

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

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

Адрес редакции: 109029, Москва,
ул. Скотопрогонная, дом 29/1,
подъезд 15

Зав. редакцией *Т. М. Курушина*
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru
www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru

www.medlit.ru

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

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Л. В. Зюкина

Корректор *Л. В. Кузнецова*

Переводчик *С. К. Чаморовский*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 01.03.2016.

Подписано в печать 18.04.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 202.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2016.

Т. 61. № 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.

Свидетельство о регистрации № 1170
от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

3

Том 61 · 2016

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.)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

Члены редколлегии:

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., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

Клименко С.М. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Щелканов М.Ю. (д.б.н.)

Юминова Н.В. (д.м.н., доцент)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., чл.-кор. 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.м.н., проф.; 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)

Дроздов С.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Заседателей А.С. (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

Злобин В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

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

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

Лебедев Г.Б. (зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Чукотском АО"; Анадырь, Россия)

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

Лисицин Е.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

Локтев В.Б. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Мальшев Н.А. (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

Михайлов М.И. (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

Мукомолов С.А. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

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

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

Огарков П.И. (д.м.н., проф.; СПб, 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)

Сергеев А.Н. (д.м.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Степанова Т.Ф. (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

Тутельян А.В. (д.м.н.; Москва, Россия)

Чучалин А.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Шестопапов А.М. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Янович В.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

Яшкулов К.Б. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

Виноград Н.А. (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

Владыко А.С. (д.м.н., проф.; Минск, Республика Беларусь)

Горбунов В.А. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

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

Петкевич А.С. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Титов А.П. (д.м.н., проф., чл.-кор. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

Becker J. (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)

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

Ciampor F. (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

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

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

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

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

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

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIROSOLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

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

Volume 61 • 3 • 2016

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

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Members of editorial board:

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 E.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, docent; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, docent; **Klimenko S.M.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D.; **Yuminova N.V.** – MD, PhD, DSc, docent

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

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

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

Borisevich S.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Sergiev Posad)

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

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

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

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

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

Drozdov S.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

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

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

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

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

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

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

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

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

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

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

Mukomolov S.L. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

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

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

Ogarkov P.I. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

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

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

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

Sergeev A.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Novosibirsk)

Stepanova T.F. – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen')

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc (Moscow)

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

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

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

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

Vladyko A.S. – MD, PhD, DSc, Prof. (Minsk, Republic of Belarus)

Gorbunov V.A. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

Petkevich A.S. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

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

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

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

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

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

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

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

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

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

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

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

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



Izdatel'stvo Meditsina

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Дерябин П.Г.** Природные резервуары вирусов рода *Hepacivirus* семейства Flaviviridae 101
- Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П.** Эмбриональные стволовые клетки мыши – перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo* 107

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лоповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глущенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р.** Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. 112
- Малолина Е.А., Лебедева А.Л., Кулибин А.Ю., Евдокимов В.В., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Куц А.А.** Взаимодействие герпесвирусов со зрелыми сперматозоидами человека в модельной системе *in vitro*. 119
- Смирнов В.С., Слита А.В., Гаршинина А.В., Беляевская С.В., Аникин В.Б., Зарубаев В.В.** Влияние комбинации глицирризиновая кислота + альфа-глутамил-триптофан на ход экспериментальной аденовирусной инфекции 125
- Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрюшин А.Е., Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М.** Вирусные инфекции и ретинобластома у детей 132
- Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Ворович М.Ф., Рогова Ю.В., Карганова Г.Г.** Вакцины на основе дальневосточного и европейского штаммов индуцируют нейтрализующие антитела ко всем известным подтипам вируса клещевого энцефалита 135
- Крылова Н.В., Леонова Г.Н.** Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите ... 139

CONTENTS

REVIEWS

- Deriabin P.G.** Natural reservoirs of viruses of the genus *Hepacivirus*, Flaviviridae 101
- Savchenkova I.P., Alekseyenkova S.V., Yurov K.P.** Mouse embryonic stem cells – a new cellular system for studying the equine infectious anemia virus *in vitro* and *in vivo* 107

ORIGINAL RESEARCH

- Lebedev A.V., Neshumaev D.A., Kazennova E.V., Lopovok I.A., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Plotnikova Yu.K., Ponomareva O.A., Yarygina E.I., Bobkova M.R.** Comparative analysis of genetic variants of the HIV-1 circulating in the Irkutsk region in 1999 and 2012 112
- Malolina E.A., Lebedeva A.L., Kulibin A.Yu., Evdokimov V.V., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Tulenev Ju.A., Nauhenko V.A., Kushch A.A.** Interaction of herpesviruses with mature human spermatozoa in the model system *in vitro* 119
- Smirnov V.S., Slita A.V., Garshinina A.V., Belyaevskaya S.V., Anikin V.B., Zarubaev V.V.** The effect of combination of glycyrrhizic acid with alpha-glutamyl-tryptophan on the experimental adenoviral infection 125
- Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M.** Viral infections and retinoblastoma in children 132
- Maikova G.B., Chernokhaeva L.L., Vorovitch M.F., Rogova Yu.V., Karganova G.G.** Vaccines based on the Far-Eastern and European strains induce the neutralizing antibodies against all known tick-borne encephalitis virus subtypes 135
- Krylova N.V., Leonova G.N.** Antiviral activity of various drugs with different mechanisms of action in patients with experimental tick-borne encephalitis 139

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

ОБЗОРЫ

© ДЕРЯБИН П.Г., 2016
УДК 578.833.2:578.4

Дерябин П.Г.

ПРИРОДНЫЕ РЕЗЕРВУАРЫ ВИРУСОВ РОДА *HEPACIVIRUS* СЕМЕЙСТВА FLAVIVIRIDAE

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Вирус гепатита С (HCV) является причиной острого и хронического заболевания печени, включая хронический гепатит, цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. В естественных условиях HCV способен инфицировать только людей, и лишь шимпанзе чувствительны к экспериментальному заражению. В последние годы были обнаружены вирусы, генетически родственные HCV, у диких млекопитающих (грызуны, летучие мыши, зайцы, приматы), домашних животных, находящихся в тесном контакте с людьми (собаки, лошади, коровы). Род *Hepacivirus* в семействе *Flaviviridae*, ранее представленный HCV и предположительно GBV-B, пополнился новыми родственными HCV вирусами животных. Данные изучения молекулярно-генетических и биологических свойств дают возможность понять историю, эволюцию HCV, его происхождение, а также открывают перспективу использования гепацивирусов неprimатов в качестве лабораторной модели для доклинических испытаний лечебных и профилактических препаратов против гепатита С. Установлено, что гепацивирус лошадей является наиболее близким гомологом HCV среди известных в настоящее время гомологов HCV животных.

Ключевые слова: вирус гепатита С (HCV); гепацивирус; гомолог; геном; последовательность; грызуны; мыши; летучие мыши; собаки; лошади; коровы; приматы; род; семейство.

Для цитирования: Дерябин П.Г. Природные резервуары вирусов рода *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 101-106.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-101-106

Deriabin P.G.

NATURAL RESERVOIRS OF VIRUSES OF THE GENUS *HEPACIVIRUS*, FLAVIVIRIDAE

D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation

HCV is a cause of acute and chronic liver diseases, including chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. Under natural conditions, HCV is able to infect only humans, and only chimpanzees are sensitive to experimental infection. In recent years, viruses genetically related to HCV were discovered in wild mammals (rodents, bats, rabbits), as well as in domestic animals living in close contact with humans (dogs, horses, cows). The *Hepacivirus* genus of the family *Flaviviridae*, previously represented only by HCV and, presumably, by GBV-B, now includes new related viruses of animals. The results of the study of molecular-genetic and biological properties of the *hepaciviruses* provide an opportunity to understand the history, evolution, and the origin of HCV. It also opens up the prospect of using HCV homologues of non-primates as a laboratory model for preclinical medical and prophylactic drugs against hepatitis C. It was found that the *hepacivirus* of horses is the most closely related to HCV among currently known HCV homologues.

Keywords: HCV; *hepacivirus*; genus; family; homologue; genome; sequence; rodents; mice; bats; dogs; horses; cattle; primates.

For citation: Deriabin P.G. Natural reservoirs of viruses of the genus *Hepacivirus*, *Flaviviridae*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 101-106. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-101-106

For correspondence: Petr G. Deriabin, MD, PhD, Prof., Deputy Director of D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: pg_deryabin@mail.ru

Information about authors:

Deriabin P.G., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 09 November 2015
Accepted 19 November 2015

Для корреспонденции: Дерябин Петр Григорьевич, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: pg_deryabin@mail.ru

Возбудители вирусных зоонозов являются причиной около 70% новых и вновь возникающих инфекционных заболеваний человека, хотя биологические и эпидемиологические барьеры, препятствующие межвидовой передаче вирусных инфекций, достаточно высоки [1–4], и большинство вирусов, способных заражать диких и домашних животных, не инфицируют людей [5, 6]. Постоянный контакт между людьми и другими видами животных увеличивает вероятность появления вирусов, которые в результате адаптации способны инфицировать и размножаться в организме человека непосредственно или через промежуточных хозяев [4]. Идентификация и характеристика биологических свойств родственных вирусов животных (гомологов) могут дать новое представление о патогенезе вирусов, поражающих человека, а в некоторых случаях вирусы-гомологи могут служить моделью для доклинических испытаний профилактических или лечебных свойств разрабатываемых препаратов [7–9]. Сравнительный анализ генома вирусом-гомологов позволяет идентифицировать последовательности, ответственные за рецепторную чувствительность вирусов, их проникновение и репликацию в клетке, за реализацию других биологических особенностей вируса [3, 10–13]. Достаточно хорошо охарактеризован ряд гомологов, изолированных от животных, включая вирусы иммунодефицита обезьян, оспы животных, герпес-вирусы, норовирус мышей, вирус гепатита В сурков и другие.

Гепатит С остается одной из наиболее значительных угроз для здоровья человека. В мире около 200 млн человек хронически инфицированы вирусом гепатита С (hepatitis C virus – HCV) [14, 15] и подвержены риску развития фиброза печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. HCV является одним из представителей семейства *Flaviviridae*, которое включает 4 рода: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* и один предполагаемый род *Pegivirus* [16]. До сих пор HCV считался единственным представителем рода *Hepacivirus*. Вирус GB (GBV-B) является предположительным представителем этого рода. Происхождение HCV оставалось неясным главным образом потому, что до недавнего времени у животных не были обнаружены вирусы, имеющие высокое родство с HCV. До настоящего времени нет четкого представления о патогенезе гепатита С у людей из-за ограниченной репликации вируса в организме человека или шимпанзе и, по мнению многих авторов, из-за неспособности вируса в течение длительного времени активно реплицироваться в культурах клеток [17–19]. Однако нам впервые удалось получить экспериментальную модель продуктивной инфекции, вызванной HCV *in vitro* и *in vivo* [20–24]. В частности показано, что в первичных культурах клеток головного мозга новорожденных мышей, инфицированных РНК HCV-содержащей сывороткой крови людей, происходит селекция и накопление высокопродуктивных вариантов вируса, характеризующихся способностью активно размножаться в культурах клеток различного происхождения. Изолированные варианты вируса были идентифицированы как HCV с помощью комплекса серологических и молекулярно-генетических методов [22]. Таким образом, впервые еще в 1997 г. нами показана способность выделенных вариантов HCV размножаться в культурах клеток не только человека, но и в клетках грызунов, обезьян, свиней, телят, куриных эмбрионов и накапливаться в среде этих культур в ти-

трах до 8,0 Ig ТЦД₅₀/мл. Кроме того, варианты HCV, выделенные из хронически инфицированных культур клеток, оказались способными индуцировать персистентную инфекцию белых мышей и кроликов [20, 24]. Гистологические срезы ткани печени хронически инфицированных HCV мышей позволили обнаружить изменения, сходные с патологией при гепатите С у человека. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о способности HCV в экспериментальных условиях достаточно легко преодолевать видовой барьер, что предполагает более широкое распространение вирусов рода *Hepacivirus* в природе, а не только в популяции человека. Однако десятилетия результаты наших исследований не принимали во внимание, так как многие специалисты в этой области считали, что передача инфекции, вызванной HCV, ограничена лишь популяцией человека, и только высшие приматы (шимпанзе) являются чувствительными к экспериментальному заражению HCV [25].

Полученные в последние годы новые данные об идентификации гомологов HCV (гепацивирусов) у разных видов животных (грызунов, собак, летучих мышей, лошадей, крупного рогатого скота, низших приматов [26]) позволяют ответить на вопросы о происхождении возбудителя гепатита С, истории вируса, его эволюции, механизмах, вовлеченных в патогенез вызываемой им инфекции, а также открывают практическую перспективу использования гепацивирусов не приматов в качестве лабораторной модели для доклинических испытаний лечебных и профилактических препаратов [27]. В приведенной таблице представлены дополненные данные о регистрации в Genbank нуклеотидной последовательности геномов новых гепацивирусов животных [26].

В частности, в поисках удобной недорогой экспериментальной модели инфекции, вызванной HCV в организме мелких животных, J.F. Drexler и соавт. [28] была собрана большая коллекция мелких млекопитающих животных. Они провели скрининг материала из органов и сывороток крови от 4 770 грызунов (41 вид). В результате у 27 (1,8%) из 1465 имеющихся в Европейском банке рыжих полевков (*Myodes glareolus*) и у 10 (1,9%) из 518 южноафриканских четырехполосных травяных мышей (*Rhabdomys pumilio*) были обнаружены высокодивергентные родственные HCV вирусы. Выполнено секвенирование 5 полноразмерных геномов, представляющих все вирусные варианты, что позволило классифицировать вирусы грызунов как представителей рода *Hepacivirus*. Применение количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), РНК-гибридизации *in situ*, а также данные гистопатологических исследований позволили установить тропизм вирусов к тканям печени, а также регистрировать воспалительные процессы в печени, напоминающие патологию при гепатите С у людей. Авторы считают необходимым направлять усилия по разработке суррогатной модели HCV-инфекции, вызванной у грызунов.

А. Кароог и соавт. [29] также обнаружили HCV-подобные вирусы у диких грызунов, и большинство из них были выявлены в организме оленых хомячков (*Peromyscus maniculatus*), которых часто используют в вирусологических лабораториях для изучения хантавирусов. Различия в аминокислотной последовательности гепацивирусов грызунов варьировали от 67 до 77% в генах в области структурных белков и от 65 до

Данные Genbank о регистрации новых представителей рода *Hepacivirus* (семейство Flaviviridae)

| Хозяин | Наименование | Номер регистра- ции в Genbank | Наименование изолята | Источник литературы |
|--------------------------------|--------------|----------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Грызуны* | RHV | NC_021153 | RHV-339 | [29] |
| | | KC815312 | RHV-098 | |
| | RHV-1 | KC411777 | RMU10/3382 | [28] |
| | | KC411796 | NLR08/365 | |
| | RHV-2 | KC411784 | NLR/oct70 | |
| | RHV-3 | KC411806 | SAR-3 | |
| Летучие мыши* | BHV клайд А | KC796077 | PDB-112 | [43] |
| | | KC796090 | PDB-452 | |
| | BHV клайд С | KC796091 | PDB-445 | |
| | | KC796078 | PDB-491.1 | |
| | BHV клайд D | KC796074 | PDB-829 | |
| | | KC796074 | PDB-829 | |
| Дикие приматы Старого Света | GHV | KC551800 | GHV-1 BWC08 | [44] |
| | | KC551801 | GHV-1 BWC05 | |
| | | KC551802 | GHV-2 BWC04 | |
| Собаки | CHV | JF744991 | AAK-2011 | [32] |
| Лошади | NPHV | JQ434001 | NPHV-NZP-1 | [34] |
| | | JQ434002 | NPHV-G1-073 | |
| | | JQ434003 | NPHV-A6-006 | |
| | | JQ434004 | NPHV-B10-022 | |
| | | JQ434005 | NPHV-F8-068 | |
| | | JQ434006 | NPHV-G5-077 | |
| | | JQ434007 | NPHV-H10-094 | |
| | | JQ434008 | NPHV-H3-011 | |
| | | JX948116 | EF369/11 | [35] |
| | | JX948119 | EF317/98 | |
| | | JX948121 | EF330/97 | |
| | | KC411810 | GER/Eq179 | [28] |
| | | KC411811 | GER/Eq285 | |
| KC411814 | GER/Eq105 | | | |
| KC411813 | GER/Eq120 | | | |
| KC411812 | GER/Eq143 | | | |
| Коровы | BovHepV | KP641123 | B1/GER/2013 | [39] |

Примечание. * Перечислены только вирусы с опубликованными данными о полноразмерном геноме.

70% в неструктурной области, что сравнимо с различиями, наблюдаемыми между HCV и GBV-B. Наиболее консервативными областями у HCV, GBV-B являются гены, кодирующие неструктурные белки NS3 и NS5b, а наиболее дивергентными областями – гены, кодирующие гликопротеины E1, E2 и NS4b. Авторы полагают, что новые вирусы могут содействовать разработке моделей HCV-инфекции у мелких грызунов [29].

Два новых гепацивируса NrHV-1 и NrHV-2 были обнаружены в организме 36 серых крыс (*Rattus norvegicus*), имеющих глобальное распространение и концентри-

рующихся в крупных городах [30]. Тесты ОТ-ПЦР на РНК вирусов NrHV-1 и NrHV-2 были положительны при изучении оральных смывов грызунов, РНК вируса NrHV-1 обнаруживали в моче и фекалиях крыс, а РНК вируса NrHV-2 – только в моче грызунов. Предполагают, что передача инфекции у крыс скорее всего происходит ингаляционным или алиментарным способом или через укусы животных, а не парентеральным или половым путем. РНК вируса крыс наиболее стабильно определялась в тканях печени и пробах сыворотки крови животных. Репликативные формы РНК гепацивирусов крыс («минус»-цепь РНК) обнаруживали только в тканях печени всех 6 животных. Таким образом, как и HCV человека, гепацивирусы крыс характеризуются гепатотропными свойствами.

Фрагменты генома, гомологичные структурным и неструктурным белкам HCV, в составе генома европейских кроликов (*Oryctolagus cuniculus*) и зайцев (*Lepus europaeus*) обнаружили исследователи из Португалии [31]. Показана их способность размножаться в культурах клеток крупного рогатого скота. Геномные гомологи HCV были определены методами ОТ-ПЦР, ПЦР, масс-спектрометрии, а экспрессия белков гепацивирусов в культурах клеток – методами иммунофлюоресценции и иммунной электронной микроскопии с помощью моноклональных антител к неструктурным белкам NS3, NS4A, и NS5 HCV.

Недавно А. Кароог и соавт. [32] получены данные об открытии новых вирусов, являющихся гомологами HCV, у домашних собак. От собак, обитающих в штатах Техас, Юта и Пенсильвании, с респираторной инфекцией были получены назальные смывы, выделена РНК и проведено секвенирование нуклеиновых кислот, содержащихся в смывах. Это позволило обнаружить вирус, высоко родственный HCV, который был назван гепацивирусом собак (canine hepacivirus – CHV). В результате сравнительного филогенетического анализа консервативных областей генома, кодирующих белок NS3 и РНК-зависимую полимеразу (NS5), было показано, что из всех извест-

ных на сегодня гепацивирусов CHV является ближайшим родственником HCV и равноудален от 7 генотипов HCV. Различия в нуклеотидной последовательности с HCV составили 50%, причем максимальная идентичность аминокислотной последовательности выявлена у белков NS3 и NS5B (более 55–65%), в то время как для других областей генома идентичность составила менее 35–45%. В течение двух независимых вспышек респираторного заболевания вирус был выявлен в смывах от 6 из 9 собак и от 3 из 5 исследованных животных. У 5 собак, умерших от желудочно-кишечного заболевания неясной этиологии, CHV детектировали в тканях пече-

ни, но не в легких. Вирус не был обнаружен в образцах от 60 здоровых домашних собак. Количество РНК СНV в пробах из респираторного тракта было существенно выше, чем в печени. РНК вируса выявляли в цитоплазме гепатоцитов собак, однако не совсем ясно, является ли СНV гепатотропным вирусом. У людей количество РНК HCV в респираторном тракте существенно ниже. Биоинформатический анализ СНV также показал, что генетически он имеет наибольшее родство с HCV, чем другие известные вирусы [32]. По мнению авторов, СНV и HCV, возможно, имели общего предка, который циркулировал 500–1000 лет назад. В статье рассматривается возможность использования собак, инфицированных СНV, в качестве удобной модели для изучения механизмов, лежащих в основе патогенеза гепатита С, а также для разработки новых средств лечения и профилактики этой болезни. Высокое генетическое родство СНV с HCV позволяет предположить, что HCV возник после передачи вируса от собаки к человеку. Авторы не исключают и альтернативный сценарий, а именно: гепацивирусы человека могли инфицировать некоторые виды животных.

El-Attar L.M и др. впервые обнаружили циркуляцию гепацивирусов неприматов среди собак за пределами США [33]. Гомологи HCV были обнаружены в популяции собак, обитающих в Великобритании. Исследование методом ОТ-ПЦР тканей, полученных от собак из питомников, эндемичных по респираторной инфекции, позволило обнаружить РНК гепацивируса в образцах трахеи 48 из 210 собак, а также в тканях печени, легких и трахеи 12 из 20 собак. Наличие вирусной РНК и ее тропизм были подтверждены гибридизацией *in situ*.

Несколько штаммов гепацивируса лошадей (EHcV) были изолированы от домашних лошадей в США, Англии и Германии [34–37]. Оказалось, что полипептиды гепацивируса собак в 95% случаях имели полную аминокислотную гомологию с полипептидами штаммов EHcV и скорее всего гепацивирус собак относится к той же группе, что и гепацивирус лошадей. По мнению авторов, высокая степень гомологии между гепацивирусами лошадей и собак при отсутствии других гепацивирусов в организме собак, вероятно, связана с возможностью передачи вирусов лошадей собакам. Проведенный сравнительный филогенетический анализ также достоверно свидетельствовал о том, что среди гепацивирусов неприматов EHcV является наиболее близким гомологом HCV человека, однако эпидемиологическая и вирусологическая информация о гепацивирусе лошадей весьма ограничена. Проведен серологический и генетический скрининг 31 образца сыворотки крови, полученного от домашних лошадей, родившихся в Японии, на наличие вирусной EHcV-инфекции и в результате методом ОТ-ПЦР было обнаружено 11 образцов, положительных на РНК EHcV, а в 7 пробах сывороток крови лошадей обнаружены антитела к EHcV. Определена полная последовательность генома EHcV, включая ранее неизвестную последовательность 3'-нетранслируемого региона, гомология которого с геномом HCV составила 95%. Таким образом, полученные результаты свидетельствовали об идентичности генетических и биологических свойств EHcV и HCV.

S. Pfaender S и соавт. [37] анализировали преимущественную циркуляцию вируса лошадей на севере Германии, изучали особенности клинических проявлений те-

чения заболевания, а также тканевый тропизм к вирусу, чтобы оценить пригодность родственных с HCV вирусов лошадей для моделирования HCV-инфекции. Примерно у 31,4% из 433 лошадей обнаружены антитела к HCV, и приблизительно 2,5% лошадей были положительными на наличие РНК этого вируса. Подобно инфекции, вызванной HCV у людей, гепацивирус лошадей оказался способным вызывать острую и хроническую инфекцию лошадей, при этом РНК вируса обнаруживали преимущественно в печени.

Недавнее открытие родственных возбудителю гепатита С вирусов, циркулирующих среди животных различных видов, порождает новые предположения относительно происхождения HCV и о возможности участия животных в передаче HCV в период эндемии. Исследование проб сывороток крови людей, контактирующих с лошадьми, на наличие РНК и антител к гепацивирусу лошадей пока не позволило подтвердить предположение о перекрестной передаче гепацивирусов между людьми и животными [38].

В Германии методом секвенирования и филогенетического анализа генетического материала, содержащегося в пробах сывороток крови коров, был открыт новый представитель рода *Hepacivirus* [39]. РНК гепацивируса обнаружена у 1,6% домашних коров и 3,2% коров из стада фермерских хозяйств. Методом ОТ-ПЦР у коров обнаруживали вирусину на протяжении 6 мес наблюдения без каких-либо симптомов заболевания, кроме развивающейся патологии печени, что свидетельствовало о тропизме вируса к ткани печени крупного рогатого скота, как и при гепатите С человека. Эволюционный анализ дал основание предположить, что вирус гепатита коров циркулирует среди животных более 100 лет. Показано, что гепацивирусы коров и лошадей филогенетически достаточно различимы.

Летучие мыши (отряд Chiroptera, подотряд Yinpterochiroptera и Yangochiroptera) являются природным резервуаром многих актуальных для здравоохранения зоонозных вирусов, вызывающих тяжелые заболевания людей [40, 41]. К этой группе можно отнести лиссавирусы (вирус бешенства), коронавирусы, вызывающие ближневосточный респираторный синдром и тяжелый острый респираторный синдром, филовирусы, представители рода *Henipavirus* и другие парамиксовирусы. Многие вирусы способны устанавливать персистентную инфекцию в организме летучих мышей, характеризующуюся отсутствием явных клинических признаков. Благодаря широкому видовому разнообразию, уникальной иммунной системе, стадному поведению, высокой пространственной мобильности и плотности заселения летучие мыши обладают уникальной способностью функционировать как большой резервуар для многих вирусов с долгим сроком службы [42]. По данным Drexler J.F. и соавт. [28], при исследовании проб сывороток крови от 9239 летучих мышей (51 вид) на наличие вирусов, передающихся через кровь от летучих мышей, гепацивирусы или их РНК не были обнаружены, однако методом иммуноблота в крови животных выявлены антитела к HCV.

С этой же целью Phenix-Lan Quan и соавт. [43] было исследовано 415 сывороток крови летучих мышей из Африки и Центральной Америки. В результате секвенирования образцов генетического материала от этих животных была выявлена весьма разнообразная группа

вирусов, отнесенных к родам *Hepacivirus* и *Pegivirus* в семействе *Flaviviridae*. Проведенный методом ОТ-ПЦР последовательный скрининг 1258 образцов от летучих мышей, собранных повсеместно, показал циркуляцию этих вирусов в Северной Америке и Азии. Было идентифицировано всего 83 вируса от летучих мышей, инфицированность животных составила около 5%. В ходе эволюционного анализа установлено, что все известные гепацивирусы и пегивирусы, включающие и их ранее документированных представителей от людей и других приматов, подпадают в рамки филогенетического разнообразия вирусов этих двух родов. Превалирование беспрецедентного биоразнообразия вирусов позволяет предположить, что летучие мыши являются большим и древним природным резервуаром как гепацивирусов, так и пегивирусов, что представляется важным для понимания эволюционной истории HCV и GBV-B человека [43].

Круг хозяев гепацивирусов был расширен группой М. Lauck и соавт. [44], когда ими был открыт и охарактеризован первый гепацивирус от диких приматов Старого Света, не относящихся к человекообразным, черно-белых колобусов (*Colobus guereza*) из Уганды. Все инфицированные животные выглядели здоровыми без явных клинических симптомов. Секвенирование РНК из проб плазмы крови 9 обезьян показало наличие вирусной РНК у трех животных с архитектурой генома, сходной с другими вирусами рода *Hepacivirus*. Показано, что вирус, названный *guereza hepacivirus* (GHV), имеет общее происхождение с GBV-B [44]. Проведен полноразмерный сиквенс генома GHV, а также его фрагментов, соответствующих 3'- и 5'-нетранслируемой области генома от трех обезьян. Обнаружена гомология нуклеотидной последовательности генома новых вирусов с геномом других известных гепацивирусов (с геномами HCV – 43%, NPHV – 43%, NgHV – 47%, GBV-B – 48% и с геномом гепацивирусов летучих мышей (BHV) – 50%). Обнаружение GHV представляет собой первое документальное подтверждение возможности естественного инфицирования нечеловекообразных приматов гепацивирусами.

Таким образом, род *Hepacivirus* в семействе *Flaviviridae* пополнился новыми гомологами HCV – гепацивирусами собак, лошадей, коров, обезьян, грызунов, летучих мышей, что предполагает способность представителей этого рода преодолевать видовой барьер (как это было продемонстрировано в наших исследованиях). Впервые гомолог HCV был обнаружен у собак в 2011 г. и в течение 4 лет получены многочисленные свидетельства широкого распространения представителей рода *Hepacivirus* в природе. Возможно, наиболее древним природным резервуаром гепацивирусов является летучая мышь, от которой вирусы со временем проникли в популяции грызунов, зайцеобразных и других млекопитающих, включая приматов, а в процессе одомашнивания – в популяции собак, лошадей, крупного рогатого скота. Со временем от домашних животных произошло инфицирование людей с дальнейшей эволюцией вируса, обладающего высокой степенью изменчивости генома. Молекулярно-генетический анализ и биологические свойства идентифицированных гепацивирусов животных и человека позволили установить, что среди известных в настоящее время гепацивирусов вирус гепатита лошадей является наиболее близким гомологом HCV человека. Нельзя исключить

вовлечение в циркуляцию гепацивирусов и других животных. Исследования в этом направлении позволят, наконец, подобрать наиболее адекватную модель инфекции для решения фундаментальных и прикладных задач, связанных с гепатитом С.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–4, 6–19, 25–44 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по медицинской вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Дерябин П.Г., Исаева Е.И., Вязов С.О., Львов Д.К. Летальная инфекция новорожденных мышей, вызванная вирусом гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 1997; (6): 253–9.
3. Дерябин П.Г., Исаева Е.И., Вязов С.О., Самохвалов Е.И., Львов Д.К. Хроническая инфекция культур клеток почки эмбрионов свиньи, вызванная вирусом гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 1997; 42(6): 259–63.
4. Дерябин П.Г., Львов Д.К. Высокопродуктивный вариант вируса гепатита С. Выделение, характеристика, идентификация. *Доклады Академии наук*. 1998; 358 (5): 688–91.
5. Дерябин П.Г., Вязов С.О., Исаева Е.И., Самохвалов Е.И., Львов Д.К. Персистенция вируса гепатита С в культурах клеток головного мозга мышей-сосунков. *Вопросы вирусологии*. 1997; 42(6): 254–8.
6. Дерябин П.Г., Исаева Е.И., Гренкова Е.П., Сухно А.С. Цитопатогенные варианты вируса гепатита С (ВГС), пригодные для разработки вакцины. *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. 2001; (1): 28–30.

REFERENCES

1. Hatzioannou T., Ambrose Z., Chung N.P., Piatak M.Jr., Yuan F., Trubey C.M. et al. A macaque model of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(11): 4425–9.
2. Parrish C.R., Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 2005; 59: 553–86.
3. Parrish C.R., Holmes E.C., Morens D.M., Park E.C., Burke D.S., Calisher C.H. et al. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008; 72(3): 457–60.
4. Tsai C.C., Follis K.E., Sabo A., Beck T.W., Grant R.F., Bischofberger N. et al. Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science*. 1995; 270(5239): 1197–9.
5. L'vov D.K., ed. *Handbook to Medical Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по медицинской вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
6. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Amsterdam: Elsevier Academic press; 2015.
7. Kapoor A., Li L., Victoria J., Oderinde B., Mason C., Pandey P. et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 12): 2965–72.
8. Kapoor A., Mehta N., Esper F., Poljsak-Prijatelj M., Quan P.L., Qaisar N. et al. Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS One*. 2010; 5(7): e11948.
9. Van Rompay K.K. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. *Antiviral Res.* 2010; 85(1): 159–75.
10. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244 (4902): 359–62.
11. Kapoor A., Victoria J., Simmonds P., Wang C., Shafer R.W., Nims R. et al. A highly divergent picornavirus in a marine mammal. *J. Virol.* 2008; 82(1): 311–20.
12. Klatt N.R., Shudo E., Ortiz A.M., Engram J.C., Paiardini M.,

- Lawson B. et al. CD8⁺ lymphocytes control viral replication in SIVmac239-infected rhesus macaques without decreasing the lifespan of productively infected cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(1): e1000747.
13. Rijnbrand R., Abell G., Lemon S.M. Mutational analysis of the GB virus 8 internal ribosome entry site. *J. Virol.* 2000; 74(2): 773–83.
 14. Ray Kim W. Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes Infect.* 2002; 4(12): 1219–25.
 15. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 11): 3173–88.
 16. Stapleton J.T., Fong S., Muerhoff A.S., Bukh J., Simmonds P. The GB viruses: A review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and G8V-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 2): 233–46.
 17. Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wölk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C. et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 2005; 309(5734): 623–6.
 18. Lohmann V., Körner F., Koch J.O., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999; 285(5424): 110–3.
 19. Nakajima N., Hijikata M., Yoshikura H., Shimizu Y.K. Characterization of long-term cultures of hepatitis C virus. *J. Virol.* 1996; 70(5): 3325–9.
 20. Deryabin P.G., Isaeva E.I., Vyazov S.O., L'vov D.K. Lethal infection of newborn mice, caused by hepatitis C virus. *Voprosy virusologii.* 1997; (6): 253–9. (in Russian)
 21. Deryabin P.G., Isaeva E.I., Vyazov S.O., Samokhvalov E.I., L'vov D.K. Chronic infection of swine embryonal kidney cells (PS), caused by hepatitis C virus. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(6): 259–63. (in Russian)
 22. Deryabin P.G., L'vov D.K. A highly productive variant of the hepatitis C virus. Isolation, identification, characteristics. *Doklady Akademii nauk.* 1998; 358(5): 688–91. (in Russian)
 23. Deryabin P.G., Vyazov S.O., Isaeva E.I., Samokhvalov E.I., L'vov D.K. Persistence of hepatitis c virus in newborn mouse brain cultures. *Voprosy virusologii.* 1997; 42(6): 254–8. (in Russian)
 24. Deryabin P.G., Isaeva E.I., Grenkova E.P., Sukhno A.S. Cytopathogenic variants of hepatitis C virus (HCV) suitable for vaccine development. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya.* 2001; (1): 28–30. (in Russian)
 25. Kolykhalov A.A., Agapov E.V., Blight K.J., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science.* 1997; 277(5325): 570–4.
 26. Pfaender S., Brown R. J.P., Pietschmann T., Steinmann E. Natural reservoirs for homologs of hepatitis C virus. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3(3): e21.
 27. Taylor D.R. Review Evolution of cell culture systems for HCV. *Anti-vir. Ther.* 2013; 18(3 Pt. B): 523–30.
 28. Drexler J.F., Corman V.M., Muller M.A., Lukashev A.N., Gmyl A., Coutard B. et al. Evidence for Novel Hepaciviruses in Rodents. *PLoS Pathog.* 2013; 9(6): e1003438.
 29. Kapoor A., Simmonds P., Scheel T.K., Hjelle B., Cullen J.M., Burbelo P.D. et al. Identification of rodent homologs of hepatitis C virus and pegiviruses. *MBio.* 2013; 4(2): e00216–13.
 30. Firth C., Bhat M., Firth M.A., Williams S.H., Frye M.J., Simmonds P. et al. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *Mbio.* 2014; 5(5): e01933–14.
 31. Silva E., Marques S., Osorio H., Carvalheira J., Thompson G. Endogenous hepatitis C virus homolog fragments in European rabbit and hare genomes replicate in cell culture. *PLoS One.* 2012; 7(11): e49820.
 32. Kapoor A., Simmonds P., Gerold G., Qaisar N., Jain K., Henriquez J.A. et al. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(28): 11608–13.
 33. El-Attar L.M., Mitchell J.A., Brooks B.H., Priestnall S.L., Brownlie J. Detection of non-primate hepaciviruses in UK dogs. *Virology.* 2015; 484: 93–102.
 34. Burbelo P.D., Dubovi E.J., Simmonds P., Medina J.L., Henriquez J.A., Mishra N. et al. Serology-enabled discovery of genetically diverse hepaciviruses in a new host. *J. Virol.* 2012; 86(11): 6171–8.
 35. Lyons S., Kapoor A., Sharp C., Schneider B.S., Wolfe N.D., Culshaw G. et al. Nonprimate hepaciviruses in domestic horses, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 1976–82.
 36. Pfaender S., Cavalleri J.M., Walter S., Doerrbecker J., Campana B., Brown R.J. et al. Clinical course of infection and viral tissue tropism of hepatitis C virus-like nonprimate hepaciviruses in horses. *Hepatology.* 2015; 61(2): 447–59.
 37. Tanaka T., Kasai H., Yamashita A., Okuyama-Dobashi K., Yasumoto J., Maekawa S. et al. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepacivirus. *J. Virol.* 2014; 88(22): 13352–66.
 38. Pfaender S., Walter S., Todt D., Behrendt P., Doerrbecker J., Wölk B. et al. Assessment of cross-species transmission of hepatitis C virus-related non-primate hepacivirus in a population of humans at high risk of exposure. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(9): 2636–42.
 39. Baechlein C., Ficher N., Grundhoff A., Alawi M., Indenbirken D., Postel A. et al. Identification of a Novel Hepacivirus in Domestic Cattle from Germany. *J. Virol.* 2015; 89(14): 7007–15.
 40. Teeling E.C., Springer M.S., Madsen O., Bates P., O'Brien S.J., Murphy W.J. et al. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science.* 2005; 307(5709): 580–4.
 41. Zhang G., Cowled C., Shi Z., Huang Z., Bishop-Lilly K.A., Fang X. et al. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. *Science.* 2013; 339(6118): 456–60.
 42. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45.
 43. Quan P.L., Firth C., Conte J.M., Williams S.H., Zambrana-Torrel C.M., Anthony S.J. et al. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(20): 8194–9.
 44. Lauck M., Sibley S.D., Lara J., Purdy M.A., Khudyakov Y., Hyeroba D. et al. A novel hepacivirus with an unusually long and intrinsically disordered NS5A protein in a wild Old World primate. *J. Virol.* 2013; 87(16): 8971–81.

