в 96-луночных планшетах (8 реплик на разведение) и рассчитывали по методу Спирмена-Кербера.

Исследование протективного эффекта человеческого сывороточного альбумина при заражении культур клеток RD. В экспериментах по ингибированию репродукции вирусов с помощью HSA-GF использовали культуру клеток RD, выращенную в 96-луночных планшетах. В предварительных экспериментах было установлено, что HSA-GF в конечных концентрациях от 0,25 до 4% (вес / объём) не оказывал цитотоксического действия в течение 5-суточного периода наблюдения. Для обнаружения зависимости протективного эффекта от концентрации альбумина, использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД₅₀ на лунку) и различные концентрации альбумина, полученные 2-кратными разведениями в среде 199. После удаления среды роста, клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем вносили в лунки планшета по 100 мкл среды 199 с различными концентрациями HSA-GF. Инкубировали планшеты 60 мин при 37 °С, затем в лунки вносили по 100 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса (множественность заражения составляла 0,001 ТЦД₅₀ на клетку). Для учёта цитопатического эффекта (ЦПЭ) вирусов, в контрольные лунки вместо раствора альбумина вносили 100 мкл среды 199. Для учёта состояния клеточного монослоя в контрольные лунки вместо ВСЖ вносили 200 мкл среды 199. Каждую конечную концентрацию HSA-GF (4, 2, 1, 0,5 и 0,25%) исследовали в 8 репликах в 2 повторах эксперимента с каждым вирусом. В ходе экспериментов ЦПЭ ежедневно визуально оценивали с помощью ин-

Таблица 1

Типы, штаммы и клоны энтеровирусов, использованные в экспериментах

Тип энтеровируса (аббревиатура)	Номер штамма (клона)	Daf фенотип	Идентификатор GenBank
<i>Echovirus 11</i> (E11)	(431-1)	Daf+	JF925116
	(431-6)	Daf-	JF925117
<i>Echovirus 3</i> (E3)	206	Daf+	MK962649, MK962655
<i>Echovirus 9</i> (E9)	8100	Daf-	MK962651, MK962657
<i>Echovirus 30</i> (E30)	7500	Daf-	MK962648, MK962654
<i>Coxsackievirus B4</i> (CVB4)	1000	Daf-	MK962653, MK962659
<i>Coxsackievirus B5</i> (CVB5)	3122	Daf-	MK962652, MK962658
<i>Coxsackievirus A9</i> (CVA9)	3000	Daf-	MK962650, MK962656

вертированного микроскопа, окончательный учет результатов проводили на 5-е сутки после фиксации монослоя 96% раствором этилового спирта и последующей окраски 0,5% раствором кристалвиолета. Степень ЦПЭ оценивали по проценту клеток в монослое с характерными для эховирусов признаками цитопатологии по условной 4-плюсовой шкале: “–” (0%); “1+” (<25%); “2+” (от 25% до <50%), “3+” (от 50% до <75%) и “4+” (от 75% до 100%). Затем вычисляли средние величины со стандартными отклонениями и обрабатывали статистическими методами.

Исследование протективного эффекта hFcRn-PAb в культуре клеток RD. Эксперименты по ингибированию репродукции вирусов с помощью hFcRn-PAb были выполнены на культуре клеток RD в 96-луночных планшетах. В предварительных экспериментах показано, что hFcRn-PAb в концентрациях от 0,15 до 10 мкг/мл не оказывали цитотоксического действия на клетки в течение 5 сут наблюдения. Для обнаружения протективного эффекта использовали одинаковые заражающие дозы вирусов (100 ТЦД₅₀ на лунку) и различные концентрации антител в среде 199. После удаления среды роста клеточный монослой однократно промывали средой 199, затем в лунки вносили по 50 мкл растворов антител в различных концентрациях и инкубировали 1 ч при 37 °С. После этого в каждую лунку с раствором антител вносили по 50 мкл ВСЖ, содержащей 100 ТЦД₅₀ соответствующего вируса (множественность заражения 0,001 ТЦД₅₀/кл). Каждую конечную концентрацию антител (10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,6 и 0,3 мкг/мл) тестировали в 8 репликах с каждым вирусом в 2 независимых экспериментах. В лунки с положительным контролем ЦПЭ вируса вносили по 50 мкл ВСЖ и 50 мкл среды 199 без антител. Для контроля цитотоксичности антител вместо ВСЖ в лунки с растворами антител вносили 50 мкл среды 199 и 50 мкл раствора антител. Лунки с отрицательным контролем, для мониторинга состояния клеточного монослоя, содержали 100 мкл среды 199. Контроль отсутствия неспецифического вируснетрализующего действия hFcRn-PAb (10,0 мкг/мл) проводили по схеме эксперимента, описанной выше. Методика учёта ЦПЭ описана выше.

Статистические методы обработки результатов. Для определения инфекционного титра вирусов использовали формулу Спирмена–Кербера с расчётом суммарной аналитической погрешности [32]. Статистически достоверные различия между экспериментальными группами определяли методами ANOVA [33] или с помощью непараметрического *U*-теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Отсутствие инактивирующего действия раствора HSA-GF на клоны вируса E11. Поскольку было известно, что раствор BSA, очищенный от глобулинов и жирных кислот, инактивировал вирусы E7 и E12 [26], проверяли инактивирующее действие раствора HSA очищенного от глобулинов, на клонированные варианты вируса E11. Вирусные пулы (100 ТЦД₅₀ в 100 мкл) инкубировали в растворе HSA-GF с конечной концентрацией 4% при 37 °С в течение 1 ч, этого времени достаточно для заражения культур клеток RD в экспериментах по исследованию протективного эффекта HSA-GF. Вирусинактивирующее действие раствора HSA-GF отсутствовало. Прединкубация не изменяла инфекционный титр клонов E11 с разной рецепторной специфичностью.

Исследование протективного эффекта альбумина

при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В. Зависимость протективного эффекта от концентрации HSA-GF изучали на нескольких интервалах времени после заражения (p.i.) культур клеток RD одинаковой инфицирующей дозой (100 ТЦД₅₀ на лунку при множественности заражения 0,001 ТЦД₅₀/кл) эховирусов 3 (E3), 9 (E9), 11 (E11), коксакивирусов A9 (CVA9) и B5 (CVB5). Результаты показаны в табл. 2.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD в отношении 2 близкородственных клонов E11 показало более выраженный ингибирующий эффект альбумина в случае заражения культуры клеток RD *daf*⁻ клоном 431-6, не взаимодействовавшим с рецептором DAF, по сравнению с DAF-зависимым *daf*⁺ клоном 431-1. При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 ч после заражения клеток каждым из клонов. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч после заражения клоном 431-1, была 0,5% (ЦПЭ 81,3±4,1% относительно 100,0% при отсутствии альбумина). Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч после заражения клоном 431-6, также составляла 0,5%, но снижение ЦПЭ было более выраженным (40,6±4,6%). Максимальная длительность протективного эффекта в случае *daf*⁺ клона 431-1 при 4% концентрации HSA-GF составляла 96 ч p.i. (ЦПЭ 50,0%). В случае *daf*⁻ клона 431-6 протективный эффект 4% концентрации HSA-GF наблюдался даже через 120 ч после заражения (ЦПЭ 12,5±4,7%). Кроме того, у клона 431-1 наблюдался более быстрый прирост ЦПЭ по времени при использовании 1 и 2% концентраций HSA-GF в сравнении с клоном 431-6.

