

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

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.  
Свидетельство о регистрации  
ПИ № ФС77-77676  
от 29 января 2020 г.

ISSN 0507-4088 (Print)  
ISSN 2411-2097 (Online)  
DOI: 10.36233

Статьи иностранных авторов и отдельные статьи, рекомендованные Редакционной коллегией журнала, публикуются на русском и английском языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала доступны на сайтах:  
<https://www.virusjour.elpub.ru>;  
<https://www.elibrary.ru>;  
<https://www.cyberleninka.ru>;  
<https://www.rucont.ru>

К публикации принимаются статьи, подготовленные в соответствии с правилами для авторов (см. [www.virusjour.elpub.ru](http://www.virusjour.elpub.ru)).

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

#### ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора  
197101, Москва, ул. Новогиревская, д. 3А.  
Тел.: +7(925) 011-87-79.

Заведующая редакцией  
*Курушина Тамара Михайловна*  
E-mail: [vopr.virusol@mail.ru](mailto:vopr.virusol@mail.ru)

Графика и верстка:  
*Е.М. Архипова*

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели. Направляя статью в редакцию, авторы принимают условия договора публичной оферты (<https://virusjour.elpub.ru/jour>).

Журнал публикует материалы на условиях Creative Commons Attribution License.

Подписано в печать 15.09.2020.  
Формат 60×90<sup>1/8</sup>.  
Тираж 100 экз. Усл.-печ. л. 7,5.  
Отпечатано в типографии  
«Буки Веди». [www.bukivedi.com](http://www.bukivedi.com).  
E-mail: [info@bukivedi.com](mailto:info@bukivedi.com)

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора, 2020

Учредители: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора,  
Всероссийское научно-практическое общество  
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSI VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

4

Том 65 • 2020

## Редакционная коллегия

Главный редактор: **ЛВОВ Д.К.** (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н.)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

### 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)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

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

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**Акимкин В.Г.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Алипер Т.И.** (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

**Антонов В.А.** (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

**Бовин Н.В.** (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

**Борисевич С.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Сергиев Посад, Россия)

**Брико Н.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Васин А.В.** (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

**Глотов А.Г.** (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

**Глуцов В.В.** (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

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

**Иванов А.И.** (Хабаровск, Россия)

**Корзяя Л.И.** (д.м.н., проф.; Сочи, Россия)

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

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

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

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

**Лукашев А.Н.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Макаров В.В.** (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

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

**Манапова Э.Р.** (д.м.н.; Казань, Россия)

**Михайлов М.И.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

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

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

**Панин А.Н.** (д.в.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Покровский А.Г.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Покровский В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Резник В.И.** (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

**Романенко В.В.** (д.м.н.; Екатеринбург, Россия)

**Савельев С.И.** (д.м.н., проф.; Липецк, Россия)

**Сметанина С.В.** (к.м.н.; Москва, Россия)

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

**Тутельян А.В.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

**Чвала И.А.** (к.в.н.; г. Владимир, Россия)

**Чумаков П.М.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

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

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

**Щелканов М.Ю.** (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., Элиста, Россия)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

**Fouchier R.A.M.** (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Greifswald - Insel Riems, Germany)

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

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

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

**Liu W.J.** (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

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

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

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**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)

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

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

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

**Webby R.** (PhD; Memphis, USA)

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

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

# PROBLEMS OF VIROLOGY

VOPROSY VIRUSOLOGII

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

**Volume 65 • 4 • 2020**

## EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K.**, MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,  
Corresponding Member of RAS

Executive secretary: **Al'khovskiy S.V.**, Doctor of Biological Sciences

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

## 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 F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zhirnov O.P.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Corresponding Member of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Kolobukhina L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Lobzin Yu.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Maleev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenko G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Popova A.Yu.** – MD, PhD, DSc, Prof., Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation; **Uryvaev L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corresponding Member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

## EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

**Bovin N.V.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

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

**Vasin A.V.** – Sc.D. (Saint-Petersburg, Russia)

**Glotov A.G.** – Sc.D., Prof. (Krasnoobsk, Russia)

**Glupov V.V.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

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

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

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Korzaya L.I.** – MD, PhD, DSc (Sochi, Russia)

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

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

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

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

**Lukashev A.N.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Makarov V.V.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

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

**Manapova E.R.** – MD, PhD, DSc (Kazan, Russia)

**Mikhailov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)

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

**Panin A.N.** – Sc.D., Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)

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

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

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

**Savel'ev S.I.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lipetsk, Russia)

**Smetanina S.V.** – PhD (Moscow, Russia)

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

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

**Chvala I.A.** – PhD (Vladimir, Russia)

**Chumakov P.M.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

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

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

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

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

## INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

**Fouchier R.A.M.** (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Greifswald - Insel Riems, Germany)

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

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

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

**Liu W.J.** (PhD, Prof.; Beijing, P.R. China)

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

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

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**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)

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

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

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

**Webby R.** (PhD; Memphis, USA)

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

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОБЗОРЫ

**Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В.**

Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. . . . . 182

**Якушина С.А., Кистенева Л.Б.**

Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*): репликативные стратегии . . . . . 191

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В., Соловьева И.В., Вершинина М.А., Квасова О.А., Плоскирева А.А., Мамошина М.В., Елькина М.А., Клушкина В.В., Андреева Е.Е., Иваненко А.В.**

Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса\* . . . . . 203

**Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Рогова Ю.В., Иванова О.Е.**

Разработка инактивированной культуральной вакцины против жёлтой лихорадки. . . . . 212

**Алаторцева Г.И., Бакирова З., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Ташов К.Э., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Малинникова Е.Ю., Касымов О.Т., Михайлов М.И., Зверев В.В.**

Серопревалентность вируса гепатита E (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) среди беременных женщин в эндемичном регионе Кыргызстана . . . . . 218

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

**Алимбарова Л.М., Керимов Т.З., Борзенок С.А.**

Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro* . . . . . 228

\*Статья опубликована на русском и английском языках на сайте журнала: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

## CONTENTS

### REVIEWS

- Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V.**  
The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment . . . . . 182
- Yakushina S.A., Kisteneva L.B.**  
Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*)  
replicative strategies . . . . . 191

### ORIGINAL RESEARCHES

- Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V.,  
Kalenskaya A.V., Solovyova I.V., Vershinina M.A., Kvasova O.A., Ploskireva A.A., Mamoshina M.V.,  
Elkina M.A., Klushkina V.V., Andreeva E.E., Ivanenko A.V.**  
Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity . . . . . 203
- Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Rogova Yu.V., Ivanova O.E.**  
Development of inactivated cultural yellow fever vaccine . . . . . 212
- Alatortseva G.I., Bakirova Z., Lkhverchik L.N., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Tashov K.E.,  
Nesterenko L.N., Malinnikova E.Yu., Kasymov O.T., Mikhailov M.I., Zverev V.V.**  
Seroprevalence of hepatitis E virus (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) among pregnant women  
in the highly endemic region of Kyrgyzstan . . . . . 218

### TO HELP THE VIROLOGIST

- Alimbarova L.M., Kerimov T.Z., Borzenok S.A.**  
Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro* . . . . . 228

## ОБЗОРЫ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

## Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК

Пашков Е.А.<sup>1,2</sup>, Файзулов Е.Б.<sup>2</sup>, Свитич О.А.<sup>1,2</sup>, Сергеев О.В.<sup>1,3</sup>, Зверев В.В.<sup>1,2</sup><sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 105064, Москва, Россия;<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Грипп является одной из самых актуальных проблем здравоохранения во всём мире. Ежегодно гриппом болеют до 15% населения земли, из них около 500 тыс. человек умирают. Особую клиническую значимость представляют вирусы гриппа А и В, имеющие высокий эпидемический и пандемический потенциал. Помимо поражения дыхательных путей, грипп способен вызвать осложнения со стороны сердечно-сосудистой и центральной нервной системы. Несмотря на широкий спектр специфически направленных на различные стадии вирусной репродукции противогриппозных препаратов, наиболее остро стоит проблема формирования вирусной резистентности к традиционным лекарственным препаратам, что требует поиска новых технологий для её преодоления. Перспективным представляется создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности вирусных или клеточных генов под влиянием механизмов РНК-интерференции. РНК-интерференция – это каскад регуляторных реакций в эукариотических клетках, вызванный чужеродной экзогенной двухцепочечной РНК, в результате чего происходит расщепление целевой матричной РНК. В настоящем обзоре рассматриваются использование механизма РНК-интерференции при разработке специфически направленных противогриппозных средств, а также перспективы, преимущества и недостатки данного подхода. Необходимо учитывать, что важным фактором, снижающим эффективность РНК-интерференции, является формирование резистентности вирусов к действию малых интерферирующих РНК, направленных к вирусным генам. Ввиду этого для преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа наиболее пристального внимания заслуживает исследование применения малых интерферирующих РНК, направленных непосредственно к факторам клетки-хозяина, которые необходимы для репродукции вируса гриппа.