Поступила 09.11.15

Принята в печать 19.11.15

Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П.

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ *IN VITRO* И *IN VIVO*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Сложность патогенеза и недостаточная изученность медленных ретровирусных инфекций, к которым относится инфекционная анемия лошадей (ИНАН), обуславливает необходимость поиска адекватной лабораторной модели для изучения инфекционного процесса, иммуногенеза с целью создания средств профилактики и терапии заболеваний. Приводятся данные о штаммах и клеточном тропизме вируса ИНАН. Показано, что эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши обладают уникальными свойствами и признаками. В отличие от фибробластов и других клеточных типов они могут являться новой клеточной системой для изучения вируса ИНАН как *in vitro*, так и *in vivo*. При условиях, которые индуцируют дифференцировку, они способны *in vitro* воспроизвести эмбриогенез с образованием клеток трех зародышевых листков. Дифференцировка ЭСК мыши в направлении гематопоэза могла бы способствовать более глубокому изучению и пониманию тропизма вируса ИНАН *in vitro*. ЭСК можно вернуть обратно в ранний предимплантационный эмбрион. Попав в окружение клеток зародыша, они участвуют в формировании всех тканей и органов развивающегося плода. Таким образом, адаптация мышинных ЭСК к вирусу ИНАН лошадей посредством генетической трансформации позволит приблизиться к созданию лабораторной модели *in vivo* для изучения иммунного ответа при лентивирусной инфекции.

Ключевые слова: инфекционная анемия лошадей; лентивирус; штаммы; тропизм; рецептор; эмбриональные стволовые клетки; цитодифференцировка *in vitro*; мышинная модель *in vivo*.

Для цитирования: Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П. Эмбриональные стволовые клетки мыши – перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 107-111.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111

Savchenkova I.P., Alekseyenkova S.V., Yurov K.P.

MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS – A NEW CELLULAR SYSTEM FOR STUDYING THE EQUINE INFECTIOUS ANEMIA VIRUS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Ya.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation

The complexity of the pathogenesis and insufficient knowledge about the slow retroviral infections, which include equine infectious anemia, necessitates finding an adequate laboratory model for the study of the infection process and immunogenesis to create means of prevention and treatment of diseases. Data about strains and cellular tropism of the virus are discussed. It was shown that mouse embryonic stem cells (ESCs) exhibited unique properties and characteristics. In contrast to fibroblasts and other cell types, these cells can be considered as a new cell system for studying EIAV *in vitro* and *in vivo*. Under differentiation-inducing conditions they are able to reproduce *in vitro* embryogenesis cells and form cells of three germ layers. Differentiation of mouse ESCs in the direction of hematopoiesis could contribute new knowledge and understanding of viral tropism EIAV *in vitro*. ESC can be returned back to the early pre-implantation embryo. Once in the germ cell environment, they participate in the formation of tissues and organs of the developing fetus. Thus, the adaptation of the mouse ESC to the equine EIAV through genetic transformation makes it possible to get closer to the creation of a laboratory model for the study of the *in vivo* immune response in the lentiviral infection.

Key words: equine infectious anemia; lentivirus; strains; tropism; receptor; mouse embryonic stem cells; differentiation *in vitro*; mouse model *in vivo*.

For citation: Savchenkova I.P., Alekseyenkova S.V., Yurov K.P. Mouse embryonic stem cells – a new cellular system for studying the equine infectious anemia virus *in vitro* and *in vivo*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 107-111. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111

For correspondence: Irina P. Savchenkova, Doctor of Biology, Professor, Chief of the Laboratory of stem cells, Ya.R. Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation, E-mail: s-ip@mail.ru

Information about authors:

Savchenkova I.P., <http://orcid.org/0000-0003-3560-5045>
Alekseyenkova S.V., <http://orcid.org/0000-0001-9580-6047>

Yurov K.P., <http://orcid.org/0000-0002-2933-8801>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 08 April 2015
Accepted 28 May 2015

Для корреспонденции: Савченкова Ирина Петровна, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. стволовой клетки ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва, E-mail: s-ip@mail.ru

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) – вирусная болезнь непарнокопытных (лошади, мулы, ослы), которая характеризуется рецидивирующей лихорадкой, анемией, тромбоцитопенией и разнообразным течением: от остро до бессимптомного латентного [1, 2]. Возбудителем ИНАН лошадей является РНК-содержащий вирус (в англоязычной литературе – EIAV), который принадлежит к семейству ретровирусов (Retroviridae), подсемейству лентивирусов (Lentiviridae) с длинным инкубационным периодом [3]. Он тесно связан с другими лентивирусами, опасными как для животных, так и для человека. К ним относятся 2 близкородственных вируса овец висна/мэди; вирусы иммунодефицита кошек, крупного рогатого скота, обезьян, человека; лентивирус пум, вирус артрита и энцефалита коз [4, 5].

Геном лентивирусов хорошо изучен и клонирован. Структура вириона ИНАН и провирусный геном описаны подробно в работе [6]. Характерной особенностью лентивирусов является появление большого числа мутаций вируса в процессе репликации, которые вызваны ошибками лентивирусной обратной транскриптазы. Такие мутации, не оказывающие отрицательного воздействия на вирус, сохраняются, и лентивирусная инфекция представляет собой гетерогенную популяцию родственных вариантов вируса. В связи с этим при ИНАН лошадей образуется нестерильный иммунитет. Имунная реакция организма возникает в ответ на иммунодоминантные белки вируса, ответственные за продукцию антител (АТ). При этом в крови появляются АТ к различным антигенам детерминантам возбудителя инфекции. Несмотря на выраженную иммунную реакцию, инфекционный вирус сохраняется в организме лошади пожизненно. Степень репликации вируса при скрытом носительстве достаточна для его передачи и может быть смертельной для вновь зараженных лошадей [7]. Вирус ИНАН является широко распространенным и опасным патогеном (регистрируется в 28 странах мира), который передается насекомыми-гематофагами.

Лентивирусы способны доставлять значительное количество генетического материала в клетку хозяина и обладают уникальной среди ретровирусов способностью реплицироваться в неделящихся клетках, что делает их удобным вектором для доставки генетического материала в молекулярной биологии [8]. Вирус ИНАН является перспективной моделью для изучения антигенного дрейфа лентивирусов, так как различные антигенные штаммы этого вируса преобладают во время каждого нового приступа болезни. К преимуществам использования его для этих целей можно отнести следующие хорошо документированные факты: вирус ИНАН не реплицируется в клетках человека, инфицирует моноциты и макрофаги лошади, но не заражает лимфоциты *in vivo*; у инфицированных животных не вызывает иммунодефицит [6, 9]. В связи с этим создание лабораторной (мышинной) модели для изучения патогенеза вируса ИНАН и иммунного ответа организма на инфекцию является актуальным.

Цель нашей статьи – показать преимущества эмбриональных стволовых клеток мыши (ЭСК) перед существующими культурами клеток для разработки новых подходов в изучении вируса ИНАН *in vitro* и *in vivo*.

Штаммы вируса ИНАН. В настоящее время существует несколько штаммов вируса ИНАН, которые хорошо изучены. Они различаются по вирулентности и способности размножения в культуре клеток. Большинство штаммов вируса ИНАН, которые используются в лабораториях, по-

лучены от вирулентных штаммов V26 [10] и Wyoming [11]. Эти два штамма реплицируются только в культурах первичных макрофагов лошади и не могут реплицироваться в других тканевых культурах клеток без предварительной обширной адаптации, которая, как правило, приводит к снижению их вирулентности [11, 12]. В результате адаптации штамма Wyoming посредством культивирования в культуре клеток, представленной дермальными фибробластами лошади, был получен и охарактеризован новый штамм, получивший название Malmquist или WSU5 вируса ИНАН [13]. Он оказался способным инфицировать клетки, выделенные из тимуса плодов собаки, линия Cf2Th [14]. В России для изготовления антигена используют новый штамм вируса ИНАН 3-К-ВНИИТИБП-ВИЭВ. Штамм выращивают в культуре клеток кожи и/или мышц, и/или легкого, и/или почек эмбриона лошади до накопления вируса в титре 10^5 ИД₅₀/мл [15].

Исследования, посвященные генетическому картированию с использованием химерных провирусов, у которых родительские вирусы характеризовались высокой вирулентностью или были невирулентными, позволили определить важные области, которые влияют на острую вирулентность вируса. Химерные провирусы обеспечивают понимание генов или областей генома, которые определяют патогенез вирусных инфекций. С помощью этого подхода были установлены области U3 в вирусном длинном концевом повторе (LTR), поверхностный белок оболочки (SU) и дополнительный ген S2, которые в значительной мере определяют острое течение этой болезни. Новый штамм vMA-1c, быстро и специфично убивающий клетки, выделенные из дермы кожи лошади, был создан посредством внесения изменений в нуклеотидные последовательности 3'-области вируса ИНАН [16]. Недавно была определена область V6 вирусного белка оболочки (env), которая может взаимодействовать с рецептором ELR-1 вируса ИНАН [17]. Дальнейший анализ этих областей позволит сосредоточиться на определенных механизмах взаимоотношения вирус – клетка, вирус – животное, которые обуславливают особенности течения болезни.

Клеточный тропизм вируса ИНАН. При экспериментальном инфицировании лошадей вирусом ИНАН была обнаружена его активная репликация и вирусная антигенная продукция во многих тканях, обогащенных макрофагами: печени, легких, селезенки, почек, надпочечников, костного мозга [18, 19]. D. Sellon и соавт. [20] продемонстрировали локализацию вируса в мононуклеарных фагоцитах. Поэтому долгое время считалось, что тканевые макрофаги могут быть единственным клеточным типом у лошади, который поддерживает активную репликацию данного вируса [12, 19, 20]. Действительно, большинство вирулентных штаммов вируса ИНАН лошади реплицируются только в культурах первичных макрофагов лошади и не могут размножаться в других тканевых культурах клеток без предварительной адаптации [10, 12]. В культуре первичных макрофагов вирус сохраняет инфекционность, сопоставимую с его вирулентностью в естественных условиях *in vivo*. Однако в дальнейшем оказалось, что в мононуклеарных клетках периферической крови обнаруживалась только его провирусная ДНК. Транскрипции вирусной мРНК или белкового синтеза в течение острой инфекции ИНАН не было выявлено. Эти исследования показали, что моноциты периферической крови компетентны к вхождению вируса в клетку, где происходит обратная транскрипция вирусной РНК, но не

способны поддерживать его активную репликацию. Чтобы понять патогенез вируса ИНАН, необходимы более детальные экспериментальные данные о регуляции вируса в клетке-хозяине. В работе W. Maugy [21] была предпринята попытка изучить влияние степени клеточной дифференцировки моноцита/макрофага на репликацию вируса ИНАН в культуре. Результаты экспериментов показали, что ограничение экспрессии вирусных генов наблюдалось в моноцитах, но не в макрофагах лошади. Эта рестрикция происходила на уровне транскрипции генов. В результате были охарактеризованы ДНК-мотивы в пределах LTR, которые контролировали экспрессию вирусных генов в моноцитах и макрофагах. В дальнейших исследованиях был обнаружен специфичный для макрофагов транскрипционный фактор, который взаимодействует с этими мотивами [22].

Известно, что первичные культуры макрофагов лошади трудно поддерживать в течение длительного времени. В связи с этим интенсивно велись исследования по оценке чувствительности к вирусу ИНАН первичных культур клеток, выделенных из других тканей и органов. Было показано, что различные штаммы вируса ИНАН могут реплицироваться в первичных культурах клеток лошади: дермальных фибробластах [16, 23–25], клетках почки [24, 26–28] и эндотелиальных клетках [29]. Эти клетки были использованы для наращивания вируса *in vitro* наряду с макрофагами. Результаты этих работ продемонстрировали способность вируса ИНАН реплицироваться в клетках, имеющих немакрофаговое происхождение. Следует отметить, что клеточный тропизм менее вирулентных штаммов этого вируса *in vitro* не был до сих пор исследован. Известно, что первичные культуры имеют ряд недостатков, в том числе краткосрочность культивирования (до 50 цитогенераций). Поэтому были предприняты попытки адаптировать иммортализованные (бессмертные) клеточные линии к вирусу. В результате показано, что перевиваемые клеточные линии эмбриональных фибробластов мыши (FEA) [30], клеток тимуса собаки (Cf2Th) [31], остеосаркомы собак (D17) [32], макрофагов собаки (DH82) [33] и макрофагов лошади (EML3C) [34] способны поддерживать репликацию вируса ИНАН *in vitro*. Однако бессмертные клеточные линии наряду с преимуществами имеют много недостатков. Они, как правило, при длительном культивировании теряют тканевую и даже видовую принадлежность. Возможно, в результате этого происходит ослабление вирулентности вируса ИНАН. Детерминанты вирулентности могут быть потеряны или изменены, когда вирусы размножаются длительное время в других клетках, отличающихся от их клеток-мишеней в естественных условиях.

В последние 10 лет появились 2 работы, в которых предпринимались попытки адаптировать мышинные эмбриональные фибробласты линии NIH 3T3 к вирусу ИНАН *in vitro* [35, 36]. Вначале для этого был найден и клонирован ген функционального рецептора для вируса ИНАН, названный «лошадиный лентивирусный рецептор 1» (ELR1), который, как оказалось, родственен семейству белков фактора некроза опухоли (ФНО) [35]. Было показано, что этот рецептор присутствует на поверхности моноцитов и макрофагов лошадей *in vitro*. Интересным является тот факт, что в нечувствительных к вирусу ИНАН клетках человека, обезьяны и мыши *in vitro* рецептор ELR1 не был выявлен. Однако при введении в эти клетки гена рецептора *ELR1* с помощью

рекомбинантного вектора, созданного на основе мышинного ретровируса, они приобретали чувствительность к вирусу ИНАН. Результаты этой работы демонстрируют, что инфицирование клеток человека, обезьяны и мыши вирусом ИНАН может быть опосредовано присутствием одного рецептора ELR1 на клетках.

Является ли этот рецептор единственным или вирус для входа в клетку использует другие рецепторы, пока неясно. Известно, что существуют культуры клеток других видов животных (собак), адаптированные к вирусу ИНАН. W. Maugy и соавт. [16, 37] сообщили, что вирус ИНАН, по-видимому, использует различные рецепторы для заражения фибробластов собак и лошадей *in vitro*. Сохраняется вероятность того, что другие штаммы ИНАН в высокоадаптированных клетках используют альтернативные рецепторы. Результаты многочисленных исследований показали, что ИНАН заражает только моноциты и макрофаги в естественных условиях и имеется одно сообщение, которое свидетельствует о том, что вирус может также инфицировать клетки эндотелия [29] *in vivo*. В литературе отсутствуют данные об инфекции вирусом ИНАН лимфоцитов или других типов клеток у инфицированных лошадей, что указывает на высокую степень тропизма ИНАН в естественных условиях. Однако в культуре репликация вируса ИНАН наблюдается и в других типах клеток лошади: дермальных фибробластах и клетках почки. В связи с этим можно предположить, что чувствительность клеток к вирусу ИНАН определяют другие биологические факторы, которые, возможно, отличаются от рецепторной специфичности. Отсутствуют данные о роли клеточной пролиферации и степени дифференцировки клеток в тропизме этого вируса.

Дальнейшие исследования в данном направлении позволили коллективу авторов [36] создать новую мышиную клеточную систему, которая была репликационно компетентна к вирусу ИНАН – NIH 3T3 (ELR1/cyc) (генетически трансформированные фибробласты мыши, в которых экспрессировались гены рецептора *ELR1* и циклина *cyc*). Таким образом, показано, что мышинные клетки можно адаптировать к лентивирусной инфекции посредством генетической трансформации. Однако использование адаптированных для вируса ИНАН мышинных фибробластов не решает основную проблему – создание адекватной модели *in vivo* вследствие недостаточных для этого свойств, которыми обладают эти клетки.

Преимущества ЭСК мыши. Особую перспективность в данном направлении представляют ЭСК мыши, о которых мы подробно сообщали ранее [38–40]. Впервые эти клетки были выделены из ранних предимплантационных эмбрионов мышей одновременно в двух независимых лабораториях в 1981 г. [41, 42]. ЭСК получили из клеток внутренней клеточной массы (ВКМ) бластоцист мышей. Эти клетки происходят из эмбриониста ранних предимплантационных зародышей и в культуре сохраняют сходство с ранними эмбрионами, в том числе содержат огромную библиотеку предсинтезированных мРНК генов раннего эмбриогенеза и органогенеза. Считается, что ЭСК наиболее близко напоминают примитивную эктодерму ранних постимплантационных эмбрионов. Они обладают высокой пролиферативной активностью, способны самообновляться и поддерживаться в недифференцированной форме в течение длительного времени *in vitro*.

В настоящий момент имеются убедительные данные, которые свидетельствуют об огромном потенциале ЭСК

мышь относительно направленной дифференцировки в клетки всех трех зародышевых листков *in vitro* [43], в том числе половые клетки [44]. При условиях, которые индуцируют дифференцировку, они способны воспроизвести эмбриогенез в культуре, что позволяет использовать их вместо ранних эмбрионов. Адаптация ЭСК мыши, которые в отличие от других клеточек можно направлять в культуре по определенному пути развития, в том числе в направлении гематопоэза, могла бы способствовать более глубокому изучению и пониманию тропизма лентивирусов и патогенеза в инфицированных клетках как *in vitro*, так и *in vivo*. Для индукции дифференцировки ЭСК мыши в направлении гематопоэза отработаны условия культивирования, индукторы и даже имеются готовые индукционные коммерческие среды (ES-Cut™, ES-Cult M3120 и другие фирмы «STEMCELL Technologies Inc»). Кроме того, дифференцировка ЭСК мыши в гематопоэтические клетки вышла на уровень крупномасштабного культивирования с использованием различных биореакторов [45–48], что свидетельствует об изученности данного направления и достоверности, высокой воспроизводимости результатов. Способность ЭСК при определенных условиях дифференцироваться в заданном направлении делает их самым перспективным материалом для разработки новых технологий. Работы в данном направлении ведутся с привлечением ЭСК человека, которые многие коллективы пытаются адаптировать к другому представителю лентивирусов – вирусу иммунодефицита человека 1 [49, 50].

ЭСК имеют уникальные свойства, которые позволяют рассматривать их как перспективный материал для создания лабораторной мышинной модели *in vivo* с целью изучения лентивирусной инфекции. ЭСК могут быть возвращены обратно в ранний предимплантационный эмбрион. Для этого 10–15 клеток микроинъектируют в бластополюсть бластоцисты или агрегируют с одним (простой сэндвич) или двумя (сложный сэндвич) ранними эмбрионами (морулы), у которых предварительно удалена прозрачная оболочка. Далее такие комплексы краткосрочно культивируют и подсаживают в матку сурrogатным самкам. Попав в окружение клеток зародыша, ЭСК формируют все ткани развивающегося плода, давая начало химерным животным. Ранее нами посредством агрегации ЭСК с морулами методом простого и сложного сэндвича были получены химерные мыши с эффективностью 50% [51]. У химерных мышей, получаемых после инъекции ЭСК в полость бластоцисты, доля ЭСК достигает 80% и, как правило, химеризм распространяется на все ткани и органы [52, 53]. Перед возвратом этих клеток в эмбрион ЭСК могут быть подвергнуты генетическим манипуляциям различными методами [54]. Ранее мы показали компетентность ЭСК мыши линий D3 и RK23 к введению чужеродной ДНК [38, 55].

Генетическая трансформация мышинных ЭСК посредством введения рекомбинантной экзогенной ДНК, содержащей ген *ELR1* рецептора вируса ИНАН, поставленный под контроль промотора гена, который экспрессируется только в полипотентных клетках, например *Oct 3/4*, позволяет легко отбирать клоны ЭСК с необходимым фенотипом и использовать их для создания трансгенных эмбрионов, плодов и в конечном счете мышей. Эти данные демонстрируют огромное преимущество ЭСК перед другими культурами клеток, используемыми в вирусологии. Поскольку эксперименты с ЭСК человека требуют особого разрешения, а ЭСК лошади до сих пор не созданы, ЭСК мыши представ-

ляют собой единственный перспективный материал для создания адекватной репликационно-компетентной клеточной системы для вируса ИНАН. Адаптация мышинных ЭСК к вирусу ИНАН лошадей посредством генетической трансформации позволит приблизиться к созданию лабораторной модели *in vivo* для изучения иммунного ответа при лентивирусной инфекции.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3–6, 8–14, 16–37, 41–43, 45–50, 52, 53 см. REFERENCES)

- Юров К.П., Заблочкий В.Т., Косминков Н.Е. *Инфекционные и паразитарные болезни лошадей*. М.: Мастер-Класс; 2010.
- Юров К.П., Алексеенкова С.В., Юров Г.К. Инфекционная анемия лошадей и её современная диагностика. *Ветеринария*. 2013; (4): 3–8.
- Юров К.П., Токарик Э.Ф., Галатюк А.Е., Самуйленко А.Я., Люлькова Л.С., Пестова Г.В. и др. *Способ изготовления культурального антигена из вируса инфекционной анемии лошадей и набор для индикации антител или антигена вируса инфекционной анемии лошадей*. Патент РФ № 2146150; 2000.
- Савченкова И.П. *Эмбриональные стволовые клетки в биологии: настоящее и будущее*. Дубровицы: ВИЖ; 1999.
- Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки в биологии и биотехнологии. В кн.: Дьяконов Л.П., ред. *Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)*. М.: Компания Спутник +; 2000: 244–73.
- Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки млекопитающих. В кн.: Дьяконов Л.П., ред. *Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии)*. М.: Компания Спутник +; 2009: 347–79.
- Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки как потенциальный источник гамет *in vitro*. *Проблемы репродукции*. 2009; 15 (3): 54–9.
- Савченкова И., Фляйшманн М., Булла Й., Брэм Г. Использование эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши для получения химерных животных. *Цитология*. 1996; 38(10): 1118–23.
- Савченкова И.П., Зиновьева Н.А., Булла Й., Брэм Г. Эмбриональные стволовые клетки, их генетическое изменение путем гомологичной рекомбинации и использование в получении трансгенных животных. *Успехи современной биологии*. 1996; 116 (1): 78–92.
- Савченкова И.П. Введение гена *lac-Z E. coli* в эмбриональные стволовые клетки мыши ДЗ электропорацией. *Доклады Российской Академии Сельскохозяйственных Наук*. 1996; (6): 36–7.

REFERENCES

- Issel C.J., Coggins L. Equine infectious anemia: current knowledge. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1979; 174 (7): 727–33.
- Yurov K.P., Zablotskiy V.T., Kosminkov N.E. *Equine Infectious and Parasitic Disease [Infektsionnye i parazitarnye bolezni loshadey]*. Moscow: Master-Klass; 2010. (in Russian)
- Montelaro R.C., Ball J.M., Rushlow K. Equine retroviruses. In: Levy J.A., ed. *The Retroviridae*. Plenum Press, New York; 1993; (2): 257–360.
- Craig J.K., Montelaro R.C. EIAV envelope diversity: shaping viral persistence and encumbering vaccine efficacy. *Curr. HIV Res.* 2010; 8(1): 81–6.
- Craig J.K., Montelaro R.C. Lessons in AIDS vaccine development learned from studies of equine infectious anemia virus infection and immunity. *Viruses*. 2013; 5(12): 2963–76.
- Leroux C., Cadore J.L., Montelaro R.C. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet. Res.* 2004; 35(4): 485–512.
- Yurov K.P., Alekseyenkova S.V., Yurov G.K. Infectious anemia of horse and its current diagnostics. *Veterinariya*. 2013; (4): 3–8. (in Russian)
- Olsen J.C. EIAN, CAEV and other lentivirus vector systems. *Somat. Cell Mol. Genet.* 2001; 26(1–6): 131–45.
- Farley D.C., Bannister R., Leroux-Carlucchi M.A., Evans N.E., Miskin J.E., Mitrophanous K.A. Development of an equine-tropic replication-competent lentivirus assay for equine infectious anemia virus-based

- lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther. Methods*. 2012; 23(5): 309–23.
10. Kono Y., Kobayashi K. Changes in pathogenicity of equine infectious anemia virus during passages in horse leukocyte cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*. 1970; 10(3): 106–12.
 11. Kemeny L.J., Mott L.O., Pearson J.E. Titration of equine infectious anemia virus. Effect of dosage on incubation time and clinical signs. *Cornell Vet.* 1971; 61(4): 687–95.
 12. Carpenter S., Chesebro B. Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1989; 63(6): 2492–6.
 13. Malmquist W.A., Barnett D., Becvar C.S. Production of equine infectious anemia antigen in a persistently infected cell line. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 42(4): 361–70.
 14. Whetter L., Archambault D., Perry S., Gazit A., Coggins L., Yaniv A. et al. Equine infectious anemia virus derived from a molecular clone persistently infects horses. *J. Virol.* 1990; 64 (12): 5750–6.
 15. Yurov K.P., Tokarik E.F., Galatyuk A.E., Samuilenko A.Ya., Lyul'kova L.S., Pestova G.V. et al. *A Method of Production of a Cultural Anti-gene from an Equine Infectious Anemia Virus and a Set for Identification of Antibodies or an Anti-gene of an Equine Infectious Anemia Virus*. Patent RF N 2146150; 2000. (in Russian)
 16. Maury W., Wright P.J., Bradley S. Characterization of a cytotytic strain of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 2003; 77 (4): 2385–99.
 17. Payne S.L., Fuller F.J. Virulence determinants of equine infectious anemia virus. *Curr. HIV Res.* 2010; 8(1): 66–72.
 18. McGuire T.C., Crawford T.B., Henson J.B. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am. J. Pathol.* 1971; 62(2): 283–94.
 19. Rice N.R., Lequarre A.S., Casey J.W., Lahn S., Stephens R.M., Edwards J. Viral DNA in horses infected with equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1989; 63(12): 5194–200.
 20. Sellon D.C., Perry S.T., Coggins L., Fuller F.J. Wild-type equine infectious anemia virus replicates in vivo predominantly in tissue macrophages, not in peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 1992; 66(10): 5906–13.21. Maury W. Monocyte maturation controls expression of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1994; 68(10): 6270–9.
 22. Raabe M.R., Issel C.J., Montelaro R.C. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods*. 1998; 71(1): 87–104.
 23. Klever-Anderson P., Cheevers W.P., Crawford T.B. Characterization of the infection of equine fibroblasts by equine infectious anemia virus. *Arch. Virol.* 1979; 60(3–4): 279–89.
 24. Payne S.L., La Celle K., Pei X.F., Qi X.M., Shao H., Steagall W.K. et al. Long terminal repeat sequences of equine infectious anemia virus are a major determinant of cell tropism. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 3): 755–9.
 25. Brindley M.A., Zhang B., Montelaro R.C., Maury W. An equine infectious anemia virus variant superinfects cells through novel receptor interactions. *J. Virol.* 2008; 82(19): 9425–32.
 26. Kono Y., Yoshino T. Propagation of equine infectious anemia virus in horse kidney cell cultures. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo)*. 1974; 14(4): 155–62.
 27. Payne S.L., Fang F.D., Liu C.P., Dhruva B., Rwambo P., Issel C. et al. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. *Virology*. 1987; 161(2): 321–31.
 28. O'Rourke K.I., Perryman L.E., McGuire T.C. Antiviral, antiglycoprotein and neutralizing antibodies in foals with equine infectious anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 1988; 69(Pt.3): 667–74.
 29. Maury W., Oaks J.L., Bradley S. Equine endothelial cells support productive infection of equine infectious anemia virus. *J. Virol.* 1998; 72 (11): 9291–7.
 30. Derse D., Dorn P.L., Levy L., Stephens R.M., Rice N.R., Casey J.W. Characterization of equine infectious anemia virus long terminal repeat. *J. Virol.* 1987; 61(3): 743–7.
 31. Bouillant A.M., Nielsen K., Ruckerbauer G.M., Samagh B.S., Hare W.C. The persistent infection of a canine thymus cell line by equine infectious anemia virus and preliminary data on the production of viral antigens. *J. Virol. Methods*. 1986; 13(4): 309–21.
 32. Beisel C.E., Edwards J.F., Dunn L.L., Rice N.R. Analysis of multiple mRNAs from pathogenic equine infectious anemia virus (EIAV) in an acutely infected horse reveals a novel protein, Ttm, derived from the carboxy terminus of the EIAV transmembrane protein. *J. Virol.* 1993; 67(2): 832–42.
 33. Hines R., Maury W. DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus. *J. Virol. Methods*. 2001; 95(1–2): 47–56.
 34. Fidalgo-Carvalho I., Craig J.K., Barnes S., Costa-Ramos C., Montelaro R.C. Characterization of an equine macrophage cell line: application to studies of EIAV infection. *Vet. Microbiol.* 2009; 136 (1–2): 8–19.
 35. Zhang B., Jin S., Jin J., Li F., Montelaro R.C. A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102(28): 9918–23.
 36. Zhang B., Montelaro R.C. Replication of equine infectious anemia virus in engineered mouse NIH 3T3 cells. *J. Virol.* 2009; 83(4): 2034–7.
 37. Maury W., Bradley S., Wright B., Hines R. Cell specificity of the transcription-factor repertoire used by a lentivirus: motifs important for expression of equine infectious anemia virus in nonmonocytic cells. *Virology*. 2000; 267(2): 267–78.
 38. Savchenkova I.P. *Embryonic Stem Cells in Biology: Present and Future [Embrional'nye stvolovye kletki v biologii: nastoyashchee i budushchee]*. Dubrovitsy: VIZH; 1999. (in Russian)
 39. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells in biology and biotechnology. In: D'yakonov L.P., ed. *An Animal Cells in Culture (Methods and application in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (Metody i primeneniye v biotekhnologii)]*. Moscow: Kompaniya Sputnik +; 2000: 244–73. (in Russian)
 40. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells of mammals. In: D'yakonov L.P., ed. *An Animal Cells in Culture (Methods and application in biotechnology) [Zhivotnaya kletka v kul'ture (Metody i primeneniye v biotekhnologii)]*. Moscow: Kompaniya Sputnik +; 2009: 347–79. (in Russian)
 41. Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819): 154–6.
 42. Martin G.R. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981; 78(12): 7634–8.
 43. Wobus A.M., Boheler L.K. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 2005; 85(2): 635–78.
 44. Savchenkova I.P. Embryonic stem cells as a potential source of gametes. *Problemy reproduktivnoy biologii*. 2009; 15(3): 54–9. (in Russian)
 45. Li Y., Kniss D.A., Lasky L.C., Yang S.T. Culturing and differentiation of murine embryonic stem cells in a three-dimensional fibrous. *Cytotechnology*. 2003; 41(1): 2–5.
 46. Cameron C.M., Hu W.S., Kaufman D.S. Improved development of human embryonic stem cell-derived embryoid bodies by stirred vessel cultivation. *Biotechnol. Bioeng.* 2006; 94(5): 938–48.
 47. Fridley K.M., Fernandez I., Li M.T., Kettlewell R.B., Roy K. Unique differentiation profile of mouse embryonic stem cells in rotary and stirred tank bioreactors. *Tissue Eng. Part A*. 2010; 16(11): 3285–98.
 48. Lu S.J., Kelley T., Feng Q., Chen A., Reuveny S., Lanza R. et al. 3D microcarrier system for efficient differentiation of human pluripotent stem cells into hematopoietic cells without feeders and serum. *Regen. Med.* 2013; 8(4): 413–24.
 49. Bandi S., Akkina R. Human embryonic stem cell (hES) derived dendritic cells are functionally normal and are susceptible to HIV-1 infection. *AIDS Res. Ther.* 2008; 5: 1–9.
 50. Kitchen S.G., Zack J.A. Stem cell-based approaches to treating HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2011; 6(1): 68–73.
 51. Savchenkova I., Flyayshmann M., Bulla Y., Brem G. The use of pluripotent mouse embryo stem cells for the production of chimeric animals. *Tsitologiya*. 1996; 38(10): 1118–23. (in Russian)
 52. Doetschman T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W., Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1985; 87: 27–45.
 53. Robertson E.J. Embryo-derived stem cell lines. In: Robertson E.J., ed. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1987: 71–112.
 54. Savchenkova I.P., Zinov'eva N.A., Bulla Y., Brem G. Embryonic stem cells, their genetic change by a homologous recombination and use in receiving transgene animals. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 1996; 116(1): 78–92. (in Russian)
 55. Savchenkova I.P. Introduction of lac-Z E. coli gene into mouse D3 embryonic stem cells by electroporation. *Doklady Rossiyskoy Akademii Sel'skokhozyaystvennykh Nauk*. 1996; (6): 36–7. (in Russian)

Поступила 08.04.15

Принята в печать 28.05.15

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.98:578.826.8]-092:612.017.1.064]-078

Лебедев А.В.^{1,4}, Нешумаев Д.А.², Казеннова Е.В.¹, Лаповок И.А.¹, Лага В.Ю.¹, Туманов А.С.¹, Глущенко Н.В.¹,
Плотникова Ю.К.³, Пономарева О.А.³, Ярыгина Е.И.⁴, Бобкова М.Р.¹

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ВИЧ-1, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ В 1999 И 2012 гг.