Сравнение протективного эффекта HSA-GF в клетках RD, инфицированных E3 и E9, выявило более быструю кинетику нарастания ЦПЭ в случае *Daf*⁺ штамма E3 в сравнении с *Daf*⁻ штаммом E9. При отсутствии альбумина в поддерживающей среде, 100% ЦПЭ наблюдался через 48 ч p.i. как у вируса E3, так и у E9. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 ч p.i. у *Daf*⁺ штамма E3 (ЦПЭ 37,5±4,7%), составляла 1,0%. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ через 48 p.i. у *Daf*⁻ штамма E9 (ЦПЭ 18,8±4,1%), была в 4 раза ниже: 0,25%. Максимальная длительность протективного эффекта в случае *Daf*⁺ штамма E3 при использовании 4% концентрации HSA-GF составляла 120 ч (ЦПЭ 62,5±4,7%). Максимальная длительность протективного эффекта в отношении *Daf*⁻ штамма E9 также составляла 120 ч, но при использовании 4, 2 и 1% концентраций HSA-GF (в частности, через 120 ч p.i. при 1% концентрации альбумина наблюдался ЦПЭ лишь 6,3±4,1%).

Таким образом, при попарном сравнении был выявлен более выраженный протективный эффект HSA-GF в отношении *daf*⁻ клона 431-6 вируса E11 и *Daf*⁻ штамма E9 в сравнении с менее выраженным ингибированием ЦПЭ в отношении *daf*⁺ клона 431-1 вируса E11 и *Daf*⁺ штамма E3.

В отличие от использованных в данной работе эховирусов и вирусов Коксаки В, штамм вируса CVA9 характеризовался замедленной кинетикой развития ЦПЭ: в отсутствие альбумина 100% ЦПЭ наблюдался через 72 ч. Минимальная концентрация HSA-GF, статистически достоверно снижавшая ЦПЭ (до 43,8±4,1%) через 72 ч p.i., была 0,25%. Протективный эффект через 120 ч p.i.

Таблица 2

Протективный эффект альбумина HSA-GF в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В (ЦПЭ ± m)^a

Тип клон/штамм	Время после заражения, ч	Концентрация альбумина HSA-GF, %					
		0,0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
E11 431-1	24	12,5±4,7	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	46,9±3,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	96,9±3,1	81,3±4,1*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	50,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6
E11 431-6	24	18,8±4,1	18,8±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	81,3±4,1*	40,6±4,6*	40,6±4,6*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	59,4±4,6*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	6,3±4,1*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	12,5±4,7*
E3 206	24	40,6±4,6	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	37,5±4,7*	6,3±4,1*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	90,6±4,6	12,5±4,7*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	62,5±4,7*
E9 8100	24	18,8±4,1	6,3±4,1	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	93,8±4,1	18,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	81,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	6,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVA9 3000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	37,5±4,7	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	43,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	31,3±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	65,6±4,6*	9,4±4,6*
CVB5 3122	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	87,5±4,7
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание. ^a – средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины; * – различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при 0% HSA-GF статистически достоверны (U-тест Манна-Уитни).

наблюдался при использовании HSA-GF в концентрациях 2% (ЦПЭ 65,6±4,6%) и 4% (ЦПЭ 9,4±4,6%).

Штамм CVB5 через 48 ч после заражения клеток RD демонстрировал развитие 100% ЦПЭ как в отсутствие альбумина, так и при всех концентрациях HSA-GF вплоть до 2%. При концентрации 4% HSA-GF снижение ЦПЭ не достигало статистически значимого отличия от контрольных лунок без альбумина.

Исследование протективной активности антител к hFcRn при заражении культур клеток RD различными типами энтеровирусов вида В. В предварительных экспериментах было установлено отсутствие вируснейтрализующего действия hFcRn-PAb в концентрации 10,0 мкг/мл после инкубации в течение 1 ч при 37°C со 100 ТЦД₅₀ соответствующих вирусов перед заражением клеток RD (данные не показаны). Зависимость протектив-

ного эффекта от концентрации hFcRn-PAb и от времени p.i. в культуре клеток RD вирусами E3, E9, E11, E30, CVA9, CVB4 и CVB5 показана в табл. 3.

Сравнение протективного эффекта hFcRn-PAb в клетках RD в отношении 2 близкородственных клонов вируса E11 (*daf*⁺ клон 431-1 и *daf*⁻ клон 431-6) выявило одинаковую минимальную концентрацию PAb (2,5 мкг/мл), обеспечившую отсутствие ЦПЭ в течение 120 ч p.i. Однако при меньшей концентрации hFcRn-PAb (1,25 мкг/мл) кинетика нарастания ЦПЭ по времени (через 72, 96 и 120 ч p.i.) была более быстрой (с меньшим протективным эффектом) в случае DAF-зависимого *daf*⁺ клон 431-1 по сравнению с *daf*⁻ клоном 431-6, не взаимодействовавшим с DAF.

Минимальные концентрации hFcRn-PAb, обеспечившие полное отсутствие ЦПЭ в течение 120 ч при заражении клеток RD штаммами вирусов E3, E9 и E30, составили соответственно 5,0; 2,5 и 1,25 мкг/мл. Более выраженная протективная активность hFcRn-PAb наблюдалась при использовании *Daf*⁻ штаммов E9 и E30 в отличие от *Daf*⁺ штамма вируса E3.

Штамм CVA9 характеризовался замедленным развитием ЦПЭ по сравнению с экховирусами и вирусами Коксаки В, использованными в данной работе. 100% ЦПЭ в отсутствие hFcRn-PAb наблюдался через 72 ч p.i. Минимальная концентрация

PAb, приводившая к полному отсутствию ЦПЭ в течение 120 ч при заражении клеток RD вирусом CVA9 была 0,6 мкг/мл.

Все использованные концентрации hFcRn-PAb, включая 10 мкг/мл, не проявляли защитного эффекта при заражении культуры клеток RD вирусами CVB4 и CVB5.

Обсуждение

Энтеровирусы вида В характеризуются высокой внутриклеточной вариабельностью взаимодействия со связывающими рецепторами, такими как DAF [2, 34], HSPG [11], интегрин *aVb3* и *aVb6* [18]. Однако взаимодействие с известными депротенинизирующими рецепторами для энтеровирусов, такими как CAR, ICAM-1 и PVR, является высококонсервативным внутри субвидовых групп вирусов, относящихся к роду *Enterovirus*.

Таблица 3

Протективное действие поликлональных антител к hFcRn в клетках RD, инфицированных различными энтеровирусами вида В (ЦПЭ ± m)^a

Тип клон/штамм	Время после заражения, ч	Концентрация поликлональных антител, мкг/мл					
		0,0	0,6	1,25	2,5	5,0	10,0
E11 431-1	24	25,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	25,0±0,0*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	75,0±0,0*	46,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	87,5±4,7	50,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*-	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	62,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E11 431-6	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	18,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	78,1±3,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	75,0±0,0*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	59,4±4,6*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E3 206	24	50,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	48	100,0±0,0	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	68,8±4,1*	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	75,0±0,0*	21,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	75,0±0,0*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E9 8100	24	12,5±4,7	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	96,9±3,1	12,5±4,7*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	43,8±4,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	68,8±4,1*	25,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	46,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
E30 7500	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	21,9±3,1*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVA9 3000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	40,6±4,6	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	72	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	96	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
	120	100,0±0,0	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,0±0,0*
CVB4 1000	24	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
CVB5 3122	24	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0	25,0±0,0
	48	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	72	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	96	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0
	120	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0	100,0±0,0

Примечание. ^a – средний процент ЦПЭ по 8 репликам в 2 повторах эксперимента ± стандартная ошибка средней величины; * – различия средних величин ЦПЭ в ячейке таблицы и ЦПЭ при концентрации поликлональных антител 0,0 мкг/мл статистически достоверны (*U*-тест Манна-Уитни).