**Ключевые слова:** грипп; РНК-интерференция; малые интерферирующие РНК; лекарственная резистентность; вирусы гриппа А и В; нокдаун гена.

**Для цитирования:** Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 182-190. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>

**Для корреспонденции:** Пашков Евгений Алексеевич, мл. науч. сотр. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия. E-mail: [pashckov.j@yandex.ru](mailto:pashckov.j@yandex.ru)

**Участие авторов:** Пашков Е.А., Файзулов Е.Б. – сбор и обработка материалов; Зверев В.В., Сергеев О.В., Свитич О.А. – написание текста, заключение; Сергеев О.В., Свитич О.А. – научное редактирование; Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

**Финансирование.** Авторы благодарят «Сеченовский Университет» за финансирование в рамках проекта «Университетский грант – 2020».

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Поступила 29.07.2020

Принята в печать 04.08.2020

## The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment

Evgeny A. Pashkov<sup>1,2</sup>, Evgeny B. Faizuloev<sup>2</sup>, Oxana A. Svitich<sup>1,2</sup>, Oleg V. Sergeev<sup>1,3</sup>, Vitaliy V. Zverev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia;

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

<sup>3</sup> National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia

Influenza is a worldwide public health problem. Annually, this infection affects up to 15% of the world population; and about half a million people die from this disease every year. Moreover, influenza A and B viruses tend to garner most of the attention, as these types are a major cause of the epidemics and pandemics. Although the influenza virus primarily affects the respiratory tract, it may also affect the cardiovascular and central nervous systems. Several antiviral drugs, that target various stages of viral reproduction, have been considered effective for the treatment and prevention of influenza, but some virus strains become resistant to these medications. Thus, new strategies and techniques should be developed to overcome the antiviral drug resistance. Recent studies suggest that new drugs based on RNA interference (RNAi) appear to be a promising therapeutic approach that regulates the activity of viral or cellular genes. As it is known, the RNAi is a eukaryotic gene regulatory mechanism that can be triggered by a foreign double-stranded RNA (dsRNA) and results in the cleavage of the target messenger RNA (mRNA). This review discusses the prospects, advantages, and disadvantages of using RNAi in carrying out a specific treatment for influenza infection. However, some viruses confer resistance to small interfering RNAs (siRNA) targeting viral genes. This problem can significantly reduce the effectiveness of RNAi. Therefore, applying siRNAs targeting host cell factors required for influenza virus reproduction can be a way to overcome the antiviral drug resistance.

**Keywords:** influenza; RNA-interference; small interfering RNA; drug resistance; influenza virus A and B; gene knockdown.

**For citation:** Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 182-190. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>

**For correspondence:** Evgeniy A. Pashkov, junior researcher of I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia. E-mail: [pashckov.j@yandex.ru](mailto:pashckov.j@yandex.ru)

### Information about the authors:

Pashkov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Faizuloev E. B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Sergeev O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

**Contribution:** Pashkov E.A., Fayzuloev E.B. – collection and processing of materials; Zverev V.V., Sergeev O.V. – writing a text, conclusion; Fayzuloev E.B., Svitich O.A. – scientific editing; Zverev V.V. – resume, general edition.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) for financing within the framework of the University Grant 2020 project.

**Conflict of interests.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Received 27 July 2020

Accepted 04 August 2020

Грипп является одной из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Ежегодно гриппом болеют до 15% населения земли, из них около 500 тыс. человек умирают [1]. Вирус гриппа поражает дыхательные пути человека, но осложнения гриппа могут затронуть не только респираторную, но и сердечно-сосудистую, и центральную нервную систему [2–4]. Особую клиническую значимость представляют вирусы рода *Alphainfluenzavirus* (*Influenza A virus*, вирус гриппа А, ВГА) и *Betainfluenzavirus* (*Influenza B virus*, вирус гриппа В, ВГВ), принадлежащие к семейству *Orthomyxoviridae* (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>), поскольку они являются причиной тяжёлых заболеваний и имеют высокий эпидемический и пандемический потенциал [5].

Терапия гриппа проблематична, поскольку вирус, в силу присущей ему высокой изменчивости, способен быстро вырабатывать резистентность к специфическим противогриппозным препаратам. Альтернативным перспективным подходом к созданию противогриппозных препаратов является использование специфических малых интерферирующих РНК (миРНК), которые могут быть нацелены на вирусные гены, либо на мРНК клеточных генов, важных для репродукции вирусов гриппа.

**Цель** данного обзора – оценка перспектив применения метода РНК-интерференции при разработке специфических противогриппозных препаратов.

Для лечения гриппа применяется широкий спектр этиотропных, патогенетических, симптоматических

и специфических препаратов. Особый интерес представляют специфические препараты, направленные на подавление репродукции вируса гриппа и разрешённые для клинического применения.

*Производные адамантана (амантадин и ремантадин).* В результате действия препаратов этого ряда эндосома, содержащая вирус гриппа, не сливается с оболочкой вируса и выход вирусного рибонуклеопротеина из неё вследствие блокировки ионного канала, сформированного белком M2, не происходит. Однако ионный канал, формируемый белком M2, у вируса гриппа В выстлан полярными аминокислотами, соответственно применение препаратов адамантанового ряда в отношении ВГВ неоправданно, поскольку присутствие полярных (гидрофильных) остатков аминокислот уменьшает эффект гидрофобного препарата – адамантана [6]. Недостатком этих препаратов является то, что практически все циркулирующие в настоящее время штаммы вирусов гриппа приобрели устойчивость к ним. Если у циркулировавших до 2004 г. ВГА наблюдалась резистентность менее 1%, то с 2004 по 2016 г. в Австралии, Азии, Европе и США у таких штаммов, как A/California/07/2009 (H1N1), A/Texas/04/2009 (H1N1), A/Denmark/524/2009 (H1N1), A/Denmark/528/2009 (H1N1) и A/WSN/33 (H1N1) была выявлена более чем 95%-ная устойчивость к производным адамантана, в результате появления у них мутации S31N в гене M2 [7].

*Ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир, занамивир, перамивир).* Препараты этого ряда подавляют проникновение вирусов в клетку путём отщепления остатков сиаловой кислоты с поверхности клеточной стенки. В разные эпидемические сезоны чувствительность штаммов ВГА и ВГВ по отношению к ним сильно различалась. Так, в сезон 2008–2009 гг. почти все циркулирующие вирусы гриппа А (H1N1) были устойчивы к озельтамивиру [8, 9]. С 2017 по 2018 г. циркулирующие вирусы гриппа А (H1N1) были восприимчивы к озельтамивиру и перамивиру на 99%, а к занамивиру – на 100% [10].