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 660049, г. Красноярск; ³КГБУЗ «Иркутский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 664035, г. Иркутск; ⁴ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии», 109472, г. Москва

Проведен сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Иркутской области Российской Федерации в 1999 и 2012 гг., по областям *pol* и *env* генома вируса. В результате исследования показано доминирование в регионе генетического варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1 (100%). У пациентов, не получавших антиретровирусную терапию, не было зарегистрировано первичных мутаций лекарственной устойчивости в составе гена *pol*. В ходе исследования установлено значительное увеличение гетерогенности по областям генов *env* и *pol* популяции вирусов варианта IDU-A, циркулировавших в среде потребителей инъекционных наркотиков в регионе в 2012 г. (12,88 и 2,16% соответственно), по сравнению с вариантами, вызвавшими вспышку ВИЧ-инфекции в 1999 г. (1,64 и 0,47% соответственно). Кроме того, при сравнении генетических дистанций нуклеотидных последовательностей вариантов вируса, полученных в 2012 г. от ВИЧ-инфицированных лиц — потребителей инъекционных наркотиков и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, был установлен факт влияния пути передачи на изменчивость популяции вируса. Среди вирусов варианта IDU-A, циркулировавших на данной территории в 2012 г., распространенность X4-тропных вариантов составила 24,7%.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита 1-го типа; вариант IDU-A; мутации лекарственной устойчивости; генетическая дистанция; тропизм.

Для цитирования: Лебедев А.В., Нешумаев Д.А., Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Туманов А.С., Глущенко Н.В., Плотникова Ю.К., Пономарева О.А., Ярыгина Е.И., Бобкова М.Р. Сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 112-118.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118

Lebedev A.V.^{1,4}, Neshumaev D.A.², Kazennova E.V.¹, Lapovok I.A.¹, Laga V.Yu.¹, Tumanov A.S.¹,
Glushchenko N.V.¹, Plotnikova Yu.K.³, Ponomareva O.A.³, Yarygina E.I.⁴, Bobkova M.R.¹

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC VARIANTS OF THE HIV-1 CIRCULATING IN THE IRKUTSK REGION IN 1999 AND 2012

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; ²Krasnoyarsk Regional AIDS Center, Krasnoyarsk, 660049, Russian Federation; ³Irkutsk Regional AIDS Center, Irkutsk, 664035, Russian Federation; ⁴Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, 109472, Russian Federation

The *pol* and *env* genome regions of the HIV-1 genetic variants circulating in the Irkutsk region of Russia in 1999 and 2012 were compared. The results of this work showed the dominance of the HIV-1 subtype A IDU-A genetic variant (100%) in this region. No primary resistance mutations in the *pol* gene in the treatment-naive patients were found. The heterogeneity of the viral population was found to be significantly increased based on the *pol* and *env* analysis among HIV-variants isolated in 2012 (12.88% and 2.16%) from the intravenous drug users as compared to HIV-variants that caused the outbreak of the HIV infection in 1999 (1.64% and 0.47%). In addition, the comparison of genetic distances of the *pol* and *env* gene sequences in the viruses isolated in 2012 from the HIV-positive persons infected through heterosexual intercourse and intravenous drug use demonstrated that the transmission route influenced the variability of the virus population. Among the viruses of IDU-A variant circulating in the area in 2012 the prevalence of X4-tropic variants was 24.7%.

Key words: HIV-1; IDU-A variant; drug resistance mutations; genetic distance; tropism.

For citation: Lebedev A.V., Neshumaev D.A., Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Tumanov A.S., Glushchenko N.V., Plotnikova Yu.K., Ponomareva O.A., Yarygina E.I., Bobkova M.R. Comparative analysis of genetic variants of the HIV-1 circulating in the Irkutsk region in 1999 and 2012. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 112-118. (In Russ.).

Для корреспонденции: Лебедев Алексей Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-112-118

For correspondence: Aleksey V. Lebedev, Junior research scientist, Laboratory of Leukosis Viruses D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gama-leya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: lebedevalesha236@gmail.com

Information about authors:

Lebedev A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6787-9345>
Neshumayev D.A., <http://orcid.org/0000-0002-3826-6088>
Kazenova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-7912-4270>
Lapovok I.A., <http://orcid.org/0000-0002-6328-1415>
Laga V.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-0987-5439>
Tumanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Glushchenko N.V., <http://orcid.org/0000-0001-6028-1244>
Plotnikova Yu.K., <http://orcid.org/0000-0003-2912-9118>
Ponomareva O.A., <http://orcid.org/0000-0001-9154-211X>
Yarygina E.I., <http://orcid.org/0000-0002-4214-039X>
Bobkova M.R., <http://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 15-15-00050).

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

Received 18 May 2015

Accepted 19 November 2015

С момента проникновения в 1996 г. варианта ВИЧ-1 подтипа А1, названного впоследствии IDU-A, в среду потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) началось стремительное распространение этого варианта вируса по всей России [1, 2]. В начале 2000-х годов вариант IDU-A вышел за пределы данной группы риска и стал распространяться уже гетеросексуальным путем [3]. За 2012 г. более 38% впервые выявленных ВИЧ-позитивных лиц, по данным Федерального центра СПИД, заразились в результате гетеросексуальных контактов [4].

Одна из наиболее крупных вспышек ВИЧ-инфекции на территории России была зарегистрирована в Иркутской области в 1999 г. среди ПИН. Молекулярно-эпидемиологические исследования вспышки показали, что она была вызвана вариантом IDU-A подтипа А ВИЧ-1 и характеризовалась высокой гомогенностью вирусной популяции [5].

С момента вспышки ВИЧ-инфекции в Иркутской области прошло более 10 лет. На сегодняшний день этот регион считается одним из наиболее неблагоприятных по ВИЧ-инфекции в Российской Федерации. На территории Иркутской области, по данным Федерального центра СПИД на 22.11.12, было зарегистрировано 37 170 ВИЧ-инфицированных лиц, показатель пораженности составил 1349,3 на 100 тыс. населения, при этом аналогичный показатель для РФ в целом составил 440,0 на 100 тыс. населения [4].

На территории РФ непрерывно проводится молекулярный мониторинг эпидемии ВИЧ-инфекции начиная с первого зафиксированного в стране случая в 1987 г. [6, 7]. Изучение распространения и генетический анализ вариантов ВИЧ-1, для которого характерна высокая степень изменчивости генома [8], имеют большое значение для понимания особенностей развития эпидемии ВИЧ-инфекции в стране.

Молекулярной основой генетической изменчивости ВИЧ-1 являются возникновение мутаций в вирусном геноме, происходящих главным образом за счет ошибок обратной транскриптазы при синтезе ДНК [9], и рекомбинационные процессы [10]. Однако степень генетической вариативности генов ВИЧ-1 неодинакова.

Наименьшая степень генетической изменчивости среди структурных генов ВИЧ-1 характерна для гена *pol* [11], кодирующего ферменты вируса, необходимые на этапах его репродукции, такие как протеаза, обратная транскриптаза и интеграза [12]. На сегодняшний день основными мишенями антиретровирусных (АРВ) препаратов остаются ферменты ВИЧ-1 [11]. Случайно

возникшие мутации лекарственной устойчивости (ЛУ) у циркулирующих в вирусной популяции вариантов в условиях приема АРВ-препаратов дают им эволюционное преимущество относительно «диких» штаммов, что может привести к закреплению и накоплению возникших мутаций ЛУ в составе генома вируса. Доминирование резистентных вариантов в вирусной популяции в конечном счете может привести к неэффективности лечения. Кроме того, в условиях широкомасштабной АРВ-терапии представляют опасность случаи первичного заражения устойчивыми штаммами ВИЧ-1 [13, 14].

Выделяют 2 вида мутаций ЛУ ВИЧ-1 – первичные и вторичные. Первичные мутации непосредственно вызывают снижение чувствительности вируса к АРВ-препаратам, но при этом, как правило, ухудшают и его репликативную способность. Вторичные мутации не влияют на уровень ЛУ, но в большей или меньшей степени восстанавливают репликативную способность вируса, несущего первичные мутации [15]. Подавляющее большинство мутаций ЛУ ВИЧ-1 локализуется в области гена *pol*, кодирующей протеазу и первые 240 аминокислотных остатков обратной транскриптазы.

Наибольшей изменчивости подвержен ген *env* ВИЧ-1 [11, 16], одним из продуктов которого является белок оболочки вируса gp120 [17], ответственный за связывание вируса с первичным рецептором CD4, а также с хемокиновыми корцепторами CCR5 и/или CXCR4 [18]. Взаимодействие gp120 с рецепторами активирует процесс слияния мембран, ведущий к проникновению вирусного генома в клетки-мишени. Домен белка gp120 – петля V3, являющаяся основной антигенной детерминантой вируса и наиболее иммуногенным эпитопом ВИЧ-1 [19], отвечает за связывание с корцептором и участвует в структурных изменениях, происходящих при контакте ВИЧ-1 с молекулой CD4. Соответственно большая часть мутаций возникает именно в области gp120, приводя к ускользанию вируса от иммунного ответа.

В зависимости от типа используемых ВИЧ-1 хемокиновых рецепторов CCR5 или CXCR4 вирусы подразделяют на R5-тропные и X4-тропные либо вирусы с двойной тропностью [20]. В связи с разработкой и внедрением препаратов – антагонистов корцептора CCR5, таких как маравирик и викривирик, определение вирусного тропизма имеет принципиальное значение, так как в отношении X4-тропных вариантов вирусов антагонисты корцептора CCR5 заведомо неэффективны [21].

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в Иркутской области в 1999 и 2012 гг., и оценка распро-

страненности R5- и X4-тропных вариантов вируса на данной территории.

Материал и методы

В исследовании была использована коллекция ДНК из мононуклеарных клеток периферической крови и/или плазма крови, собранная от 97 лиц, проживающих на территории Иркутской области, с зарегистрированным диагнозом «ВИЧ-инфекция» в период с 1999 по 2012 г. Забор образцов крови и получение препаратов крови у ВИЧ-инфицированных осуществляли в 2012 г. Из 97 пациентов на момент забора крови 15 находились на лечении АРВ-препаратами, 82 пациентам АРВ-терапия не назначалась.

Выявление факторов риска, возможных мест заражения, эпидемиологических связей с другими ВИЧ-инфицированными лицами проводили путем опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза. Кроме того, регистрировали возраст, пол пациента, дату забора клинического материала, дату и регион постановки диагноза «ВИЧ-инфекция». Сведения о применении/неприменении пациентом АРВ-препаратов получали, руководствуясь записями в амбулаторных картах. Весь полученный клинический материал использовали с информированного согласия пациентов на основании одобрения Локального комитета по этике на базе ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» на проведение научно-исследовательской работы (протокол 06-13 заседания Локального комитета по этике от 05.06.13).

Геномную ДНК, включая провирусную ДНК, из клеток крови выделяли с применением наборов QIAmp DNA Blood Mini Kit и прибора QIAcube («Qiagen», США) в соответствии с инструкциями производителя.

Генотипирование вариантов вируса проводили путем анализа нуклеотидных последовательностей области гена *pol*, кодирующей протеазу и 2/3 обратной транскриптазы ВИЧ-1, с использованием набора ViroSeq (версия 2) (ViroSeq HIV-1 Genotyping System, «Celera Diagnostics», США).

Для получения нуклеотидных последовательностей, соответствующих области C2-V5 гена *env* с координатами 7001–7647 (координаты даны для варианта ВИЧ-1 HXB2, регистрационный номер GeneBank K03455), фрагменты ДНК амплифицировали методом «гнездовой» ПЦР с использованием двух пар праймеров: Eп-vF1/EnvR1 [22] и ES7/ES8 [23] для 1-го и 2-го раундов соответственно.

Секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК проводили с использованием набора реагентов BigDye Terminator™ v. 3.1 на автоматическом секвенаторе ABI 3130 («Applied Biosystems», США) с последующей обработкой полученных последовательностей в пакете программ DNASTAR Lasergene v. 8.0 («DNASTAR», США).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей методом ClustalW и филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (ML, maximum-likelihood) проводили с помощью программы MEGA v.5.05 (<http://megasoftware.net>). Выбор модели нуклеотидных замен осуществляли с использованием приложения jModeltest 2.0 (<http://jmodeltest.org>). В качестве оптимальной была выбрана обобщенная реверсивная модель со скоростью нуклеотидных замен описываемой гамма-распределением (GTR + G).

Анализ мутаций ЛУ проводили с использованием ViroSeq HIV-1 Genotyping System Software v. 2.8 и ба-

зы данных Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu/>).

Подтипы ВИЧ-1 определяли с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool (версия 2), представленной на сайте Стэнфордского университета (<http://hivdb.stanford.edu>)

Определение степени внутригрупповой изменчивости осуществляли путем расчета матрицы генетических дистанций, полученной при попарном сравнении последовательностей друг с другом с использованием модели Тамура-Нея (TrN) в пакете программы MEGA v.5.05.

Тропизм ВИЧ-1 определяли методом SMV с применением онлайн ресурса geno2pheno, доступного по адресу <http://www.geno2pheno.org/cgi-bin/geno2pheno.pl>. Для предсказания фенотипа была выбрана вероятностная ложноположительных результатов, т.е. вероятность классификации R5-вирусов как X4, равная 10%, в соответствии с рекомендациями Европейской экспертной группы по тестированию тропизма ВИЧ-1 в клинике (Recommendations from the European Consensus Group on Clinical Management of HIV-1 Tropism Testing) [24].

Статистический анализ проводили в пакете прикладных программ Statistica v.10.0 («StatSoft», США). Статистическую значимость различий оценивали с использованием *U*-теста Манна-Уитни и критерия χ^2 в модификации Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Нуклеотидные последовательности от пациентов из Иркутской области, выделенные в 1999 г., получены из базы данных нуклеотидных последовательностей GeneBank (регистрационные номера: KM247291-KM247294; KM247296-KM247300, AF284043-AF284054, AF284056).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были получены нуклеотидные последовательности области гена *pol* и *env* ВИЧ-1 от 97 и 69 ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих на территории Иркутской области, соответственно. Пациенты были разделены на группы исходя из основного фактора риска заражения ВИЧ-1 на ПИН и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов. Распределение обследованных пациентов по полу, возрасту и основным факторам риска заражения представлено в табл. 1.

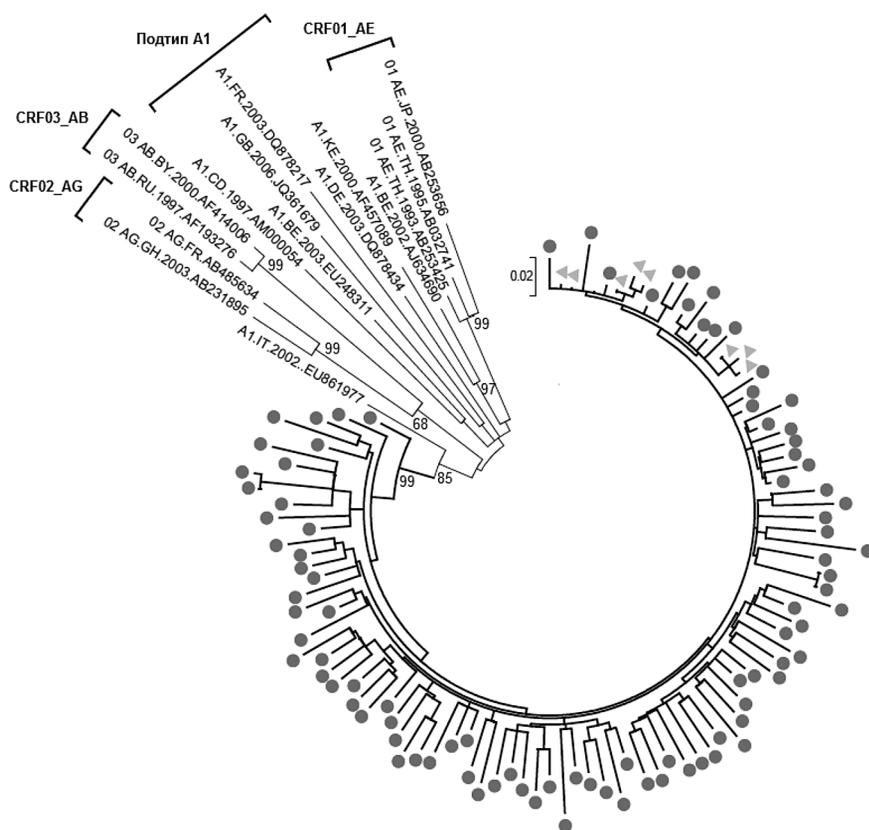
Как видно из табл. 1, распределение образцов по основным факторам риска передачи вируса составило 49,5 и 50,5% для ПИН и группы лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, соответственно. Таким образом, на сегодняшний день наблюдается увеличение доли гетеросексуального пути передачи вируса

Таблица 1

Распределение исследованных пациентов по основным факторам риска заражения ВИЧ-1

| Группа риска | Количество образцов, <i>n</i> (%) | Пол | | Возраст (медиана), годы* |
|--------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| | | мужчины, <i>n</i> (%) | женщины, <i>n</i> (%) | |
| ПИН | 48 (49,5) | 35/48 (72,9) | 13/48 (27,1) | 32,7 ± 0,5 (33) |
| ГС | 49 (50,5) | 8/49 (16,4) | 41/49 (83,6) | 32,7 ± 0,9 (31) |
| Всего... | 97 (100) | 43/97 (44,3) | 54/97 (55,7) | 32,7 ± 0,5 (33) |

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – среднее ± стандартная ошибка; ГС – лица, заразившиеся гетеросексуальным путем.



Филогенетическое ML-дерево образцов ВИЧ-1 подтипа A1 из Иркутской области. Последовательности гена участка *pol* образцов ВИЧ-1 из Иркутской области ($n = 97$) отмечены кругом, референс-последовательности варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1 – треугольником. Кластер варианта IDU-A ВИЧ-1 выделен жирным шрифтом. В качестве группы сравнения были использованы нуклеотидные последовательности аналогичного региона генома ВИЧ-1 подтипа A1, CRF01_AE, CRF02_AG и CRF03_AB. Статистическая поддержка узлов ветвления представлена в виде бутстрэп-значений (указаны значения 60% и более), полученных при 500 итерациях.

в Иркутской области по сравнению с ситуацией на период 1999–2000 гг., когда доминирующим (98%) был парентеральный путь передачи при внутривенном потреблении психоактивных препаратов [5]. Распределение пациентов по полу в исследуемых группах риска было неодинаковым. В группе ПИН большинство составляют лица мужского пола (72,9%), тогда как в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, – женщины (83,6; $p < 0,01$). Средний возраст ВИЧ-инфицированных пациентов в обеих группах оказался одинаковым и составил 32,7 года. Необходимо отметить, что средний возраст ВИЧ-инфицированных пациентов, исследованных в ходе вспышки ВИЧ-инфекции среди ПИН в 1999 г., составлял 23,3 года [5], тогда как в настоящем исследовании он был 32,7 года. По результатам опроса пациентов при сборе эпидемиологического анамнеза установлено, что большинство пациентов из группы ПИН-2012 (82%) заразились ВИЧ-1 в период 1999–2001 гг. Таким образом, можно утверждать, что значительная часть ВИЧ-инфицированных ПИН из когорты 2012 г. заражена вариантом вируса, который циркулировал среди лиц, употребляющих психоактивные препараты внутривенно, в 1999 г.

Изучение распространенности генетических вариантов ВИЧ-1. В ходе анализа полученных последователь-

ностей была установлена принадлежность всех исследованных образцов ($n = 97$) ВИЧ-1 к подтипу A1.

Филогенетический анализ 97 нуклеотидных последовательностей области гена *pol* ВИЧ-1 с генотипом A1, кодирующих протеазу, выделенных в Иркутской области в 2012 г., показал, что все они (97/97, 100%) образуют единый кластер с 9 ранее полученными нуклеотидными последовательностями той же области генома варианта IDU-A подтипа A1 ВИЧ-1, выделенными в Иркутской области в 1999 г. (см. рисунок). Кроме того, все исследуемые образцы принадлежат к одной монофилиетической группе с вариантом ВИЧ-1 EU861977 (A-01), который, по данным литературы, является родоначальником варианта IDU-A [25]. Исследование вариантов ВИЧ-1, относящихся к монофилиетической группе IDU-A ВИЧ-1, не выявило групповой специфичности при анализе нуклеотидных последовательностей, выделенных от пациентов из группы риска ПИН и лиц, инфицированных при гетеросексуальных контактах. Таким образом, установлено, что на территории Иркутской области в 2012 г. по-прежнему доминирует генетический вариант IDU-A.

Анализ резистентности ВИЧ-1. Для выявления случаев передающейся резистентности среди пациентов из Иркутской области провели анализ мутаций ЛУ по области гена *pol*, кодирующей протеазу и 2/3 части обратной транскриптазы. В ходе анализа 82 образцов от пациентов, не получающих АРВ-терапию, не было выявлено ни одной первичной мутации ЛУ. В 52 (52/82, 63,4%) образцах, полученных от «наивных» пациентов, выявлена мутация A62V. У 20 (20/82, 24,4%) пациентов замена A62V была ассоциирована с мутациями L101/V, L33F, A71T и V118I. Наиболее часто мутация A62V регистрировалась в сочетании с вторичной мутацией L101/V ($p < 0,01$), ассоциированной с чувствительностью к ингибиторам протеазы (19/20, 95%). Как было обнаружено ранее, замена A62V в области обратной транскриптазы для варианта A1 (IDU-A) является мутацией полиморфизма [26] и не обуславливает ЛУ в отсутствие первичных мутаций (например, Q151M) [7, 27]. Полное отсутствие мутаций, ассоциированных с ЛУ, выявлено только у 8 (8/82, 9,8%) пациентов.

В ходе анализа 9 нуклеотидных последовательностей, полученных от «наивных» пациентов из Иркутской области в 1999 г., также не было зарегистрировано первичных мутаций ЛУ, а замена A62V обнаружена во всех образцах (9/9, 100%).

Для 15 пациентов, находящихся на АРВ-терапии, использовали следующие схемы лечения: ламивудин/зидовудин (ЗТС /AZT) либо ламивудин /абакавир (ЗТС/АВС) или ламивудин/ставудин (ЗТС/d4Т), третьим препаратом схемы был либо лопинавир/ритонавир (LPV/r), либо

Таблица 2

Основные мутации ЛУ, выявленные в области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы, у ВИЧ-инфицированных лиц, находящихся на АРВ-терапии (*n* = 5)

| Класс препаратов | Мутации | Количество | |
|------------------|---------|------------|------|
| | | абс. | % |
| ННИОТ | L100I | 1 | 12,5 |
| | K101E | 2 | 25 |
| | K103N | 1 | 12,5 |
| | V106A | 1 | 12,5 |
| | G190S | 2 | 25 |
| | P225H | 1 | 12,5 |
| НИОТ | M41L | 1 | 11,1 |
| | L74V | 2 | 22,2 |
| | M184V | 4 | 44,5 |
| | K219E | 2 | 22,2 |

дарунавир, либо дарунавир/ритонавир (DRV/RTV), либо эфавиренц (EFV).

У 10 (10/15, 66,7%) из этих пациентов не было выявлено первичных мутаций ЛУ, при этом 5 из них через некоторое время после начала приема АРВ-препаратов самостоятельно отказались от продолжения курса терапии. У 5 пациентов, продолживших АРВ-терапию, отмечена высокая вирусная нагрузка (1185–504 589 копий РНК/мл), что наряду с отсутствием первичных мутаций ЛУ, вероятно, может свидетельствовать о низкой приверженности лечению данных лиц.

Первичные мутации ЛУ были выявлены у 5 пациентов, получающих АРТ (5/15, 33,3%). Значение показателя вирусной нагрузки, полученное на фоне терапии, у данных лиц лежало в интервале 4087–337987 РНК/мл, что указывало на неэффективность терапии. С учетом полученных данных можно говорить о необходимости замены терапии только у этих 5 пациентов, находящихся на лечении. Зарегистрированные первичные мутации ЛУ, выявленные у лиц, получающих АРВ-терапию, представлены в табл. 2. Как видно из представленных данных, наиболее часто встречающимися мутациями ЛУ к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (ННИОТ) были замены K101E и G190S (факт высокой частоты встречаемости этой мутации у лиц, инфицированных вариантом IDU-A, был нами сообщен ранее [28]), к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы (НИОТ) – замена M184V. Мутаций ЛУ к ингибиторам протеазы выявлено не было.

Оценка степени генетической изменчивости. Исследования, проведенные в 1999 г., показали очень низкие генетические различия между вирусами, циркулирующими в среде ПИН. Среднее значение генетической дистанции между вариантами ВИЧ-1 в группе ПИН по области гена *env*, кодирующей участок С2-V3, выделенными в Иркутске и Иркутской области в 1999–2000 гг., не превышало 1,8% [5]. Такую гомогенность популяции, несмотря на высокую способность вируса к изменчивости, можно объяснить особенностями заражения в группе ПИН. В результате инфицирования лиц в группе ПИН (в большинстве случаев из одного источника) происходит практически одновременное заражение вирусом сразу нескольких человек через нестерильный медицинский

инструментарий либо с наркотическим препаратом. Таким образом, лица в этой группе риска инфицируются фактически одним и тем же вариантом вируса, и генетическое разнообразие ВИЧ-1 в популяции остается на невысоком уровне. Однако, по данным литературы [29, 30], со временем гетерогенность вирусной популяции в пределах одной группы риска увеличивается.

Для получения данных о генетических изменениях в популяции ВИЧ-1 среди ПИН на территории Иркутской области в 1999 и 2012 гг. были определены генетические дистанции по С2-V3 области гена *env* и области гена *pol*, кодирующей протеазу и часть обратной транскриптазы. Для анализа областей генов *env* и *pol* использовали 34 и 36 нуклеотидных последовательностей соответственно, полученных в настоящем исследовании, а также 13 и 9 нуклеотидных последовательностей указанных областей генов, полученных ранее.

Значения средней внутригрупповой изменчивости (\pm стандартная ошибка) области гена *env*, кодирующей участок С2-V3 (размер фрагмента – 234 нуклеотидные пары (н. п.)), составили $12,88 \pm 1,23$ (диапазон 3,22–22,68) для образцов ВИЧ-1 2012 г. и $1,64 \pm 0,52$ (диапазон 0,43–4,05) для образцов 1999 г. По области гена *pol* (1302 н. п.) значения внутригрупповой изменчивости составили $2,16 \pm 0,19$ для образцов ВИЧ-1 2012 г. и $0,47 \pm 0,10$ для образцов 1999 г.

Статистически значимые различия генетической изменчивости в пределах групп 1999 и 2012 гг. в 7,9 раза по гену *env* ($p < 0,001$) и в 4,5 раза по гену *pol* ($p < 0,001$) свидетельствуют о том, что гетерогенность популяции ВИЧ-1 варианта IDU-A в данной группе риска значительно выросла по сравнению с таковой в начале эпидемии ВИЧ-инфекции среди ПИН в Иркутской области в 1999–2000 гг., что, по всей вероятности, является следствием естественной дивергенции между вирусами в популяции.

В связи с увеличением числа лиц, заразившихся вариантом IDU-A ВИЧ-1 в результате гетеросексуальных контактов, представляло интерес оценить генетическую изменчивость вируса в зависимости от пути передачи среди лиц, не получавших АРВ-терапию. С этой целью проведен сравнительный анализ генетических дистанций между вирусами, циркулирующими в группах ПИН и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов. Кроме того, в отдельную группу были выде-

Таблица 3

Генетическая изменчивость областей генов *env* и *pol* в исследованных группах риска заражения ВИЧ-инфекцией

| Группа риска | Ген | Нуклеотидные последовательности, <i>n</i> | Среднее \pm стандартная ошибка, % | Максимум–минимум, % |
|--------------|------------|---|-------------------------------------|---------------------|
| ПИН | <i>pol</i> | 36 | $2,16 \pm 0,19$ | 0,69–3,98 |
| | <i>env</i> | 34 | $10,70 \pm 0,82$ | 3,11–17,15 |
| ГС | <i>pol</i> | 33 | $2,94 \pm 0,20$ | 1,63–4,53 |
| | <i>env</i> | 28 | $13,33 \pm 0,95$ | 6,74–34,55 |
| ГС/ПИН | <i>pol</i> | 13 | $2,65 \pm 0,23$ | 1,16–3,82 |

Примечание. ГС/ПИН – лица, заразившиеся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН.

лены случаи заражения в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, на что указали 15,8% (13/82) пациентов из исследуемой когорты. Для анализа использовали участок гена *env*, кодирующий область C2-V5 (523 н. п.), и участок гена *pol*, кодирующий протеазу и 2/3 обратной транскриптазы (1302 н. п.). Значения генетических дистанций представлены в табл. 3.

Из представленных в табл. 3 результатов видно, что значение генетической дистанции по анализируемому участку гена *pol* в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов, в 1,3 раза выше, чем у ПИН ($p < 0,001$), и в 1,1 раза выше такового у лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН ($p = 0,001$). В свою очередь генетическая изменчивость в группе лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, достоверно ($p = 0,023$) выше, чем у ПИН. Таким образом, наблюдается увеличение генетической дистанции по области гена *pol* при «переходе» ВИЧ-1 из группы риска ПИН в группу риска лиц, основным фактором заражения которых был гетеросексуальный контакт. При этом лица, составляющие группу половых партнеров ПИН, являются промежуточным связующим звеном в цепи передачи вируса из группы риска ПИН в группу лиц с гетеросексуальным путем передачи, не имеющих половых контактов с ПИН (так называемая проводниковая группа).

Схожие различия в степени генетической изменчивости были выявлены между группами риска ПИН и лиц с гетеросексуальным путем передачи вируса при анализе гена *env* ВИЧ-1. Степень изменчивости указанного гена была 1,2 раза ($p < 0,01$) выше среди лиц, инфицированных в результате гетеросексуальных контактов. Ввиду малой величины выборки лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов с ПИН, значение генетической дистанции в данной группе не учитывалось при сравнительном анализе по области гена *env*.

Таким образом, можно заключить, что степень гетерогенности популяции ВИЧ-1 связана с изменением пути передачи вируса и определяется, вероятно, как естественной дивергенцией между вирусами в популяции, так и эволюционным процессом в ходе смены группы риска. Однако не стоит исключать и другие причины, которые могут влиять на уровень изменчивости популяции ВИЧ-1, что требует дальнейших исследований.

Анализ тропизма. При анализе тропизма вариантов IDU-A ВИЧ-1 ($n = 69$) с целью оценки распространенности R5- и R5X4/X4-тропных вариантов вируса, циркулировавших на территории Иркутской области, было установлено, что 52 (52/69, 75,3%) образца являются R5-тропными и 17 (17/69, 24,7%) – R5X4/X4-тропными вариантами. Данное распределение по типу используемых вирусом корцепторов согласуется с результатами аналогичного исследования вирусов варианта IDU-A, проведенного на территории России в 2014 г., согласно которому доля R5-тропных вариантов составила 73,9%, а R5X4/X4-тропных – 26,1% [31].

Таким образом, полученный в настоящем исследовании показатель распространенности X4-тропных вирусов среди варианта IDU-A в популяции ВИЧ-инфицированных в Иркутской области совпадает с таковым по России в целом.

Полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности депонированы в GeneBank

под номерами KC254616-KC254643, KC509769-KC509886, KP057516-KP057579 (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>).

Выводы

1. На территории Иркутской области в 2012 г. продолжал доминировать генетический вариант ВИЧ-1 IDU-A подтипа A1 (97/97, 100%).

2. В ходе исследования у пациентов, не получающих лечения АРВ-препаратами, не было выявлено первичных мутаций ЛУ.

3. Гетерогенность популяции вирусов варианта IDU-A ВИЧ-1, циркулировавших среди ПИН, по генам *env* и *pol* в 2012 г. выросла в 7,9 и 4,5 раза соответственно по сравнению с 1999 г. ($p < 0,0001$).

4. Выявлены достоверные различия ($p < 0,05$) между генетической изменчивостью вируса по генам *env* и *pol* в группах риска ПИН (10,70 и 2,16% соответственно) и лиц, заразившихся в результате гетеросексуальных контактов (13,33 и 2,94% соответственно).

5. Среди вирусов варианта IDU-A, выделенных на территории Иркутской области в 2012 г., распространенность вариантов с фенотипом R5X4/X4 составляет 24,7%.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (проект №15-15-00050).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (П. П. 8–14, 16–20, 23–25, 28–31 СМ. REFERENCES)

1. Ладная Н.Н., Покровский В.В., Бобков А.Ф., Селимова Л.М., Савченко И.Г., Казеннова Е.В. и др. Распространение субтипов ВИЧ-1 в России. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1998; (3): 19–23.
2. Бобков А.Ф., Казеннова Е.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А., Ладная Н.Н., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-вирусологические особенности эпидемии ВИЧ-инфекции в России и других странах СНГ. *Вестник РАМН*. 2003; (12): 83–5.
3. Суханова А.Л., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р., Кравченко А.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А. и др. Варианты вируса иммунодефицита человека типа 1, обнаруживаемые в России среди инфицированных половым путем. *Вопросы вирусологии*. 2004; (1): 4–7.
4. Справка: ВИЧ-инфекция в Российской Федерации в 2012 г. Количество ВИЧ-инфицированных в России за 2012 год. Available at: <http://www.hivrussia.ru/stat/2012-3.shtml>.
5. Покровский В.В., Бобков А.Ф., Казеннова Е.В., Селимова Л.М., Ханина Т.А., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика вспышки ВИЧ-инфекции в Иркутской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2001; (4): 18–20.
6. Покровский В.В., Юрин О.Г., Кравченко А.В., Потехаев Н.С. Первый случай ВИЧ-инфекции у гражданина СССР. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992; (11): 19–22.
7. Казеннова Е.В., Антонова О.В., Кузин С.Н., Серкина Е.П., Соколова С.С., Васильев А.В. и др. Молекулярно-эпидемиологическое исследование распространения ВИЧ-1 на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2011; 56 (5): 30–4.
15. Носик М.Н. Проблема резистентности вируса иммунодефицита человека к антиретровирусным препаратам. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59 (4): 5–9.
21. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Предсказание фенотипа R5/X4 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, с использованием компьютерных методов. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54 (3): 17–21.
22. Лага В.Ю., Казеннова Е.В., Васильев А.В., Лаповок И.А., Исмаилова А., Бейшеева Н. и др. Молекулярно-генетическая харак-

теристика вариантов ВИЧ-1, распространенных на территории Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57 (5): 26–32.

26. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена *pol* варианта ВИЧ-1 IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессия*. 2012; 4 (4): 44–51.
27. Волова Л.Ю., Грезина Л.А., Уланова Т.И. Результаты исследования резистентности ВИЧ-1 на территории Ямала и сравнение частоты встречаемости мутаций с различными значениями «Score». *Клиническая лабораторная диагностика*. 2010; (2): 43–6.