В настоящей работе показано, что HSA-GF в физиологических концентрациях защищал культуру клеток RD при заражении несколькими типами эховирусов (E3, E9, E11) с различной рецепторной специфичностью и виру-

сом CVA9, независимо от используемых ими связывающих рецепторов. Кроме того, HSA-GF не ингибировал инфекцию клеток RD вирусом CVB5, который используется в качестве депротенинизирующего рецептора CAR. Аналогичный спектр протективной активности был показан при использовании hFcRn-PAb, которые защищали клетки RD от инфицирования эховирусами (E3, E9, E11, E30) и CVA9, но не вирусами CVB4 и CVB5. Поскольку связывание альбумина является физиологической функцией hFcRn, то общий механизм протективного эффекта, наблюдавшегося при использовании альбумина и PAb к hFcRn, был обусловлен их связыванием с hFcRn, которое нарушало взаимодействие hFcRn с эховирусами и CVA9.

Спектр протективной активности HSA-GF и hFcRn-PAb, наблюдавшийся в культуре клеток RD, соответствовал спектру протективной активности описанных ранее MAб к gp44 в культуре клеток человеческого происхождения P2002 [23]. Поскольку MAб к gp44 ингибировали репродукцию практически всех типов эховирусов, а gp44 идентичен FCGRT (альфа-цепи hFcRn), полученные нами результаты можно экстраполировать на всю группу эховирусов.

Роль hFcRn в качестве первичного («primary») пан-эховирусного («pan-echovirus») рецептора была показана другими методами и на других культурах клеток в недавно опубликованной работе [35]. Методом копреципитации *in vitro* с последующим иммуноблоттингом было продемонстрировано прямое взаимодействие рекомбинантной молекулы гFcRn-B2M (состоявшей из внеклеточного домена hFcRn и B2M) с вирионами E11 и E30. Кроме того, было показано вируснейтрализующее действие гFcRn-B2M.

Ранее нами были картированы аминокислотные заме-

ны в области каньона E11, связанные с адаптацией клонированного вируса E11, полученного в культуре клеток RD, к культурам клеток обезьяньего (BGM) и человеческого (HEp-2 и J-41/КД84) происхождения [15]. Затем были селекционированы 2 близкородственных клон E11 (*daf*⁺ клон 431-1 *daf*⁻ клон 431-6), отличавшиеся единственной аминокислотной заменой в сайте связывания вириона с DAF и имевшие одинаковую структуру капсидных белков в области каньона [16]. Клон 431-1 был DAF-зависимым, так как его репродукция эффективно подавлялась МАб к DAF в культуре клеток RD, а клон 431-6 не взаимодействовал с DAF. Репродукция обоих клонов в культуре клеток RD ингибировалась МАб к В2М [16]. Полученные данные указывали на существование общего каньон-связывающего рецептора для 2 клонов, функциональность которого зависела от В2М. Поскольку В2М является субъединицей hFcRn и в настоящей работе был обнаружен протективный эффект HSA-GF и hFcRn-PAб при заражении культуры клеток RD как *daf*⁺ клоном 431-1, так и *daf*⁻ клоном 431-6, то общий каньон-связывающий рецептор для 2 клонов может быть идентифицирован как hFcRn. Кроме того, DAF-зависимый клон 431-1 демонстрировал двухэтапное взаимодействие с клетками RD, так как первый этап взаимодействия мог быть блокирован с помощью МАб к связывающему рецептору DAF, а второй этап мог быть блокирован с помощью МАб к В2М, HSA-GF или hFcRn-PAб.

Отличительным свойством депротенинизирующих рецепторов является их способность трансформировать зрелые 160S вирионы энтеровирусов в 135S А-частицы. Объединение доказательств прямого взаимодействия рекомбинантной молекулы rFcRn-В2М с вирионами E11, приводившего к снижению их инфекционной активности [35], с данными о снижении продукции 135S А-частиц и блокировании депротенинизации E11 в культуре клеток RD с помощью МАб к В2М [36], и с результатами наших исследований по картированию сайта связывания альтернативного по отношению к DAF клеточного рецептора на поверхности вириона E11 позволяет сделать вывод о роли hFcRn в качестве каньон-связывающего депротенинизирующего рецептора для вируса E11 в культуре клеток RD.

Учитывая обнаруженный нами протективный эффект HSA-GF и hFcRn-PAб при заражении клеток RD вирусом CVA9, наблюдавшийся ранее в культуре клеток RD протективный эффект МАб 1350 к В2М [24], а также протективный эффект МАб к gp44 [23] при заражении вирусом CVA9 культуры клеток P2002, можно сделать вывод о сходстве функции hFcRn при репродукции эховирусов и CVA9 в этих видах клеток. О. Heikkila и соавт. [37] было показано, что сайленсинг В2М методом РНК-интерференции не только эффективно подавлял репродукцию CVA9 в культуре клеток А549, но и приводил к накоплению CVA9 на поверхности клеток. Эти данные подразумевают участие В2М-содержащих молекул (включая hFcRn) в интернализации CVA9 в клетки А549. Следовательно, функциональная активность hFcRn является необходимым условием для заражения клеток RD вирусом CVA9, так же, как для заражения эховирусами.

С учётом возможности двухэтапного взаимодействия некоторых вариантов эховирусов со связывающим и с депротенинизирующим рецептором, роль hFcRn в качестве связывающего рецептора не может считаться

универсальной, поскольку существуют и другие связывающие рецепторы. Если связывание вирусов с клеткой происходит на плазматической мембране, то слабая экспрессия (или отсутствие экспрессии) депротенинизирующего рецептора на поверхности клеток в сочетании с низкой множественностью заражения может обеспечить клеткам невосприимчивость к вирусам, имеющим монорецепторный тропизм к hFcRn. У вирусов, имеющих мультирецепторный тропизм, слабая экспрессия (или отсутствие экспрессии) депротенинизирующего рецептора компенсируется их взаимодействием с каким-либо связывающим рецептором. Двухэтапная схема взаимодействий объясняет, каким образом блокирование связывающих рецепторов защищало клетки от инфицирования DAF-зависимыми и SHPG-зависимыми вариантами эховирусов. В соответствии с двухэтапной схемой, мы наблюдали меньшую выраженность протективного эффекта альбумина и PAb к hFcRn в отношении эховирусов, взаимодействующих с DAF, при условиях неполного блокирования hFcRn, имитирующих его сниженную экспрессию.

Идентификация hFcRn в качестве общего депротенинизирующего рецептора для эховирусов и CVA9 открывает новые возможности для изучения взаимосвязи экспрессии hFcRn в различных видах клеток и тканей с патогенезом заболеваний, вызываемых эховирусами и CVA9 у человека. Установление ключевой роли hFcRn в репродукции эховирусов и CVA9 позволяет использовать трансгенных мышей, экспрессирующих hFcRn [38, 39], для экспериментальных исследований патогенеза эховирусных инфекций на мышах [35] и, следовательно, для доклинических испытаний противовирусных лекарственных средств. Специфичность протективного действия человеческого сывороточного альбумина HSA-GF и hFcRn-PAб в культуре клеток RD позволяет использовать эти реагенты для субвидовой классификации малоизученных и новых энтеровирусов.

Выводы

1. В настоящей работе определена роль hFcRn в качестве каньон-связывающего и депротенинизирующего рецептора для вируса E11 при репродукции в культуре клеток RD.

2. Кинетика и величина протективных эффектов, наблюдавшихся при использовании альбумина HSA-GF и антител к hFcRn, были менее выраженными у эховирусов, способных к связыванию с DAF, по сравнению с эховирусами, не взаимодействовавшими с DAF, при условиях неполного блокирования hFcRn. Данное наблюдение подтверждает двухэтапную схему взаимодействия DAF-зависимых эховирусов с рецепторами при входе в клетку: сначала со связывающим рецептором (DAF), затем – с депротенинизирующим (hFcRn).

3. Протективные эффекты альбумина HSA-GF и антител к hFcRn могут быть объяснены блокированием функции hFcRn при связывании, интернализации или депротенинизации эховирусов и CVA9.