*Ингибитор слияния умифеновир (Арбидол®).* Данный препарат блокирует слияние липидной оболочки вируса с мембранами эндосомы, что предотвращает выход vРНК из эндосомы [11]. Известно, что некоторые циркулирующие штаммы резистентны к данному препарату. Так, у реассортантов, образованных от штаммов A/Singapore/1/57 и A/chicken/Germany/27/Weybridge, лишь на 50% снижалась репродукция при дозировке арбидола 10 мкг/мл [12].

*Ингибиторы вирусных полимераз (фавипиравир и пр.).* Они эффективны в отношении штаммов вируса гриппа, резистентных к препаратам адамантанового ряда и ингибиторам нейраминидазы [13]. Механизм действия фавипиравира заключается в том, что в клетке под воздействием протеаз он фосфорилируется в свою активную форму – фавипиравир-рибофуранозил-5'-трифосфат (F-RTP), что приводит к ингибированию РНК-зависимой РНК-полимеразы, в результате чего тормозится репродукция вируса гриппа [14]. Установлено, что замена Lys229 на Arg в белке PB1 приво-

дит к формированию устойчивости в отношении фавипиравира, что было продемонстрировано на штамме вируса гриппа A/England/195/2009 (H1N1) [15].

Таким образом, несмотря на широкий спектр специфических противогриппозных препаратов, остро стоит проблема формирования вирусной резистентности к ним [16]. Для её преодоления необходимы принципиально новые противовирусные препараты. Одна из перспективных технологий создания специфических противовирусных препаратов основана на механизме РНК-интерференции.

РНК-интерференция – это регуляторный путь эукариотических клеток, индуцированный двухцепочечной молекулой РНК [17]. Явление РНК-интерференции было открыто Э. Файром и К. Мелло в 1998 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Этими исследователями также были описаны основные особенности РНК-интерференции, которые доказывают, что при ней расщепляется матричная РНК (мРНК); двухцепочечная РНК (дцРНК), определяющие узнавание комплементарного участка мРНК-мишени, эффективнее, чем одноцепочечная РНК (оцРНК); для подавления экспрессии гена необходим короткий фрагмент дцРНК [18]. В 2006 г. Э. Файр и К. Мелло получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие явления РНК-интерференции – механизма сайленсинга генов при участии дцРНК.

Сущность РНК-интерференции заключается в подавлении экспрессии гена-мишени под влиянием миРНК (*siRNA*) [19–21]. Механизм РНК-интерференции состоит в том, что эндонуклеаза Dicer расщепляет экзогенную чужеродную дцРНК на отдельные двухцепочечные последовательности длиной от 21 до 25 пар нуклеотидов, которые и есть миРНК. Далее миРНК связывается с белковым комплексом *RISC (RNA-induced silencing complex)*, в состав которого входит белок *Ago2* из семейства *Argonaute*, белок *PACT* и белок *TRBP*, который распознает и расщепляет мРНК-мишень [22, 23].

Создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности целевых генов путём РНК-интерференции, представляется перспективным направлением, эффективность которого исследуется в отношении широкого спектра заболеваний различной этиологии, в том числе инфекционных. На данный момент разработаны и проходят стадии клинических испытаний такие препараты, как *Miravirsen* (против гепатита С), *ARC-520* и *ARC-521* (против гепатита В), *ALN-RSV01* (против респираторно-синцитиальной вирусной инфекции), *pHIV7-sh1-TAR-CCR5RZ* (против ВИЧ-инфекции) [22, 24–26].

Традиционный подход к разработке противовирусных препаратов – дизайн миРНК, мишенью которых является вирусный геном. Метод РНК-интерференции был успешно испытан в одной из ранних работ Q. Ge и соавт. на двух модельных штаммах вируса гриппа: A/PR/8/34 (PR8) и A/WSN/33 (WSN) на разных клеточных культурах (Vero и MDCK). Были подобраны и исследованы около 20 миРНК, но наибольший эффект показали те, которые были направлены к мРНК вирусных



белков NP и PA. При наличии в клетке миРНК, специфичных к последовательностям мРНК белков NP и PA, приостанавливался синтез этих белков, что приводило к подавлению репродукции вируса, так как прекращались репликация и транскрипция вирусного генома [27].

В дальнейшем эти авторы исследовали эффективность данного подхода на модели *in vivo*. Исследование проводили с использованием штамма вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) на мышах. Вводили смесь, содержащую миРНК, путём эндотрахеального аэрозольного распыления. Были выбраны миРНК к генам NP, PA и PB1. В работе было показано, что использование миРНК как в терапевтических, так и в профилактических целях способно снижать репродукцию ВГА у мышей в эпителиальных клетках дыхательных путей. Доказан дозозависимый эффект препарата миРНК: при введении мышам 60 мкг миРНК к мРНК последовательности вирусного белка NP титр вируса в лёгких снижался на один порядок, тогда как при введении 120 мкг той же миРНК – в 1000 раз [28].

Успешное использование миРНК, направленных к вирусному геному, было показано в работе W. Zhiqiang и соавт. [29]. Авторы провели выравнивание последовательностей 8 сегментов РНК вируса гриппа A/Beijing/01/2009 (H1N1) и выбрали для конструирования миРНК наиболее консервативные области генов. Эффективность синтезированных миРНК оценивали по экспрессии вирусных генов при полимеразной цепной реакции (ПЦР) и с помощью титрования по цитопатическому действию. За 6 ч до инфицирования клеток A549 вирусом гриппа с множественностью заражения (МОИ), равной 0,001, авторы проводили на них трансфекцию выбранными миРНК. Из 35 созданных миРНК было отобрано 10, которые снижали экспрессию целевых генов ВГА на 70% и более: PB2-912, PB1-851, PB1-1067, PB1-1789, PA-1274, NP-574, NP-571, NP-1494, M-969, M-559. Через 1 сут определяли содержание вирусной РНК (вРНК) и вирусных белков с помощью ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга.

В работе H.Y. Sui и соавт. [30] была определена консервативная последовательность вирусного гена белка M2, подобраны миРНК и продемонстрировано пролонгированное ингибирование репродукции ВГА в культуре клеток MDCK. В исследовании использовали 2 миРНК, направленные к белку M2 и 2 миРНК, направленные к гену NP [27], в качестве положительного контроля. Клетки MDCK были трансфицированы синтетическими миРНК и через 8 ч заражены штаммом вируса гриппа A/New Caledonia/20/1999 (H1N1) при МОИ = 0,005. Вирусосодержащую жидкость собирали через 48 ч и оценивали концентрацию вРНК методом количественной ОТ-ПЦР-РВ. Наибольший противовирусный эффект обеспечивала миРНК M-950, снижая репродукцию вируса гриппа на 80% относительно отрицательного контроля (миРНК к GFP). Кроме того, миРНК, направленные к гену белка M2, ингибировали репродукцию высококовирулентного A/Hong Kong/486/97 (H5N1) при МОИ = 0,5 и 0,05 в 3 раза, при МОИ = 0,005 – в 7 раз.

J. Piasecka и соавт. подобрали 9 миРНК (183, 412, 471, 613, 682, 901, 1008, 1090, 1312), нацеленных на различные участки последовательности мРНК 5-го сегмента вируса гриппа, которая кодирует белок NP. В работе использовали штаммы вируса гриппа A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1) и культуры клеток MDCK. В качестве положительного контроля применяли миРНК-1496, направленную к аналогичной последовательности мРНК гена NP [27–29]. Из девяти предложенных авторами последовательностей самый высокий ингибирующий эффект оказали миРНК 613 и 682, при использовании которых концентрация вирусной РНК снижалась от 78 до 85% в зависимости от штамма вируса по сравнению с отрицательным контролем [31].

В табл. 1 представлены наиболее эффективные вирусные гены-мишени, подавление которых с последующим эффективным снижением репродукции вируса гриппа было подтверждено в независимых исследованиях.