REFERENCES

1. Ladnaya N.N., Pokrovskiy V.V., Bobkov A.F., Selimova L.M., Savchenko I.G., Kazennova E.V. et al. Spread of HIV-1 subtypes in Russia. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 1998; 3 (5): 19–23. (in Russian)
2. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ladnaya N.N., Bobkova M.R. et al. The molecular and virological specificities of the epidemic of HIV infections in Russia and other CIS countries. *Vestnik RAMN*. 2003; (12): 83–4. (in Russian)
3. Sukhanova A.L., Kazennova E.V., Bobkova M.R., Kravchenko A.V., Selimova L.M., Khanina T.A. et al. Variants of human immunodeficiency virus type 1, detected in Russia among those infected by the sexual route. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (1): 4–7. (in Russian)
4. HIV infection in the Russian Federation in 2012. Number of HIV-infected people in Russia in 2012. Available at: <http://www.hivrussia.ru/stat/2012-3.shtml> (in Russian)
5. Pokrovskiy V.V., Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Bobkova M.R. et al. Moleculo-epidemiological characteristics of a HIV infection outbreak in the Irkutsk region. *Zhurnal mikrobiologii*. 2001; (4): 18–20 (in Russian)
6. Pokrovskiy V.V., Yurin O.G., Kravchenko A.V., Potekaev N.S., Gabrilovich D.I., Makarova N.Y. et al. 1-st case of HIV-infection in a citizen of the USSR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1992; (11): 19–22. (in Russian)
7. Kazennova E.V., Antonova O.V., Kuzin S.N., Serkina T.P., Sokolova L.S., Vasil'ev A.V. et al. Molecular and epidemiology studies of HIV-1 prevalence in the Republic of Sakha (Yakutia). *Voprosy virusologii*. 2011; 56 (5): 30–4. (in Russian)
8. Peeters M., Sharp P.M. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS*. 2000; 14(Suppl. 3): S129–40.
9. Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988; 242 (4882): 1171–3.
10. Robertson D.L., Sharp P.M., McCutchan F.E., Hahn B.H. Recombination in HIV-1. *Nature*. 1995; 374 (6518): 124–6.
11. Santoro M.M., Perno C.F. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol*. 2013; 2013: 481314.
12. Abram M.E., Parniak M.A. Virion instability of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase (RT) mutated in the protease cleavage site between RT p51 and the RT RNase H domain. *J. Virol*. 2005; 79 (18): 11952–61.
13. Lukashov V.V., de Ronde A., de Jong J.J., Goudsmit J. Epidemiology of HIV-1 and emerging problems. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2000; 16 (4): 463–6.
14. Ammaranond P., Cunningham P., Oelrichs R., Suzuki K., Harris C., Leas L. et al. Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1. *J. Clin. Virol*. 2003; 26(2): 153–61.
15. Nossik M.N. A Problem of the HIV drug resistance. *Voprosy virusologii*. 2014; 59 (4): 5–9. (in Russian)
16. Araujo L.A., Almeida S.E. HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition. *Viruses*. 2013; 5(2): 595–604.
17. Miranda L.R., Schaefer B.C., Kupfer A., Hu Z., Franzusoff A. Cell surface expression of the HIV-1 envelope glycoproteins is directed from intracellular CTLA-4-containing regulated secretory granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99(12): 8031–6.
18. Lin G., Baribaud F., Romano J., Doms R.W., Hoxie J.A. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins site. *J. Virol*. 2003; 77 (2): 931–42.
19. Sirois S., Sing T., Chou K.C. HIV-1 gp120 V3 loop for structure-based drug design. *Curr. Protein Pept. Sci*. 2005; 6(5): 413–22.
20. Hendrix C.W., Collier A.C., Lederman M.M., Schols D., Polard R.B., Brown S. et al. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2004; 37 (2): 1253–62.
21. Vasilyev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Prediction of phenotype R5/X4 of HIV-1 variants circulating in Russia, by using computer methods. *Voprosy virusologii*. 2009; 54 (3): 17–21. (in Russian)
22. Laga V.Yu., Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Lapovok I.A., Ismailova A., Beysheeva N. et al. Molecular-genetic characterization of the HIV-1 variants abundant in Kirghizia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57 (5): 26–32. (in Russian)
23. Delwart E., Shpaer E.G., Louwagie J., McCutchan F.E., Grez M., Rübnsamen-Waigmann H. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay analysis of HIV-1 env genes. *Science*. 1993; 262(5137): 1257–61.
24. Vandekerckhove L., Wensing A., Kaiser R., Brun-Vézinet F., Clotet B., De Luca A. et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect. Dis*. 2011; 11(5): 394–407.
25. Riva C., Romano L., Saladini F., Lai A., Carr J.K., Francisci D. et al. Identification of a possible ancestor of the subtype A1 HIV Type 1 variant circulating in the former Soviet Union. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2008; 24 (10): 1319–25.
26. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant *pol* gene. *VICH-infektsiya i immunosupressiya*. 2012; 4 (4): 44–51. (in Russian)
27. Volova L.Yu., Grezina L.A., Ulanova T.I. The results of a study of HIV-1 resistance in the area of Yamal and the comparison of the frequency of mutations with different score values. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2010; (2): 43–6. (in Russian)
28. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014; 28(17): F1–8.
29. Lukashov V., Op de Coul E.L., Coutinho R.A., Goudsmit J. HIV-1 strains for Dutch injecting drug users in heterosexually infected individuals in the Netherlands. *AIDS*. 1998; 12 (6): 635–41.
30. Ou C.Y., Takebe Y., Luo C.C., Kalish M., Auwanit W., Bandea C. et al. Wide distribution of two subtypes of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992; 8 (8): 1471–2.
31. Lopatukhin A., Kireev D., Kuevda D., Korovina G., Dementeva N., Pokrovskaya A. et al. First broad experience of HIV-1 genotypic tropism testing in the Russian Federation. In: *14th European AIDS Conference, October 16–19, 2013*. Brussels, Belgium; 2013: 206–7.

Малолкина Е.А.^{1,2}, Лебедева А.Л.^{1,3}, Кулибин А.Ю.², Евдокимов В.В.^{1,4}, Курило Л.Ф.³, Сорокина Т.М.³, Тюленев Ю.А.¹, Науменко В.А.¹, Куш А.А.¹

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕРПЕСВИРУСОВ СО ЗРЕЛЫМИ СПЕРМАТОЗОИДАМИ ЧЕЛОВЕКА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO*

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ² ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова» РАН, 119334, г. Москва; ³ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва; ⁴ ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы, 127473, г. Москва

ДНК герпесвирусов человека (ГВЧ), в том числе вируса простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловируса (ЦМВ), часто присутствует в эякулятах пациентов с различными заболеваниями урогенитального тракта и бесплодием. Установлено, что по крайней мере часть вирусной ДНК ассоциирована с клеточной фракцией эякулята, однако оставалось неясным, как вирус попадает в эякулят, может ли он находиться внутри гамет, способен ли инфицировать зрелые половые клетки, в том числе подвижные сперматозоиды. Для решения этих вопросов была использована разработанная нами ранее и оптимизированная в настоящей работе модель герпесвирусной инфекции мужских гамет *in vitro* и проведено исследование взаимодействия ЦМВ и ВПГ со сперматозоидами человека. Анализ иммунофлюоресцентной окраски гамет на вирусные антигены установил, что ЦМВ инфицирует 2% гамет *in vitro*, в то время как ВПГ – 17,26 ± 2,58% сперматозоидов. Во фракции прогрессивно подвижных сперматозоидов доля инфицированных гамет составляла 13,99 ± 4,64%. Локализацию антигенов ВПГ изучали с помощью конфокальной микроскопии. В части клеток вирусный белок gB обнаружен на мембране сперматозоидов. Наряду с этим оптическое сканирование других клеток показало внутриклеточную локализацию вирусных белков. Чаще всего вирусные белки наблюдали в головке и шейке сперматозоидов, реже – в средней части и хвосте, редко – в экваториальной области. В целом антигены ГВЧ при заражении *in vitro* располагались в тех же участках сперматозоидов, что и в эякулятах инфицированных пациентов. Доля гамет, содержащих ДНК ВПГ по данным ДНК-ДНК-гибридизации *in situ* составляла 16,94 ± 5,28%, что соответствует данным о степени заражения гамет, полученным с помощью иммунофлюоресценции. Можно заключить, что зрелые мужские гаметы способны инфицироваться ГВЧ при прохождении по половому тракту, прочно связываться с клеточной мембраной и проникать внутрь сперматозоида. Взаимодействие ГВЧ с прогрессивно подвижными сперматозоидами указывает на возможность вертикальной передачи вирусов при оплодотворении и целесообразность диагностики герпесвирусной инфекции эякулята.

Ключевые слова: герпесвирусы человека; вирус простого герпеса; цитомегаловирус; сперматозоиды человека; инфицирование гамет *in vitro*; мужское бесплодие; вертикальная передача вирусов; ДНК-ДНК-гибридизация; локализация вирусных антигенов; конфокальная микроскопия.

Для цитирования: Малолкина Е.А., Лебедева А.Л., Кулибин А.Ю., Евдокимов В.В., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Куш А.А. Взаимодействие герпесвирусов со зрелыми сперматозоидами человека в модельной системе *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 119-125.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-119-125

Malolkina E.A.^{1,2}, Lebedeva A.L.^{1,3}, Kulibin A.Yu.², Evdokimov V.V.^{1,4}, Kurilo L.F.³, Sorokina T.M.³, Tulenev Ju.A.¹, Naumenko V.A.¹, Kushch A.A.¹

INTERACTION OF HERPESVIRUSES WITH MATURE HUMAN SPERMATOZOA IN THE MODEL SYSTEM *IN VITRO*

¹ Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation; ² Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334, Russian Federation; ³ Research Center for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation; ⁴ Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Department of Healthcare of the Government of Moscow, Moscow, Russia

The DNA of human herpesviruses (HHV), including the herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV), is often identified in ejaculates of patients with urogenital diseases and infertility. At least a part of viral DNA is associated with cell fraction of ejaculate. However, it remains unclear how the semen is infected by the virus. It can be located in gametes or be capable of infecting mature germ cells, including motile sperm cells. In order to resolve this issue, interactions of the CMV and HSV with human sperm cells were studied using an original optimized model of the herpesviral infection of male gametes *in vitro*. The analysis of the immunofluorescent staining of gametes for viral antigens has shown that CMV infected 2% gametes, while HSV infected 17.26 ± 2.58% gametes. The fraction of progressively motile sperm cells contained 13.99 ± 4.64% infected cells. Localization of HSV was studied by the confocal microscopy. Sometimes, viral gB protein was found on sperm cell membrane. In addition, optical scanning of other cells has shown the intracellular localization of the viral proteins. In the majority of spermatozoa, the viral proteins were observed in the head and neck. In some cells, they were located in the middle piece or, rarely, in the equatorial segment. In general, after *in vitro* infection HSV antigens were located in the same areas of the sperm cells as in ejaculates from infected patients. According to DNA-DNA hybridization *in situ*, gametes containing HSV

Для корреспонденции: Малолкина Екатерина Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: kate.ma85@gmail.com

DNA accounted for 16.94 ± 5.28%, which is consistent with the results obtained in the immunofluorescence assay. It can be concluded that mature male gametes are infected by HHV in the genital tract, where the virus binds to the sperm cell membrane and enters the cell. Interaction of HHV with progressively motile sperm cells implies a vertical viral transmission upon fertilization and points to the necessity of testing ejaculate for herpesviruses infections.

Key words: *human herpesviruses; herpes simplex virus; cytomegalovirus; human sperm; infection of gametes in vitro; male infertility; vertical transmission; DNA-DNA hybridization; localization of viral antigens; confocal microscopy.*

For citation: Malolina E.A., Lebedeva A.L., Kulibin A.Yu., Evdokimov V.V., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Tulenev Ju.A., Naumenko V.A., Kushch A.A. Interaction of herpesviruses with mature human spermatozoa in the model system *in vitro*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 119-125. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-119-125

For correspondence: Ekaterina A. Malolina, Candidate of Biology, Research scientist, Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: kate.ma85@gmail.com

Information about authors:

Malolina E.A., <http://orcid.org/0000-0003-3539-6829>

Kulibin A.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-5532-6794>

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

Evdokimov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-3910-2488>

Kurilo L.F., <http://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 14-04-32276 mol_a).

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

Received 09 November 2015
Accepted 19 November 2015

Введение

Инфекционные заболевания и воспалительные процессы в урогенитальном тракте занимают одно из первых мест среди причин мужского бесплодия. В настоящее время предостаточно немало свидетельств, доказывающих, что вирусные инфекции могут приводить к снижению фертильности либо за счет прямого токсического воздействия на клетки, либо вызывая иммунный ответ и развитие воспаления [1]. Если роль вирусов парогита или иммунодефицита человека в развитии бесплодия не вызывает сомнений, то степень воздействия на мужскую фертильность герпесвирусов человека (ГВЧ) до конца не выяснена. Во многих исследованиях установлено присутствие ГВЧ в эякулятах [2], однако частота их встречаемости сильно варьирует, что связано, по-видимому, с разной чувствительностью применяемых методов детекции вируса, неодинаковой распространенностью вирусов в различных странах, объемом выборок и особенностями контингента обследованных пациентов. Так, некоторые авторы находят вирус простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов менее чем у 4% мужчин, как фертильных, так и страдающих бесплодием [2]. В то же время, например, в работах, выполненных на материале греческих клиник [3, 4], ВПГ в эякуляте выявляют у 29% и даже у 50% пациентов с проблемами фертильности, при этом используют гнездовую (nested) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию *in situ*. В выборке пациентов с бесплодием, проходящих курс лечения в китайских клиниках, ВПГ обнаружен в 25% эякулятов [5], в японских клиниках – в 24% [6]. В работе Е.Н. Бочаровой и соавт. [7], проведенной на российской популяции пациентов, страдающих бесплодием, ВПГ выявлен в половине эякулятов, для обнаружения вируса использован комплекс методов: иммунофлюоресценция, гибридизация *in situ* и другие. В работе Р.Р. Климовой и соавт. [8] по данным изучения цельных эякулятов ВПГ присутствовал в 31% случаев у пациентов с проблемами фертильности и в 17% случаев у фертильных мужчин. Во фракции активно подвижных сперматозоидов ВПГ найден в 30 и 8% эякулятов соответственно. Некоторые исследователи не находят связи между присутствием

ВПГ в эякуляте и ухудшением показателей спермограммы [2]. Другие отмечают снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в эякулятах, положительных на ВПГ, а также увеличение в них содержания морфологически аномальных форм гамет [2, 8, 9]. Также есть данные о том, что в группе пациентов, у жен которых в анамнезе имелись спонтанное прерывание беременности и неудачи экстракорпорального оплодотворения, высок уровень инфицирования сперматозоидов ВПГ [10]. Частота обнаружения ДНК другого представителя ГВЧ – цитомегаловируса (ЦМВ) в эякуляте здоровых доноров обычно колеблется в пределах 3–5%, в эякуляте пациентов с бесплодием – от 1,4 до 56,5% [2]. В проведенном нами [11] скрининге эякулятов пациентов с различными заболеваниями мочеполового тракта методом ПЦР установлено, что ЦМВ часто встречается у страдающих бесплодием мужчин с хроническими воспалительными заболеваниями мочеполовой системы, причем ДНК ЦМВ ассоциирована с клеточной фракцией эякулята. Установлено, что по крайней мере часть вирусной ДНК ассоциирована с клеточной фракцией эякулята, и это ставит ряд вопросов: как вирус попадает в эякулят, может ли он находиться внутри гамет, способен ли инфицировать зрелые мужские половые клетки и какова форма герпесвирусной инфекции сперматозоидов (литическая, abortивная, латентная). Пути проникновения вирусов в мужские гаметы до сих пор не ясны. Заразить зрелые сперматозоиды ЦМВ и ВПГ до недавнего времени не удавалось [12, 13]. Высказывалось предположение, что проникновение ГВЧ возможно лишь в ранних стадиях сперматогенеза в клетки с активно транскрибируемым хроматином. Нам удалось разработать модель заражения сперматозоидов *in vitro* и впервые доказать принципиальную возможность инфицирования зрелых гамет ЦМВ [11]. Поскольку выяснение вопроса о внутригаметной герпесвирусной инфекции имеет значение для оценки влияния ГВЧ на фертильность, а также для решения проблемы вертикальной передачи ГВЧ, цель настоящей работы состояла в оптимизации модельной системы *in vitro* и детальном изучении с ее помощью взаимодействия ГВЧ со сперматозоидами человека.

Материал и методы

Клинический материал. Образцы спермы получены от мужчин, поступивших для профилактического обследования в Медико-генетический научный центр. До исследования информированное согласие на участие в нем было получено от каждого пациента. Процедуры исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены местным комитетом по биоэтической этике в ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Образцы эякулята пациенты получали путем мастурбации после 3-дневного полового воздержания.

ПЦР в реальном времени. Для обнаружения ДНК ГВЧ методом ПЦР использовали наборы реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Москва): комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала АмплиСенс ДНК-сорб-В; набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ЦМВ, вируса Эпштейна–Барр и ГВЧ 6-го типа АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL; набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени для определения ВПГ 1-го и 2-го типов АмплиСенс HSV1, II-FL. β -глобиновый ген применяли в качестве эндогенного внутреннего контроля.

В экспериментах использовали образцы, не содержащие ДНК ГВЧ.

Инфицирование сперматозоидов. В работе использовали штаммы F ВПГ 1-го типа и ЦМВ AD 169, полученные из Государственной коллекции вирусов ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. ВПГ-1 накапливали путем пассирования на культуре клеток почечного эпителия зеленой маргаритки линии Vero в среде Игла MEM, ЦМВ – на культуре клеток фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ) в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбриона коровы. Инфекционную множественность вирусов определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек и выражали в бляшкообразующих единицах (БОЕ), содержащихся в 1 мл (БОЕ/мл), используя формулу:

$$A = a \cdot b / v,$$

где A – число БОЕ/мл; a – среднее число бляшек на 1 лунку; b – разведение вируса; v – объем вносимого вирусосодержащего материала.

Для заражения из образцов спермы выделяли подвижные сперматозоиды методом градиентного разделения с использованием среды Спермселект («ПанЭко», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Инфицирование гамет ГВЧ проводили при 37°C на шейкере в течение 0,5, 1 или 2 ч. Клетки заражали вирусами с множественностью инфицирования от 0,1 до 10 БОЕ на клетку. После инкубации с вирусом сперматозоиды несколько раз отмывали от неприкрепившихся вирусных частиц центрифугированием. Далее часть образцов продолжали инкубировать еще 18 ч при 37°C и 5% уровне CO₂ в воздухе. Оценивали подвижность сперматозоидов и готовили препараты фиксированных клеток – мазки.

Иммуноцитохимический анализ. Для выявления вирусных антигенов мазки сперматозоидов окрашивали первичными моноклональными антителами (МКА) к белку ЦМВ pp65, а также МКА к белкам ВПГ gB, ICP0 («Abcam», Великобритания), ICP4 («Abcam») и поликлональными антителами к структурным белкам ВПГ («Abcam»). Затем образцы инкубировали с соответствующими вторичными антителами и докрасивали ядра с помощью DAPI или пропидия йодида. Препараты анализировали и фотографировали на эпифлюоресцентном (Keyence BZ-9000, Япония) и конфокальном (Leica TCS

SP5 STED, Германия) микроскопах. Для локализации вирусных белков в инфицированных клетках изучали серийные оптические срезы с шагом 0,5–1 мкм.

Гибридизация *in situ*. Для выявления вирусной ДНК в клетках на цитологическом препарате применяли метод ДНК-ДНК-гибридизации *in situ*. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде («AppliChem», Германия). Использовали биотинилированные зонды ДНК ВПГ («Enzo Life Sciences», США) и набор Ultra Sensitive Enhanced Hrp-DAB *in situ* detection system («Enzo») в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов применяли пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0 и Biostat. Статистические различия анализировали с помощью критериев Стьюдента и Манна–Уитни. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для оптимизации инфицирования сперматозоидов *in vitro* были проведены эксперименты, при выполнении которых варьировали продолжительность инкубации клеток с вирусами, температуру инкубационной смеси, концентрацию клеток, количество и инфекционную активность вирусов. Установлено, что эффективность заражения сперматозоидов ЦМВ и ВПГ различалась. Так, после 2-часовой инкубации сперматозоидов человека с ЦМВ инфицировалось лишь небольшое количество клеток: положительный сигнал при окрашивании образцов МКА к мажорному белку тегумента ЦМВ pp65 наблюдали в 2% гамет. Представляло интерес сравнить количество клеток, зараженных *in vitro*, с количеством ЦМВ-инфицированных клеток в эякулятах обследованных пациентов. Анализ 7 положительных образцов, содержащих ДНК ЦМВ, показал, что доля инфицированных клеток значительно различалась и колебалась от 0,1 до 45%. При этом количество инфицированных клеток прямо зависело от количества ДНК ЦМВ в эякуляте, которое по данным ПЦР варьировало от 15 до 68 070 (медиана 6489) копий ДНК на 100 тыс. клеток.

При заражении *in vitro* сперматозоидов высокоактивным ВПГ-1 было обнаружено значительно больше инфицированных клеток по сравнению с ЦМВ уже после часовой инкубации. Подсчеты числа клеток, положительно окрашенных поликлональными антителами к гликопротеинам оболочки вируса и белку капсида ВПГ, показали, что эффективность заражения составила $17,26 \pm 2,58\%$. При этом доля инфицированных гамет статистически значимо не изменялась при их дальнейшем культивировании и через 18 ч после заражения составляла $19,06 \pm 4,18\%$. Жизнеспособность клеток после 18-часового инкубирования оставалась высокой и равнялась в среднем $90,7 \pm 7,5\%$ в контрольных образцах и $89,3 \pm 8,1\%$ в инфицированных ($p > 0,05$).

Для выяснения вопроса о влиянии заражения *in vitro* на подвижность сперматозоидов сравнивали долю прогрессивно подвижных гамет ($a + b$) в 10 образцах, зараженных вирусом, и в 10 контрольных неинфицированных образцах. Оказалось, что количество подвижных клеток через 18 ч после заражения статистически значимо не различалось и составляло $52,4 \pm 20,7\%$ в контроле и $59,2 \pm 19,2\%$ в опыте.

Важные данные получены при анализе подвижных сперматозоидов. Подсчеты показали, что через 18 ч после заражения во фракции подвижных сперматозоидов

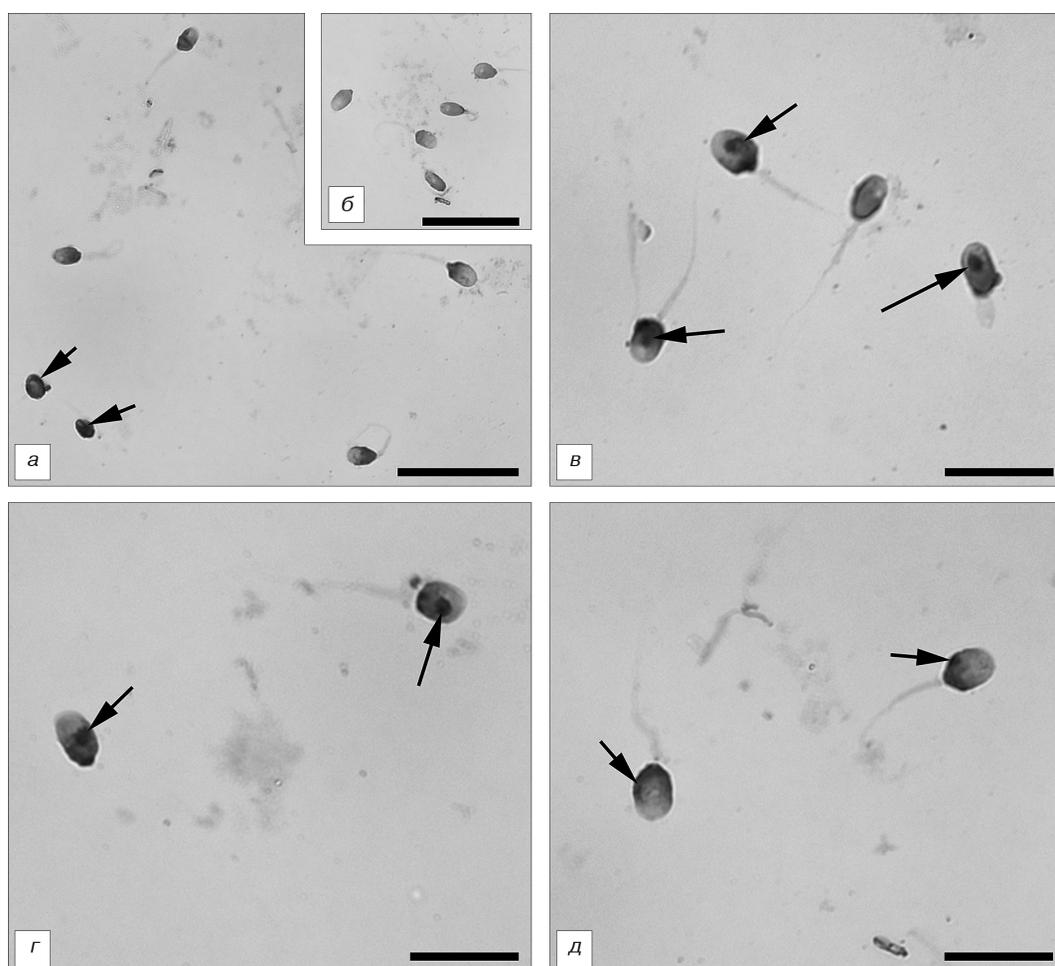


Рис. 3. Локализация ДНК ВПГ в сперматозоидах по результатам ДНК-ДНК-гибридизации *in situ*.

Гибридационный сигнал (коричневая окраска, стрелки) детектируется в головках сперматозоидов (а): в экваториальной зоне (в, з) и пришеечной части головки (д); б – отрицательный контроль. Ядра клеток докрасены гематоксилином Карацци. Масштаб: 20 мкм (а, б), 10 мкм (в–д).

находилось $13,99 \pm 4,64\%$ ВПГ-положительных клеток, что несколько меньше, чем в смешанной фракции подвижных и неподвижных гамет ($19,06 \pm 4,18\%$), однако это различие статистически незначимо ($p > 0,05$). Это указывает на потенциальную возможность вертикальной передачи ВПГ-инфекции со сперматозоидами.

Локализацию антигенов ВПГ в инфицированных сперматозоидах изучали методом сканирующей конфокальной микроскопии. Чаще всего вирусные белки, окрашенные поликлональными антителами, наблюдали в головке, в том числе в экваториальной области (рис. 1, а–ж, см. 3-ю полосу обложки), и шейке сперматозоидов (рис. 1, з, и). Реже прокрашивались средняя часть (рис. 1, и) и хвост. Встречали также различные сочетания окрашенных участков клетки. Изучение серийных оптических срезов показало, что идентифицированные вирусные белки локализованы внутри клетки.

Чтобы выяснить характер инфицирования сперматозоидов и форму инфекции, клетки изучали иммуноцитохимически с помощью МКА к сверххранним/ранним неструктурным белкам ВПГ-1 ICP0 и ICP4. При иммунофлюоресцентной окраске зараженных сперматозоидов не выявлено присутствия в гаметах этих антигенов.

В то же время окраска МКА к позднему вирусному белку гликопротеину gV ВПГ дала положительный ре-

зультат (рис. 2, см. 3-ю полосу обложки): gV был обнаружен на мембране сперматозоидов и локализован в шейке (см. рис. 2, а) и пришеечной части головки (см. рис. 2, в, з). Обращает на себя внимание нестандартная форма головки инфицированного сперматозоида на рис. 2, нарушение морфологии можно характеризовать как «клетка с округлой головкой».

Обнаружение вирусного белка на мембране может свидетельствовать о прочной связи вирусного белка с клеточной мембраной, а также о недостаточно эффективной отмывке зараженных клеток. Так как эффективность отмывки сперматозоидов от патогенов является весьма важным фактором при применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), мы провели сравнительный анализ вирусной нагрузки в эякулятах, содержащих ВПГ, полученных от 56 пациентов. После выделения фракции подвижных сперматозоидов клетки отмывали центрифугированием (10 мин при 1500 об/мин). Отмывку считали эффективной при уменьшении количества вирусных частиц во фракции подвижных сперматозоидов по сравнению с цельным эякулятом. В результате элиминация ВПГ была отмечена в 28 образцах из 56, т. е. эффективность отмывки (отношение количества эффективных отмывок к общему количеству отмывок) составила 50%.

Данные о присутствии в сперматозоидах ДНК ВПГ бы-

ли получены с помощью ДНК-ДНК-гибридизации гамет *in situ* с олигонуклеотидными зондами, комплементарными к участку вирусного генома (рис. 3). Доля гамет, содержащих ДНК ВПГ, составляла $16,94 \pm 5,28\%$ в образцах, отобранных сразу после заражения, и $18,90 \pm 6,05\%$ во фракции подвижных сперматозоидов через 18 ч после заражения ($p > 0,05$). Вирусная ДНК локализовалась в головке сперматозоидов, в том числе в экваториальной зоне (см. рис. 3, в, з), и области шейки (см. рис. 3, д).

Обсуждение

Ранее мы показали принципиальную способность ЦМВ инфицировать мужские гаметы *in vitro* [11], однако эффективность и характер взаимодействия вируса со сперматозоидами не были изучены. В настоящей работе установлено, что при искусственном заражении ЦМВ инфицирует сперматозоиды человека с низкой эффективностью (2%). В то же время в некоторых проанализированных нами образцах спермы от пациентов, положительных на ДНК ЦМВ, доля инфицированных гамет достигала 45%. Мы предположили, что низкая эффективность заражения ЦМВ связана с невысокой активностью использованного вируса (0,1–1 БОЕ на клетку). Данное предположение подтвердилось при анализе клеток, инфицированных естественным путем. Количество зараженных клеток в эякулятах пациентов было прямо пропорционально количеству ЦМВ в эякуляте. В связи с этим в опытах с ВПГ использовали вирус с большей инфекционной множественностью (1–10 БОЕ на клетку). Действительно, в этом случае доля зараженных сперматозоидов по результатам иммунофлюоресцентного анализа составляла 17–19%.

Данные о степени инфицирования гамет ВПГ, полученные иммуноцитохимически, в дальнейшем были подтверждены с помощью ДНК-ДНК-гибридизации гамет *in situ*. Установлено, что доля сперматозоидов, содержащих ДНК ВПГ, полностью соответствует данным о степени заражения гамет, полученным с помощью иммунофлюоресценции. Более того, локализация вирусной ДНК также соответствует иммунофлюоресцентной картине, что дополнительно подтверждает специфичность обоих методов выявления вирусных маркеров.

Анализ локализации антигенов ВПГ показал, что в целом белки ВПГ располагались в тех же участках сперматозоидов, что и белки ЦМВ, как в случае искусственно зараженных клеток ЦМВ, так и в эякулятах инфицированных пациентов [11]. Сходная локализация вирусных маркеров в головках сперматозоидов ранее была продемонстрирована в работе Е.Н. Бочаровой и соавт. [7], проводивших скрининг положительных на ВПГ эякулятов пациентов, страдающих бесплодием. Примечательно, что в работе, проводившейся на ГВЧ 6-го типа [14], также было осуществлено инфицирование сперматозоидов человека вирусом *in vitro*, причем степень заражения была сходной с полученной нами для ВПГ. Однако вирусные частицы ГВЧ 6-го типа никогда не располагались в шейке сперматозоидов, самом распространенном месте прикрепления ВПГ и ЦМВ, но локализовались в верхней части головки в районе акросомы. После проведения искусственной акросомной реакции в отсутствие интактной акросомы ГВЧ 6-го типа к гаметам не прикреплялся. В то же время для вируса папилломы человека (ВПЧ) [15] не отмечено его прикрепление к акросоме. В инфицированных ВПЧ эякулятах вирусные частицы располагаются в экваториальной области головки, как это часто наблюдается и в случае ВПГ и ЦМВ.

Оптическое скринирование сперматозоидов, окрашенных поликлональными антителами и МКА, показало внутриклеточную локализацию белков ВПГ. Кроме того, гликопротеин gV был обнаружен на мембране клеток и, по-видимому, прочно связывался с мембранными рецепторами, так как был выявлен после градиентного центрифугирования и отмывок. Вирусная контаминация сперматозоидов представляет серьезную проблему для использования ВРТ в лечении бесплодия. Внутригаметная локализация вирусов в подвижных сперматозоидах не позволяет произвести очистку от инфекционных агентов путем стандартных процедур отмывки, но и в случаях прикрепления вирусных частиц к мембране сперматозоида отмывка может оказаться неэффективной. Об этом свидетельствуют результаты настоящей работы, показавшие, что снижение вирусной нагрузки после отмывки наблюдали только в 50% ВПГ-положительных образцов.

Сходные данные были получены авторами, изучавшими эякуляты ВИЧ-инфицированных пациентов. Исследования, проведенные с ВИЧ-инфицированными эякулятами, показали, что после очистки сперматозоидов градиентным центрифугированием инфекционная активность ВИЧ снижается [16], однако эффективность отмывки остается низкой [17].

В настоящей работе для выявления антигенов ВПГ, кроме поликлональных антител, были использованы МКА к сверхранним/ранним неструктурным белкам ВПГ-1 ICP0 и ICP4. Белки ICP0 и ICP4 в сперматозоидах выявлены не были. Так как экспрессия α -генов, которые кодируют эти белки, необходима для экспрессии β -генов, кодирующих структурные белки и ферменты, главствующие в репликации ДНК ВПГ, можно предположить, что репродукции вируса и литического цикла в сперматозоидах не происходило. Это может быть связано с низкой активностью метаболических процессов в зрелых сперматозоидах, хотя, по некоторым данным, транскрипция и трансляция клеточных РНК могут иметь место в сперматозоидах, хотя и в очень ограниченных масштабах, главным образом на митохондриальных рибосомах [18, 19]. Данное предположение подтверждают и приведенные выше количественные данные: доля зараженных сперматозоидов со временем не увеличивалась, т. е. распространения вируса не происходило. По-видимому, поздний белок gV, который был выявлен на сперматозоидах и локализовался на мембране клеток, принадлежит к тем вирусным частицам, которые инфицировали сперматозоиды (а не является синтезированным *de novo*). Таким образом, можно предположить, что инфекция сперматозоидов протекает в abortивной форме: после проникновения вирусной ДНК и белков тегумента и нуклеокапсида экспрессии вирусного генома не происходит. Есть основания считать, что герпесвирусная инфекция зрелых сперматозоидов *in vitro* представляет новую модель для изучения молекулярных механизмов установления латенции, которая отличается от классической модели инфицированных нейронов. Действительно, в некоторых нейронах обнаружена экспрессия ICP4 и некоторых других белков ВПГ [20]. Использование модели инфицирования сперматозоидов *in vitro* открывает перспективы изучения реактивности вируса после попадания его в ооцит в результате оплодотворения.

Необходимо отметить, что инфицирование сперматозоидов ВПГ не снижало их подвижности. Интересно, что в литературе нет однозначного мнения о влиянии ГВЧ на сперматозоиды. Некоторые исследователи не находят связи между присутствием вирусов в эякуляте

и ухудшением показателей спермограммы, другие отмечают снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в эякулятах, положительных на ГВЧ, а также увеличение в них содержания морфологически аномальных форм гамет [2, 8, 9, 21]. Возможно, имеют место 2 варианта инфицирования сперматозоидов вирусом. В первом варианте развития событий уже зрелые гаметы инфицируются ГВЧ при их прохождении по половым путям, причем, по данным работы, проведенной на ГВЧ 6-го типа [14], прикрепление вируса к сперматозоидам может происходить очень быстро – за минуты. Этот вариант аналогичен проводимому нами инфицированию гамет *in vitro*, и в этом случае морфология гамет и их подвижность не изменяются. При втором варианте инфицирование может происходить раньше: ГВЧ могут заражать предшественники гамет непосредственно в яичках и влиять на морфологию сперматозоидов либо инфицировать гаметы, находящиеся в придатке яичка эпидидимисе, где наблюдается созревание гамет и приобретение ими подвижности. В последнем случае ГВЧ могут отрицательно воздействовать на подвижность и морфологию сперматозоидов. Косвенным подтверждением возможности заражения мужских гамет ГВЧ как в яичках, так и в половых путях могут служить данные обнаружения ВПГ и ЦМВ в яичках, эпидидимисе и семенных пузырьках человека [22, 23].