Благодарности. Авторы выражают признательность Т.Э. Снитковской за предоставление культуры клеток RD, а также благодарят Justin N. Yeager, PhD, PsyD, за стилистическую правку рукописи на английском языке.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Усольцева П.С., Резайкин А.В., Новосёлов А.В., Алимов А.В.; сбор и обработка материала – Усольцева П.С., Резайкин А.В.; статистическая обработка – Усоль-

цева П.С., Резайкин А.В.; написание текста – Новосёлов А.В., Усольцева П.С., Резайкин А.В.; редактирование – Сергеев А.Г., Алимов А.В.; утверждение окончательного варианта статьи - Сергеев А.Г., Алимов А.В., Новосёлов А.В.; ответственность за целостность всех частей статьи - Сергеев А.Г., Алимов А.В., Новосёлов А.В.

Финансирование. Данное исследование не имело финансовой поддержки.

Конфликты интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421-2. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
- Carson S.D., Chapman N.M., Hafenstein S., Tracy S. Variations of coxsackievirus B3 capsid primary structure, ligands, and stability are selected for in a coxsackievirus and adenovirus receptor-limited environment. *J. Virol.* 2011; 85(7): 3306-14. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01827-10>
- Delorme-Axford E., Sadvovsky Y., Coyne C.B. Lipid raft- and SRC family kinase-dependent entry of coxsackievirus B into human placental trophoblasts. *J. Virol.* 2013; 87(15): 8569-81. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00708-13>
- Shieh J.T., Bergelson J.M. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9474-80. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.76.18.9474-9480.2002>
- Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., Barry R.D. Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.* 1997; 71(6): 4736-43.
- Bergelson J.M., Coyne C.B. Picornavirus entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 790: 24-41. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7651-1_2
- Kim C., Bergelson J.M. Echovirus 7 entry into polarized intestinal epithelial cells requires clathrin and Rab7. *MBio.* 2012; 3(2): e00304-11. Doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00304-11>
- Sobo K., Rubbia-Brandt L., Brown T.D.K., Stuart A.D., McKee T.A. Decay-accelerating factor binding determines the entry route of echovirus 11 in polarized epithelial cells. *J. Virol.* 2011; 85(23): 12376-86. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00016-11>
- Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., Evans D.J. Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4918-21. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4918-4921.2001>
- Israelsson S., Gullberg M., Jonsson N., Roivainen M., Edman K., Lindberg A.M. Studies of echovirus 5 interactions with the cell surface: heparan sulfate mediates attachment to the host cell. *Virus Res.* 2010; 151(2): 170-6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.001>
- McLeish N.J., Williams C.H., Kaloudas D., Roivainen M.M., Stanway G. Symmetry-related clustering of positive charges is a common mechanism for heparan sulfate binding in enteroviruses. *J. Virol.* 2012; 86(20): 11163-70. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00640-12>
- Jokinen J., White D.J., Salmela M., Huhtala M., Kapyla J., Sipilä K., et al. Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J.* 2010; 29(1): 196-208. Doi: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.326>
- Ylipaasto P., Eskelinen M., Salmela K., Hovi T., Roivainen M. Vitronectin receptors, alpha v integrins, are recognized by several non-RGD-containing echoviruses in a continuous laboratory cell line and also in primary human Langerhans' islets and endothelial cells. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 1): 155-65. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.012450-0>
- Nelsen-Salz B., Eggers H.J., Zimmermann H. Integrin alpha(v)beta3 (vitronectin receptor) is a candidate receptor for the virulent echovirus 9 strain Barty. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 9): 2311-3. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2311>
- Rezaikin A.V., Novoselov A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A., Lebedev S.V. Two clusters of mutations map distinct receptor-binding sites of echovirus 11 for the decay-accelerating factor (CD55) and for canyon-binding receptors. *Virus Res.* 2009; 145(1): 74-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.004>
- Novoselov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A., Grigoryeva J.V., Sokolova Z.I. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. *Virus Res.* 2012; 166(1-2): 87-96. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.03.007>
- Triantafyllou M., Triantafyllou K., Wilson K.M., Takada Y., Fernandez N., Stanway G. Involvement of beta2-microglobulin and integrin alphaVbeta3 molecules in the coxsackievirus A9 infectious cycle. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 10): 2591-600. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2591>
- Heikkila O., Susi P., Stanway G., Hyypia T. Integrin alphaVbeta6 is a high-affinity receptor for coxsackievirus A9. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 1): 197-204. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.004838-0>
- Heikkila O., Merilahti P., Hakanen M., Karelehto E., Alanko J., Sukki M., et al. Integrins are not essential for entry of coxsackievirus A9 into SW480 human colon adenocarcinoma cells. *Virology.* 2016; 13(1): 171. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0619-y>
- Basnet S., Palmenberg A.C., Gern J.E. Rhinoviruses and their receptors. *Chest.* 2019; 155(5): 1018-1025. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>
- Newcombe N.G., Andersson P., Johansson E.S., Au G.G., Lindberg A.M., Barry R.D., et al. Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J. Gen. Virol.* 2003; 84(11): 3041-50. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.19329-0>
- Mbida A.D., Pozzetto B., Gaudin O.G., Grattard F., Le Bihan J.C., Akono Y., et al. A 44,000 glycoprotein is involved in the attachment of Echovirus-11 onto susceptible cells. *Virology.* 1992; 189(1): 350-3. Doi: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90714-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90714-z)
- Mbida A.D., Gaudin O.G., Sabido O., Pozzetto B., Le Bihan J.C. Monoclonal antibody specific for the cellular receptor of echoviruses. *Intervirology.* 1992; 33(1): 17-22. Doi: <https://doi.org/10.1159/000150226>
- Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., Almond J.W. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.* 1998; 72(7): 5360-5.
- Ward T., Powell R.M., Evans D.J., Almond J.W. Serum albumin inhibits echovirus 7 uncoating. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 2): 283-90. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-283>
- Ward T., Powell R.M., Chaudhry Y., Meredith J., Almond J.W., Kraus W., et al. Fatty acid-depleted albumin induces the formation of echovirus A particles. *J. Virol.* 2000; 74(7): 3410-2. Doi: <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3410-3412.2000>
- Pyzik M., Rath T., Lencer W.I., Baker K., Blumberg R.S. FcRn: The architect behind the immune and nonimmune functions of IgG and albumin. *J. Immunol.* 2015; 194(10): 4595-603. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403014>
- Zhu X., Peng J., Raychowdhury R., Nakajima A., Lencer W.I., Blumberg R.S. The heavy chain of neonatal Fc receptor for IgG is sequestered in endoplasmic reticulum by forming oligomers in the absence of beta2-microglobulin association. *Biochem. J.* 2002; 367(3): 703-14. Doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20020200>
- Sockolovsky J.T., Szoka F.C. The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 91: 109-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.005>
- Arola A., Santti J., Ruuskanen O., Halonen P., Hyypia T. Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2): 313-8.
- Palacios G., Casas I., Tenorio A., Freire C. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(1): 182-92. Doi: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.1.182-192.2002>
- Husson-van Vliet J., Roussel P. Pipetting errors in viral titrations: a useful approach. *J. Virol. Methods.* 1988; 22(2-3): 183-90. Doi: [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(88\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0166-0934(88)90101-2)
- Wulff N.H., Tzatzaris M., Young P.J. Monte Carlo simulation of the Spearman-Kaerber TCID50. *J. Clin. Bioinforma.* 2012; 2(1): 5. Doi: <https://doi.org/10.1186/2043-9113-2-5>
- Schmidtke M., Selinka H.C., Heim A., Jahn B., Tonew M., Kandolf R., et al. Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology.* 2000; 275(1): 77-88. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0485>
- Morosky S., Wells A.I., Lemon K., Evans A.S., Schamus S., Bakkenist C.J., et al. The neonatal Fc receptor is a pan-echovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019; 116(9): 3758-63. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1817341116>
- Chevaliez S., Balanant J., Maillard P., Lone Y.C., Lemonnier F.A., Delpyroux F. Role of class I human leukocyte antigen molecules in early steps of echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *Virology.* 2008; 381(2): 203-14. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.viro.2008.08.006>
- Heikkila O., Susi P., Tevaltuot T., Harma H., Marjomaki V., Hyypia T., et al. Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by beta2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin. *J. Virol.* 2010; 84(7): 3666-81. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01340-09>
- Avery L.B., Wang M., Kavosi M.S., Joyce A., Kurz J.C., Fan Y.Y., et al. Utility of a human FcRn transgenic mouse model in drug discovery for early assessment and prediction of human pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *MAbs.* 2016; 8(6): 1064-78. Doi: <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1193660>
- Roopenian D.C., Christianson G.J., Proetz G., Sproule T.J. Human FcRn transgenic mice for pharmacokinetic evaluation of therapeutic antibodies. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1438: 103-14. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3661-8_6