Следует отметить, что метод РНК-интерференции имеет ограничения. Помимо необходимости создания эффективного и безопасного средства доставки специфической миРНК в клетки лёгких, существует риск возникновения устойчивых к действию миРНК вирусов. В процессе репродукции популяции вирусов в заражённых клетках образуются квазивиды вирусов, среди которых под селективным влиянием миРНК будут получать преимущества вируса, имеющие нуклеотидные замены в сайте связывания с миРНК. Образование единичной мутации в последовательности РНК-мишени приводит к полной утрате эффекта РНК-интерференции [32]. Способность РНК-содержащих вирусов ускользать от воздействия РНК-интерференции экспериментально доказана на клеточной модели инфекции ВИЧ-1, который способен уходить от миРНК в результате появления нуклеотидных замен в генах *tat*, *nef*, *int* и *att* [33]. Кроме того, остро стоит проблема точной, безопасной и действенной доставки миРНК в клетки-мишени для вируса, поскольку миРНК – неустойчивое соединение и часто подвержена воздействию нуклеаз [34].

Альтернативным подходом к созданию противогриппозных препаратов является использование специфических миРНК, направленных к мРНК клеточных генов, важных для репродукции вирусов гриппа. Вирус гриппа способен к высокой изменчивости посредством не только мутаций и реассортаций, но и путём эпистаза, то есть благодаря парным мутациям, когда появление одной мутации ведёт к возникновению другой [35]. По мнению M. Lesch и соавт. [36], целесообразно влиять непосредственно на внутриклеточные структуры клетки-хозяина, способствующие репродукции вируса гриппа в клетке, поскольку вероятность появления альтернативного пути вирусной репродукции очень низка.

Эффективность использования миРНК, направленных на подавление клеточных факторов, была исследована в работах по полногеномному миРНК-скринингу с целью выявления перспективных мишеней для РНК-интерференции. В одной из первых работ

R. König и соавт. с использованием этого подхода обнаружили 295 клеточных факторов, необходимых для ранних стадий репродукции вируса гриппа. Из них авторами было выделено 23 наиболее эффективных гена-мишени, нокдаун которых не приводил к индукции значительной цитотоксичности. Исследование проведено на клеточных линиях A549 (аденокарцинома лёгкого человека) и штамме вируса гриппа A/WSN/33 [37].

В другой работе A. Karlas и соавт. [38] использовали двухэтапный подход для проведения полногеномного миРНК-скрининга. Первым шагом была трансфекция миРНК культуры клеток A549, через 48 ч их инфицировали штаммом вируса гриппа A/WSN/33, а после окрашивали специфическими антителами к ВГА. Вторым шагом был перенос вирусосодержащего супернатанта с A549 на репортерную культуру клеток почки эмбриона человека 293T, стабильно трансфицированную геном люциферазы, в которой после заражения вирусом гриппа запускается экспрессия транскриптов светляковой люциферазы, фланкированных нетранслируемым участком сегмента нуклеопротеина (NP) вируса гриппа A/WSN/33. Надёжность этого подхода подтвердили с помощью миРНК, направленной к мРНК вирусного белка NP, в результате чего блокировалась репродукция вируса гриппа.

В 2018 г. A. Karlas и соавт. провели масштабный миРНК-скрининг на клеточной модели инфек-

ции ВГА и ВГВ, в том числе A/WSN/1933(H1N1), A/Panama/2007/1999 (H3N2), ВГА птиц (A/Vietnam/1203/2004(H5N1)) и B/Thuringia/02/2006xB/Vienna/33/2006 для определения факторов клетки-хозяина, необходимых для репродукции вирусов гриппа. На основании скрининга установлено, что нокдаун таких генов, как *Nup98*, *Nup205*, *FLT4*, *COPA*, *ARCN1*, *COPG*, *NXF1*, *EIF3A*, *ATP6V0C*, *EIF4A3*, *COPB1*, *NME3*, *AP2M1*, *MAGI2*, *EIF3C*, *ROR2* приводит к достоверному подавлению репродукции ВГА и ВГВ. Затем в базе [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com) искали лекарственные препараты, нацеленные на выявленные гены, необходимые для репродукции всех четырёх штаммов. В результате найдены два препарата, регорафениб и сорафениб, нацеленные на *FLT4*, с высокой противовирусной активностью при нетоксичных концентрациях в клетках A549. Эти препараты являются ингибиторами киназ и представляют особый интерес, поскольку ген *FLT4* кодирует белок-рецептор эпидермального фактора роста (EGF), а именно рецептор тирозинкиназы. Известно, что *EGF* принимает активное участие в проникновении вируса гриппа в клетку [39]. Авторами было установлено, что при применении регорафениба и сорафениба внутриклеточный уровень *EGF* оставался неизменным из-за нарушения закисления эндосом. Далее авторы описали влияние регорафениба и сорафениба на слияние вируса гриппа с мембраной эндосомы. Они пометили вирусные частицы двумя липофильными красителя-

**Таблица 1.** Вирусные гены, нокдаун которых эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа\*

**Table 1.** The inhibition of influenza virus reproduction using knockdown of virus genes\*

Ген вируса гриппа A Gene of influenza A virus	Функция гена Gene function	Ссылка References
<i>NP</i>	Инкапсидация вирусного генома для осуществления транскрипции, репликации и упаковки вирусной РНК Viral genome encapsidation required for subsequent replication, transcription, and packaging of the viral RNA	[27] <sup>A</sup> [27] <sup>A</sup> [28]** <sup>B</sup> [28]** <sup>B</sup> [29] <sup>C</sup> [29] <sup>C</sup> [31] <sup>D</sup> [31] <sup>D</sup>
<i>PA</i>	Участие в процессе вирусной транскрипции Participation in the process of viral transcription	[27] <sup>A</sup> [27] <sup>A</sup>
<i>PB1</i>	Содержит SDD-последовательность, характерную для вирусных полимераз Contains SDD sequence characteristic of viral polymerases	[28]** <sup>B</sup> [28]** <sup>B</sup> [29] <sup>C</sup> [29] <sup>C</sup>
<i>PB2</i>	Распознавание «cap» на клеточных мРНК Recognition of «cap» on cellular mRNA	[27] <sup>A</sup> [27] <sup>A</sup> [29] <sup>C</sup> [29] <sup>C</sup>
<i>M2</i>	Стабилизация вирусной оболочки, формирование ионных каналов Viral envelope stabilization formation of ion channels	[27] <sup>A</sup> [27] <sup>A</sup> [30] <sup>E</sup> [30] <sup>E</sup>

**Примечание.** \* Приведены вирусные гены-мишени для миРНК, нокдаун которых приводил к достоверному снижению вирусной репродукции в независимых исследованиях; \*\* в исследовании была использована модель животных; штаммы, использованные при проведении исследования: <sup>A</sup> – A/PR/8/34 (PR8), A/WSN/33 (WSN) subtypes H1N1; <sup>B</sup> – A/PR/8/34 (PR8) – в работе использовали животную модель; <sup>C</sup> – A/Beijing/01/2009 (H1N1); <sup>D</sup> – A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1); <sup>E</sup> – A/New Caledonia/ 20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1).

**Note.** \* Findings from independent studies revealed that specific knockdown of miRNA-targeted virus genes resulted in the inhibition of viral reproduction; \*\* an animal model was used in the research. Virus strains used in the study: <sup>A</sup> – A/PR/8/34 (PR8), A/WSN/33 (WSN) subtypes H1N1; <sup>B</sup> – A/PR/8/34 (PR8); <sup>C</sup> – A/Beijing/01/2009 (H1N1); <sup>D</sup> – A/California/04/2009 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1); <sup>E</sup> – A/New Caledonia/ 20/1999 (H1N1), A/Hong Kong/486/97 (H5N1).