Суммируя результаты работы, можно сделать следующие выводы. Использование оптимизированной модели заражения *in vitro* показало, что зрелые мужские гаметы могут инфицироваться ГВЧ во время их прохождения по половому тракту, причем с высокой степенью эффективности. Изучение локализации вирусных ДНК и белков позволило установить, что ГВЧ способны не только прикрепляться к мембране сперматозоидов, но и проникать внутрь клеток. Отсутствие неструктурных α -белков ВПГ после заражения *in vitro* указывает на abortивный характер герпесвирусной инфекции зрелых мужских гамет. Установленный нами факт, что переносчиками ГВЧ могут быть прогрессивно подвижные сперматозоиды, указывает на возможность вертикальной передачи вирусов при оплодотворении от сперматозоидов к зиготе. Полученные данные свидетельствуют о необходимости диагностики герпесвирусной инфекции эякулятов как при проведении ВРТ, так и при нарушениях фертильности мужчин в парах с бесплодием. Обнаружение ГВЧ в урогенитальном тракте открывает возможность разработки тактики лечения бесплодия у больных, выделяющих ГВЧ с эякулятом.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-32276 мол_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–6, 11–20, 22, 23
см. REFERENCES)

7. Бочарова Е.Н., Завалишина Л.Э., Брагина Е.Е., Климова Р.Р. и др. Выявление геномной ДНК вируса простого герпеса методом гибридизации *in situ* в сперматозоидах человека при нарушении фертильности. *Доклады Академии наук*. 2007; 412(3): 417–21.
8. Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А., Гаджиева З.С., Цибизов А.С., Адиева А.А. и др. Вирус простого герпеса и цитомегаловирус в эякуляте мужчин: вирус простого герпеса чаще встречается при идиопатическом бесплодии и коррелирует со снижением показателей спермы. *Вопросы вирусологии*. 2010; (1): 27–30.
9. Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Пушкарь Д.Ю., Сегал А.С., Ковалев В.А., Курило Л.Ф. и др. Влияние вируса простого герпеса на сперматогенез. *Урология*. 2011; (6): 32–6.

10. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Н., Гусак Ю.К., Зыкова М.С., Лихаев Д.Н., Зотов В.В. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов. *Андрология и генитальная хирургия*. 2006; (1): 59–65.
21. Евдокимов В.В., Ковалык В.П., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Тюленев Ю.А. и др. Распространение герпесвирусов и вируса папилломы человека у мужчин с бесплодием и воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и их влияние на основные показатели спермы. *Урология*. 2015; (6): 55–9.

REFERENCES

1. Dejuq N., Jégou B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001;65(2): 208–31.
2. Kaspersen M.D., Höllsberg P. Seminal shedding of human herpesviruses. *Virol. J.* 2013; 10: 226.
3. Kapranos N., Petrakou E., Anastasiadou C., Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* 2003; 79(3): 1566–70.
4. Michou V., Liarmakopoulou S., Thomas D., Tsimaratou K., Makarounis K., Constantoulakis P. et al. Herpes virus infected spermato-following density gradient centrifugation for IVF purposes. *Andrologia*. 2012; 44(3): 174–80.
5. Chen M., Cai L.Y., Kanno N., Kato T., Lu J., Jin F. et al. Detection of human herpesviruses (HHVs) in semen of human male infertile patients. *J. Reprod. Dev.* 2013; 59(5): 457–62.
6. El Borai N., Inoue M., Lef@èvre C., Naumova E.N., Sato B., Yamamura M. Detection of herpes simplex DNA in semen and menstrual blood of individuals attending an infertility clinic. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 1997; 23(1): 17–24.
7. Bocharova E.N., Zavalishina L.E., Bragina E.E., Klimova P.P. et al. Detection of genomic DNA of the herpes simplex virus by hybridization *in situ* of human sperm with impaired fertility. *Doklady Akademii nauk*. 2007; 412(3): 417–21. (in Russian)
8. Klimova R.R., Chichev E.V., Naumenko V.A., Gadzhieva Z.S., Tsbizov A.S., Adieva A.A. et al. Herpes simplex virus and cytomegalovirus in male ejaculate: herpes simplex virus is more common in idiopathic infertility and correlates with a decrease in sperm parameters. *Voprosy virusologii*. 2010; (1): 27–30. (in Russian)
9. Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Pushkar' D.Yu., Segal A.S., Kovalev V.A., Kurilo L.F. et al. Impact of herpes simplex virus on spermatogenesis. *Urologiya*. 2011; (6): 32–6. (in Russian)
10. Bocharova E.N., Bragina E.N., Gusak Yu.K., Zykova M.S., Likhav D.N., Zotov V.V. et al. Spontaneous abortion, failure of reproductive technology and herpetic infection of sperm. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2006; (1): 59–65. (in Russian)
11. Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Kurilo L., Shileiko L., Sorokina T., Evdokimov V.V. et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4–6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology*. 2014; 2(5): 687–94.
12. Deture F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.M. Herpesvirus type2: study of semen in male subjects with recurrent infections. *J. Urol.* 1978; 120(4): 449–51.
13. Pallier C., Tebourbi L., Chopineau-Proust S., Schoevaert D., Nordmann P., Testart J. et al. Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. *Hum. Reprod.* 2002; 17(5): 1281–7.
14. Kaspersen M.D., Larsen P.B., Kofod-Olsen E., Fedder J., Bonde J., Höllsberg P. Human herpesvirus-6A/B binds to spermatozoa acrosome and is the most prevalent herpesvirus in semen from sperm donors. *PLoS One*. 2012; 7(11): e48810.
15. Foresta C., Patassini C., Bertoldo A., Menegazzo M., Francavilla F., Barzon L. et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*. 2011; 6(3): e15036.
16. Loskutov N.M., Huyser C., Singh R., Walker D.L., Thornhill A.R., Morris L. et al. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil. Steril.* 2005; 84(4): 1001–10.
17. Chrystie I.L., Mullen J.E., Braude P.R., Rowell P., Williams E., Elkington N. et al. Assisted conception in HIV discordant couples: eval-

- uation of semen processing techniques in reducing HIV viral load. *J. Reprod. Immunol.* 1998; 41(1–2): 301–6.
18. Gur Y., Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 2006; 20(4): 411–6.
 19. Miller D., Ostermeier G.C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.* 2006; 12(6): 757–67.
 20. Feldman L.T., Ellison A.R., Voytek C.C., Yang L., Krause P., Margolis T.P. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(2): 978–83.
 21. Evdokimov V.V., Kovalyk V.P., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Tyulenev Yu.A. et al. Distribution of human herpes viruses and human papilloma virus in men with infertility and inflammatory diseases of the urogenital tract and their influence on the basic parameters of semen. *Urologiya.* 2015; (6): 55–9. (in Russian)
 22. Dalton A.D., Harcourt-Webster J.N. The histopathology of the testis and epididymis in AIDS—a post-mortem study. *J. Pathol.* 1991; 163(1): 47–52.
 23. DeTure F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.N. Herpesvirus type 2: isolation from seminal vesicle and testes. *Urology.* 1976; 7(5): 541–4.

Поступила 09.11.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.281.8.03:616.98:578.826].076.9.036.8

Смирнов В.С.¹, Слита А.В.², Гаршинина А.В.², Беляевская С.В.², Аникин В.Б.², Зарубаев В.В.²

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА + АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАН НА ХОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»», 191023, г. Санкт-Петербург; ²ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

В работе изучена активность препаратов глицирризиновой кислоты (GL) и дипептида глутамил-триптофана (EW) по отдельности и в комбинации (GL + EW) на модели экспериментальной аденовирусной инфекции у сирийских хомяков. Показано, что использование препаратов GL и GL+ EW снижает репликативную активность аденовируса в печени на 0,6–1,2 Ig TCID₅₀ в зависимости от препарата и срока развития инфекции, а также приводит к нормализации структуры печени животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне. Полученные данные позволяют рассматривать эти препараты как потенциальный компонент комплексной терапии аденовирусной инфекции.

Ключевые слова: аденовирус; животная модель; глицирризиновая кислота; глутамил-триптофан; химиотерапия.

Для цитирования: Смирнов В.С., Слита А.В., Гаршинина А.В., Беляевская С.В., Аникин В.Б., Зарубаев В.В. Влияние комбинации глицирризиновая кислота + альфа-глутамил-триптофан на ход экспериментальной аденовирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (2): 125-131.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-125-131

Smirnov V.S.¹, Slita A.V.², Garshinina A.V.², Belyaevskaya S.V.², Anikin V.B.², Zarubaev V.V.²

THE EFFECT OF COMBINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID WITH ALPHA-GLUTAMYL-TRYPTOPHAN ON THE EXPERIMENTAL ADENOVIRAL INFECTION

¹MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation; ²Influenza Research Institute, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In this work, the activity of glycyrrhizic acid (GL) and dipeptide alpha-glutamyl-tryptophane (EW) as single preparations or in combination (GL+EW) against experimental adenoviral infection in the Syrian hamsters was studied. Application of GL and GL+EW was shown to decrease the level of the adenovirus replication in liver tissue by 0.6 – 1.2 IgTCID₅₀ depending on the composition and time point of the post infection. It was also demonstrated that normalization of the structure of the liver tissue was required, which was shown on the level of both optical and electron microscopy. The results obtained in this work suggest that GL and GL+EW may be considered as potential component of the complex therapy of adenoviral infection.

Key words: adenovirus; animal model; glycyrrhizic acid; glutamyl-tryptophan; chemotherapy.

For citation: Smirnov V.S., Slita A.V., Garshinina A.V., Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V. The Effect of combination of glycyrrhizic acid with alpha-glutamyl-tryptophan on the experimental adenoviral infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(3): 125-131. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-125-131

For correspondence: Vyacheslav S. Smirnov, Doctor of Medicine, Professor, Chief Research Scientist, MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru

Information about authors:

Zarubaev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-6837-5242>

Funding. The study of anti-viral activity of glycyrrhizic acid was supported by Cytomed, Ltd., St. Petersburg

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

Received 11 May 2015

Accepted 29 May 2015

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, проф., главный научный сотрудник ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»», 191023, г. Санкт-Петербург, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru

Введение

Аденовирусы представляют собой семейство безоболочечных вирусов с двуцепочечным ДНК-геномом. Аденовирусы широко распространены среди людей и животных. Благодаря широкому спектру тканевой и клеточной тропности они вызывают разнообразные по клиническим проявлениям и часто тяжело протекающие заболевания. В то же время аденовирусная инфекция протекает относительно легко у иммунокомпетентных пациентов, но представляет серьезную угрозу для людей с различными формами иммуносупрессии, таких как ВИЧ-инфицированные, реципиенты донорских органов и костного мозга, пациентов, проходящих курс противоопухолевой радио- или химиотерапии. В этих случаях аденовирусы могут приводить к тяжелым последствиям вплоть до летального исхода [1]. Проблема поиска химиопрепаратов, которые бы эффективно подавляли репродукцию аденовирусов и имели при этом минимальный уровень побочных эффектов, представляет собой важную задачу для медицинской науки.

Из существующих препаратов для терапии аденовирусных инфекций следует отметить цидофовир («Gilead Sciences Inc.») [2–8]. Активность в отношении аденовируса была показана *in vitro* для некоторых других аналогов нуклеотидов [9, 10]. Рибавирин, используемый в терапии гепатита С и инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом, оказался эффективным [11, 12], частично эффективным [13] или не имел эффективности [14, 15] против аденовирусной инфекции. Ганцикловир – ациклический аналог гуанозина, эффективный при цитомегаловирусной инфекции, проявляет эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* [16, 17]. Рибавирин, ганцикловир и цидофовир использовались в терапии аденовирусных гепатитов, циститов и пневмоний при иммунодефицитных состояниях у реципиентов органов [11, 12, 14, 16]. Однако выраженные побочные действия преимущественно в форме нефропатий, анемии и нейтропении ограничивают применение этих препаратов [4, 7, 18].

Другие классы соединений также проявляют антиаденовирусную активность. К ним можно отнести липиды [19], акридоны [20], имидазохинолинамины [21], аналоги нуклеозидов [9, 10, 22–25]. Низкомолекулярный нуклеотидный аналог СМХ001 дает в опытах *in vitro* и *in vivo* уровень противовирусной активности, на несколько порядков превосходящий эффект цидофовира, однако еще далек от клинического применения [26]. Рост вируса в клеточной культуре может быть ингибирован катехинами зеленого чая [27, 28] путем как влияния на очищенный вирус, так и инактивации вирусной протеазы в ходе репродукции.

Аденовирусы обладают эффективными механизмами подавления интерферониндуцированного противовирусного каскада реакций [29], поэтому устойчивы к действию интерферона и его индукторов.

Ранее была показана ингибирующая активность комбинации глицирризиновой кислоты (GL) и альфа-глутамил-триптофана (EW) против вируса гриппа в опытах на животных [30]. Целью настоящего исследования была оценка противовирусной активности GL и EW и их комбинации против аденовируса человека в экспериментах *in vivo*.

Материал и методы

Препараты. В работе использовали препараты натриевой соли EW (ЗАО МБНПК «Цитомед», Россия) и

тринатриевой соли GL («Mafco Worldwide Corporation», США) в виде монопрепаратов или в комбинации. В качестве плацебо использовали стерильный физиологический раствор, в качестве препарата сравнения – 6-азацитидин (6-АЦ) производства НИИ органической химии (Киев, Украина). Дозы изучаемых препаратов составили: EW – 1 мг/кг, GL – 10 мг/кг, 6-АЦ – 50 мг/кг. Дозы EW и GL были определены на основании ранее проведенных опытов, которые показали оптимальную противовирусную активность этих доз против вируса гриппа [30], доза 6-АЦ – на основании результатов экспериментов по изучению активности 6-АЦ на модели аденовирусной инфекции, использованной в настоящем исследовании [25].

Вирусы. В работе был использован аденовирус человека 5-го типа. Вирус пассировали в клетках Нер-2 при 36°C в атмосфере 5% CO₂.

Животные. Поскольку аденовирусная инфекция у животных не моделируется в виде респираторной патологии, использовали модель диссеминированной аденовирусной инфекции, протекающей с поражением печени, легких и сердца [25]. Наиболее выраженным проявлением этой инфекции является аденовирусный гепатит, параметры которого и были изучены в настоящем исследовании. Новорожденных сирийских хомяков получали от половозрелых родителей и использовали в опытах через 24–48 ч после рождения. Животных распределяли в группы опыта методом случайной выборки, предварительно отобрав животных массой от 2 до 3 г.

Экспериментальная аденовирусная инфекция. Вирус вводили животным подкожно в объеме 0,1 мл (10⁵ TCID₅₀). В каждую группу наблюдения брали по 20 хомяков. Препараты вводили через 24, 48, 72, 96 и 120 ч после инфицирования. Доза 6-АЦ составила 50 мг/кг. В качестве плацебо в контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

На 3-й и 7-е сутки после заражения по 10 животных из каждой группы умерщвляли, вскрывали и изолировали печень. Полученные органы взвешивали и использовали для выделения вируса (n = 5), гистологического и ультраструктурного (n = 5) анализа (см. ниже).

Титрование вируса. Для определения инфекционного титра вируса печень животных гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного физиологического фосфатного буфера и готовили из гомогенатов серию 10-кратных разведений (10⁻¹–10⁻⁶) на том же буфере. При определении титра вируса использовали культуру клеток Vero, выращенных на 96-луночных планшетах на среде MEM. Клетки заражали серийными 10-кратными разведениями гомогенатов от 10⁻¹ до 10⁻⁶ и инкубировали в термостате в течение 96 ч. По окончании срока инкубации клетки промывали 2 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером и оценивали количество живых клеток при помощи микротетразолиевого теста (МТТ), характеризующего интенсивность митохондриального дыхания живых клеток [31]. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид («ICN Biochemicals Inc.», Аурора, Огайо, США) на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 2 ч и промывали в течение 5 мин фосфатно-солевым буфером. Осадок растворяли в 100 мкл на лунку диметилсульфоксида, после чего оптическую плотность

Таблица 1

Репликация аденовируса 5-го типа в органах новорожденных сирийских хомяков при подкожном заражении в присутствии исследованных препаратов

| Препарат, концентрация | Титр вируса в печени, lgTCID ₅₀ /20 мг | |
|------------------------|---|------------------------------|
| | 3-и сутки | 7-е сутки |
| EW | 4,1±0,3 (p = 0,360)* (n = 5) | 3,2±0,3 (p=0,806) (n = 5) |
| GL | 3,9±0,2 (p = 0,041) (n = 5) | 2,5±0,1 (p=0,034) (n = 5) |
| EW + GL | 3,3±0,4 (p = 0,015) (n = 5) | 1,6±0,6 (p=0,060) (n = 5) |
| 6-АЦ 50 мг/кг | 3,1±0,3 (p = 0,015) (n = 5) | 1,7±0,1 (p=0,022) (n = 5) |
| Плацебо | 4,2±0,4 (p = 0,521) (n = 5) | 3,2±0,2 (p=0,789) (n = 5) |

Примечание. * – коэффициент Стьюдента при сравнении с группой плацебо

в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 (“Perkin Elmer”, Финляндия) при длине волны 535 нм. Вирус считали присутствующим в лунке, если ее оптическая плотность была в 2 и более раз меньше, чем в лунках с интактными клетками. На основании полученных данных рассчитывали титр аденовируса, который выражали в десятичных логарифмах 50% тканевой цитотоксической инфекционной дозы (lg TCID₅₀). О противовирусной активности соединений судили по снижению инфекционного титра аденовируса.

Гистологический анализ. Ткань фиксировали 10% формалином на фосфатном буфере, отмывали в проточной воде в течение ночи, дегидратировали в этаноле нарастающей концентрации, проводили через хлороформ, заливали в парафин и готовили из полученных блоков срезы толщиной 4 мкм. Срезы освобождали от парафина ксилолом, регидратировали в этаноле убывающей концентрации, окрашивали гематоксилином и эозином, дифференцировали в подкисленном спирте, окончательно обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации, проводили через 2 смены ксилола и заключали в балзам. Полученные препараты исследовали под световым микроскопом Leica DM1000. Качественно оценивали интенсивность и клеточный состав воспалительного инфильтрата в очагах гепатита, а также степень дегенеративных процессов в ткани печени.

Поскольку в поздних стадиях аденовирусной инфекции (7-е сутки) выраженность патологических изменений печени снижается по сравнению с ранними стадиями (3-и сутки) [25], для морфометрического исследования использовали печень животных только на 3-и сутки после инфицирования подсчитывали общее число очагов аденовирусного гепатита. Размеры (по длинной и короткой оси) очагов измеряли в миллиметрах на экране монитора при ув. 40. Условный объем очага рассчитывали по формуле

$$V = ab^2/2,$$

где V – искомый объем очага, a и b – размеры очага в миллиметрах по длинной и короткой оси соответственно, и выражали в полученных условных единицах. Кроме того, в каждом очаге подсчитывали количество инфицированных клеток с увеличенным гиперхромным ядром и включениями в ядре и цитоплазме.

Электронно-микроскопические исследования. Кусочки ткани фиксировали 2,5% раствором OsO₄, обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut («Reichert», Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S («JEOL», Япония) при инструментальном ув. 5000–8000. Фотосъемку производили на пленку ФТ-41МД.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов (расчет средних значений и стандартных отклонений) проводили при помощи программы Microsoft Excel. Достоверность раз-

личий оценивали по критерию Стьюдента. Достоверными считали различия между группами, если значение p не превышало 0,05.

Результаты

Влияние препаратов на репродукцию аденовируса в организме животных. В ходе опыта по определению протективной активности препаратов на животных не было отмечено неспецифической смертности в контрольной группе интактных животных.

Данные о репликации вируса в ткани печени лабораторных животных приведены в табл. 1.

Из представленных результатов видно, что аденовирус человека 5-го типа эффективно размножался в печени новорожденных хомяков, достигая к 3-м суткам после инфицирования титров 4,5 lg TCID₅₀/20 мг ткани. К 7-м суткам

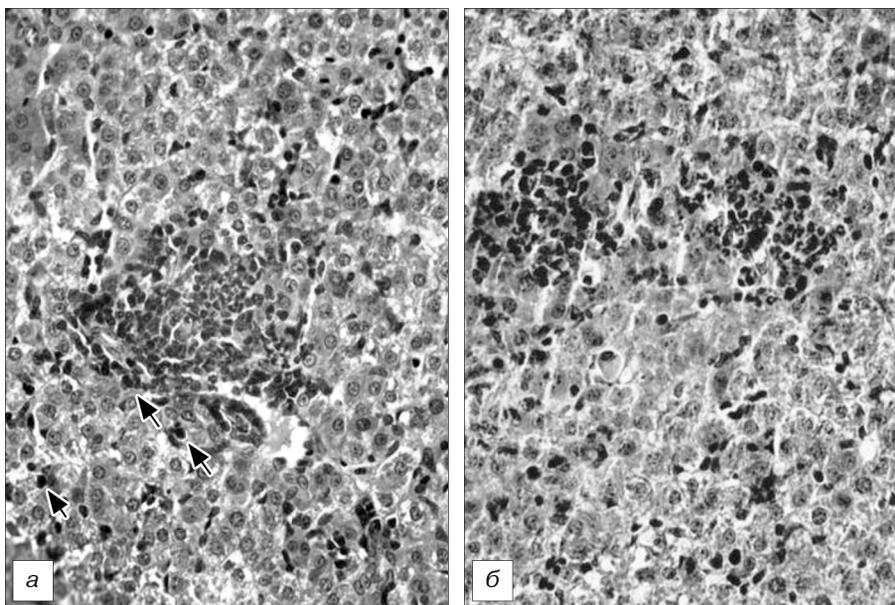


Рис. 1. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа. Очаговая воспалительная инфильтрация печеночной стромы, специфическое аденовирусное поражение ядер печеночных клеток (указаны стрелками), выраженная вакуолизация гепатоцитов. Здесь и на рис. 2 и 3: окраска гематоксилином и эозином; ув. 400.

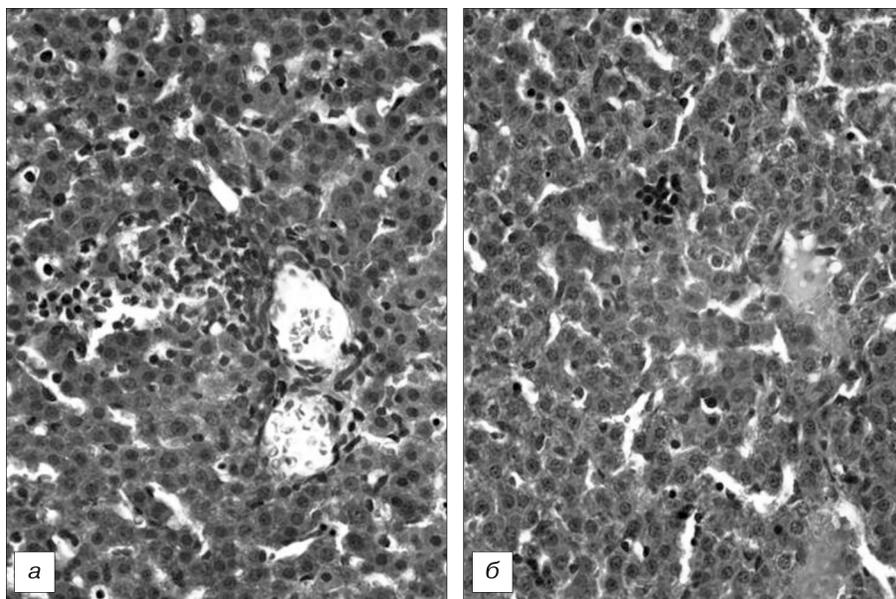


Рис. 2. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа при использовании препарата EW + GL. Интактные гепатоциты, прилежащие к зоне воспаления, низкий уровень некроза и воспалительной инфильтрации.

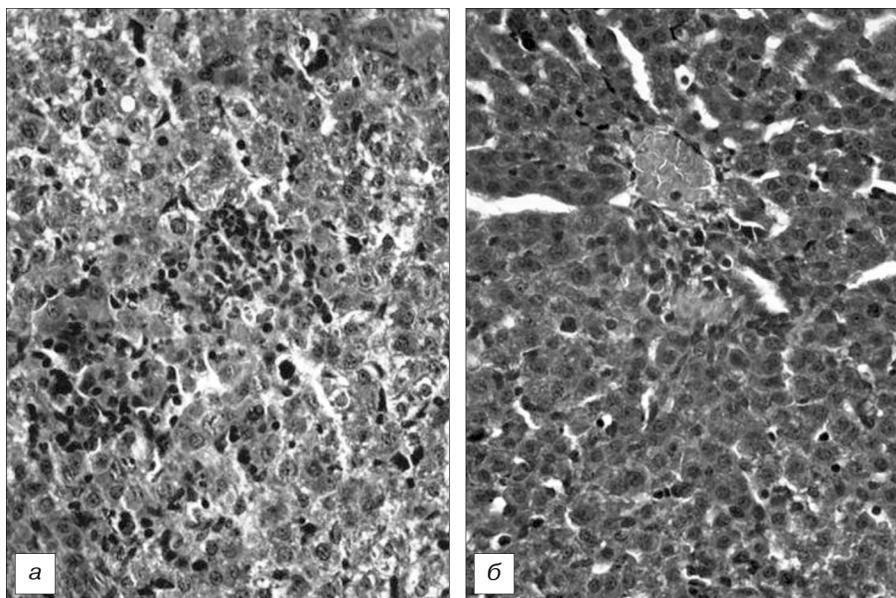


Рис. 3. Очаговый аденовирусный гепатит у новорожденного сирийского хомяка на 3-й (а) и 7-й (б) день после заражения аденовирусом 5-го типа при использовании 6-АЦ. Интактные гепатоциты, прилежащие к зоне воспаления, низкий уровень некроза и воспалительной инфильтрации.

инфекционная активность вируса снижалась и составляла в этот срок $3,3 \lg \text{TCID}_{50}/20$ мг ткани.

Применение препарата сравнения 6-АЦ достоверно снижало уровень репликации аденовируса в оба срока исследования приблизительно на 1,5 порядка.

Исследуемые препараты влияли на репродукцию вируса в печени животных в разной степени. Так, инфекционная активность аденовируса в печени животных, получавших препарат EW, не отличалась достоверно от таковой в группе плацебо. В то же время использование препаратов

GL и EW + GL снижало репликативную активность вируса на $0,6-1,2 \lg \text{TCID}_{50}/20$ мг ткани в зависимости от собственно препарата и срока развития инфекции. Наибольшую активность проявил препарат EW + GL, который снижал продукцию вируса примерно на полтора порядка, т. е. по активности был сопоставим с препаратом сравнения.

Влияние исследованных препаратов на морфогенез экспериментальной аденовирусной инфекции у животных. В печени интактных животных, не инфицированных вирусом, печеночные дольки были представлены центральными венами с радиально расположенными печеночными балками. Гепатоциты выглядели интактными, имели гомогенную цитоплазму или были слабо вакуолизированы. Купферовские клетки расположены равномерно. Признаков цитодеструкции или воспалительной инфильтрации не отмечалось.

Макроскопически при обследовании внутренних органов у всех животных на 3-й день после заражения обнаруживали светлые очажки воспаления в печени. Микроскопически они представляли собой участки деструкции печеночной паренхимы, вызванной специфическим поражением гепатоцитов и неспецифическим повреждением печеночных балок местной воспалительной реакцией. Специфическое поражение печеночных клеток проявлялось увеличением размеров ядер, их деформацией и формированием в них эозинофильных или базофильных внутриядерных включений, аналогичных по своей структуре включениям, образуемым в культуре клеток, и характеризующих вирусную репродукцию в этих клетках. Неспецифическое повреждение гепатоцитов было связано с лейкоцитарной инфильтрацией печеночной паренхимы и ферментативной деструкцией клеток в очаге воспаления с образованием телец Каунсилмена (рис. 1, а). На 7-е сутки деструктивные процессы были менее выражены и нейтрофильная инфильтрация сменялась круглоклеточными элементами – преимущественно лимфоцитами (рис. 1, б), нередко расположенными по периферии желчных протоков или периваскулярно.

Исследуемые препараты оказывали влияние на морфогенез аденовирусного гепатита в разной степени. Так, использование EW заметно не влияло на размер и клеточный состав очагов воспаления. В то же время применение препаратов GL и EW + GL, а также препарата сравнения 6-АЦ приводило к заметной нормализации структуры органов инфицированных животных. Очаги деструкции

Таблица 2

Морфометрические показатели ткани печени новорожденных сирийских хомяков при экспериментальном аденовирусном гепатите в условиях применения исследованных препаратов на 3-и сутки после заражения

| Препарат | Число очагов в печени | <i>p</i> (КВ)* | Размер очага при инструментальном ув. 40, усл. ед. | <i>p</i> (КВ)* | Число инфицированных клеток в очаге | <i>p</i> (КВ)* |
|----------|-----------------------|----------------|--|----------------|-------------------------------------|----------------|
| EW | 9,8 ± 1,5 (n = 5) | 0,488 | 108 076,8 ± 8766,7 | 0,328 | 2,6 ± 0,7 | 0,393 |
| GL | 8,8 ± 0,9 (n = 5) | 0,795 | 56 018,1 ± 5843,5 | 0,000 | 1,7 ± 1,4 | 0,001 |
| EW + GL | 10,8 ± 1,7 (n = 5) | 0,278 | 46 017,4 ± 6262,2 | 0,000 | 1,6 ± 1,5 | 0,000 |
| 6-АЦ | 7,8 ± 0,6 (n = 5) | 0,738 | 54 336,5 ± 7178,7 | 0,000 | 1,2 ± 0,2 | 0,000 |
| Плацебо | 8,4 ± 1,2 (n = 5) | 1,000 | 96 190,2 ± 8306,8 | 1,000 | 3,1 ± 0,2 | 1,000 |

Примечание. * КВ – коэффициент вариации.

Морфометрические показатели аденовирусного гепатита в контрольных и опытных группах животных суммированы в табл. 2.

Как видно из приведенных данных, ни один из изученных препаратов не снижал общего количества очагов воспаления в печени. По-видимому, первичное инфицирование вирусом приводит к инициации развития таких очагов уже в течение 1-х суток, когда лечение еще не проводится. Однако в дальнейшем развитие первичных очагов претерпевало существенные изменения по сравнению с контролем, причем влияние изучаемых препаратов на этот процесс было различным. Так, препарат EW не приводил к достоверному снижению морфометрических показателей аденовирусного гепатита – размеров очагов и количества пораженных клеток. Препараты GL и EW + GL также достоверно снижали эти два показателя, что в комбинации с ранее полученными данными о снижении под их влиянием титров вируса в ткани печени позволяет говорить об их ингибирующем влиянии на изучаемую вирусную патологию.

Электронно-микроскопические исследования. При электронно-микроскопическом исследовании печени животных было установлено, что гепатоциты интактных животных имели гексагональную форму с четко выраженными синусоидальными и билиарными полюсами, обращенными к кровеносному сосуду и желчному каналцу соответственно. Мембрана гепатоцитов имела многочисленные микроворсинки, особенно выраженные на синусоидальном полюсе. В цитоплазме содержалось много органелл и включений. Ядро было округлое и светлое, располагалось в центральной части гепатоцита и имело хорошо заметную ядерную оболочку, немногочисленные мелкие глыбки хроматина и от 1 до 4 округлых ядрышек (рис. 4).

При инфицировании животных аденовирусом морфо-

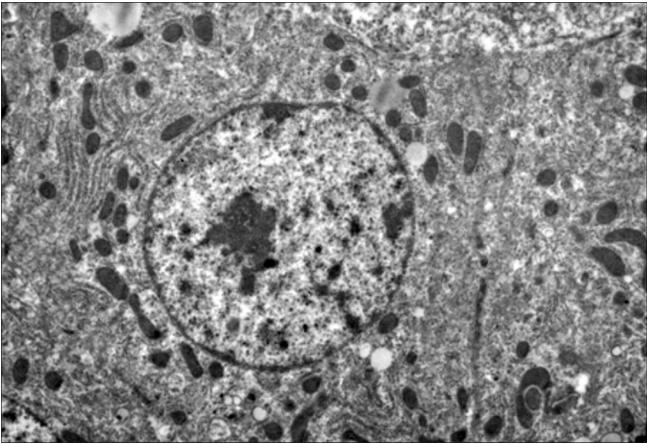


Рис. 4. Гепатоцит печени интактного животного. Органеллы выражены четко, вакуолизация клеток отсутствует. Здесь и на рис. 5 и 6: ув. 4000.

ткани в печени занимали меньшую площадь и содержали намного меньше вирусинфицированных клеток по сравнению с контролем без препаратов. За пределами очагов аденовирусного гепатита в отличие от сильно вакуолизованных гепатоцитов контрольных животных клетки печени выглядели интактными (рис. 2, 3).

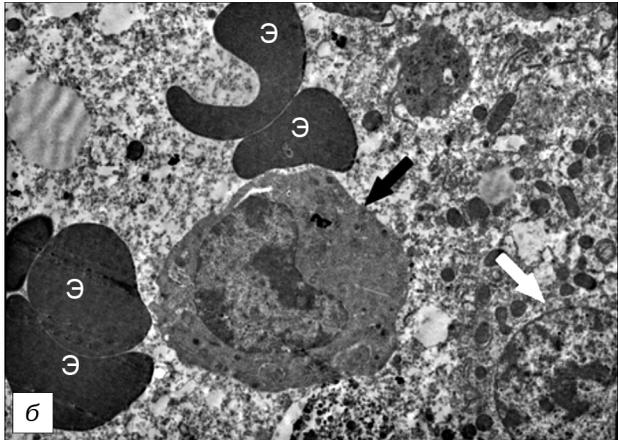
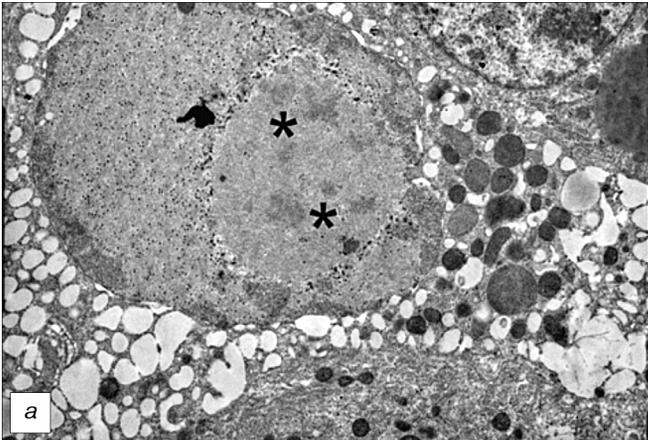


Рис. 5. Деструкция печени новорожденных сирийских хомяков на 3-и сутки после инфицирования аденовирусом человека 5-го типа. а – вирусспецифические включения (отмечены звездочками) и вирионы потомства в ядре, вакуолизация цитоплазмы гепатоцита и деструкция органелл; б – расширение синусоидного капилляра, разрушающийся гепатоцит (белая стрелка) и клетка воспалительного инфильтрата (черная стрелка). Э – эритроциты.