Поступила 29.07.19

Принята в печать 20.08.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ I- И E- ГЕНОТИПОВ РОТАВИРУСА А С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, г. Нижний Новгород, Россия

Введение. В связи с разработкой и применением полногеномной системы классификации ротавирусов в последние годы в мире всё чаще отмечают присутствие реассортантных штаммов. Сведения о циркуляции таких штаммов на территории России недостаточны и фрагментарны. **Цель** настоящей работы – разработка методики определения генотипа сегментов, кодирующих белки VP6 (I-генотип) и NSP4 (E-генотип), позволяющей выявить реассортанты. **Материал и методы.** Ротавирус-положительные образцы изучали с помощью секвенирования и мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Филогенетический анализ штаммов проводили с применением Байесовского подхода. **Результаты.** На основе полученных нуклеотидных последовательностей нижегородских ротавирусов выявлены 3 аллеля гена VP6 (I1-1, I2-IV и I2-VII) и 7 аллелей гена NSP4 (E1-I, E1-III, E2-VI, E2-VII, E2-X, E2-XII и E3). С учётом результатов филогенетического анализа сконструированы олигонуклеотидные праймеры, специфичные в отношении генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3. Подобраны оптимальные условия для проведения мультиплексной ПЦР. Методика апробирована с использованием проб, содержащих ротавирусы, выявленные в Нижнем Новгороде в 2018 г. Определены спектр и долевое распределение I- и E-генотипов, а также их комбинации с G- и P-генотипами. **Обсуждение.** Доминировали ротавирусы с сочетанием G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), на 2-м месте были ротавирусы с констелляцией G2-P[4]-I2-E2 (29,1%). В единичных случаях были обнаружены штаммы с генотипами G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 и G2-P[4]-I2-E1, имеющие гены двух геногрупп ротавирусов, что позволяет отнести их к реассортантам. **Заключение.** Предложенный подход может послужить удобным инструментом для характеристики ротавирусов на этапе внедрения вакцинации населения против ротавирусной инфекции в России.

Ключевые слова: ротавирус А; генотип; праймеры; ПЦР; реассортантные штаммы; генотипирование; филогенетический анализ; аллели.

Для цитирования: Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Идентификация I- и E- генотипов ротавируса А с использованием мультиплексной ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 140-144.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144>

Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.

IDENTIFICATION OF ROTAVIRUS I- AND E-GENOTYPES BY MULTIPLEX PCR METHOD

I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

Introduction. In recent years the presence of reassortant rotavirus strains is increasingly mentioned in the world due to the application of the full-genome based classification system. Information on the circulation of such strains in the territory of Russia is limited. **The aim** of this work was the development of the approach for determination of genotypes of segments encoding VP6 (I) and NSP4 (E) to reveal reassortant strains. **Material and Methods.** Rotavirus-positive samples were studied by means of nucleotide sequencing and multiplex PCR. Phylogenetic analysis was conducted using the Bayesian approach. **Results.** Three alleles of the VP6 gene (I1-1, I2-IV, I2-VII) and seven alleles of the NSP4 gene (E1-I, E1-III, E2-VI, E2-VII, E2-X, E2-XII, E3) were detected on the base of nucleotide sequences of Nizhny Novgorod rotaviruses. Taking into account these results, the oligonucleotide primers specific to genotypes I1, I2, I3 and E1, E2, E3 were designed. Optimal conditions for multiplex PCR were chosen. The method was tested using the strains collected in Nizhny Novgorod in 2018. The diversity of I and E genotypes was determined and various combinations with G and P genotypes were identified. **Discussion.** G9-P[8]-I1-E1 rotaviruses were predominant (32.7 %) and G2-P[4]-I2-E2 rotaviruses were in second place (29.1 %). Strains with genotypes G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 and G2-P[4]-I2-E1 were detected sporadically. They had genes of two rotavirus genogroups, so can be considered to be reassortant. **Conclusion.** The proposed approach is a useful tool for the characterization of rotaviruses in the conditions of the beginning of vaccination against rotavirus infection in Russia.

Keywords: rotavirus A; genotype; primers; PCR; reassortant strains; genotyping; phylogenetic analysis; alleles.

For citation: Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Identification of rotavirus I- and E-genotypes by multiplex PCR method. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(3): 140-144. (In Russ.).

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144>

For correspondence: Tatiana A. Sashina, Research Assistant, laboratory of molecular epidemiology of viral infections, I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com

Information about authors:

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Epifanova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

Acknowledgments. Detection of rotavirus G- and P-genotypes was conducted in the framework of federal program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (No. 141-00063-18-00). Development of the PCR method for identification of rotavirus I- and E-genotypes was funded by RFBR, research project No. 18-34-00586.

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

Received 09 October 2018

Accepted 31 October 2018

Для корреспонденции: Сашина Татьяна Александровна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН НИИЭМ им. академика И. Н. Блохиной, 603950, г. Нижний Новгород. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com

Введение

Ротавирус А (вид *Rotavirus A*, семейство *Reoviridae*) является возбудителем острого гастроэнтерита у детей первых лет жизни во всём мире. В России в последние 10 лет показатель заболеваемости ротавирусной инфекцией возрос более чем в 8 раз (с 9,3 до 80,9 на 100 тыс. населения) [1]. Большое разнообразие генетических вариантов, способность к накоплению точечных мутаций и реассортация сегментов генома являются характерными чертами ротавируса А [2] и обуславливают необходимость постоянного мониторинга циркулирующих штаммов.

Для характеристики ротавирусов традиционно используют бинарную номенклатуру (G- и P-генотипы), основываясь на молекулярных свойствах 2 сегментов генома, кодирующих белки наружного капсида вириона (VP7 и VP4) [2]. Однако данная номенклатура не позволяет выявить и охарактеризовать реассортантные варианты ротавируса. Для преодоления этого ограничения была разработана полногеномная система классификации ротавирусов на основе свойств всех 11 сегментов генома [3]. В этой системе для сегментов, кодирующих белки VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, предложен акроним Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x – арабские цифры, обозначающие генотип). Генотипы VP7 и VP4 не отличаются от бинарной системы. Для каждого из оставшихся 9 сегментов, которые называют внутренними генами, выделено 8 генотипов или более [3, 4].

В ранних исследованиях было показано, что внутренние гены ротавирусов человека генотипов G1P[8], G3P[8], G4P[8] и G9P[8] почти без исключений относятся к генотипу 1 и принадлежат первой или Wa-подобной геногруппе. Внутренние гены штаммов генотипа G2P[4], инфицирующих людей, как правило, относятся к генотипу 2 и принадлежат второй или DS-1-подобной геногруппе [4–7].

Однако в дальнейшем во многих странах были обнаружены межгеногрупповые реассортанты, имеющие смешанный набор генов 2 геногрупп. Например, начиная с 2011 г. в Японии, Таиланде и Вьетнаме были выявлены штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, имеющие гены белков наружного капсида 1-й геногруппы и внутренние гены 2-й геногруппы ротавирусов [8–13]. Также в качестве примера можно привести ротавирусы с генными конstellляциями G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 и G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, выявленные в Австралии, Испании, Японии, Таиланде, Венгрии и Вьетнаме [14–18].