ми, красным DiI и зелёным DiOC18, которые генерировали между собой Фёрстеровский перенос энергии. Интактные меченые вирионы становились красными, когда происходил перенос энергии от DiOC18 к DiI, в то время как сдвиг в сторону зелёного DiOC18 свидетельствовал о том, что мембраны вируса и эндосомы сливаются и происходит рассеивание хромофоров, что уменьшает Фёрстеровский перенос энергии. Таким образом, авторами было доказано, что нарушаются процессы, необходимые для слияния. А. Karlas и соавт. также сравнили профилактическую (за 2 ч до заражения) и терапевтическую (через 4 ч после заражения) эффективность обоих препаратов. При профилактическом подходе эти препараты никак не влияли на репродукцию вируса гриппа. При терапевтическом применении сорафениба вирусная нагрузка снижалась в  $10^9$  раз. В супернатанте клеток, обработанных регорафенибом, вирус не обнаруживался. Данная работа показывает, что внутриклеточный процесс, строго необходимый для репродукции всех штаммов вирусов гриппа, – это нуклеоцитоплазматический транспорт. Следовательно, агенты, блокирующие нуклеоцитоплазматический транспорт, представляют собой пер-

спективных кандидатов для терапии гриппа, направленной на факторы хозяина. Авторами также изучена возможная эффективность подхода для вирусов других штаммов ВГА и ВГВ. Были протестированы шесть человеческих штаммов ВГА (A/WSN/33 (H1N1), A/Puerto Rico (H1N1), A/Hamburg/04/2009 (H1N1), A/Victoria/3/1975 (H3N2), A/Panama/2007/1999 (H3N2), A/England/691/2010/ (H3N2)), три птичьих штамма (A/Vietnam/1203/2004 (H5N1), A/FPV/Bratislava/1979 (H7N7), A/Mallard/Germany/439/2004 (H3N2)) и два штамма ВГВ (B/Thuringia/02/2006xB/Vienna/33/2006, B/Brisbane/60/2008). Сорафениб был активен в отношении всех штаммов, в то время как регорафениб не показал значительного влияния на репродукцию птичьих штаммов. По мнению авторов, данный результат связан с различием в кислотной стабильности гемагглютинина птичьих и человеческих штаммов. При меньшей стабильности гемагглютинина нужны более высокие значения pH для слияния и образования эндосомы. Особый интерес представляет тот факт, что регорафениб и сорафениб влияют ещё и на вирусы, которые находятся в отдалённых друг от друга филогенетических группах, такие как хантавирусы, вирусы

**Таблица 2.** Клеточные гены, нокдаун которых эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа в культуре клеток\*

**Table 2.** The inhibition of influenza virus reproduction in cell culture using knockdown of cellular genes\*

Клеточные гены (группы генов) Cellular gene (group of genes)	Функция гена Gene function	Стадия репродукции вируса гриппа Stage of influenza virus reproduction	Ссылка References
<i>ATP6API</i>	Участие в работе клеточных АТФаз Regulation of cellular ATPase activity	Защисление эндосомы для последующего выхода вирусной РНК Endosome acidification and subsequent release of viral RNA	[40] <sup>A</sup> [40] <sup>A</sup> [37] <sup>B</sup> [37] <sup>B</sup>
<i>COPA ARCN1</i>	Транспорт белка от эндоплазматической сети к аппарату Гольджи, раннее созревание эндосомы Protein translocation from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. Early endosome maturation	Участие в процессе эндоцитоза Regulation of endocytosis	[38] <sup>C</sup> [38] <sup>C</sup> [40] <sup>A</sup> [40] <sup>A</sup>
<i>Nup98</i>	Участие в работе ядерно-порового комплекса Control of the nuclear pore complex functions	Импорт и экспорт в РНК из нуклеоплазмы Import and export of viral RNA through the nucleoplasm	[36] <sup>D</sup> [36] <sup>D</sup> [38] <sup>C</sup> [38] <sup>C</sup> [40] <sup>A</sup> [40] <sup>A</sup>
<i>NXF1</i>	Участие в работе ядерно-порового комплекса, регуляция сигналов ядерного экспорта Control of the nuclear pore complex functions regulation of nuclear export signals	Импорт и экспорт в РНК из нуклеоплазмы Import and export of viral RNA through the nucleoplasm	[36] <sup>D</sup> [36] <sup>D</sup> [40] <sup>A</sup> [40] <sup>A</sup>
<i>ATP6V0D</i>	Участие в работе клеточных АТФаз и в закислении внутренней среды эндосомы Regulation of cellular ATPase activity the decrease in internal pH of endosomes	Защисление эндосомы для последующего выхода в РНК Endosome acidification and subsequent release of viral RNA	

**Примечание.** \* Приведены клеточные гены-мишени для миРНК, нокдаун которых приводил к достоверному снижению вирусной репродукции в независимых исследованиях.

Штаммы, использованные в исследовании: <sup>A</sup> – A/WSN/1933 (H1N1), A/New-Jersey/8/1976/ (H1N1), A/Netherlands/2629/2009 (H1N1), A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/Nanchang/933/1995 (H3N2), A/Brisbane/10/2007 (H3N2), A/WSN/15/2009 (H3N2), A/NWS/34(HA), A/RI/5/57(-NA) (H1N1), A/harbour seal/New Hampshire/2011 (H3N8), A/mallard/interior Alaska/6MP0758/2006 (H10N8), A/mallard/Interior Alaska/10BM05347R0/2010 (H7N3), Alaska/10BM02980R0/2010 (H9N2); <sup>B</sup> – A/Netherlands/602/2009 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1); <sup>C</sup> – A/H1N1 (WSN), A/Panama/2007/1999 (H3N2), A/Vietnam/ 1203/2004 (H5N1), B/Thuringia/02/2006; <sup>D</sup> – A/H1N1 (A/WSN/33).

**Note.** \* Findings from independent studies revealed that specific knockdown of cellular miRNA-targeted genes resulted in the inhibition of viral reproduction.

Virus strains used in the study: <sup>A</sup> – A/WSN/1933 (H1N1), A/New-Jersey/8/1976/ (H1N1), A/Netherlands/2629/2009(pH1N1), A/Hong Kong/8/68(H3N2), A/Nanchang/933/1995(H3N2), A/Brisbane/10/2007(H3N2), A/WSN/15/2009(H3N2), A/NWS/34(HA), A/RI/5/57(NA)(H1N1), A/harbour seal/New Hampshire/2011(H3N8), A/mallard/interior Alaska/6MP0758/2006(H10N8), A/mallard/Interior Alaska/10BM05347R0/2010(H7N3), Alaska/10BM02980R0/2010(H9N2); <sup>B</sup> – A/Netherlands/602/2009 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1); <sup>C</sup> – A H1N1 (WSN), A/Panama/2007/1999(H3N2), A/Vietnam/ 1203/2004(H5N1), B/Thuringia/02/2006; <sup>D</sup> – A H1N1 (A/WSN/33).

везикулярного стоматита и простого герпеса 1 [36].

Перспективность подхода, основанного на подавлении активности клеточных генов, необходимых для репродукции вируса гриппа, показана в исследовании М. Estrin и соавт. [40]. Авторы отобрали группу генов, для которых ранее была определена важная роль в цикле репродукции вируса гриппа, и оценили эффективность профилактического и терапевтического применения миРНК, направленных к этим генам как раздельно, так и в виде комбинаций из нескольких миРНК на клетках A549. В работе использовали 12 штаммов ВГА, включая серотипы H1N1, H3N2, H1N2, H3N8, H10N8, H7N3, H9N2 и миРНК, направленные к генам *ATP6API*, *COPA*, *ARCNI*, *NUP98*, *RPS14*, *PGD*. миРНК к мРНК вирусного белка *NP* использовали в качестве положительного контроля. 1-я – 4-я комбинации миРНК ингибировали репродукцию вируса более чем на 70%. Для учёта полученных данных авторы использовали метод бляшкообразования.