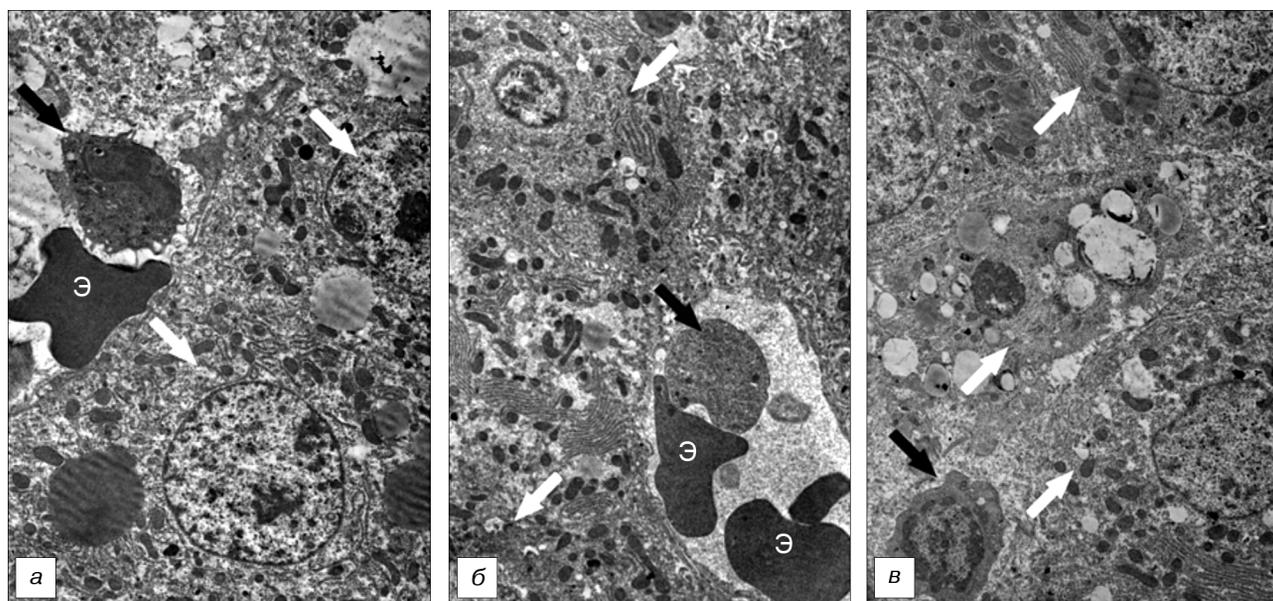


Рис. 6. Структура паренхимы печени новорожденных сирийских хомячков на 3-и сутки после инфицирования аденовирусом человека 5-го типа при применении препарата GL (а), EW + GL (б) и 6-АЦ (в). Белыми стрелками указаны гепатоциты, Э – эритроциты, черные стрелки – клетки воспалительного инфильтрата.

логия печени существенно изменялась. В печеночной паренхиме присутствовали гепатоциты, содержащие в ядре типичные структурированные вирусные включения, белковые паракристаллы и многочисленные вирионы аденовируса в ядре и цитоплазме (рис. 5, а). Признаки неспецифического поражения печени проявлялись появлением обширных участков вакуолизации гепатоцитов, обусловленным расширением эндоплазматического ретикулума в сочетании с его очаговым лизисом. Некоторые клетки имели морфологические признаки апоптоза в виде пикноза и конденсации хроматина или, наоборот, полного лизиса хроматина с формированием пузырьковидных форм. Митохондриальный матрикс во многих случаях был вакуолизирован, кристы дезорганизованы или полностью разрушены, многие митохондрии поглощены аутофагосомами. Расширенные щели между гепатоцитами были заполнены детритом, значительная часть десмосом, скрепляющих межклеточные контакты, находилась в состоянии лизиса.

Синусоидные капилляры были расширены и заполнены клеточным детритом. В пространстве Диссе в повышенном количестве выявлялись клетки лимфоидно-моноцитарного ряда (рис. 5, б). В просвете желчных капилляров обнаружен детрит и миелиноподобные частицы, свидетельствующие о распаде мембранных структур. Значительная часть эндотелиоцитов синусоидных капилляров находилась в состоянии апоптоза, на что указывали конденсация хроматина, остаточные тельца на месте ядер и многочисленные вакуоли в цитоплазме.

Как и в ранее проведенных тестах, применение изучаемых препаратов в разной степени влияло на ультраструктурные особенности морфогенеза аденовирусного гепатита. Так, структура печени животных, получавших EW, практически не отличалась от таковой в группе плацебо. Как и в контрольной группе, гепатоциты в пределах очагов воспаления находились в разных стадиях дегенерации, печеночные синусы были расширены и содержали большое количество клеток воспалительного инфильтрата. В то же время использование препаратов GL, EW + GL и 6-АЦ

нормализовало структуру печеночной паренхимы (рис. 6). Вакуолизация гепатоцитов была выражена в меньшей степени, просветы синусоидных капилляров сужены, количество клеток воспалительного инфильтрата снижено.

Обсуждение

В результате проведенных исследований показано, что применение GL снижало проявления экспериментального аденовирусного гепатита. В более ранних экспериментах установлено, что GL, будучи мембранотропным агентом, оказывает ингибирующее действие на оболочечные вирусы. Оболочечные вирусы в процессе слияния вирусной и клеточной мембран нуждаются в определенной текучести липидного бислоя и, следовательно, зависят от реологических свойств клеточной мембраны. Так, снижение текучести мембраны на 5% ингибировало размножение ВИЧ-1 на 56%, а 5% повышение текучести, напротив, повышало инфекционность вируса в 2,4 раза [32]. Те же закономерности наблюдались и в случае гриппозной инфекции [33], а также в отношении других вирусов – респираторно-синцитиального, SARS-ассоциированного коронавируса, вируса гепатита В, арбовирусов, вируса осповакцины, вирусов группы герпеса и других [34]. Известно также, что GL снижает мембранный транспорт и сialiрование поверхностного антигена вируса гепатита В, а также ингибирует ферменты фосфорилирования при инфекции, вызванной вирусом везикулярного стоматита [34]. Таким образом, по многочисленным данным, GL обладает комплексным механизмом противовирусной активности.

В нашем исследовании использован аденовирус, не имеющий липидной оболочки. В отношении безоболочечных вирусов активность GL также была продемонстрирована [35–37], хотя и в меньшем объеме, как *in vitro*, так и *in vivo*. В частности, показан эффект GL при гепатите С, что может быть обусловлено как прямыми противовирусными, так и цитопротекторными и/или противовоспалительными свойствами соединения.

Таким образом, исследования показали, что использо-

вание препаратов GL и GL + EW снижает репликативную активность аденовируса в печени, а также приводит к нормализации структуры печени животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне. Несмотря на очевидное протективное действие изученных препаратов на морфологическом и ультраструктурном уровне, их прямое противовирусное действие было незначительным и снижение инфекционного титра вируса не превышало значений, полученных при использовании этиотропного препарата сравнения 6-АЦ. Возможно в случае аденовирусной инфекции оптимальные действующие дозы изучаемых соединений отличаются от использованных при гриппозной инфекции [30]. Для оптимизации дозировок, а также выработки окончательных выводов относительно перспективности использования этих препаратов против аденовируса человека необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

Финансирование. Работа по исследованию противовирусной активности глицирризиновой кислоты была поддержана ЗАО МБНПК «Цитомед», Санкт-Петербург

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–29, 31–37 см. REFERENCES)

30. Смирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. Влияние комбинации глутамил-триптофана с глицирризиновой кислотой на течение острой инфекции у мышей, вызванной вирусом гриппа (H3N2). *Вопросы вирусологии*. 2012; 3: 23–7.

REFERENCES

1. Hierholz J.C. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992; 5 (3): 262–74.

2. Hillenkamp J., Reinhard T., Ross R.S., Böhringer D., Cartsburg O., Roggendorf M. et al. The effect of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study. *Ophthalmology*. 2002; 109 (5): 845–50.

3. Hoffman J.A., Shah A.J., Ross L.A., Kapoor N. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001; 7 (7): 388–94.

4. Romanowski E.G., Gordon Y.J., Araullo-Cruz T., Yates K.A., Kinchington P.R. The antiviral resistance and replication of cidofovir-resistant adenovirus variants in the New Zealand white rabbit ocular model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42 (8): 1812–5.

5. Romanowski E.G., Yates K.A., Gordon Y.J. Antiviral prophylaxis with twice daily topical cidofovir protects against challenge in the adenovirus type 5/New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 2001; 52 (3): 275–80.

6. Safrin S., Cherrington J., Joffe H.S. Cidofovir. Review of current and potential clinical uses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 458: 111–20.

7. Gordon Y.J., Naesens L., De Clercq E., Mandel P.C., Veckeneer M. The treatment of adenoviral conjunctivitis with topical cidofovir. *Cornea*. 1996; 15 (5): 546.

8. Hitchcock M.J.M., Jaffe H.S., Martin J.C., Stagg R.J. Cidofovir, a new agent with potent anti-herpesvirus activity. *Antivir. Chem. Chemother.* 1996; 7 (3): 115–27.

9. Das A., Trousdale M.D., Ren S., Lien E.J. Inhibition of herpes simplex virus type 1 and adenovirus type 5 by heterocyclic Schiff bases of aminohydroxyguanidine tosylate. *Antiviral Res.* 1999; 44 (3): 201–8.

10. De Clercq E., Sakuma T., Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Rosenberg I. et al. Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines. *Antiviral Res.* 1987; 8 (5–6): 261–72.

11. Arav-Boger R., Echavarría M., Forman M., Charache P., Persaud D. Clearance of adenoviral hepatitis with ribavirin therapy in a pediatric liver transplant recipient. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2000; 19 (11): 1097–100.

12. Shetty A.K., Gans H.A., So S., Millan M.T., Arvin A.M., Gutierrez K.M. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus pneumonia. *Pediatr. Pulmonol.* 2000; 29 (1): 69–73.

13. Gavin P.J., Katz B.Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics*. 2002; 110 (1 Pt. 1): 1–8.

14. Bordigoni P., Carret A.S., Venard V., Witz F., Le Faou A. Treatment of

adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (9): 1290–7.

15. La Rosa A.M., Champlin R.E., Mirza M., Gajewski J., Giralt S., Rolston K.V. et al. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin. Infect. Dis.* 2001; 32 (6): 871–6.

16. Chen F.E., Liang R.H., Lo J.Y., Yuen K.Y., Chan T.K., Peiris M. Treatment of adenovirus-associated haemorrhagic cystitis with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.* 1997; 20 (11): 997–9.

17. Trousdale M.D., Goldschmidt P.L., Nobrega R. Evaluation of ganciclovir against human adenovirus type 5 infection in cell culture and cotton rat eyes. *Antiviral Res.* 1993; 20 (Suppl. 1): 48.

18. Coca S., Perazella M.A. Rapid communication: acute renal failure associated with tenofovir: evidence of drug-induced nephrotoxicity. *Am. J. Med. Sci.* 2002; 324 (6): 342–4.

19. Kaneko H., Kato K., Mori S., Shigeta S. Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus in vitro. *Antiviral Res.* 2001; 52 (3): 281–8.

20. Zarubaev V.V., Slita A.V., Krivitskaya V.Z., Sirotkin A.K., Kovalenko A.L., Chatterjee N.K. Direct antiviral effect of cycloferon (10-carboxymethyl-9-acridanone) against adenovirus type 6 in vitro. *Antiviral Res.* 2003; 58 (2): 131–7.

21. Rautenschlein S., Miller R.L., Sharma J.M. The inhibitory effect of the imidazoquinolinamine S-28828 on the pathogenesis of a type II adenovirus in turkeys. *Antiviral Res.* 2000; 46 (3): 195–205.

22. Naesens L., Lenaerts L., Andrei G., Snoeck R., Van Beers D., Holy A. et al. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49 (3): 1010–6.

23. Mentel R., Kinder M., Wegner U., Janta-Lipinski M., Matthes E. Inhibitory activity of 3-fluoro-2-deoxythymidine and related nucleoside analogues against adenoviruses in vitro. *Antiviral Res.* 1997; 34 (3): 113–9.

24. Alexeeva I., Dyachenko N., Nosach L., Zhovnovataya V., Rybalko S., Lozitskaya R. et al. 6-azacytidine-compound with wide spectrum of antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001; 20 (4–7): 1147–52.

25. Zarubaev V.V., Slita A.V., Sukhinin V.P., Nosach L.N., Dyachenko N.S., Povnitsa O.Y. et al. Effect of 6-azacytidine on the course of experimental adenoviral infection in newborn Syrian hamsters. *J. Chemother.* 2007; 19 (1): 44–51.

26. Dropulic L.K., Cohen J.I. Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010; 88 (5): 610–9.

27. Weber J.M., Ruzindana-Umunyana A., Imbeault L., Sircar S. Inhibition of adenovirus infection and adenain by green tea catechins. *Antiviral Res.* 2003; 58 (2): 167–73.

28. Steinmann J., Buer J., Pietschmann T., Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br. J. Pharmacol.* 2013; 168 (5): 1059–73.

29. Zhang Y., Schneider R.J. Adenovirus inhibition of cellular protein synthesis and the specific translation of late viral mRNAs. *Semin. Virol.* 1993; 4 (4): 229–36.

30. Sмирнов В.С., Зарубаев В.В., Анфимов П.М., Штро А.А. Effect of combinations glutamyl-tryptophan glycyrrhizic acid on during acute infection in mice caused by influenza virus (H3N2). *Voprosy virusologii*. 2012; 3: 23–7. (in Russian)

31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65 (1–2): 55–63.

32. Harada S., Yusa K., Monde K., Akaike T., Maeda Y. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 329 (2): 480–6.

33. Wolkerstorfer A., Kurz H., Bachhofner N., Szolar O.H. Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell. *Antiviral Res.* 2009; 83 (2): 171–8.

34. Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanini D. et al. Antiviral effects of Glycyrrhiza species. *Phytother. Res.* 2008; 22 (2): 141–8.

35. Ashfaq U.A., Masoud M.S., Nawaz Z., Riazuddin S. Glycyrrhizin as antiviral agent against Hepatitis C Virus. *J. Transl. Med.* 2011; 9: 112.

36. Wang J., Chen X., Wang W., Zhang Y., Yang Z., Jin Y. et al. Glycyrrhizic acid as the antiviral component of Glycyrrhiza uralensis Fisch. against coxsackievirus A16 and enterovirus 71 of hand foot and mouth disease. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 147 (1): 114–21.

37. Zhang H., Song Y., Zhang Z. Glycyrrhizin administration ameliorates coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *Am. J. Med. Sci.* 2012; 344 (3): 206–10.

Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрияшин А.Е.,
Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М.

ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ И РЕТИНОБЛАСТОМА У ДЕТЕЙ

ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва

В статье представлены результаты комплексного лабораторного обследования 37 детей с ретинобластомой (РБ). В сыворотке крови с помощью иммуноферментного анализа определяли наличие IgM-, IgA-, IgG-антител к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типов, цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусу герпеса человека (ВГЧ) 6-го типа, токсоплазме гондии, микоплазме гоминис и уреоплазме уреалитикум. В полимеразной цепной реакции определяли наличие ДНК этих патогенов в плазме крови 18 пациентов и биоптатах опухоли 10 глаз. Полученные результаты показали, что дети с РБ инфицированы преимущественно вирусами группы герпеса, среди которых преобладал ЦМВ. В 4 из 5 энуклеированных глаз в ткани опухоли также присутствовала ДНК герпесвирусов (ЦМВ (2 глаза), ВЭБ (1 глаз), ВГЧ-6 (1 глаз)) и уреоплазмы уреалитикум (1 глаз). Нуклеиновая кислота инфекционных микроорганизмов существенно чаще определялась в ткани опухоли, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$), что позволяет предположить наличие вируса в глазу и его неблагоприятную роль в патогенезе РБ.

Ключевые слова: ретинобластома; вирусы герпеса человека; цитомегаловирус; вирус Эпштейна–Барр; полимеразная цепная реакция; иммуноферментный анализ.

Для цитирования: Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андрияшин А.Е., Хорошилова-Маслова И.П., Захарова Г.П., Майбогин А.М. Вирусные инфекции и ретинобластома у детей. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 132-134.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 132-134

Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E.,
Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M.

VIRAL INFECTIONS AND RETINOBLASTOMA IN CHILDREN

Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation

In this work, the results of a comprehensive laboratory examination of 37 children with retinoblastoma were described. The presence of IgM-, IgA-, IgG- antibodies to the herpes simplex virus types 1 and 2, cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus (HHV) type 6, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the serum was tested using ELISA. In the polymerase chain reaction the DNA of these pathogens were detected in the blood plasma of 18 patients and tumor biopsy specimens from 10 eyes. The results showed that children with RB were predominantly infected by the herpesviruses, among which prevailed CMV. In 4 of 5 enucleated eyes the DNA of herpesvirus [CMV (2 eyes), EBV (1 eye), HHV 6 (1 eye)] and *Ureaplasma urealyticum* (1 eye) were also present in tumor tissue. Nucleic acid of infectious microorganisms were considerably more often detected in the tumor tissue than in plasma (5 of 10, 1 of 18, respectively; $p = 0.023$), suggesting thereby the presence of the virus in the eye and its adverse role in the pathogenesis of the RB.

Key words: retinoblastoma; human herpesvirus; cytomegalovirus; Epstein–Barr virus; human herpesvirus 6; polymerase chain reaction; ELISA.

For citation: Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., Khoroshilova-Maslova I.P., Zakharova G.P., Maybogin A.M. Viral infections and retinoblastoma in children. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 132-134. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 132-134

For correspondence: Elena B. Myakoshina, Candidate of Medicine, Research Scientist, Department of Ocular Oncology and Radiology, Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases, Moscow, 105062, Russian Federation, E-mail: myakoshina@mail.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 11 November 2015
Accepted 19 November 2015

Введение

Ретинобластома (РБ) – злокачественная опухоль сетчатки у детей [1–5]. В настоящее время существует гипотеза о возникновении наследственной двусторонней формы РБ вследствие мутации гена *RBI* [6]. Монокулярная форма РБ рассматривается многими авторами как спорадическое заболевание, причины возникновения которого до сих пор не

изучены. Многие вирусы способны вызывать злокачественную трансформацию клеток хозяина [7–13]. Например, описаны лимфома орбиты, вызванная герпесвирусом человека 4 (HHV-4, или вирус Эпштейна–Барр) (Herpesvirales, Herpesviridae, Lymphocryptovirus) [9], и экстраокулярная маргинальноклеточная лимфома, вызванная *Chlamydomphila psittaci* [10].

Для корреспонденции: Мякошина Елена Борисовна, канд. мед. наук, научный сотрудник отдела офтальмоонкологии и радиологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва, E-mail: myakoshina@mail.ru

Целенаправленное изучение влияния инфекционных агентов на развитие РБ до настоящего времени не проводили.

Цель исследования – определить наличие ДНК возбудителей распространенных хронических офтальмотропных инфекций в плазме крови и биоптатах опухоли у детей с РБ для оценки возможного их влияния на бластогенез.

Материал и методы

Обследовали оба глаза у 37 детей (14 девочек и 23 мальчика) в возрасте от 5 до 69 (в среднем $39 \pm 1,1$) мес с бинокулярной (3) и монокулярной (34) формами РБ. Опухолевое поражение диагностировали в 40 из 74 исследуемых глаз.

Всем пациентам под наркозом осуществляли комплексное офтальмологическое обследование с использованием ретинальной педиатрической камеры Ret Cam, ультразвукового исследования, оптической когерентной томографии.

В настоящее время принята международная классификация РБ (ICRB, 2001 Амстердам), предусматривающая разделение опухоли на **группу А** (маленькие интратретинальные опухоли, не распространяющиеся на центральную ямку сетчатки и диск зрительного нерва (ДЗН), размером 3 мм и менее, ограниченные сетчаткой и расположенные минимум в 3 мм от фovea и в 1,5 мм от ДЗН), **группу В** (все остальные, отдельно лежащие опухоли, ограниченные сетчаткой, не вошедшие в группу А, с наличием связанной с опухолью жидкости в субретинальном пространстве, менее чем в 3 мм от опухоли при отсутствии субретинальных опухолевых отсеков), **группу С** (отдельные локализованные опухоли с минимальным обсеменением субретинального пространства или стекловидного тела менее чем в 3 мм от очага опухоли, с наличием жидкости в субретинальном пространстве, занимающей до 1/4 площади сетчатки), **группу D** (диффузно-распространенная опухоль со значительным обсеменением субретинального пространства или стекловидного тела в виде «сальных» отсеков или аваскулярных опухолевых масс с полной отслойкой сетчатки), **группу E** (наличие опухоли, прилежащей к хрусталику, расположенной впереди от передней поверхности стекловидного тела, захватывающей цилиарное тело или передний сегмент глаза, сопровождающейся неоваскулярной глаукомой, непрозрачностью стекловидного тела из-за кровоизлияния, некрозом опухоли с асептическим целлюлитом орбиты, фтизисом глаза, отсутствием шансов на сохранение зрения).

Опухоль группы А диагностировали в 2 глазах, группы В – в 5, группы С – в 2, группы D – в 7, группы E – в 24 (по международной АВС-классификации, 2001).

По показаниям проводили энуклеацию 10 глаз с далекозашедшей стадией РБ. Одновременно брали биоптат опухоли для исследования в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Диагноз РБ подтвердили гистологически.

Комплексное лабораторное обследование выполняли для выявления системных и локальных (внутриглазных) инфекций, их активности. Сыворотки крови всех 37 детей исследовали в иммуноферментном анализе (ИФА) на наличие IgM-, IgA-, IgG- антител к вирусу простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1, ВПГ-2), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), вирусу герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), токсоплазме гондии, токсокаре канис, микоплазме гоминис и уреоплазме уреалитикум. В ПЦР в реальном времени определяли наличие ДНК этих патогенов в плазме крови (18 пациентов) и биоптатах опухоли (10 глаз). В ИФА и ПЦР использовали коммерческие сертифицированные наборы производства ЗАО «Вектор-Бест», пос. Кольцово.

Результаты

Результаты исследований показали наличие IgG-антител к ВПГ-1 и ВПГ-2 в сыворотке крови у 13 (35,1%) из 37 пациентов, причем у детей моложе 8 мес при однократном обследовании было трудно отличить перенесенную инфекцию от трансплацентарно переданных материнских антител, что

потребовало наблюдения в динамике. IgM-ВПГ-антитела (маркеры первичной инфекции) не выявлены; IgG-антитела к ранним антигенам ВПГ (маркеры активации инфекции) детектировали у 10 детей старше 1 года.

В сыворотке 22 (59,5%) из 37 детей обнаружили IgG-антитела к ЦМВ (в 1,5 раза чаще, чем к ВПГ).

Серопозитивными к ВЭБ оказались 11 (29,7%) из 37 детей, маркеры атипичной реактивации установлены у 3 (8,1%) из них.

IgG-антитела к токсоплазме обнаружили только у 1 (2,7%) из 37 пациентов в очень низком недиагностическом титре (16 МЕ/мл).

Инфицированность токсокарой выявили у 4 (10,8%) из 37 детей. Диагностический уровень антител к ней (1:800) отмечен только у 1 мальчика в возрасте 26 мес, у которого позднее РБ подтвердили гистологически.

Хламидийную инфекцию обнаружили у 3 (8,1%) детей в возрасте от 12 до 19 мес, причем у 2 из них титры IgG-антител были высокие (1:80), а у 1 – низкие (1:10). Редко выявляли антитела к уреоплазме (1 (2,7%) из 37 детей) и микоплазме (2 (5,4%) из 37 детей). Заражение возбудителями урогенитальных инфекций происходило, вероятнее всего, во время родов или в постнатальном периоде при тесном контакте с матерью.

При проведении ПЦР в 5 из 10 биоптатов опухоли выявляли инфекционную ДНК: ЦМВ (2 глаза), ВЭБ (1 глаз), ВГЧ-6 (1 глаз), уреоплазмы уреалитикум (1 глаз); одновременно ДНК двух или более патогенов в одной опухоли не обнаруживали. В целом геномы микроорганизмов в ткани опухоли определяли достоверно чаще, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$).

Результаты ПЦР-исследования плазмы и ткани опухоли совпали у 1 ребенка (16 мес): в обоих образцах присутствовала ДНК ЦМВ. Серологический анализ выявил хроническую ЦМВ-инфекцию (высокие уровни IgG-ЦМВ-антител) с наличием антител-маркеров реактивации вируса, в стекловидном теле больного глаза также обнаружили IgG-антитела к ЦМВ. Следует подчеркнуть, что этот ребенок был по данным серологии инфицирован только ЦМВ. Полученные результаты позволяют предположить у него не только системную хроническую ЦМВ-инфекцию, но и, возможно, внутриглазную репликацию вируса (наличие ДНК ЦМВ в опухолевой ткани и IgG-противовирусных антител в стекловидном теле), что могло неблагоприятно сказаться на динамике опухолевого роста.

ДНК ВЭБ обнаружили в ткани опухоли у ребенка (32 мес) с серологическими маркерами реактивации хронических ЦМВ- и ВЭБ-инфекций. Еще у 1 мальчика (14 мес) в опухоли присутствовала ДНК ВГЧ 6-го типа, антитела к другим герпесвирусам в сыворотке не выявляли.

Трудно объяснить результаты обследования девочки 7 мес, серонегативной ко всем исследованным возбудителям, у которой в биоптате опухоли была обнаружена ДНК уреоплазмы уреалитикум. Хотя в литературе имеются сообщения о противоречивых результатах серологии и ПЦР при диагностике ВГЧ-6-инфекции [14], в подобных случаях нельзя полностью исключить ложноположительный ответ в ПЦР-анализе.

Обсуждение

В настоящее время активно обсуждается роль вирусов в бластогенезе. Имеются сообщения о детекции генома вируса папилломы человека (ВПЧ) в тканях опухоли при раке гортани [17], ВЭБ и ВПЧ при раке органов полости рта [18, 19], уреоплазмы уреалитикум при раке шейки матки [20]. Другие исследователи полагают, что малигнизация опухолей простаты повышается у людей с генетическими особенностями ответа на инфекцию и воспаление [21].

РБ – злокачественная опухоль сетчатки, наблюдаемая у детей раннего возраста. Ее возникновению способствует мутация в одном из аллелей гена-супрессора опухолевого роста (*Rb1*).

Двусторонние формы РБ обусловлены наследственными факторами, односторонние относят к спорадическим заболеваниям, причины возникновения которых не вполне ясны [1–5, 16].

Белок РБ, кодируемый геном *Rb1*, существенно влияет на регуляцию роста и дифференцировки клеток, являясь супрессором опухолевого роста. Установлено, что некоторые вирусы, в частности ЦМВ, оказывают супрессивное действие на белок РБ, значительно увеличивая риск возникновения опухоли [12]. Ранее мы обнаружили, что в группе детей с РБ число пациентов, инфицированных ЦМВ, в 2 раза больше по сравнению с детьми с воспалительными заболеваниями глаз аналогичного возраста [15]. Результаты проведенных исследований показали, что дети с РБ инфицированы преимущественно ВГЧ, среди которых преобладает ЦМВ. Помимо этого, серологические маркеры реактивации ВЭБ выявляли только у детей с РБ [8].

Инфицированность токсокарой определяли у 4 (10,8%) из 37 детей. Клинически некоторые формы глазного токсокароза напоминают РБ, серологический анализ на токсокароз входит в комплекс их дифференциальной диагностики [15]. Очевидно, этот тест выявляет токсокарозную инфекцию, но не является абсолютным доказательством токсокарозной этиологии заболевания. Глистная инвазия, влияя на иммунную систему ребенка, может, по-видимому, способствовать более агрессивному течению опухолевого процесса.

В 4 из 5 энуклеированных глаз в ткани опухоли также присутствовала ДНК герпесвирусов и только в одном случае – ДНК уреоплазмы уреаплазматиком. Нуклеиновая кислота инфекционных микроорганизмов существенно чаще определялась в ткани опухоли, чем в плазме крови (5 из 10, 1 из 18 наблюдений соответственно; $p = 0,023$), что позволяет предположить наличие вируса в глазу и его неблагоприятную роль в патогенезе РБ.

Таким образом, первый опыт комплексного лабораторного обследования сыворотки крови в ИФА на наличие офтальмотропных инфекций у 37 детей с РБ и ПЦР в реальном времени с выявлением ДНК этих патогенов в плазме крови (18) и биоптатах опухоли (10) показал преимущественную инфицированность вирусами группы герпеса, среди которых преобладал ЦМВ. Кроме того, в половине случаев в биоптате опухоли также выявляли ДНК герпесвирусов, что позволило нам предположить их возможное влияние на бластогенез.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4–6, 9–13, 20, 21 с.м. REFERENCES)

1. Бровкина А.Ф. *Офтальмоонкология*. М.: Медицина; 2002.
2. Саакян С.В. *Ретинобластома (клиника, диагностика, лечение)*. М.: Медицина; 2005.
3. Пантелеева О.Г. *Ретинобластома: прогностическая значимость клинических симптомов, эффективность комбинированного лечения*: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1997.
7. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. *Биохимия*. 2000; 65(1): 5–33.
8. Кричевская Г.И., Слепова О.С., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Денисова Е.В. К вопросу о роли инфекций в патогенезе ретинобластомы. *Российский офтальмологический журнал*. 2013; (2): 37–41.
14. Миронкова Е.А., Макаров П.В., Слепова О.С., Гундорова Р.А., Кугушева А.Э., Демкин В.В. и др. Инфицированность донорского материала вирусами группы герпеса как возможная причина развития болезни трансплантата при сквозной кератопластике. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; XIV(4): 48–51.
15. Катаргина Л.А., Хватова А.В. *Эндогенные увеиты у детей и подростков*. М.: Медицина; 2000.
16. Скрыбина О.А. *Иммунодиагностика и иммунокоррекция Т-активных ретинобластом у детей*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 1990.
17. Шилова О.Ю., Уразова Л.Н., Мухамедов М.Р., Черемисина О.В., Евтушенко В.А., Чойзонов Е.Л. Рак гортани: ретроспективное исследование. *Сибирский онкологический журнал*. 2009; (прил. 2): 227–8.

18. Светицкий П.В., Златник Е.Ю., Зыкова Т.А., Нистратов Г.П., Аединова И.В., Волкова В.Л. и др. Течение рака органов полости рта с учетом ассоциированности с вирусом Эпштейна–Барр, папилломы человека и уровня некоторых цитокинов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; (11): 120–2.
19. Нистратов Г.П., Светицкий П.В., Зыкова Т.А., Аединова И.В., Волкова В.Л., Баужадзе М.В. и др. Влияние вирусов Эпштейна–Барр и папилломы человека на течение рака органов полости рта. *Современные проблемы науки и образования*. 2014; (6). Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16497>

REFERENCES

1. Brovkina A.F. *Ophthalmooncology [Oftal'moonkologiya]*. Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
2. Saakyan S.V. *Retinoblastoma (clinical features, diagnosis, treatment) [Retinoblastoma (klinika, diagnostika, lechenie)]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
3. Panteleeva O.G. *Retinoblastoma: Prognostic Significance of Clinical Symptoms, the Efficacy of Combined Treatment*: Diss. Moscow; 1997. (in Russian)
4. Aerts I., Le Rouic L.L., Gauthier-Villars M., Brisse H., Doz F., Desjardins L. Retinoblastoma. *Orphanet J. Rare Dis.* 2006; 1 (31): 1750–9.
5. Doz F. Retinoblastoma: a review. *Arch. Pediatr.* 2006; 13 (10): 1329–37.
6. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1971; 68 (4): 820–3.
7. Kopnin B.P. Targets of Oncogenes and Tumor Suppressors: Key for Understanding Basic Mechanisms of Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65(1): 2–28.
8. Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Denisova E.V. The role of infection in the pathogenesis of retinoblastoma. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal*. 2013; (2): 37–41. (in Russian)
9. Auw-Hädrich C., Göbel N., Illerhaus G. Infection agents in ocular adnexal tumours. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 2010; 227 (7): 530–7.
10. Goebel N., Serr A., Mittelviehhaus A.H., Reinhard T., Bogdan C., Auw-Hädrich C. Chlamydia psittaci, Helicobacter pylori and ocular adnexal lymphoma – is there an association? The German experience. *Leuk. Res.* 2007; 31 (10): 1450–2.
11. Orjuela M.A., Castaneda V.P., Ridaura C., Lecona E., Leal C., Abramson D.H. et al. Prevalence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development. *Clin. Cancer Res.* 2000; 6(10): 4010–6.
12. Sage J. The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes Dev.* 2012; 26 (13): 1409–20.
13. Liu X., Tang X., Zhang S., Wang Y., Wang X., Zhao C. et al. Methylation and expression of retinoblastoma and transforming growth factor- β 1 genes in Epstein-Barr virus-associated and negative gastric carcinomas. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012; 2012: 906017.
14. Mironkova E.A., Makarov P.V., Slepova O.S., Gundorova R.A., Kugusheva A.E., Demkin V.V. et al. HIV status of the donor material by the herpes viruses as a possible cause of the disease transplant in penetrating keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2012; XIV(4): 48–51. (in Russian)
15. Katargina L.A., Khvatova A.V. *Endogenous Uveitis in Children and Adolescents [Endogennye uveity u detey i podrostkov]*. Moscow: Meditsina; 2000. (in Russian)
16. Skryabina O.A. *Immunodiagnosics and Immunotherapy of T-active Retinoblastoma in Children*: Diss. Moscow; 1990. (in Russian)
17. Shilova O.Yu., Urazova L.N., Muxamedov M.R., Cheremisina O.V., Evtushenko V.A., Choyzonzonov E.L. Laryngeal cancer: a retrospective study. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2009; (Suppl. 2): 227–8. (in Russian)
18. Svetitskiy P.V., Zlatnik E.Yu., Zykova T.A., Nistratov G.P., Aedinova I.V., Volkova V.L. et al. For cancer of the oral cavity with regard to Association with the Epstein-Barr, human papilloma and the level of some cytokines. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014; (11): 120–2. (in Russian)
19. Nistratov G.P., Svetitskiy P.V., Zykova T.A., Aedinova I.V., Volkova V.L., Bauzhadze M.V. et al. The effect of Epstein-Barr and human papilloma on the course of cancer of the oral cavity. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; (6). Available at: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=16497> (in Russian)
20. Xiaolei C., Taot H., Zongli S., Hongying Y. The role of ureaplasma urealyticum infection in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2014; 35(5): 571–5.
21. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G., Bolton D.M., Pedersen J., Longano A. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer*. 2014; 14: 579–82.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.371:578.833.26].015.4

Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Ворович М.Ф., Рогова Ю.В., Карганова Г.Г.

ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО И ЕВРОПЕЙСКОГО ШТАММОВ ИНДУЦИРУЮТ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АНТИТЕЛА КО ВСЕМ ИЗВЕСТНЫМ ПОДТИПАМ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва

Для изучения поствакцинального иммунного ответа использовали сыворотки детей в возрасте от 1 года до 16 лет, полученные в ходе клинических испытаний, проведенных в Свердловской области в 2011 г. Дети были дважды иммунизированы вакцинами против клещевого энцефалита (КЭ) «Клещ-Э-Вак» на основе штамма Софьин дальневосточного подтипа и ФСМЕ-ИММУН Джуниор на основе штамма Найдорфл европейского подтипа. По данным реакции нейтрализации бляшек (РНБ) обе вакцины обладают высокой иммуногенностью: в сыворотках 100% детей, иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак», и 95% детей, иммунизированных вакциной ФСМЕ-ИММУН Джуниор, через 30 дней после двукратной вакцинации были выявлены антитела (АТ) к штамму Софьин в защитных титрах, при этом 24,5 и 21,4% детей соответственно, имели титры АТ > 1:10 000. Отобранные сыворотки реципиентов с титрами от 1:25 до 1:1000 были исследованы в РНБ в одном эксперименте с использованием штаммов Софьин (дальневосточный подтип), Абсеттаров (европейский подтип) и Васильченко (сибирский подтип). Обе вакцины индуцировали АТ к представителям всех трех подтипов вируса в защитных титрах.