Между тем в России на этапе внедрения вакцинации населения против ротавирусной инфекции знания о ротавирусах ограничиваются характеристикой с помощью бинарной системы классификации, информация о реассортантных штаммах фрагментарна, сведения о генотипах внутренних генов отсутствуют. В сезон 2013–2014 гг. на территории России (Нижний Новгород) были впервые выявлены реассортантные DS-1-подобные G1P[8]-штаммы ротавируса, родственные ранее обнаруженным в Японии и Таиланде. Секвенирование 4 генов (VP7, VP4, VP6 и NSP4) показало их принадлежность к генотипу G1-P[8]-I2-E2 [19]. Таким образом, дополнительный анализ генов, кодирующих белки VP6 (структурный элемент внутреннего капсида ротавириона) и NSP4 (ротавирусный энтеротоксин), может служить источником информации о реассортантном происхождении штамма. В связи с этим целью данной работы была

разработка методик для определения генотипов сегментов VP6 и NSP4 ротавирусов на основе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Материал и методы

В работе использованы ротавирус-положительные образцы фекалий, полученные от 75 детей, госпитализированных с диагнозом «острая кишечная инфекция» (ОКИ) в инфекционный стационар Нижнего Новгорода. Ротавирусы выявляли с применением коммерческой ПЦР тест-системы АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Ропотребнадзора (далее – ЦНИИЭ), Россия). РНК ротавирусов выделяли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, Россия). Реакцию обратной транскрипции и ПЦР для определения генотипов вируса проводили с использованием реактивов производства ЗАО «Силекс» (Россия). Секвенирование кДНК открытых рамок считывания генов VP6 и NSP4 ротавирусов осуществляли по 2 цепям с применением набора реагентов Beckman Coulter GenomeLab™ DTCS-Quick Start Kit и прибора Beckman Coulter CEQTM 8000 (Beckman Coulter, США). I- и E-генотипы штаммов определяли с помощью онлайн-сервиса RotaC 2.0. Далее, в программе MEGA 6.0 анализировали полученные нуклеотидные последовательности и собирали выборки для построения деревьев [20]. Филогенетический анализ на основе 166 нуклеотидных последовательностей проводили с применением пакета программ BEAST 1.8 [21]. Использовали модель замещения нуклеотидов Хасегава–Кишино–Яно (Hasegawa–Kishino–Yano, HKY). Скорость эволюции моделировали на базе нестрогих логнормальных молекулярных часов. Для достижения значений ESS более 200 задавали длину цепи Маркова (MCMC) 50 млн шагов. На основе полученных данных в программе TreeAnnotator 1.8.2 строили филогенетические деревья и визуализировали их в программе FigTree 1.4.2. Идентификационные номера последовательностей в базе данных GenBank указаны в названиях изолятов на деревьях. Дизайн праймеров и анализ их свойств проводили в программах MEGA 6.0 и OligoAnalyzer [22]. Для подсчёта температуры плавления и моделирования возможных вторичных структур использовали значения $C_{\text{Oligo}} = 0,16$ мкМ, $C_{\text{Mg}^{2+}} = 3$ мМ, $C_{\text{dNTPs}} = 0,12$ мМ.

Результаты

Исследование разнообразия ротавирусов по генам VP6 и NSP4. На первом этапе было охарактеризовано разнообразие I- и E-генотипов в нижегородской популяции ротавирусов. Методом секвенирования генов VP6 и NSP4 при анализе выборки из 16 нижегородских ротавирусов, выявленных в 2016 г., определены два I-генотипа (I1 и I2) и три E-генотипа (E1, E2 и E3).

Был проведён филогенетический анализ для оценки разнообразия аллелей генов VP6 и NSP4 внутри генотипов. В выборки также вошли 36 нуклеотидных последовательностей штаммов из Нижнего Новгорода, установленные ранее [23–25] и 128 последовательностей генов VP6 и NSP4 ротавирусов, выявленных в 24 странах (Россия, Бельгия, Германия, Венгрия, Италия, США, Китай, Япония, Индия, Южная Корея, Таиланд, Бангладеш, Бразилия, Парагвай, ЮАР, Австралия, Демократическая Республика Конго, Тунис, Филиппины, Кения, Хорватия, Пакистан, Франция, Дания). Сокращённые филогенетические деревья представлены на рис. 1 (см. 3-ю полосу обложки).

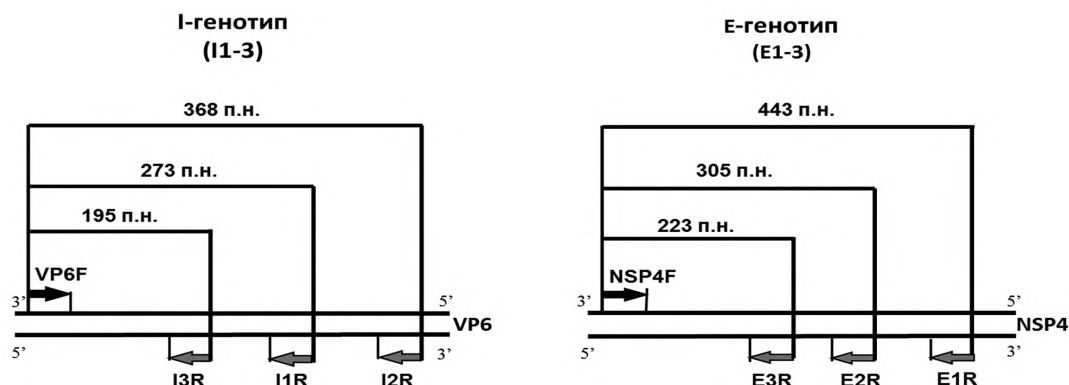


Рис. 2. Схема посадки праймеров для определения I- и E-генотипов на нуклеотидные последовательности генов VP6 и NSP4.

У нижегородских ротавирусов выявлена вариабельность внутри генотипа I2, проявившаяся в принадлежности к 2 сублиниям (I2-IV и I2-VII), в то время как все штаммы ротавируса генотипа I1 относились к одной сублинии I1-1. Анализ гена NSP4 показал наличие представителей 2 сублиний внутри генотипа E1 (E1-I и E1-III), 4 сублиний генотипа E2 (E2-VI, E2-VII, E2-X и E2-XII), в то время как все штаммы генотипа E3 принадлежали одному кластеру на филогенетическом дереве. Таким образом, было выявлено 3 аллеля гена VP6 и 7 – гена NSP4.

Подбор олигонуклеотидных праймеров. С учётом данных секвенирования и филогенетического анализа были подобраны последовательности обратных праймеров, специфичных в отношении наиболее распространённых у ротавирусов человека генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3. В комбинации с концевыми прямыми праймерами, общими для всех генотипов сегмента, подобранные олигонуклеотиды фланкировали участки последовательности разной длины: 195 п.н. (I3), 273 п.н. (I1), 368 п.н. (I2) для гена VP6 и 233 п.н. (E3), 305 п.н. (E2), 443 п.н. (E1) для гена NSP4, соответственно (рис. 2). Таким образом, полученные с помощью подобранных праймеров фрагменты кДНК могут быть идентифицированы методом электрофореза в агарозном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью.

С помощью программы OligoAnalyzer была теоретически рассчитана температура плавления праймеров и оценена их способность к образованию вторичных структур и димеров (см. таблицу). Далее, в ходе постановки серии пробных ПЦР с использованием ротавирус-содержащих проб были эмпирически скорректированы

условия постановки реакции. Параметры температуры отжига (T_a) подбирали в диапазоне 47–57 °C с шагом 2–3 °C. Кроме того, были подобраны необходимые концентрации ионов магния и праймеров в реакционной смеси. Оптимальными для определения I-генотипа были $T_a = 57$ °C, $C_{Oligo} = 130$ нМ, $C_{Mg^{2+}} = 2$ мМ. Для идентификации E-генотипа выбраны следующие условия: $T_a = 55$ °C, $C_{Oligo} = 130$ нМ, $C_{Mg^{2+}} = 2,5$ мМ.