В исследовании J. Rupp и соавт. было продемонстрировано, что миРНК, направленные к генам, влияющим на гомеостаз меди, снижают репродукцию вируса гриппа. Чтобы оценить противовирусный эффект, в клеточной линии A549 была проведена трансфекция миРНК к гену *CTR1*, который является высокоаффинным транспортёром меди, в заражённых клетках. Нокдаун *CTR1* привёл к снижению репродукции в 7,3 раза (через 24 ч,  $p = 0,04$ ). Авторы считают, что влияние на внутриклеточный метаболизм меди с помощью миРНК можно использовать для профилактики и лечения гриппа [41].

Известно, что вирус гриппа блокирует процессы аутофагии, что, в свою очередь, приводит к накоплению аутофагосом из-за нарушения их слияния с лизосомами и способствует его репродукции внутри клетки [42]. Одну из ключевых ролей в аутофагии играют гены *ATG5* и *BECN1* [43, 44]. R. Wang и соавт. показали, что подавление образования аутофагосом с помощью миРНК, нацеленных на *ATG5* и *BECN1*, снижает репродукцию вируса гриппа. В клетках A549, инфицированных штаммом вируса гриппа (A/duck/Hubei/Hangmei01/2006 (H5N1)), была снижена экспрессия вирусных генов *PB1*, *PB2*, *PA*, *NP* и *M2*. По результатам вестерн-блоттинга, их экспрессия при использовании миРНК к *ATG5* снизилась в 4 раза относительно контрольной *GAPDH*, тогда как при использовании миРНК к *BECN1*, – в 2 раза [45].

В табл. 2 представлены наиболее эффективные клеточные гены-мишени, эффективность которых была подтверждена в независимых исследованиях.

Анализ научной литературы свидетельствует о большом потенциале механизмов РНК-интерференции для создания специфических противогриппозных препаратов. Учитывая, что на данный момент ни один лекарственный или профилактический препарат не обеспечивает полной защиты от гриппа, метод РНК-интерференции продолжает привлекать внимание исследователей. Однако следует понимать, что важным фактором, снижающим эффективность РНК-интерференции, является формирование резис-

тентности вирусов к действию миРНК, направленных к вирусным генам. С точки зрения преодоления лекарственной устойчивости вируса гриппа большого внимания заслуживает применение миРНК, направленных к факторам клетки-хозяина, которые необходимы для репродукции вируса.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2016; 37(4): 487-500. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
- Cheng A.C., Holmes M., Dwyer D.E., Senanayake S., Cooley L., Irving L.B., et al. Influenza epidemiology in patients admitted to sentinel Australian hospitals in 2018: the Influenza Complications Alert Network (FluCAN). *Commun. Dis. Intell.* (2018). 2019; 43. DOI: <http://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.48>
- Chekkoth S.M., Supreeth R.N., Valsala N., Kumar P., Raja R.S. Spontaneous pneumomediastinum in H1N1 infection: uncommon complication of a common infection. *J. R. Coll Physicians. Edinb.* 2019; 49(4): 298-300. DOI: <http://doi.org/10.4997/JRCPE.2019.409>
- Mastrolia M.V., Rubino C., Resti M., Trapani S., Galli L. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 1012. DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-019-4636-5>
- Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic form. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 440-51. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
- Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(14): 8997-9000. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.R500020200>
- Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(4): 1315-20. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
- Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral Res.* 2009; (1): 90-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
- Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2014; (8): 22-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
- Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201-8. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>
- Киселев О.И., Малеев В.В., Деева Э.Г., Ленева И.А., Селькова Е.П., Осипова Е.А. и др. Клиническая эффективность препарата Арбидол (умифеновир) в терапии гриппа у взрослых: промежуточные результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования АРБИТР. *Терапевтический архив.* 2015; 87(1): 88-96. DOI: <http://doi.org/10.17116/terarkh201587188-96>
- Ленева И.А., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 2009; 81(2): 132-40. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
- Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3): 981-6. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.49.3.981-986.2005>
- Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A (H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2517-24. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01739-0954>
- Goldhill D.H., Te Velthuis A.J.W., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., et al. Barclayb. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115(45): 11613-8. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1811345115>
- Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115-27. DOI: <http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>

17. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998-2012.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
18. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/hep.30594>
19. Park S., Park J., Kim E., Lee Y. The Capicua-ETV 5 axis regulates liver-resident memory CD 8+ T cell development and the pathogenesis of liver injury. *Hepatology*. 2019; 70(1): 358-71.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/hep.30594>
20. Vaucheret X., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001; 114(Pt. 17): 3083-91.
21. Sharp P.A. RNA-interference – 2001. *Genes Dev.* 2001; 15(5): 485-90.  
DOI: <http://doi.org/10.1101/gad.880001>
22. Файзулов Е.Б., Никонова А.А., Зверев В.В. Перспективы создания противовирусных препаратов на основе малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии*. 2013; (Спец. 1): 159-69.
23. Haiyong H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1706: 293-302.  
DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16)
24. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen S., Janssen H.L., et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102-13.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/apt.13432>
25. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2017; 26(7): 843-51.  
DOI: <http://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology*. 2018; 28(4): 1976.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(5): 2718-23.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
28. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101(23): 8676-81.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0402486101>
29. Zhiqiang W., Yaowu Y., Fan Y., Jian Y., Yongfeng H., Lina Z., et al. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res.* 2010; 85(3): 559-61.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.010>
30. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671>
31. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA Secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020; 19: 627-42.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>
32. Presloid J.B., Novella I.S. RNA viruses and RNAi: quasispecies implications for viral escape. *Viruses*. 2015; 7(6): 3226-40.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v7062768>
33. Das A.T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M., Madireddy M., Bernards R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2601-5.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2601-2605.2004>
34. Nikam R.R., Gore K.R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther.* 2018; 28(4): 209-24.  
DOI: <http://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
35. Lyons D.M., Lauring A.S. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses*. 2018; 10(8): 407.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10080407>
36. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Rafferty M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
37. König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 46(7282): 813-7.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08699>
38. Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K.P., Artarini A., Heuer D., et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 463(7282): 818-22.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08760>
39. Eierhoff T., Hrinicius E.R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9): e1001099.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
40. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197246.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
41. Rupp J.C., Locatelli M., Grieser A., Ramos A., Campbell P.J., Yi H., et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication. *Virus J.* 2017; 14(1): 11.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
42. Feizi N., Mehrbod P., Romani B., Soleimanjahi H., Bamdad T., Feizi A., et al. Autophagy induction regulates influenza virus replication in a time-dependent manner. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(4): 536-41.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000455>
43. Rossman J.S., Lamb R.A. Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(4): 299-300.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.009>
44. Romanov J., Walczak M., Ibricic L., Schuchner S., Ogris E., Kraft C., et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 2012; 31(22): 4304-17.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
45. Wang R., Zhu Y., Zhao J., Ren C., Li P., Chen H., et al. Autophagy Promotes Replication of Influenza A Virus In Vitro. *J. Virol.* 2019; 93(4): e01984-18.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01984-18>

## REFERENCES

1. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C. Human influenza virus infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2016; 37(4): 487-500.  
DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0036-1584801>
2. Cheng A.C., Holmes M., Dwyer D.E., Senanayake S., Cooley L., Irving L.B., et al. Influenza epidemiology in patients admitted to sentinel Australian hospitals in 2018: the Influenza Complications Alert Network (FluCAN). *Commun. Dis. Intell.* (2018). 2019; 43.  
DOI: <http://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.48>
3. Chekkoth S.M., Supreeth R.N., Valsala N., Kumar P., Raja R.S. Spontaneous pneumomediastinum in H1N1 infection: uncommon complication of a common infection. *J. R. Coll Physicians. Edinb.* 2019; 49(4): 298-300.  
DOI: <http://doi.org/10.4997/JRCPE.2019.409>
4. Mastrolia M.V., Rubino C., Resti M., Trapani S., Galli L. Characteristics and outcome of influenza-associated encephalopathy/encephalitis among children in a tertiary pediatric hospital in Italy, 2017-2019. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 1012.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12879-019-4636-5>
5. Taubenberger J.K., Kash J.C. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic form. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(6): 440-51.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>
6. Pinto L.H., Lamb R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(14): 8997-9000.  
DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.R500020200>
7. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(4): 1315-20.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
8. Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral Res.* 2009; (1): 90-3.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. Hurt A.C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2014; (8): 22-9.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.04.009>
10. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/s10096-020-03840-9>