Ключевые слова: клещевой энцефалит; поствакцинальный иммунитет; вакцина против клещевого энцефалита.

Для цитирования: Майкова Г.Б., Чернохаева Л.Л., Ворович М.Ф., Рогова Ю.В., Карганова Г.Г. Вакцины на основе дальневосточного и европейского штаммов индуцируют нейтрализующие антитела ко всем известным подтипам вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 135-139.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-135-139

Maikova G.B., Chernokhaeva L.L., Vorovitch M.F., Rogova Yu.V., Karganova G.G.

VACCINES BASED ON THE FAR-EASTERN AND EUROPEAN STRAINS INDUCE THE NEUTRALIZING ANTIBODIES AGAINST ALL KNOWN TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS SUBTYPES

Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalities, Moscow, 142782, Russian Federation

Serum of children aged 1 to 16 obtained in the course of clinical trials conducted in the Sverdlovsk region in 2011 was used to study the post-vaccination immunity. Children were immunized twice with vaccines against the tick-borne encephalitis (TBE) Tick-E-Vak on the basis of the strain Sofjin of the Far-Eastern subtype and FSME-IMMUN Junior based on the Neudorf strain of the European subtype. According to the plaque reduction neutralization test (PRNT), both vaccines have a high immunogenicity: after 30 days since two-time vaccination in the sera of 100% of children immunized with the vaccine Tick-E-Vak and in the 95% of children immunized with the vaccine FSME-IMMUN Junior antibodies (AT) against strain Sofjin were identified in protective titers, whereas 24.5% and 21.4% of children, respectively, had antibody titers higher than 1:10000. Selected sera of recipients with titers from 1:25 to 1:1000 were examined in the PRNT in a single experiment using the Sofjin (Far-Eastern subtype), Absettarov (European subtype) and Vasilchenko (Siberian subtype) strains. The two vaccines induced AT against the representatives of all three subtypes.

Key words: tick-borne encephalitis; postvaccination immunity; vaccine against tick-borne encephalitis.

For citation: Maikova G.B., Chernokhaeva L.L., Vorovitch M.F., Rogova Yu.V., Karganova G.G. Vaccines based on the Far-Eastern and European strains induce the neutralizing antibodies against all known tick-borne encephalitis virus subtypes. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 135-139. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-135-139

For correspondence: Galina G. Karganova, Sc.D., full professor, Head of Laboratory of biology of arboviruses, «Chumakov Institute of Poliomyelitis and viral encephalities», Moscow, 142782, Russian Federation, E-mail: karganova@bk.ru

Information about authors:

Karganova G.G., <http://orcid.org/0000-0002-8901-6206>

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 15-14-00048).

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

Received 09 November 2015

Accepted 19 November 2015

Введение

Клещевой энцефалит (КЭ) представляет серьезную проблему для российского здравоохранения. В настоящее время в России регистрируется около 3 тыс. случаев заболевания в год. Летальность составляет от 0,5 до 17,5%. Для КЭ характерен длитель-

ный период реконвалесценции, и около 10% случаев переходят в хроническую форму.

Возбудителем КЭ является вирус КЭ (род *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*), который имеет 3 подтипа – дальневосточный, европейский и сибирский [1]. Кроме того, описаны 2 новые

Для корреспонденции: Карганова Галина Григорьевна, д-р биол. наук, профессор, заведующая лабораторией биологии арбовирусов ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142782, г. Москва, E-mail: karganova@bk.ru

группы вирусов, которые филогенетически значительно отличаются друг от друга и от известных генотипов вируса КЭ [2]. По-видимому, многообразие вариантов вируса КЭ этим не исчерпывается, поскольку недавно был описан еще один новый вариант, изолированный на юге Кемеровской области, который отличается на 11% по нуклеотидной последовательности фрагмента генома, кодирующего белок Е, от других представителей сибирского подтипа [3]. В России циркулируют все описанные варианты вируса, однако на большей части территории страны вирус КЭ представлен сибирским подтипом [4].

Все варианты вируса КЭ антигенно близки и трудноразличимы в серологических реакциях [2, 5–7]. На ограниченном количестве штаммов было показано, что результаты деления на генотипы на основе филогенетического анализа совпадают с серологическими данными, полученными в реакции диффузной преципитации в агаре с адсорбированными сыворотками [2, 8].

Вакцинация остается основным и наиболее эффективным средством защиты от заболевания. В настоящее время в РФ применяются очищенные концентрированные цельновирионные вакцины 3 производителей [9, 10]. Австрийская вакцина ФСМЕ-ИММУН («Вахтер»), приготовленная на основе европейского штамма Найдорфл, используется с середины 80-х годов прошлого столетия. Вакцина «Энцевер» (НПО «Микроген», Томск) на основе штамма 205 дальневосточного подтипа выпускается с 2003 г. ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов им. М.П. Чумакова» выпускает 2 препарата на основе штамма Софьин дальневосточного генотипа: универсальный вариант очищенной концентрированной лиофилизованной вакцины, разработанной в 80-е годы прошлого столетия [11], и жидкую сорбированную вакцину «Клещ-Э-Вак» с 2012 г. [12].

Эпидемиологические данные демонстрируют высокую эффективность современных вакцин для защиты от КЭ [13–16]. Наиболее убедительные результаты получены в регионах, где привито более 80% населения. Это показано как в Австрии, где подтип вакцинного штамма совпадает с подтипом циркулирующего в природе вируса [16], так и в Свердловской области, где для вакцинации используют все существующие вакцинные препараты [14, 15], а циркулирует в природе преимущественно сибирский подтип вируса [17].

Недавно проведен анализ опубликованных данных о характеристике иммунного ответа у реципиентов вакцин КЭ на основе европейской и дальневосточных штаммов [18]. На основании результатов анализа сыворок реципиентов вакцинных препаратов с использованием реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и иммуноферментного анализа (ИФА) сделано заключение, что все вакцины индуцируют иммунный ответ против штаммов вируса КЭ, представляющих все 3 подтипа. Данные об анализе сыворок реципиентов с помощью более информативной реакции нейтрализации бляшек (РНБ) приведены в этой статье в основном только для вакцины ФСМЕ-ИММУН.

В данной работе проведено сравнительное исследование сыворок реципиентов в возрасте от 1 года до 16 лет после иммунизации вакциной «Клещ-Э-Вак» на основе штамма Софьин и вакциной ФСМЕ-ИММУН Джуниор на основе штамма Найдорфл в РНБ с использованием представителей всех трех подтипов вируса КЭ. Показано, что вакцины сравнимы по своей иммуногенности и индуцируют нейтрализующие антитела в защитном титре против всех подтипов вируса.

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали штаммы вируса КЭ из коллекции ИПВЭ им. М.П. Чумакова: штамм Софьин (ГенБанк (Софьин–Чумаков) КС806252) выделен в 1937 г. в Приморском крае из мозга умершего человека; штамм Абсеттаров (ГенБанк AF091005), выделенный в 1951 г. в Ленинградской области из крови больного; штамм Васильченко (ГенБанк L40361) выделен в 1961 г. в Новосибирской области из крови больного. Все вирусы

использованы в виде 10% суспензии мозга инфицированных мышей, которая хранилась при -70°C .

Сыворотки крови реципиентов вакцин. Для анализа были использованы сыворотки крови реципиентов вакцин, полученные в клинических испытаниях в 2010–2011 гг. в Свердловской области [12] и любезно предоставленные д-ром А.В. Киктенко (ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова»). Дети 1–16 лет, серонегативные по антителам (АТ) к вирусу КЭ в ИФА, были дважды иммунизированы внутримышечно с интервалом 30 дней между иммунизациями. Забор крови у реципиентов проводили до иммунизации и через 30 дней после второй иммунизации.

Вакцины. Для клинических испытаний использовали серию № 6.2009ж вакцины «Клещ-Э-Вак» и серию VN-R1J08D вакцины ФСМЕ-ИММУН Джуниор.

РНБ (50%). РНБ в перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) проводили в 6-луночных панелях («Corning»), как описано ранее [19]. К разведениям сыворотки, приготовленной на среде 199 на растворе Эрла (ФГУП «ПИПВЭ им. М.П. Чумакова») с 2% фетальной сыворотки коров (ФСК) («Gibco»), добавляли равное количество вирусной суспензии, содержащей 40–70 бляшек, и инкубировали 1 ч при 37°C . Далее смесь разведений сыворотки и вируса в объеме 200 мкл добавляли к слившимся монослоям клеток. После адсорбции в течение 1 ч при 37°C в лунки добавляли по 5 мл 1% агарового покрытия («Difco») на растворе Эрла, содержащего 7,5% ФСК и 0,015% нейтрального красного. На 5–6-й день инкубации при 37°C клетки фиксировали с помощью 5% трихлоруксусной кислоты и окрашивали 4% генциановым фиолетовым. Каждый эксперимент включал соответствующие контроли: отрицательную и положительную сыворотку крови человека с известным титром противовирусных антител. Подсчет титров АТ, нейтрализующих 50% бляшек, осуществляли по модифицированному методу Рида и Менча [20].

Результаты

Для изучения спектра АТ, индуцируемых вакцинами на основе дальневосточного и европейского штаммов вируса КЭ, использовали сыворотки иммунизированных детей в возрасте от 1 года до 16 лет, полученные в ходе клинических испытаний, проводимых в 2010–2011 гг. в Свердловской области. Дети были дважды внутримышечно иммунизированы по стандартной схеме с интервалом 30 дней.

Полученные до иммунизации сыворотки детей исследовали на наличие противовирусных АТ в РНБ с использованием штамма Софьин. Для дальнейшего анализа были отобраны сыворотки изначально серонегативных реципиентов вакцины, полученные через 30 дней после второй иммунизации.

Сыворотки детей – реципиентов обеих вакцин исследовали в РНБ с использованием штамма Софьин. Среди 49 реципиентов вакцины «Клещ-Э-Вак» 12 (24,5%) детей имели титры АТ, нейтрализующие штамм Софьин, более 4 lg. Средний геометрический титр (СГТ) нейтрализующих АТ к этому штамму в сыворотках остальных 37 детей составил $2,25 \pm 0,12$ lg. Среди 42 детей – реципиентов вакцины ФСМЕ-ИММУН Джуниор 2 (4,8%) ребенка не имели АТ к штамму Софьин, 9 (21,4%) детей имели титры выше 4 lg, а в сыворотках остальных детей ($n = 31$) СГТ противовирусных АТ составил $2,32 \pm 0,12$ lg.

Для дальнейшего исследования были отобраны 17 и 18 сывороток реципиентов вакцины ФСМЕ-ИММУН Джуниор и «Клещ-Э-Вак» с титрами от 1,4 до 3,0 lg (от 1:25 до 1:1000). Сыворотки исследовали в РНБ в одном эксперименте с использованием штаммов Софьин (дальневосточный подтип), Абсеттаров (европейский подтип) и Васильченко (сибирский подтип). СГТ противовирусных АТ в сыворотках реципиентов обеих вакцин приведены в таблице.

На рисунке приведены данные о титрах АТ к разным штаммам в индивидуальных сыворотках каждого из реципиентов. В сыворотках реципиентов вакцины «Клещ-Э-Вак» в

основном определяются более высокие титры АТ к штамму Софьин, и чаще всего титры АТ к штамму Абсеттаров ниже, чем к остальным штаммам. Иммуный ответ к штамму Васильченко занимает промежуточное положение. В 2 сыворотках реципиентов этой вакцины титры к штамму Абсеттаров и в 1 сыворотке титры к штамму Васильченко были 1:8, т. е. несколько ниже (в пределах ошибки метода), чем 1:10 – титр, условно принятый как защитный.

Распределение АТ, нейтрализующих разные штаммы вируса КЭ, в сыворотках реципиентов вакцины ФСМЕ-ИММУН Джуниор более гетерогенное. Только одна сыворотка содержала АТ к штаммам Абсеттаров и Васильченко в титре 1:8.

Обсуждение

Изменение эпидемиологической ситуации в 90-е годы прошлого столетия сделало КЭ одной из самых актуальных трансмиссивных вирусных нейроинфекций на территории Евразии. Характеристика поствакцинального иммунного ответа привлекает пристальное внимание исследователей, так как до сих пор вакцинация остается единственным эффективным средством контроля данного заболевания. Большая часть работ в этой области посвящена изучению иммунного ответа и протективной активности вакцин в экспериментах на лабораторных животных, в первую очередь на мышах [21–25].

Описаны клинические испытания с использованием современных вариантов вакцин против КЭ на основе европейских штаммов, в результате которых были получены сыворотки реципиентов из регионов, где циркулирует гомологичный вариант вируса. Эти сыворотки были проверены на наличие АТ к штаммам вируса КЭ, представляющим разные подтипы вируса КЭ [18, 26, 27]. В работах Г.Н. Леоновой и соавт. [28, 29] описаны исследования сывороток проживающих на Дальнем Востоке реципиентов 4 вакцин на основе европейских и дальневосточных штаммов в реакции нейтрализации с использованием дальневосточных штаммов вируса КЭ. В этих работах было показано, что все вакцины индуцируют АТ ко всем использованным в данных работах штаммам вируса КЭ. Описанные исследования проведены на взрослом контингенте. Хотя все участники испытания были серонегативными до иммунизации, нельзя исключить контакта реципиентов с вирусом до иммунизации, что могло определенным образом сказаться на уровне АТ к разным подтипам вируса КЭ.

В нашей работе для изучения поствакцинального иммунного ответа мы использовали сыворотки изначально серонегативных детей, что значительно снизило вероятность контакта

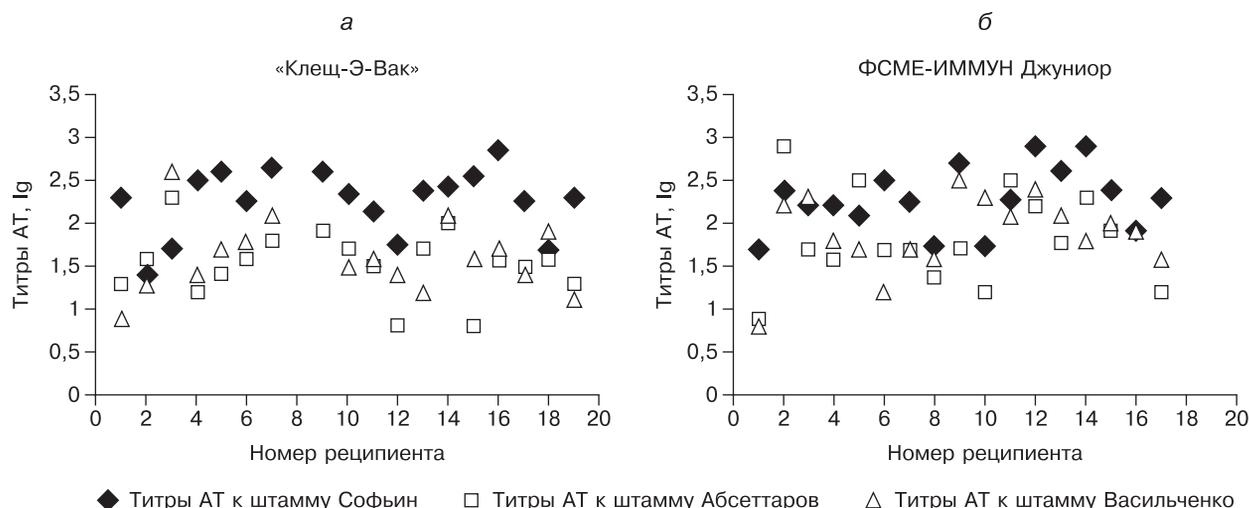
СГТ нейтрализующих АТ в сыворотках реципиентов вакцины «Клещ-Э-Вак» и ФСМЕ-ИММУН Джуниор на 30-й день после второй иммунизации

| Вакцина | СГТ антител в РНБ к штаммам вируса КЭ | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | штамм Софьин – дальневосточный подтип | штамм Абсеттаров – европейский подтип | штамм Васильченко – сибирский подтип |
| «Клещ-Э-Вак» (n = 18) | 2,3 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 | 1,7 ± 0,1 |
| ФСМЕ-ИММУН Джуниор (n = 17) | 2,3 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 | 1,9 ± 0,1 |

реципиентов с вирусом до иммунизации. Детей иммунизировали двумя препаратами, один из которых достаточно давно применяется, а второй является первой российской вакциной для профилактики КЭ у детей в возрасте от 1 года. Представленные нами данные позволяют сделать заключение, что обе вакцины на основе штаммов дальневосточного и европейского подтипов вируса КЭ обладают высокой иммуногенностью, поскольку 100% детей, иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак», и 95% детей, иммунизированных вакциной ФСМЕ-ИММУН Джуниор, через 30 дней после двукратной вакцинации имели нейтрализующие АТ к штамму Софьин в защитных титрах. Следует отметить, что 24,5 и 21,4% детей имели титры противовирусных АТ > 1:10 000.

Для оценки спектра поствакцинального иммунного ответа мы отобрали сыворотки реципиентов с низкими и средними титрами АТ к штамму Софьин, поскольку очевидно, что сыворотки с высокими содержанием АТ к этому штамму (более 1:1000) будут содержать нейтрализующие АТ к другим штаммам вируса КЭ в защитных титрах.

Сравнение СГТ АТ в сыворотках реципиентов обеих вакцин к 3 штаммам, представляющим 3 подтипа вируса, показывает, что наиболее выраженный иммунный ответ формируется к штамму Софьин. Для вакцины «Клещ-Э-Вак» это очевидно, поскольку к гомологичному штамму титры АТ могут быть выше, чем к гетерологичному. Для вакцины на основе штамма Найдорфл данный результат был неожиданным. Ранее было проведено аналогичное исследование с использованием тех же штаммов вируса КЭ и сывороток лабораторных мышей, иммунизированных описанными вакцинами [10]. При анализе в РНБ сывороток



Титры нейтрализующих АТ в сыворотках реципиентов вакцины «Клещ-Э-Вак» (а) и ФСМЕ-ИММУН Джуниор (б) к штаммам Софьин (дальневосточный подтип), Абсеттаров (европейский подтип) и Васильченко (сибирский подтип) вируса КЭ.

мышей после иммунизации обеими вакцинами практически не было выявлено различий в иммунном ответе к штаммам Софьин и Абсеттаров. Остается открытым вопрос, почему при иммунизации детей европейским штаммом вируса КЭ титры АТ к штамму Софьин выше, чем к гомологичному штамму Абсеттаров.

Представленные данные показывают, что двукратная вакцинация детей в возрасте от 1 года до 16 лет по стандартной схеме (30 дней между иммунизациями) с использованием вакцин на основе дальневосточного штамма Софьин и европейского штамма Найдорфл индуцирует синтез АТ к представителям всех трех подтипов вируса.

Финансирование. Работа была поддержана грантом РНФ 15-14-00048.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 6, 7, 13, 16, 18, 19, 21, 22, 25–28 см. REFERENCES)

2. Козлова И.В., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Ткачев С.Е., Карань Л.С. и др. Комплексная характеристика оригинальной группы штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на территории Восточной Сибири. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012; 111(4): 81–5.
3. Ефимова А.Р., Карань Л.С., Дроздова О.М., Григорьева Я.Е., Фролова Н.А., Шейдерова И.Д. и др. Современная эпидемиологическая ситуация по клещевому энцефалиту и генетическое разнообразие ВКЭ на территории Кемеровской области. *Медицинская вирусология. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова*. 2015; 29(1): 3–15.
4. Злобин В.И., Верхозина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(6): 4–13.
5. Бочкова Н.Г., Жермер В.Ю., Трухина А.Г., Гусарова Н.А., Погодина В.В. Серотип Айна/1448 вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1981; 30(5): 572–5.
6. Погодина В.В., Бочкова Н.Г., Карань Л.С., Фролова М.П., Трухина А.Г., Маленко Г.В. и др. Сравнительный анализ вирулентности сибирского и дальневосточного подтипов вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2004; 49(6): 24–30.
7. Воробьева М.С. Современная стратегия вакцинопрофилактики клещевого энцефалита. *Медицинская вирусология. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов*. 2009; 26: 73–4.
8. Афонина О.С., Терехина Л.Л., Бархалева О.А., Ладзыженская И.П., Саркисян К.А., Воробьева М.С. и др. Экспериментальное изучение перекрестного иммунного ответа на антигены штаммов вируса клещевого энцефалита разных генотипов у мышей BALB/c, иммунизированных различными вариантами вакцины клещевого энцефалита. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (5): 88–95.
9. Воробьева М.С., Эльберт Л.Б., Грачев В.П., Леликов В.Л., Первиков Ю.В. Реактогенность и иммунологическая эффективность концентрированной, очищенной вакцины против клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1983; (5): 622–6.
10. Анкудинова А.В., Романенко В.В., Ворович М.Ф., Ковтун О.П., Есюнина М.С., Киктенко А.В. и др. Результаты клинического исследования по оценке безопасности и иммуногенности вакцины «Клещ-Э-Вак» в объеме 0,25 мл (детская доза). *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2014; 51(5): 64–9.
11. Романенко В.В., Есюнина М.С., Киячина А.С. Опыт реализации программы массовой иммунизации против клещевого энцефалита в Свердловской области. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(6): 116–25.
12. Романенко В.В., Есюнина М.С., Киячина А.С., Пименова Т.А. Массовая иммунизация населения Свердловской области против клещевого энцефалита, ее эпидемиологическая, клиническая и иммунологическая эффективность вакцинопрофилактики. *Медицинская вирусология. Труды института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова*. 2006; 23: 116–25.
13. Погодина В.В., Романенко В.В., Карань Л.С., Есюнина М.С., Киячина А.С., Колясникова Н.М. и др. Структура популяций вируса клещевого энцефалита в Свердловской области на современном этапе и вопросы вакцинопрофилактики. *Медицинская вирусология. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова*. 2006; 23: 110–5.
14. Топчий М.К., Корнюшенко Н.П. *Руководство к практическим занятиям по вирусологии*. Киев: Издательство Киевского Университета; 1967.
15. Воробьева М.С., Расщепкина М.Н. Изучение взаимосвязи антигенной характеристики вируса клещевого энцефалита с уровнем протективной активности инактивированных культуральных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1992; (11–12): 35–7.
16. Воробьева М.С., Расщепкина М.Н., Ладзыженская И.П., Горбунов М.А., Павлова П.И., Бектимиров Т.А. Сравнительное изучение инактивированных культуральных вакцин против клещевого энцефалита отечественного производства и производства фирмы «Иммуно» (Австрия). *Вопросы вирусологии*. 1996; 41(5): 221–4.
17. Леонова Г.Н., Павленко Е.В. Функциональная активность специфических антител у лиц, вакцинированных против клещевого энцефалита, по отношению к разным штаммам вируса. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 33–7.
18. King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press; 2012.
19. Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Tkachev S.E., Karan' L.S. et al. Comprehensive description of the original group of tick-borne encephalitis virus strains isolated on the territory of Eastern Siberia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk)*. 2012; 111(4): 81–5. (in Russian)
20. Efimova A.R., Karan' L.S., Drozdova O.M., Grigor'eva Ya.E., Frolova N.A., Sheiderova I.D. et al. Tick-borne encephalitis in Kemerovo region: epidemiology and genetic diversity of the virus. *Meditsinskaya virusologiya. Transactions of the Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis*. 2015; 29(1): 3–15. (in Russian)
21. Zlobin V.I., Verkhozina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Adel'shin R.V., Kozlova I.V. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(6): 4–13. (in Russian)
22. Bochkova N.G., Zhermer V.Yu., Trukhina A.G., Gusarova N.A., Pogodina V.V. The Aйна/1448 serotype of the tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 1981; 30(5): 572–5. (in Russian)
23. Calisher C.H., Karabatsos N., Dalrymple J.M., Shope R.E., Porterfield J.S., Westaway E.G. et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J. Gen. Virol*. 1989; 70(Pt.1): 37–43.
24. Clarke D.K. Studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tick-borne complex. *Bull. World Health Organ*. 1964; 31: 45–56.
25. Pogodina V.V., Bochkova N.G., Karan L.S., Frolova M.P., Trukhina A.G., Malenko G.V. et al. Comparative analysis of virulence of the Siberian and Far-East subtypes of the tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2004; 49(6): 24–30. (in Russian)
26. Vorob'eva M.S. Modern strategy of tick-borne encephalitis vaccinal prevention. *Meditsinskaya virusologiya. Transactions of the Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis*. 2009; 26: 73–4. (in Russian)
27. Afonina O.S., Terekhina L.L., Barkhaleva O.A., Ladyzhenskaya I.P., Sarkisyan K.A., Vorob'eva M.S. et al. Experimental studies cross immune response to antigens of the virus strains of tick-borne encephalitis different genotypes in BALB/c mice, immunized with various embodiments of tick-borne encephalitis vaccine. *Epidemiologiya i vaksinooproflaktika*. 2014; (5): 88–95. (in Russian)
28. Vorob'eva M.S., El'bert L.B., Grachev V.P., Lelikov V.L., Pervikov Yu.V. Reactogenicity and immunological effectiveness of a concentrated, purified vaccine against tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*. 1983; (5): 622–6. (in Russian)
29. Ankudinova A.V., Romanenko V.V., Vorovich M.F., Kovtun O.P., Esiyunina M.S., Kiktenko A.V. et al. Results of a clinical immunogenicity and safety trial of «Tick-E-Vac» 0.25 ml Vaccine (Pediatric Dosage). *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2014; 51(5): 64–9. (in Russian)
30. Heinz F.X., Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine*. 2012; 30(29): 4301–6.
31. Romanenko V.V., Esiyunina M.S., Kilyachina A.S. Experience in implementing the mass immunization program against tick-borne encephalitis in the Sverdlovsk Region. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(6): 116–25. (in Russian)
32. Romanenko V.V., Esiyunina M.S., Kilyachina A.S., Pimenova T.A. Mass immunization Sverdlovsk region population against tick-borne encephalitis, its epidemiological, clinical and immunological effectiveness of vaccination. *Meditsinskaya virusologiya. Transactions of the Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis*. 2006; 23: 116–25. (in Russian)
33. Kunze U., Böhm G. Tick-borne encephalitis (TBE) and TBE-vaccination in Austria: Update 2014. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2015; 165(13–14): 290–5. (in German)
34. Pogodina V.V., Romanenko V.V., Karan L.S., Esiyunina M.S., Kilyachina A.S., Kolyasnikova N.M. et al. The structure of tick-borne encephalitis virus populations in the Sverdlovsk region at present and questions vaccinal prevention. *Meditsinskaya virusologiya. Transactions of the*

- Chumakov institute of poliomyelitis and viral encephalitis.* 2006; 23: 110–5. (in Russian)
18. Domnich A., Panatto D., Arbuzova E.K., Signori A., Avio U., Gasparini R. et al. Immunogenicity against Far Eastern and Siberian subtypes of tick-borne encephalitis (TBE) virus elicited by the currently available vaccines based on the European subtype: systematic review and meta-analysis. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2015; 10(10): 2819–33.
 19. Pripuzova N.S., Gmyl L.V., Romanova L.Iu., Tereshkina N.V., Rogova Y.V., Terekhina L.L. et al. Exploring of primate models of tick-borne flavivirus infection for evaluation of vaccines and drugs efficacy. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61094.
 20. Topchiy M.K., Korniyushenko N.P. *Guide to Practical Training in Virology [Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po virusologii]*. Kiev: Izdatel'stvo Kievskogo Universiteta; 1967. (in Russian)
 21. Fritz R., Orlinger K., Hofmeister Y., Janeckia K., Traweger A., Perez-Burgos L. et al. Quantitative comparison of the cross-protection induced by tick-borne encephalitis virus vaccines based on European and Far Eastern virus subtypes. *Vaccine.* 2012; 30(6): 1165–9.
 22. Holzmann H., Vorobyova M.S., Ladyzhenskaya I.P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C. et al. Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine.* 1992; 10(5): 345–9.
 23. Vorob'eva M.S., Rasshchepkina M.N. The relationship of the antigenic characteristics of the tick-borne encephalitis virus to the level of the protective activity of inactivated cultured vaccines. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1992; (11–12): 35–7. (in Russian)
 24. Vorob'eva M.S., Rasshchepkina M.N., Ladyzhenskaya I.P., Gorbunov M.A., Pavlova L.I., Bektimirov T.A. Comparative study of inactivated cultured vaccines against tick-borne encephalitis manufactured in Russia and in Austria by the «Immun» firm. *Voprosy virusologii.* 1996; 41(5): 221–4. (in Russian)
 25. Morozova O.V., Bakhvalova V.N., Potapova O.F., Grishechkin A.E., Isaeva E.I., Aldarov K.V. et al. Evaluation of immune response and protective effect of four vaccines against the tick-borne encephalitis virus. *Vaccine.* 2014; 32(25): 3101–6.
 26. Chiba N., Osada M., Komoro K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. Protection against tick-borne encephalitis virus isolated in Japan by active and passive immunization. *Vaccine.* 1999; 17(11–12): 1532–9.
 27. Orlinger K.K., Hofmeister Y., Fritz R., Holzer G.W., Falkner F.G., Unger B. et al. A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(11): 1556–64.
 28. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Characterization of neutralizing antibodies to Far-Eastern of tick-borne encephalitis virus subtype and the antibody avidity for four tick-borne encephalitis vaccines in human. *Vaccine.* 2009; 27(21): 2899–904.
 29. Leonova G.N., Pavlenko E.V. Functional activity of specific antibodies in patients vaccinated against tick-borne encephalitis in relation to different virus strains. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(3): 33–7. (in Russian)

Поступила 09.11.15
Принята в печать 19.11.15

© КРЫЛОВА Н.В., ЛЕОНОВА Г.Н., 2016

УДК 615.281.8.03:616.831-002-022:578.833.26].076.9

Крылова Н.В., Леонова Г.Н.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ С РАЗЛИЧНЫМ МЕХАНИЗМОМ ДЕЙСТВИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток

Одним из возможных подходов к эффективному, патогенетически обоснованному лечению пациентов с клещевым энцефалитом (КЭ) является включение в комплексную терапию иммуотропных препаратов, выделенных из природных объектов. Проведено сравнительное изучение противовирусной активности тинростима (иммуноактивного пептида из оптических ганглиев кальмара *Berryteuthis magister*) и некоторых официальных препаратов, применяемых для профилактики и лечения КЭ (рибавирин, реферон-ЕС, циклоферон, йодантипирин, иммуноглобулин против КЭ) при экспериментальном КЭ. Все тестируемые препараты достоверно подавляли размножение высоковирулентного штамма вируса КЭ в чувствительной культуре клеток почки эмбриона свиньи: рибавирин и иммуноглобулин против КЭ ингибировали репродукцию вируса полностью – на 100%, циклоферон – на 75%, тинростим, реферон-ЕС и йодантипирин – на 50–60%. На модели острого летального КЭ у мышей оценивали терапевтическую эффективность препаратов. Применение циклоферона и иммуноглобулина против КЭ предотвращало смертность 35–45% инфицированных животных, тинростима – 25%, рибавирин, реферон-ЕС и йодантипирин – 5–10% животных. Комбинация иммуноактивного пептида тинростима с официальными препаратами (рибавирином, циклофероном) была более эффективна, чем применение отдельных препаратов, что свидетельствует о перспективности использования такой терапии при КЭ.

Ключевые слова: *противовирусная активность; иммуноактивный пептид; вирус клещевого энцефалита.*

Для цитирования: Крылова Н.В., Леонова Г.Н. Противовирусная активность препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном клещевом энцефалите. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(3): 139-144.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144

Krylova N.V., Leonova G.N.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF VARIOUS DRUGS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF ACTION IN PATIENTS WITH EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation

A possible approach to effective, pathogenetically valid treatment of patients with the tick-borne encephalitis (TBE) is a complex therapy with the immunotropic preparations isolated from natural objects. This work is devoted to the comparative study of the antiviral activity of the tinrostim (immunoactive peptide from the optical ganglia of the squid *Berrytiuthis magister*) and some official drugs used for prevention and treatment of the TBE

Для корреспонденции: Крылова Наталья Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории flavivirusных инфекций ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова», 690087, г. Владивосток, E-mail: krylovanatalya@gmail.com

(ribavirin, reaferon-EC, cycloferon, 4-jodantipyrin, immunoglobulin human against encephalitis ixodicum) in the experimental models of the TBE. All tested drugs significantly inhibited the proliferation of the highly virulent strain of the TBEV in the sensitive PK cell cultures: ribavirin and immunoglobulin against TBE completely inhibited viral replication (by 100%); cycloferon – by 75%; tinrostim, reaferon-EC, and jodantipyrin – by 5-60%. Therapeutic efficacy of the compounds was evaluated on a model of acute lethal TBE in mice: treatment with cycloferon and immunoglobulin against TBE prevented the mortality in 35-45% of infected animals; tinrostim – in 25%; ribavirin, reaferon-EC, and jodantipyrin – in 5-10%. The combination of the immunoactive peptide, tinrostim, with official drugs (ribavirin, cycloferon) was more effective than the treatment with a single drug, thereby indicating the prospects of the use of this therapy for treating TBE.

Key words: antiviral activity; immunoactive peptide; tick-borne encephalitis virus.

For citation: Krylova N.V., Leonova G.N. Antiviral activity of various drugs with different mechanisms of action in patients with experimental tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 139-144. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3- 139-144

For correspondence: Natalya V. Krylova, Doctor of Biology, Leading research scientist, Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok, 690087, Russian Federation, E-mail: krylovanatalya@gmail.com

Information about authors:

Krylova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-9048-6803>

Leonova G.N., <http://orcid.org/0000-0001-6387-1127>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 22 10 2015
Accepted 19 11 2015

Введение

До настоящего времени лечение клещевого энцефалита (КЭ), как и других вирусных инфекций, представляет собой сложную и нерешенную проблему. Тактика терапии КЭ предполагает обязательное проведение комплексной терапии – этиотропной, патогенетической и симптоматической [1, 2]. Современный арсенал этиотропных средств противовирусной терапии включает широкий спектр препаратов из нескольких фармакологических групп: противовирусные химиопрепараты; интерфероны и их индукторы; специфические иммуноглобулины; иммуномодуляторы [3]. Однако целесообразность применения в терапии КЭ препаратов специфических иммуноглобулинов неоднозначна [4], а существующие противовирусные средства недостаточно эффективны. В этой связи поиск препаратов, которые бы не только ингибировали репликацию вируса и элиминировали его из организма, но и корригировали индуцированное вирусом иммунодефицитное состояние, остается актуальным. Одним из возможных подходов к эффективному, патогенетически обоснованному лечению пациентов с КЭ является включение в комплексную терапию иммуноактивных соединений (белков, полисахаридов, пептидов, полифенолов и других), выделенных из природных объектов.