Апробация разработанных методик. Экспериментально подобранные условия проведения ПЦР и специфичность разработанных праймеров были проверены с использованием проб, содержащих РНК ротавирусов разных E- и I-генотипов, ранее исследованных методом секвенирования. Выборка образцов включала 9 изолятов генотипа I1, 7 изолятов генотипа I2, 7 изолятов генотипа E1, 5 изолятов генотипа E2 и 2 изолята генотипа E3. Результаты генотипирования предложенными ПЦР-методиками полностью соответствовали данным секвенирования. Таким образом, данные методики могут быть использованы для рутинного определения E- и I-генотипа в ротавирус-положительных образцах.

Разработанные методики были апробированы на 55 образцах кДНК ротавирусов, выявленных в 2018 г. (рис. 3). I- и E-генотипы были установлены в 51 (92,7%) образце. В 1 (1,8%) пробе был определён только E-генотип, в 3 (5,5%) – только I-генотип. В большинстве случаев генотипы были выявлены в сочетании I1-E1 (52,7%). Комбинация I2-E2 обнаружена в 30,9% случаев. Кроме того, в 3 (5,5%) пробах идентифицирован генотип I1-E2, и в единичных случаях показаны генотипы I2-E1 и I3-E3 (в сумме 3,6%). Установлены следующие сочетания G-, P-, I-, и E-генотипов: G1-P[8]-I1-E1 (9,1%), G4-P[8]-I1-E1 (7,3%), G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), G4-P[8]-I1-E2 (5,5%), G3-P[8]-I2-E2 (1,8%), G2-P[4]-I2-E2 (29,1%), G2-P[4]-I2-E1 (1,8%), G2-P[4]-I2-Ex (3,6%), G9-P[8]-I1-Ex (1,8%), Gx-P[8]-I1-E1 (5,5%) и Gx-P[x]-I3-E3 (1,8%).

Обсуждение

В настоящее время показано, что реассортантные варианты ротавируса имеют более широкое распространение в мире, чем предполагали ранее. Так, в Японии в 2012 г. штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-N2 составили 46,7% изолятов, собранных в 3 городах [9]. Кроме того, в 2012–2013 гг. эти штаммы вызвали 12 вспышек острой кишечной инфекции (ОКИ) в детских до-

Последовательность праймеров для определения I- и E-генотипов ротавирусов

Праймер	Последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, н.о.	Регион посадки, н.о.	T_m средняя, °C
NSP4F	GGCTTTTAAAAGTTCTGTTC	–	1–21	58,2
E1R	CAGGTTGTCAATGATACG	443	443–426	54,8
E2R	YTGCTTTTTRTAACSTGC	305	305–288	55,4
E3R	GACGTTCTAAGAGCAATC	223	223–206	55,1
VP6F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	–	1–21	58,2
I1R	AGTTCTKGCAGTCTCAAC	272	272–255	58,1
I2R	GARTCTGATGTGGTGC	367	367–361	56,3
I3R	TCTGACGGGTAGRTTA	194	194–179	53,9

школьных учреждениях [10]. Родственные им ротавирусы были обнаружены в Таиланде в 2013 г. [11]. Во Вьетнаме штаммы генотипа G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 составили 14% всех ротавирус-положительных образцов и, по предположению авторов, возникли независимо от японских ротавирусов [13]. В качестве нового пандемического варианта рассматриваются штаммы G3P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, родственные ротавирусам лошадей и обнаруженные на территории Европы, Азии и Австралии [16]. Во Вьетнаме в первой половине 2015 г. молниеносно возник генотип G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, составив 27% всех исследованных ротавирусов [18].

Выявление реассортантов с использованием только бинарной классификации не представляется возможным. В связи с её широким использованием в России реальный вклад таких штаммов может быть недооценён. Например, в Нижнем Новгороде в 2013–2014 гг. были обнаружены и охарактеризованы методом секвенирования реассортантные DS-1-подобные G1P[8]-штаммы ротавируса генотипа G1-P[8]-I2-E2 [19]. Однако осталась неясна их истинная доля среди ротавирусов генотипа G1P[8] в нижегородской популяции, а также не решён вопрос о том, являются ли такие штаммы уникальными для Нижегородской области или они представлены и в других регионах России.

Эти вопросы могут частично решить представленные методики, которые подходят для быстрого определения E- и I-генотипов ротавирусов. С использованием прямых праймеров, общих для всех генотипов сегмента, и обратных праймеров, специфичных в отношении генотипов I1, I2, I3 и E1, E2, E3, могут быть амплифицированы фрагменты нуклеотидных последовательностей генов VP6 и NSP4 разных длин, заданных для каждого E- и I-генотипа. Данные методики были проверены на выборке образцов, ранее охарактеризованных методом секвенирования, и апробированы на ротавирус-содержащих пробах 2018 г.

Оба изучаемых генотипа были установлены в 92,8% образцов, при этом доминирующей комбинацией была I1-E1 (52,7%). В 30,9% случаев показано сочетание I2-E2, также обнаружены генотипы I1-E2, I2-E1 и I3-E3 (в сумме 9,2%). При анализе их соответствия G- и P-генотипам в 49,1% случаев были обнаружены констелляции, характерные для Wa-подобной группы (G1-P[8]-I1-E1, G4-P[8]-I1-E1 и G9-P[8]-I1-E1) и в 29,1% случаев – для DS-1-подобной геногруппы (G2-P[4]-I2-E2). В единичных случаях обнаружены штаммы генотипов G4-P[8]-I1-E2 (5,5%), G3-P[8]-I2-E2 (1,8%) и G2-P[4]-I2-E1 (1,8%), имеющие гены 2 геногрупп и, таким образом, являющиеся реассортантами. Возможно, штаммы генотипа G3-P[8]-I2-E2 родственны варианту, широко распространённому в мире и охарактеризованному R. Dogo и соавт. [16], поэтому необходимо дальнейшее изучение особенностей других сегментов их генома.

Следует отметить, что в 2018 г. не были обнаружены реассортантные штаммы генотипа G1-P[8]-I2-E2, которые присутствовали в нижегородской популяции ранее. Также особенностью данного периода является высокая доля ротавирусов генотипа G2P[4]-I2-E2 (29,1%), представителей DS-1-подобной геногруппы. В предыдущие годы доля ротавирусов данного генотипа не превышала 10% на фоне доминирования в Нижнем Новгороде генотипа G9P[8] [26, 27]. В некоторых регионах России ранее также был отмечен низкий долевым вклад ротавирусов генотипа G2P[4]: в Москве в 2009–2014 гг. – 3,3%

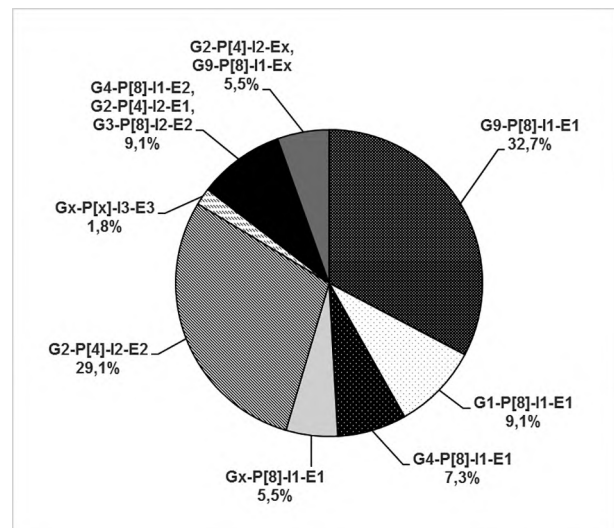


Рис. 3. Распределение комбинаций G-, P-, I-, и E-генотипов ротавирусов в Нижнем Новгороде в 2018 г.