11. Kiselev O.I., Maleev V.V., Deeva E.G., Leneva I.A., Sel'kova E.P., Osipova E.A., et al. Clinical efficacy of arbidol (umifenovir) in the therapy of influenza in adults: preliminary results of the multicenter double-blind randomized placebo-controlled study ARBITR. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 87(1): 88-96.  
DOI: <http://doi.org/10.17116/terarkh201587188-96> (in Russian)
12. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res.* 2009; 81(2): 132-40.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
13. Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3): 981-6.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.49.3.981-986.2005>
14. Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A (H1N1) viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(6): 2517-24.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01739-0954>
15. Goldhill D.H., Te Velthuis A.J.W., Fletcher R.A., Langat P., Zambon M., Lackenby A., et al. Barclayb. The mechanism of resistance to favipiravir in influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2018; 115(45): 11613-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1811345215>
16. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115-27.  
DOI: <http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
17. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998-2012.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
18. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806-11.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/lep.30594>
19. Park S., Park J., Kim E., Lee Y. The Capicua-ETV 5 axis regulates liver-resident memory CD 8+ T cell development and the pathogenesis of liver injury. *Hepatology*. 2019; 70(1): 358-71.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/lep.30594>
20. Vaucheret X., Béclin C., Fagard M. Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell Sci.* 2001; 114(Pt. 17): 3083-91.
21. Sharp P.A. RNA-interference – 2001. *Genes Dev.* 2001; 15(5): 485-90.  
DOI: <http://doi.org/10.1101/gad.880001>
22. Fayzuloev E.B., Nikonova A.A., Zverev V.V. Prospects for the development of antiviral drugs based on small interfering RNA. *Voprosy virusologii*. 2013; (S1): 159-69. (in Russian)
23. Haiyong H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol. Biol.* 2018; 1706: 293-302.  
DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16)
24. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen S., Janssen H.L., et al. Miravirsens dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102-13.  
DOI: <http://doi.org/10.1111/apt.13432>
25. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2017; 26(7): 843-51.  
DOI: <http://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology*. 2018; 28(4): 1976.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003; 100(5): 2718-23.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0437841100>
28. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101(23): 8676-81.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0402486101>
29. Zhiqiang W., Yaowu Y., Fan Y., Jian Y., Yongfeng H., Lina Z., et al. Effective siRNAs inhibit the replication of novel influenza A (H1N1) virus. *Antiviral Res.* 2010; 85(3): 559-61.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.010>
30. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671>
31. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA Secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2020; 19: 627-42.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>
32. Preslold J.B., Novella I.S. RNA viruses and RNAi: quasispecies implications for viral escape. *Viruses*. 2015; 7(6): 3226-40.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v7062768>
33. Das A.T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M., Madiredjo M., Bernards R., et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2601-5.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2601-2605.2004>
34. Nikam R.R., Gore K.R. Journey of siRNA: clinical developments and targeted delivery. *Nucleic Acid Ther.* 2018; 28(4): 209-24.  
DOI: <http://doi.org/10.1089/nat.2017.0715>
35. Lyons D.M., Lauring A.S. Mutation and epistasis in influenza virus evolution. *Viruses*. 2018; 10(8): 407.  
DOI: <http://doi.org/10.3390/v10080407>
36. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog.* 2019; 15(3): e1007601.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007601>
37. Konig R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., et al. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 466(7282): 813-7.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08699>
38. Karlas A., Machuy N., Shin Y., Pleissner K.P., Artarini A., Heuer D., et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*. 2010; 463(7282): 818-22. DOI: <http://doi.org/10.1038/nature08760>
39. Eierhoff T., Hrincius E.R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9): e1001099.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
40. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197246.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
41. Rupp J.C., Locatelli M., Grieser A., Ramos A., Campbell P.J., Yi H., et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication. *Virology*. 2017; 14(1): 11.  
DOI: <http://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
42. Feizi N., Mehrbod P., Romani B., Soleimanjahi H., Bamdad T., Feizi A., et al. Autophagy induction regulates influenza virus replication in a time-dependent manner. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(4): 536-41.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000455>
43. Rossman J.S., Lamb R.A. Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(4): 299-300.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.009>
44. Romanov J., Walczak M., Ibricic I., Schuchner S., Ogris E., Kraft C., et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J.* 2012; 31(22): 4304-17.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/emboj.2012.278>
45. Wang R., Zhu Y., Zhao J., Ren C., Li P., Chen H., et al. Autophagy Promotes Replication of Influenza A Virus In Vitro. *J. Virol.* 2019; 93(4): e01984-18.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01984-18>

## ОБЗОРЫ



© ЯКУШИНА С.А., КИСТЕНЕВА Л.Б., 2020

## Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*): репликативные стратегии

Якушина С.А., Кистенева Л.Б.

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

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) – один из наиболее распространённых в человеческой популяции, он способен на протяжении всей жизни персистировать в покоящихся В-клетках памяти, в Т-клетках (ВЭБ 2-го типа) и в некоторых недифференцированных эпителиальных клетках. У большинства людей персистенция ВЭБ не сопровождается значительными симптомами, но при частых активациях вируса возрастают риски тяжёлых сопутствующих заболеваний, включая хроническую активную ВЭБ-инфекцию, гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, рассеянный склероз, системную красную волчанку, карциному желудка и носоглотки, а также различные Т- и В-клеточные лимфомы. Большой интерес представляют молекулярные вирусные и клеточные процессы во время бессимптомной или малосимптомной персистенции ВЭБ. В этом обзоре рассматриваются поведение вирусной ДНК в заражённой клетке, формы её существования (линейная, циркулярная эписома, хромосомно-интегрированная форма), а также методы копирования генома ВЭБ. Рассмотрены два тесно связанных цикла вируса – литический и латентный. Литическая активация неблагоприятна для выживания конкретного вирусного генома в клетке, она запускается в результате дифференцировки латентно инфицированной клетки или появления стресс-сигналов из-за неблагоприятных условий внеклеточной среды. ВЭБ обладает большим количеством адаптивных механизмов для предотвращения литической реактивации и снижения враждебности иммунных клеток хозяина. Понимание молекулярных аспектов персистенции ВЭБ поможет в будущем разработать более эффективные, таргетные препараты для лечения как самой вирусной инфекции, так и сопутствующих заболеваний.

**Ключевые слова:** персистенция; вирус Эпштейна–Барр; вирусная репликация; эписома; хромосомная интеграция; активация; латентность; ДНК; РНК.

**Для цитирования:** Якушина С.А., Кистенева Л.Б. Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*): репликативные стратегии. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 191-202. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202>

**Для корреспонденции:** Кистенева Лидия Борисовна, д-р мед. наук, зав. лабораторией хронических вирусных инфекций ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия.  
E-mail: lidia.kisteneva@gmail.com; sofia.iakushina@gmail.com

**Участие авторов:** авторы в равной мере участвовали в выработке концепции обзорной статьи и её написании.  
**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 29.06.2020  
Принята в печать 09.07.2020

## Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*): replication strategies

Sof'ya A. Yakushina, Lidiya B. Kisteneva

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

The Epstein–Barr virus (EBV), one of the most common in the human population, is capable of lifelong persistence in resting memory B-cells, in T-cells in case of type 2 EBV, and in some undifferentiated epithelial cells. In most people, EBV persistence is not accompanied by significant symptoms, but frequent virus activations are associated with the increased risks of severe diseases, such as chronic active Epstein-Barr virus infection, hemophagocytic lymphohistiocytosis, multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus, gastric and nasopharyngeal carcinomas, and a variety of T- and B-cell lymphomas. Therefore, the molecular viral and host cell processes during asymptomatic or low-symptom EBV persistence are of great interest. This review describes the behavior of the viral DNA in an infected cell and the forms of its existence (linear, circular episome, chromosomally integrated forms), as well as

methods of EBV genome copying. Two closely related cycles of viral reproduction are considered. Lytic activation is unfavorable for the survival of a particular viral genome in the cell, and may be a result of differentiation of a latently infected cell, or the arrival of stress signals due to adverse extracellular conditions. The EBV has a large number of adaptive mechanisms for limiting lytic reactivation and reducing hostility of host immune cells. Understanding the molecular aspects of EBV persistence will help in the future develop more effective targeted drugs for the treatment of both viral infection and associated diseases.