Изучение пептидов, полученных из природных источников и обладающих высокой биологической, в том числе иммуномодулирующей активностью, является одним из перспективных направлений иммунофармакологии. Источником уникальных биологически активных веществ широкого спектра действия являются морские гидробионты, которые в составе соединений часто превосходят аналоги наземного происхождения по биологической или фармакологической активности [5]. Дальневосточные ученые интенсивно занимаются выделением и изучением иммуноактивных пептидов из различных тканей гидробионтов: костного мозга и гормонов тимуса морских млекопитающих, из молока, печени и сердца лососевых рыб [6]. Из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister* выделен комплекс пептидов тинростим [7]. Было установлено, что это пептидное соединение стимулирует гуморальный иммунный ответ, фагоцитоз, оказывает активирующее воздействие на ферменты антиоксидантной системы, проявляет апоптозрегулирующую активность, влияет на перекисное окисление липидов, реакции сосудистотромбоцитарного гемостаза, обладает противовоспалительными свойствами [8]. В настоящее время тинростим выпускается в виде биологически активной добавки к пище и используется практическими врачами в качестве средства сопровождения базисной терапии при некоторых заболеваниях [9]. Учитывая иммуномодулирующие свойства тинростима, представляется необ-

ходимым исследовать его активность в отношении вируса КЭ и обосновать целесообразность его применения в комплексной терапии КЭ.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение противовирусной эффективности иммуноактивного пептида тинростима и некоторых официальных препаратов с различным механизмом действия при экспериментальном КЭ.

Материал и методы

Вирус. В работе использован вирус КЭ дальневосточного субтипа, штамм Dal'negorsk (Dal), выделенный в 1973 г. из мозга человека, умершего от очаговой формы КЭ. Нами описана молекулярно-генетическая характеристика этого штамма (номер полногеномной последовательности в GenBank: FJ402886), изучены его биологические свойства [10]. В настоящем исследовании была использована 10% суспензия мозга инфицированных мышей-сосунков (9-й пассаж), титр которой на культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) составлял 10^7 ТЦИД₅₀/мл.

Культура клеток. Для анализа противовирусной активности препаратов *in vitro* использовали перевиваемую культуру клеток СПЭВ, высокочувствительную к вирусу КЭ. Клетки культивировали в 24-луночных пластиковых панелях с использованием среды 199 и добавлением 10% сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина. Поддерживающая среда содержала ту же смесь, но с добавлением 1% эмбриональной сыворотки.

Животные. Изучение противовирусной активности препаратов *in vivo* проводили на 920 неинбредных мышах-самцах массой 12–14 г, полученных из питомника «Столбовая». Протокол экспериментальной части исследования на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта соответствовал принципам биологической этики, изложенным в международных и российских нормативных документах по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Работа одобрена Этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова» (протокол № 5 от 05.11.13).

Препараты. Тинростим – комплекс пептидов, выделенных из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister*, содержит 84% низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой от 1 до 12,5 кДа и 16% свободных аминокислот, представленных в основном аспарагиновой, глутаминовой кислотой и лизином [7]. На основе тинростима получена биологически активная добавка к пище «Тинростим-СТ», производство, реализация и применение которой разрешено Минздравом РФ на территории Российской Федерации (регистрационное удостоверение № 77.99.04.928.Б.000663.08.03 от 29.08.03).

Для сравнительного изучения противовирусной эффективности тинростима были использованы официальные препараты, применяемые для профилактики и лечения КЭ, из вышеперечисленных фармакологических групп. Из группы химиопрепаратов выбран рибавирин® (ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург), из группы интерферонов – реаферон-ЕС® (ЗАО «Вектор-Медика», Новосибирск), из эндогенных индукторов интерферона – циклоферон® (ООО НТФФ «Полисан», Санкт-Петербург) и йодантипирин® (ООО «НТМ», Томск). Группа специфических иммуноглобулинов представлена иммуноглобулином против КЭ® (НПО «Микроген», Хабаровск). Тинростим рассматривали как препарат из группы иммуномодуляторов.

Определение цитотоксичности препаратов. На неинфицированный однослойный монослой культуры клеток СПЭВ нанесли различные концентрации исследуемых препаратов и помещали при 37°C в CO₂-инкубатор на 5 сут. Результаты учитывали по появлению цитодеструктивных изменений монослоя клеток. Контролем являлся монослой клеток, на который была нанесена поддерживающая среда без препарата. В качестве показателя токсичности каждого препарата для данной культуры клеток служила максимально переносимая концентрация (МПК), которая составляет 1/2 максимальной концентрации препарата, не оказывающей на клетки токсичного действия (по данным прижизненного морфологического исследования и нарушению поглощения клетками витального красителя) [11].

Определение противовирусной активности препаратов *in vitro*. Монослой культуры клеток инфицировали 10-кратными разведениями штамма Dal вируса КЭ с инфекционным титром 7 lg ТЦИД₅₀/мл. После 1 ч контакта вируса с клетками при 37°C монослой клеток трижды отмывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,2. Исследуемые препараты в различных концентрациях (опыт) или поддерживающую среду (контроль) наносили на инфицированные клетки, пластиковые панели помещали на 5 сут в CO₂-инкубатор. Противовирусное действие препаратов рассчитывали по соотношению инфекционной активности вируса в опытных и контрольных образцах. Все опыты проводили в трехкратной повторности.

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vitro* являлись следующие показатели [11]: снижение инфекционного титра вируса под воздействием препарата (Δ , lg), коэффициент ингибирования (Ки, %) и химиотерапевтический индекс (ХТИ). Снижение уровня накопления вируса под влиянием препарата (Δ , lg) определяли по формуле:

$$\Delta = A_k - A_o,$$

где A_k – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду изучаемого препарата (в lg ТЦИД₅₀/мл); A_o – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого препарата (в lg ТЦИД₅₀/мл). Ки рассчитывали по формуле:

$$Ki = (A_k - A_o) / A_k \cdot 100\%.$$

За величину ХТИ препарата принимали соотношение МПК/МЭК, где МЭК – минимально эффективная вирусингибирующая концентрация препарата, снижающая титр вируса не менее чем на 2 lg ТЦИД₅₀ [11].

Определение противовирусной активности препаратов *in vivo*. Для моделирования экспериментального КЭ неинбредных мышей подкожно инфицировали штаммом Dal вируса КЭ в дозе 100 LD₅₀/0,2 мл. Животные получали исследуемые препараты через 1 ч после заражения вирусом. Препараты вводили в дозах, рекомендуемых для применения в клинике и пересчитанных на массу тела животного. Способы введения препаратов указаны в табл. 1. Контролем служила группа мышей, инфицированных вирусом КЭ и не получавших препараты. За животными наблюдали 21 день. В каждой группе было по 10 животных, опыты повторялись трехкратно.

Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vivo* являлись показатели летальности (отношение павших животных к общему количеству мышей в группе, %) и средней продолжительности жизни (СПЖ) животных в группе (в сут) [11].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета про-

грамм Statistica 6.0 и Excel. Для оценки значимости различий количественных признаков использовали критерий Вилкоксона для связанных выборок и логранговый критерий z (с поправкой Йетса) для сравнения выживаемости животных двух групп.

Результаты и обсуждение

Изучение активности препаратов *in vitro* в отношении вируса КЭ. При исследовании цитотоксического действия изучаемых препаратов (в концентрациях от 1 до 8000 мкг/мл) на неинфицированную культуру клеток СПЭВ установлено, что их МПК составляли 1000 мкг/мл или более, т. е. эти препараты были нетоксичны для используемой культуры клеток.

Сравнительную оценку вирусингибирующей активности различных препаратов проводили на данной культуре клеток, инфицированную высоковирулентным штаммом Dal вируса КЭ (табл. 1). Установлено, что эффективность подавления репродукции вируса КЭ препаратами, различающимися по своему химическому составу и механизму действия, имела дозозависимый характер. Внесение в культуру клеток противовирусного химиопрепарата рибавирин в концентрации 500 мкг/мл полностью подавляло репродукцию вируса КЭ (на 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл), а минимальная вирусингибирующая концентрация этого препарата составила 31 мкг/мл (см. табл. 1). Известно, что рибавирин (синтетический аналог нуклеозидов 1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) характеризуется широким спектром противовирусного действия в отношении ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Отмечено ингибирующее действие этого препарата на репликацию ряда флавивирусов в различных клеточных культурах [12, 13]. Предполагают, что противовирусная активность рибавирина может быть обусловлена тремя различными механизмами действия [14, 15]. Во-первых, препарат ингибирует активность фермента хозяина инозинмонофосфат дегидрогеназы, что снижает внутриклеточные запасы гуанозинтрифосфата и тем самым опосредованно угнетает синтез нуклеиновых кислот вируса. Во-вторых, он может изменять синтез РНК с последующим нарушением транскрипции вируса. В-третьих, установлено прямое угнетающее влияние рибавирина на активность полимеразы вирусной [14, 15].

Применение реаферона-ЕС (рекомбинантного интерферона – ИФН-α2b) в максимальной концентрации (10⁴ МЕ/мл) вызывало снижение титров вируса КЭ на 3,5 lg ТЦИД₅₀/мл (Ки = 58,3%) (см. табл. 1). Механизм противовирусного действия реаферона-ЕС, как и других ИФН-α, заключается в том, что данные препараты, взаимодействуя со специфическими рецепторами на поверхности клеток, инициируют ряд внутриклеточных изменений, включающих синтез цитокинов и ферментов (2–5-аденилатсинтетазы и протеинкиназы), действие которых блокирует образование вирусных белков и вирусной РНК в клетке [16, 17].

Внесение в культуру клеток индукторов ИФН циклоферона (метилглюкамина акридоната) и йодантипирина (1-фенил-2,3-диметил-4-йодпирозолона) в различной степени снижало репродукцию вируса КЭ (см. табл. 1). Ингибирование репликации вируса на 75% (71,7–78,3%) зарегистрировано при применении 125 мкг/мл циклоферона, противовирусное действие которого обусловлено индукцией эндогенных ИФН-α/β и прямым воздействием на репликацию вируса путем блокирования инкорпорации вирусных РНК в капсиды и увеличения количества дефектных вирусных частиц [18]. Максимальный эффект йодантипирина – снижение репродукции вируса КЭ на 50% (46,7–55,0%) – наблюдали при концентрации препарата 1000 мкг/мл. Полагают [19], что йодантипирин не прямо, а опосредованно усиливает продукцию эндогенных ИФН-α/β, вероятно, за счет способности подавлять синтез простагландинов, оказывающих ингибирующее действие на продукцию ИФН. Данный препарат способен подавлять репродукцию ряда РНК- и ДНК-содержащих вирусов и оказывает стабилизирующее действие на биологические мембраны, что может также обуславливать торможение проникновения вируса в клетку [19].

Применение иммуноглобулина против КЭ (антитела против КЭ класса IgG, титры не менее 1:80) полностью подавляло репродукцию вируса КЭ (см. табл. 1). Даже при максимальном

Т а б л и ц а 1

Оценка влияния препаратов на репродукцию вируса КЭ в культуре клеток СПЭВ

| Препараты | Концентрация препаратов | Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /мл | Подавление репродукции вируса, Δ, lg | Ки, % |
|---------------------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|------------------|
| Контроль (без препаратов) | – | 6,0 (5,5–7,0) | – | – |
| Рибавирин | 500 мкг/мл | 0 | 6,0 (5,5–6,5) | 100 |
| | 250 мкг/мл | 1,0 (0,8–1,2)* | 5,0 (4,7–5,3) | 83,3 (81,5–85,5) |
| | 125 мкг/мл | 2,0 (1,8–2,3)* | 4,0 (3,7–4,2) | 66,7 (62,1–70,0) |
| | 62 мкг/мл | 3,1 (2,8–3,3)* | 2,9 (2,7–3,2) | 50,0 (47,0–53,1) |
| | 31 мкг/мл | 4,0 (3,8–4,3)* | 2,0 (1,7–2,2) | 33,3 (28,2–36,7) |
| Реаферон-ЕС | 10 ⁴ МЕ/мл | 2,5 (2,0–3,0)* | 3,5 (3,0–4,0) | 58,3 (50,0–66,7) |
| | 10 ³ МЕ/мл | 3,0 (2,7–3,2)* | 3,0 (2,8–3,3) | 50,0 (46,7–55,0) |
| | 10 ² МЕ/мл | 4,1 (3,8–4,5)* | 1,9 (1,7–2,0) | 31,6 (28,3–33,3) |
| | 10 МЕ/мл | 5,0 (4,6–5,2) | 1,0 (0,9–1,3) | 16,7 (15,0–21,7) |
| Циклоферон | 125 мкг/мл | 1,5 (1,2–1,8)* | 4,5 (4,3–4,7) | 75,0 (71,7–78,3) |
| | 60 мкг/мл | 3,0 (2,6–3,4)* | 3,0 (2,9–3,1) | 50,0 (48,3–52,7) |
| | 12,5 мкг/мл | 3,9 (3,5–4,2)* | 2,1 (1,8–2,4) | 35,0 (30,0–40,0) |
| | 1,25 мкг/мл | 6,0 | 0 | 0 |
| Йодантипирин | 1000 мкг/мл | 3,0 (2,7–3,2)* | 3,0 (2,8–3,3) | 50,0 (46,7–55,0) |
| | 100 мкг/мл | 4,2 (3,8–4,4)* | 1,8 (1,6–2,2) | 30,0 (26,7–36,7) |
| | 10 мкг/мл | 5,0 (4,6–5,2) | 1,0 (0,9–1,3) | 16,7 (15,0–21,7) |
| | 1 мкг/мл | 6,0 | 0 | 0 |
| Иммуноглобулин против КЭ, титры | Цельный | 0 | 6,0 (5,5–6,5) | 100 |
| | 1:10 | 1,0 (0,9–1,2)* | 5,0 (4,8–5,3) | 83,3 (81,5–87,3) |
| | 1:100 | 2,0 (1,8–2,1)* | 4,0 (3,7–4,3) | 66,7 (65,1–68,5) |
| | 1:1000 | 2,3 (2,0–2,5)* | 3,7 (3,5–4,0) | 61,7 (58,5–63,6) |
| Тинростим | 100 мкг/мл | 4,0 (3,5–4,5)* | 2,0 (1,5–2,5) | 33,3 (25,0–41,6) |
| | 10 мкг/мл | 2,5 (2,0–3,0)* | 3,5 (3,0–4,0) | 58,3 (50,0–66,7) |
| | 1 мкг/мл | 3,3 (3,0–3,5)* | 2,7 (2,5–3,0) | 45,0 (41,7–50,0) |
| | 0,1 мкг/мл | 3,9 (3,5–4,2)* | 2,1 (1,8–2,4) | 35,0 (30,0–40,0) |
| Рибавирин + Тинростим | 30 мкг/мл | 2,0 (1,6–2,4)* | 4,0 (3,6–4,4) | 66,7 (60,0–73,3) |
| | 0,1 мкг/мл | | | |

Примечание. Препараты вносили через 1 ч после инфицирования культуры клеток штаммом Dal вируса КЭ. * – различия значимы по отношению к контролю ($p \leq 0,05$). Использован критерий Вилкоксона для связанных выборок.

разведении препарата (1:1000) Ки репликации вируса составил 61,7% (58,5–63,6%). Фармакологическое действие специфических иммуноглобулинов, в том числе иммуноглобулина против КЭ, основано на связывании и нейтрализации внеклеточных вирусных частиц и блокировании присоединения вируса к клетке-мишеню [20, 21].

При использовании пептидного комплекса тинростима в концентрации 10 мкг/мл было зарегистрировано снижение титров вируса КЭ на 3,5 lg ТЦИД₅₀/мл (Ки = 58,3%) (см. табл. 1). Необходимо отметить, что минимальная вирусингибирующая концентрация для тинростима составила 0,1 мкг/мл, что обусловило высокий химиотерапевтический индекс этого препарата (табл. 2).

Механизмы противовирусного действия тинростима, как и ряда других пептидных препаратов, находятся в процессе изучения. Можно предположить, что снижение титров вируса КЭ под действием тинростима происходит за счет блокирования проникновения вируса в клетку, поскольку этот пептид может конкурировать за «вирусспецифические» рецепторы на клетках-мишенях, участвующие в прикреплении и проникновении вируса в клетку. Кроме того, возможно прямое взаимодействие препарата с вирусом, приводящее к нарушению целостности оболочки вируса и блокированию его адсорбции на клетки. Есть

основания полагать, что противомикробные пептиды непосредственно участвуют в изменении структуры вируса [22].

Известно, что комбинированное использование противовирусных препаратов, имеющих разную химическую структуру и принципиально разный механизм действия, может приводить к усилению антивирусного эффекта аддитивного или синергидного характера [23]. Нами был изучен противовирусный эффект сочетанного применения химиопрепарата рибавирина и иммуномодулятора тинростима (см. табл. 1). Монопрепараты применяли в МЭК, снижающих накопление вируса КЭ на 2 lg ТЦИД₅₀/мл. Комбинированное использование рибавирина и тинростима (в соотношении 1:1) в указанных минимальных концентрациях снижало титр вируса КЭ на 4,0 (3,6–4,4) lg ТЦИД₅₀/мл, подавляя репродукцию вируса на 66,7% (60,0–73,3%), т. е. эффект комбинации препаратов имеет аддитивный характер и может быть оценен положительно.

Результаты данного этапа исследований на модели *in vitro* продемонстрировали высокую ингибирующую активность препаратов в отношении вируса КЭ, что свидетельствовало о целесообразности дальнейшего изучения *in vivo* как самих препаратов, так и их совместного применения.

Изучение активности препаратов при экспериментальном КЭ. В настоящем исследовании моделировали летальную вирусную инфекцию у мышей, инфицированных штаммом Dal вируса КЭ в дозе 100 LD₅₀ с использованием лечебной схемы введения препаратов. В контрольной группе все животные погибали начиная с 9-х суток (СПЖ составила 9,8 ± 1,9 дня) (табл. 3).

Пероральное введение животным рибавирина в дозах 50–100 мг/кг защищало от гибели лишь 5,0–13,3% животных (см. табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что хотя рибавирин на модели *in vitro* проявляет высокую ингибирующую активность в отношении вируса КЭ, в то же время он недостаточно эффективно защищает инфицированных животных. Подобные результаты получены другими авторами при флавивирусных инфекциях [24, 25].

Внутримышечное введение реаферона-ЕС в дозе 10⁴ МЕ/кг удлиняло СПЖ животных на 1 день по сравнению с таковой в контрольной группе, защищая от гибели 5,0 ± 1,0% мышей, инфицированных вирусом КЭ (см. табл. 3). Слабое протективное действие реаферона-ЕС, выявленное в наших экспериментах, может объясняться не только видоспецифичностью данного препарата, но и невысокой эффективностью монотерапии препаратами ИФН-α, продемонстрированной другими авторами на моделях животных, инфицированных разными флавивирусами [17, 24].

Т а б л и ц а 2

Определение ХТИ исследуемых препаратов в культуре клеток СПЭВ

| Препарат | Диапазон концентраций препаратов | МПК, мкг/мл | МЭК, мкг/мл | ХТИ |
|--------------|---|-------------|-------------|-------|
| Рибавирин | 10 – 8000 мкг/мл | 2000 | 30 | 67 |
| Реаферон-ЕС | 10 ¹ – 10 ⁶ МЕ/мл | 5000 | 100 | 50 |
| Циклоферон | 1,25 – 2000 мкг/мл | 1000 | 12,5 | 80 |
| Йодантипирин | 1 – 2000 мкг/мл | 1000 | 100 | 10 |
| Тинростим | 0,001 – 6400 мкг/мл | 3200 | 0,1 | 32000 |

Таблица 3

Влияние препаратов на выживаемость животных, инфицированных вирусом КЭ

| Препараты | Способ и кратность введения препаратов | Дозы препаратов | % выживших животных | СПЖ, дни | Логранговый критерий z |
|---------------------------|--|-----------------------|---------------------|------------|--------------------------|
| Контроль (без препаратов) | | | 0 | 9,8 ± 1,9 | |
| Рибавирин | Перорально 10 дней | 50 мг/кг | 5,0 ± 1,0 | 10,8 ± 2,0 | $z = 0,891, a = 0,346$ |
| | | 100 мг/кг | 13,3 ± 3,2 | 11,8 ± 2,4 | $z = 1,516, a = 0,130$ |
| | | 200 мг/кг | 0 | 9,1 ± 1,8 | $z = 0,379, a = 0,744$ |
| Реаферон-ЕС | Внутримышечно 5 дней | 10 ³ МЕ/кг | 0 | 10,0 ± 2,0 | $z = 0,936, a = 0,875$ |
| | | 10 ⁴ МЕ/кг | 5,0 ± 1,0 | 10,6 ± 2,1 | $z = 0,771, a = 0,441$ |
| Циклоферон | Внутримышечно 5 дней | 0,6 мг/кг | 0 | 10,2 ± 2,0 | $z = 0,399, a = 0,711$ |
| | | 6 мг/кг | 21,7 ± 4,3 | 12,3 ± 2,5 | $z = 2,065, a = 0,039$ |
| | | 60 мг/кг | 35,0 ± 5,0 | 14,5 ± 2,8 | $z = 2,490, a = 0,013$ |
| Йодантипирин | Перорально 5 дней | 1,25 мг/кг | 0 | 10,0 ± 2,0 | $z = 0,936, a = 0,875$ |
| | | 12,5 мг/кг | 15,5 ± 3,1 | 11,5 ± 2,3 | $z = 1,020, a = 0,308$ |
| Имуноглобулин против КЭ | Внутримышечно однократно | 0,15 мл/кг | 30,0 ± 5,0 | 13,9 ± 2,8 | $z = 2,240, a = 0,029$ |
| | | 0,25 мл/кг | 45,0 ± 8,0 | 16,2 ± 3,2 | $z = 3,646, a = 0,000$ |
| Тинростим | Подкожно 5 дней | 5 мг/кг | 25,3 ± 5,8 | 12,5 ± 2,5 | $z = 2,080, a = 0,041$ |
| | | 50 мг/кг | 10,0 ± 2,0 | 11,0 ± 2,8 | $z = 1,056, a = 0,411$ |
| Тинростим + Рибавирин | Подкожно | 5 мг/кг | 33,3 ± 6,7 | 13,8 ± 2,5 | $z = 2,153, a = 0,028$ |
| | | | | | $z_1 = 0,316, a = 0,752$ |
| Тинростим + Циклоферон | Подкожно | 5 мг/кг | 50,0 ± 5,0 | 15,9 ± 3,0 | $z_2 = 2,060, a = 0,043$ |
| | | | | | $z = 3,121, a = 0,000$ |
| | Внутримышечно | 60 мг/кг | | | $z_1 = 2,368, a = 0,021$ |
| | | | | | $z_2 = 2,077, a = 0,039$ |

Примечание. z – логранговый критерий выживаемости с поправкой Йетса характеризует различия в выживаемости между животными опытной и контрольной групп (1,960 – критическое значение для уровня значимости 0,05), z_1 – между животными, получавшими комбинированную терапию, и животными, получавшими монотерапию тинростимом, z_2 – между животными, получавшими комбинированную терапию, и животными, получавшими монотерапию официальными препаратами; a – уровень значимости различий в выживаемости между животными двух групп.

Выживаемость мышей, получавших циклоферон, значительно отличалась от таковой у нелеченых животных ($z > 1,960; a \leq 0,05$). Этот препарат в дозе 60 мг/кг защищал от гибели 35,0 ± 5,0% инфицированных животных, увеличивая СПЖ на 4,7 дня (см. табл. 3). Выраженный защитный и лечебно-профилактический эффект циклоферона был показан как при экспериментальном КЭ, так и у пациентов с лихорадочной и менингеальной формами КЭ [26, 27]. Использование циклоферона в комплексной терапии у этих пациентов приводило к более быстрому купированию клинических симптомов заболевания, сокращению сроков лечения в стационаре, коррекции иммунологических показателей и предупреждению развития двухволнового течения КЭ.

При летальной вирусной инфекции монотерапия йодантипирином (12,5 мг/кг) защищала от гибели 15,5 ± 3,1% животных, зараженных вирусом КЭ, увеличивая СПЖ на 1,7 дня (см. табл. 3). Рядом авторов установлено, что в комплексной терапии КЭ применение йодантипирина сокращало продолжительность лихорадочного периода, субфебрилитета и общеинфекционных проявлений, а также сроки пребывания в стационаре, реже наблюдался постинфекционный астенический синдром [28].

Наибольший защитный эффект в отношении вируса КЭ зарегистрирован при применении 0,25 мл/кг иммуноглобулина против КЭ (см. табл. 3). Однократное введение этого препарата после заражения животных защищало от гибели 45,0 ± 8,0% мышей, СПЖ увеличивалась на 6,4 дня по сравнению с контрольной группой ($z = 3,646, a = 0,000$). Другими авторами было продемонстрировано выраженное протективное действие данного иммуноглобулина как при экспериментальном КЭ, так и при экстренной профилактике КЭ у людей [21, 29].

Подкожное введение тинростима защищало от гибели 25,3 ±

5,8% животных и увеличивало СПЖ инфицированных вирусом КЭ мышей на 2,7 дня по сравнению с таковой в контрольной группе. Вероятно, механизм протективного действия этого препарата реализуется за счет его иммуномодулирующей активности: усиления цитотоксической активности НК-клеток, стимуляции фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов [8, 9]. Было изучено сочетанное применение рибавирина и циклоферона с тинростимом при остром летальном КЭ у мышей (см. табл. 3). Комбинация официальных препаратов с иммуноактивным пептидом значимо повышает выживаемость животных и срок их жизни по сравнению с контрольной группой ($z > 1,960, a \leq 0,05$). Следует отметить, что совместное применение рибавирина с тинростимом ($z_2 = 2,060, a = 0,043$) более эффективно, чем монотерапия рибавирином ($z = 1,516, a = 0,130$). В то же время эффективность комбинации тинростима с рибавирином значимо не отличалась от результатов монотерапии тинростимом ($z_1 = 0,316, a = 0,752$). На более эффективной оказалась комбинация тинростима с циклофероном, которая превышала значения для отдельных препаратов ($z > 1,960, a \leq 0,05$). Комбинированное введение циклоферона и тинростима защищало от гибели 50,0 ±

5,0% инфицированных животных, удлинняя срок их жизни на 6,1 дня по сравнению с контрольной группой мышей ($z = 3,121, a = 0,000$). Таким образом, сочетание препаратов с различным механизмом действия (тинростима с рибавирином и циклофероном) дает выраженный защитный эффект аддитивного характера, что может свидетельствовать о перспективности использования тинростима в комбинированной терапии КЭ.

Выводы

1. На моделях экспериментального КЭ установлена вирусингибирующая и протективная активность пептида из оптических ганглиев кальмара *Beryteuthis magister* – тинростима, оказывающего широкий спектр биологического действия, при сравнительном исследовании с некоторыми официальными препаратами (рибавирином, реафероном-ЕС, циклофероном, 4-йодантипирином, иммуноглобулином против КЭ).
2. Все тестируемые препараты достоверно подавляли размножение высоковирулентного штамма вируса КЭ в чувствительной культуре клеток СПЭВ: рибавирин и иммуноглобулин против КЭ ингибировали репродукцию вируса полностью – на 100%, циклоферон – на 75%, тинростим, реаферон-ЕС и йодантипирин – на 50–60%.
3. На модели острого летального КЭ у мышей применение циклоферона и иммуноглобулина против КЭ предотвращало смертность 35–45% инфицированных животных, применение тинростима – 25%, рибавирина, реаферона-ЕС и йодантипирина – 5–10% животных.
4. Сочетанное применение иммуноактивного пептида тинростима с официальными препаратами (рибавирином, циклофероном) было более эффективным, чем терапия отдельными препаратами. Наиболее эффективным оказалось комбинированное

введение циклоферона и тинростима, которое защищало от гибели 50,0 ± 5,0% инфицированных животных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5, 10, 12–17, 22, 24, 25
с.м. REFERENCES)**

1. Иерусалимский А.П. Клещевые инфекции в начале XXI века. *Неврологический журнал*. 2009; 3: 17–21.
2. Конькова-Рейдман А.Б. Современные стратегии патогенетической терапии клещевых нейроинфекций. *Инфекционные болезни*. 2009; 3: 35–9.
3. Ершов Ф.И. *Антивирусные препараты*. 2-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2006.
4. Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В. Эффективность применения препаратов иммуноглобулина для постэкспозиционной профилактики клещевого энцефалита в России (обзор полувекowego опыта). *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2010; 1: 53–9.
6. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. *Иммуноактивные пептиды из гидробионтов и наземных животных*. Владивосток: ТИПРО-центр; 2004.
7. Эпштейн Л.М., Боровская Г.А., Ковалев Н.Н. Способ получения иммуностимулятора. Патент РФ № 2222337; 2004.
8. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. *Иммуноактивные биополимеры из гидробионтов*. Владивосток: ТИПРО-центр; 2007.
9. Кузнецова Т.А., Киняйкин М.Ф., Суханова Г.И., Беседнова Н.Н. Применение тинростима для коррекции нарушений иммунитета и гемостаза в комплексном лечении пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2010; 1: 106–9.
11. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. 2-е изд. М.: Медицина; 2005.
18. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б. От чего зависят эффекты индукторов интерферона? В кн.: Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. *Интерферон – 2011*. М.; 2012: 80–106.
19. Худoley В.Н., Саратиков А.С., Лепехин А.В., Яровская В.Е., Евстропов А.Н., Помогаева А.Д. и др. Неспецифическая профилактика клещевых нейроинфекций. *Бюллетень сибирской медицины*. 2008; 7 (Прил.1): 92–7.
20. Мейл Д., Броstoff Дж., Рот Д.Б., Ройт А. *Иммунология*. М.: Логосфера; 2007.
21. Воробьева М.С., Расщепкина М.Н., Ладженская И.П. Вакцины, иммуноглобулины и тест-системы для профилактики и диагностирования клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2007; 6: 30–6.
23. Яковлев В.П., Яковлев С.В. *Рациональная антимикробная фармакотерапия*. М.: Литтерра; 2003.
26. Ратникова Л.И., Ермакова И.В., Миронов И.Л. Циклоферон в комплексном лечении больных с лихорадочной и менингеальной формами клещевого энцефалита. *Российский медицинский журнал*. 2004; 6: 16–8.
27. Ершов Ф.И., Коваленко А.Л., Романцов М.Г., Голубев С.Ю. *Циклоферон. Клиническая фармакология и терапия: Руководство для врачей*. М.-СПб.: Полисан; 1998.
28. Лепехин А.В., Ильинских Е.Н., Лукашова Л.В., Дорошенко А.С., Замятинна Е.В. Изучение клинической эффективности профилактического применения йодантипирина при клещевом энцефалите. *Сибирский медицинский журнал*. 2012; 4: 55–8.
29. Воронкова Г.М. *Специфические иммуноглобулины из донорской крови человека для лечения КЭ и ГЛПС (лабораторные и клинические испытания)*: Дисс. ... докт. мед. наук. Хабаровск; 2002.

REFERENCES

1. Ierusalimskiy A.P. Tick-borne infections in the beginning of the XXI century. *Neurologicheskiy zhurnal*. 2009; 3: 17–21. (in Russian)
2. Kon'kova-Reydmann A.B. Current strategies pathogenic therapy of mite neuroinfections. *Infektsionnye bolezni*. 2009; 3: 35–9. (in Russian)
3. Ershov F.I. *Antiviral Drugs [Antivirusnye preparaty]*. 2nd ed. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. (in Russian)
4. Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V. The efficacy of immunoglobulin preparations for the post-exposure prophylaxis tick-borne encephalitis in Russia (review of half a century of experience). *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2010; 1: 53–9. (in Russian)
5. Proksch P., Edrada-Ebel R., Ebel R. Drugs from the Sea – opportunities and obstacles. *Marine Drugs*. 2003; 1: 5–17.

6. Besednova N.N., Epshteyn L.M. *Immunoactive Peptides of Hydrobiotics and Terrestrial Animals [Immunoaktivnye peptidy iz gidrobiontov i nazemnykh zhivotnykh]*. Vladivostok: TINRO-tsentr; 2004. (in Russian)
7. Epshteyn L.M., Borovskaya G.A., Kovalev N.N. A Method of Producing an Immunopotentiator. Patent RF № 2222337; 2004. (in Russian)
8. Zaporozhets T.S., Besednova N.N. *Immunoactive Biopolymers from Hydrobiotics [Immunoaktivnye biopolimery iz gidrobiontov]*. Vladivostok: TINRO-tsentr; 2007. (in Russian)
9. Kuznetsova T.A., Kinyaykin M.F., Sukhanova G.I., Besednova N.N. Tinrostim application for correction of immunity disorders and hemostasis in the complex treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Pul'monologiya*. 2010; 1: 106–9. (in Russian)
10. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratov I.G., Takashima I. Comprehensive assessment of the genetics and virulence of tick-borne encephalitis virus strains isolated from patients with inapparent and clinical forms of the infection in the Russian Far East. *Virology*. 2013; 443: 89–98.
11. Khabrieve R.U. *A Manual on Experimental (preclinical) Studies of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. 2nd ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
12. Huggins J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11(Suppl.4): 750–61.
13. Jordan J., Briese T., Fischer N., Lau J.Y., Lipkin W.I. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J. Infect. Dis.* 2000; 182(4): 1214–7.
14. Dixit N.M., Perelson A.S. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006; 63(7-8): 832–42.
15. Parker W.B. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* 2005; 107: 165–71.
16. Anderson J.F., Rahal J.J. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (1): 107–8.
17. Crance J.M., Scaramozzino N., Jouan A., Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res.* 2003; 58: 73–9.
18. Ershov F.I., Tazulakhova E.B. What determines the effects of interferon inducers? In: Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Интерферон – 2011 [Интерферон – 2011]*. Moscow; 2012: 80–106. (in Russian)
19. Khudoley V.N., Saratikov A.S., Lepekhin A.V., Yarovskaya V.E., Evstropov A.N., Pomogaeva A.D. et al. Non-specific prophylactic measures of mite neuroinfections. *Byulleten' sibirskoy meditsiny*. 2008; 7 (Suppl.1): 92–7. (in Russian)
20. Meyl D., Brostoff Dzh., Rot D.B., Royt A. *Immunology [Immunologiya]*. Moscow: Logosfera; 2007. (in Russian)
21. Vorob'eva M.S., Rasshepkina M.N., Ladyzhenskaya I.P. Vaccines, immunoglobulins and test systems for the prevention and diagnosis of tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii*. 2007; 6: 30–6. (in Russian)
22. Howell M.D., Jones J.F., Kisich K.O., Streib J.E., Gallo R.L., Leung D.Y. Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J. Immunol.* 2004; 172(3): 1763–7.
23. Yakovlev V.P., Yakovlev S.V. *Rational Antimicrobial Pharmacotherapy [Ratsional'naya antimikrobnaya farmakoterapiya]*. Moscow: Litterra; 2003. (in Russian)
24. Leyssen P., Drosten C., Paning M., Charlier N., Paeshuyse J., De Clercq E. et al. Interferons, interferon inducers, and interferon-ribavirin in treatment of flavivirus-induced encephalitis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(2): 777–82.
25. Huggins J.W. Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11 (Suppl.4): 750–61.
26. Ratnikova L.I., Ermakova I.V., Mironov I.L. Cycloferon in complex treatment of patients with febrile and meningeal forms of tick-borne encephalitis. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2004; 6: 16–8. (in Russian)
27. Ershov F.I., Kovalenko A.L., Romantsov M.G., Golubev S.Yu. *Cycloferon. Clinical Pharmacology and Therapeutics: A Guide for Physicians [Tsikloferon. Klinicheskaya farmakologiya i terapiya: Rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow - St. Petersburg: Polisan; 1998. (in Russian)
28. Lepekhin A.V., Il'inskikh E.N., Lukashova L.V., Doroshenko A.S., Zamyatina E.V. Assessment of effectiveness of iodantipyrine preventive use in treatment of Russian tick-borne encephalitis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*. 2012; 4: 55–8. (in Russian)
29. Voronkova G.M. *Specific Immunoglobulins from Donated Human Blood for the Treatment of TBE and HFRS (laboratory and clinical trials)*: Diss. Khabarovsk; 2002. (in Russian)

Поступила 22.10.15

Принята в печать 19.11.15