[28], в Оренбургской области в 2015–2016 гг. – 11,1% [29], по Российской Федерации в целом в 2012–2013 гг. – 7,9% [30]. В условиях активной циркуляции DS-1-подобных ротавирусов возможно повышение числа событий межгеногрупповой реассортации и появление необычных штаммов. Предложенные в настоящей работе подходы для определения E- и I-генотипов ротавирусов могут послужить удобным инструментом для их характеристики.

Заключение

Таким образом, были разработаны и апробированы новые методики определения генотипов сегментов, кодирующих белки VP6 и NSP4, которые могут быть использованы для рутинного исследования ротавирус-положительных образцов и выявления реассортантных штаммов. Определены спектр и доленое распределение I- и E-генотипов, выявлены их различные комбинации с G- и P-генотипами. В Нижнем Новгороде в 2018 г. доминировали ротавирусы генотипа G9-P[8]-I1-E1 (32,7%), следующим по распространённости был генотип G2-P[4]-I2-E2 (29,1%). Обнаружены реассортантные штаммы с генотипами G4-P[8]-I1-E2, G3-P[8]-I2-E2 и G2-P[4]-I2-E1.

Финансирование. Определение G- и P-генотипов ротавирусов проведено в рамках государственного задания Роспотребнадзора (№ 141-00063-18-00), разработка методики идентификации I- и E-генотипов ротавирусов выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00586.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-18, 20-22, 26-28, 30 см. REFERENCES)

- Черепанова Е.А., Симонова Е.Г., Раичич Р.Р., Линок А.В., Филатов Н.Н. Оценка эпидемиологического риска в системе надзора за актуальными для Российской Федерации острыми кишечными инфекциями. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018; (3): 23-8.
- Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8]-штаммов ротавируса группы А. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(1): 91-6.

23. Новикова Н.А., Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Прилипов А.Г., Епифанова Н.В., Голицына Л.Н. Анализ нуклеотидных последовательностей гена NSP4 ротавирусов группы А, изолированных в Нижнем Новгороде. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(6): 35-9.
24. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011-12 годах. *Медицинский алфавит*. 2013; 4(24): 20-6.
25. Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А., Морозова О.В., Фомина С.Г., Луквникова Л.Б. и др. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005-2012 годах. Доминирование генотипа G4P[8]. *Медицинский альманах*. 2014; (2): 52-7.
29. Денисюк Н.Б., Паньков А.С. Генетическая структура ротавирусной группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в эпидемический сезон 2013-2014 гг. *Инфекционные болезни*. 2016; 14(1): 14-8.

REFERENCES

1. Cherepanova E.A., Simonova E.G., Raichich R.R., Linok A.V., Filatov N.N. Assessment of epidemiological risk in the system of surveillance for acute intestinal infections relevant to the Russian Federation. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2018; (3): 23-8. (in Russian)
2. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347-401.
3. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
4. Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijis I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204-19. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
5. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Patton J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 2008; 82(22): 11106-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-08>
6. McDonald S.M., Matthijnssens J., McAllen J.K., Hine E., Overton L., Wang S., et al. Evolutionary dynamics of human rotaviruses: balancing reassortment with preferred genome constellations. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000634. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000634>
7. Jere K.C., Mlera L., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Page N.A., Seheri M.L., et al. Whole genome analyses of African G2, G8, G9, and G12 rotavirus strains using sequence-independent amplification and 454(R) pyrosequencing. *J. Med. Virol.* 2011; 83(11): 2018-42. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.22207>
8. Kuzuya M., Fujii R., Hamano M., Kida K., Mizoguchi Y., Kanadani T., et al. Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan. *J. Med. Virol.* 2014; 86(6): 1056-64. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.23746>
9. Fujii Y., Nakagomi T., Nishimura N., Noguchi A., Miura S., Ito H., et al. Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 426-33. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.001>
10. Yamamoto S.P., Kaida A., Kubo H., Iritani N. Gastroenteritis Outbreaks Caused by a DS-1-like G1P[8] Rotavirus Strain, Japan, 2012-2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(6): 1030-3. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2006.131326>
11. Komoto S., Tacharoengmuang R., Guntapong R., Ide T., Haga K., Katayama K., et al. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One*. 2015; 10(11): e0141739. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141739>
12. Phan M.V.T., Anh P.H., Cuong N.V., Munnink B.B.O., van der Hoek L., My P.T., et al. Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection. *Virus Evol.* 2016; 2(2): vew027. Doi: <https://doi.org/10.1093/ve/vew027>
13. Nakagomi T., Nguyen M.Q., Gauchan P., Agbembabiese C.A., Kaneko M., Do L.P., et al. Evolution of DS-1-like G1P[8] double-gene reassortant rotavirus A strains causing gastroenteritis in children in Vietnam in 2012/2013. *Arch. Virol.* 2017; 162(3): 739-48. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3155-6>
14. Arana A., Montes M., Jere K.C., Alkorta M., Iturriza-Gómara M., Cilla G. Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44: 137-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.048>
15. Cowley D., Donato C.M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403-10. Doi: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>
16. Dóro R., Marton S., Bartókné A.H., Lengyel G., Agócs Z., Jakab F., et al. Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel intergenogroup reassortant pandemic strain? *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2016; 63(2): 243-55. Doi: <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.2.8>
17. Hoa-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Do L.P., Gauchan P., Agbembabiese C.A., et al. Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 479-82. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2682-x>
18. Tacharoengmuang R., Komoto S., Guntapong R., Ide T., Sinchai P., Upachai S., et al. Full Genome Characterization of Novel DS-1-Like G8P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Thailand: Reassortment of Bovine and Human Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like Intergenogroup Reassortant Strains. *PLoS One*. 2016; 11(11): e0165826. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165826>
19. Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P [8] strains of rotavirus A. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(1): 91-6. (in Russian)
20. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731-9. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
21. Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 2012; 29(8): 1969-73. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
22. IDT's Oligo Analyzer Version 3.1. Available at: <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>
23. Novikova N.A., Ponomareva N.V., Novikov D.V., Prilipov A.G., Epifanova N.V., Golitsyna L.N. Nucleotide sequence analysis of the NSP4 gene from group A rotaviruses isolated in Nizhny Novgorod. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(6): 35-9. (in Russian)
24. Epifanova N.V., Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Characteristics of rotavirus with G9-genotype identified in Nizhny Novgorod during years 2011-12. *Meditsinskiy alfavit*. 2013; 4(24): 20-6. (in Russian)
25. Epifanova N.V., Sashina T.A., Novikova N.A., Morozova O.V., Fomina S.G., Lukovnikova L.B., et al. The variety of genotypes of rotaviruses in Nizhny Novgorod in 2005-2012. The domination of G4P[8] genotype. *Meditsinskiy al' manakh*. 2014; (2): 52-7. (in Russian)
26. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Zverev V.V., Kashnikov A.U., Novikova N.A. Phylogenetic comparison of the VP7, VP4, VP6, and NSP4 genes of rotaviruses isolated from children in Nizhny Novgorod, Russia, 2015-2016, with cogent genes of the RotaTaq vaccine strains. *Virus Genes*. 2018; 54(2): 225-35. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1529-9>
27. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387-92.
28. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-Genetic Characterization of Human Rotavirus A Strains Circulating in Moscow, Russia (2009-2014). *Virus Sin.* 2018; 33(4): 304-13. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
29. Denisjuk N.B., Pan'kov A.S. The genetic structure of group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in the 2013-2014 epidemic season. *Infektsionnye bolezni*. 2016; 14(1): 14-8. (in Russian)
30. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5: 407-13. Doi: <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.5.7055>

Поступила 09.10.18

Принята в печать 31.10.18