**Keywords:** persistence; Epstein–Barr virus; viral replication; episome; chromosomal integration; activation; latency; DNA; RNA.

**For citation:** Yakushina S.A., Kisteneva L.B. Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*): replicative strategies. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 191–202. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-191-202>

**For correspondence:** Lidiya B. Kisteneva, Doct. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Chronic Viral Infections, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gama-leya, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, 123098, Russia. E-mail: [lidia.kisteneva@gmail.com](mailto:lidia.kisteneva@gmail.com)

**Information about the authors:**

Yakushina S.A., <https://orcid.org/0000-0003-0507-0174>

Kisteneva L.B., <https://orcid.org/0000-0001-7336-409X>

**Contribution:** the authors have equally contributed to the development of the review article concept and to the writing of the article.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 29 June 2020

Accepted 09 July 2020

## Введение

Вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) является гамма-герпесвирусом человека 4-го типа. Он естественная часть человеческого микробиома, более 90% взрослого населения во всём мире латентно инфицировано ВЭБ на протяжении всей жизни [1]. Распространённость вируса в популяции зависит от социально-экономического статуса и повышается с возрастом. По данным Р.Е. Бошняна [2], 10% детей в возрасте до одного года инфицированы ВЭБ, однако к 18–19 годам антитела к вирусу определяются уже у 65,4% людей. Источниками инфекции становятся как пациенты с клиническими проявлениями, так и бессимптомные носители. Вирус передаётся через слюну, кровь, органы при трансплантации (особенно костный мозг) и при половом контакте.

ВЭБ обладает тропизмом, реализуемым с помощью восьми вирусных гликопротеинов, из которых наиболее изучен gp350/220 [3]. Он служит для связывания с рецептором комплемента типа 2 (CR2, CD21) на В-лимфоцитах – частью сигнального рецепторного комплекса, который также включает CD19 и CD35 [4]. CR2 экспрессируется и на некоторых эпителиальных клетках в меньшем количестве, поэтому вирус может инфицировать эпителиальные клетки [5, 6]. Дополнительным механизмом заражения эпителиальных клеток полости рта является взаимодействие между вирусным белком BMRF-2 и членами трансмембранных клеточных рецепторов – интегринов семейства  $\beta 1$ ,  $\alpha v$  [7]. Существуют и другие механизмы, которые ВЭБ использует для проникновения в Т-лимфоциты, НК-клетки, моноциты, макрофаги (включая астроциты нервной системы), фолликулярные дендритные клетки (включая клетки селезёнки) и клетки гладкой мускулатуры [8].

После контакта с чужеродными антигенами часть В-клеток переходит в «покоящееся» состояние, такой клон иммунных клеток может существовать годами

и десятилетиями. Именно в покоящихся В-клетках памяти персистирует ВЭБ, используя физиологические для человеческого организма пути миграции В-клеток в лимфоидной ткани кольца Пирогова–Вальдейера в ротоглотке [9, 10]. Внутри клеток памяти вирус находится в состоянии покоя, но после их дифференцировки в плазматические клетки начинается выработка антител и вирионов, поступающих непосредственно в слюну. Наивные В-клетки редко содержат латентные геномы ВЭБ в ядре, их количество <1 клетки на 10 000 всех латентно инфицированных клеток в крови [11]. ВЭБ 2-го типа может латентно инфицировать Т-клетки [12]. Предполагается также, что он способен латентно инфицировать недифференцированные эпителиальные клетки, например клетки назофарингеальной или желудочной карциномы.

ВЭБ – один из наиболее патогенных герпесвирусов, он ассоциирован с большим количеством заболеваний. Клиническая картина ВЭБ-инфекции может проявляться как инфекционный мононуклеоз или напоминать острую респираторную вирусную инфекцию в 20–30% случаев первичного инфицирования. Чем моложе человек, тем более неспецифичны симптомы, связанные с незрелостью иммунного ответа, особенно у детей. Литическая инфекция сопровождается активной репликацией вируса и высвобождением вирионов из всех инфицированных клеток, которые при этом погибают. После того как вирус проникает в В-клетку и переходит в состояние латентности, начинает действовать целый ряд защитных механизмов ВЭБ, целью которых является защита заражённой клетки от иммунной системы хозяина.

Нарушение иммунитета с преобладанием иммуноактивации приводит к формированию тяжёлых форм хронической активной ВЭБ-инфекции, таких как хронический мононуклеоз, гемофагоцитарный лимфоги-



стиоцитоз. Иммуносупрессия характерна для атипичной хронической активной ВЭБ-инфекции [13]. Аутоиммунный механизм является ведущим в развитии синдрома хронической усталости, рассеянного склероза и системной красной волчанки [14–16]. Латентные продукты вируса оказывают пролиферирующее и им-мортиализирующее действие. Существует множество ВЭБ-ассоциированных лимфопролиферативных заболеваний и эпителиальных злокачественных новообразований, среди которых В-, Т-, НК-клеточные лимфомы, лимфома Беркитта, болезнь Ходжкина, карцинома носоглотки, рак желудка и волосатая лейкоплакия. Продолжается поиск корреляции между генетическим вариантом вируса и ассоциированным заболеванием.

### Штаммы вируса Эпштейна–Барр

Существует два исторически признанных штамма ВЭБ: 1-го типа (B95-8) и 2-го типа (AG876), которые имеют основные различия в генах EBNA-2 и EBNA-3, и менее значимые – в EBNA-1 и LMP-1 [17]. Штамм «дикого типа» вируса EBV-WT (Epstein–Barr virus wild type) был воссоздан на основе штамма B95-8 путём искусственного исправления его дефекта размером 12 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) с использованием участка генома штамма Raji, полученного от пациента с лимфомой Беркитта из Нигерии [18]. Тем не менее до сих пор не опубликована «дикая» последовательность генома вируса, полностью полученная от клинически здорового человека. Долгое время технология секвенирования оставалась малодоступной, в лабораториях изучали и использовали ограниченное количество штаммов вируса, среди которых, помимо вышеперечисленных, GD1 и GD2 (штаммы Guangdong 1 и Guangdong 2), выделенные от пациентов с назофарингеальной карциномой в Юго-Восточной Азии [19, 20], Akata – от японской пациентки с лимфомой Беркитта, а также Mutu – от кенийской пациентки с лимфомой Беркитта [21].

На настоящий момент классификация ВЭБ на 1-й и 2-й типы считается основной характеристикой варианта генома. Каждый вновь обнаруженный штамм можно отнести к этим двум типам в зависимости от вариаций генов EBNA-2 и EBNA-3 [22]. В связи с развитием технологии секвенирования NGS (next generation sequencing) проводятся масштабные исследования, становится известно всё больше штаммов ВЭБ, полученных из клинических образцов. Например, в исследовании A.L. Palser и соавт. определена 71 новая последовательность генома ВЭБ [22], а исследовательская группа S. Correia и соавт. под руководством P.J. Farrell расшифровала 138 последовательностей [23]. Некоторые из впервые обнаруженных штаммов значительно отличаются от классических двух типов генома, имеют этнические и географические различия в распространении и могут быть ассоциированы с определёнными заболеваниями [24].

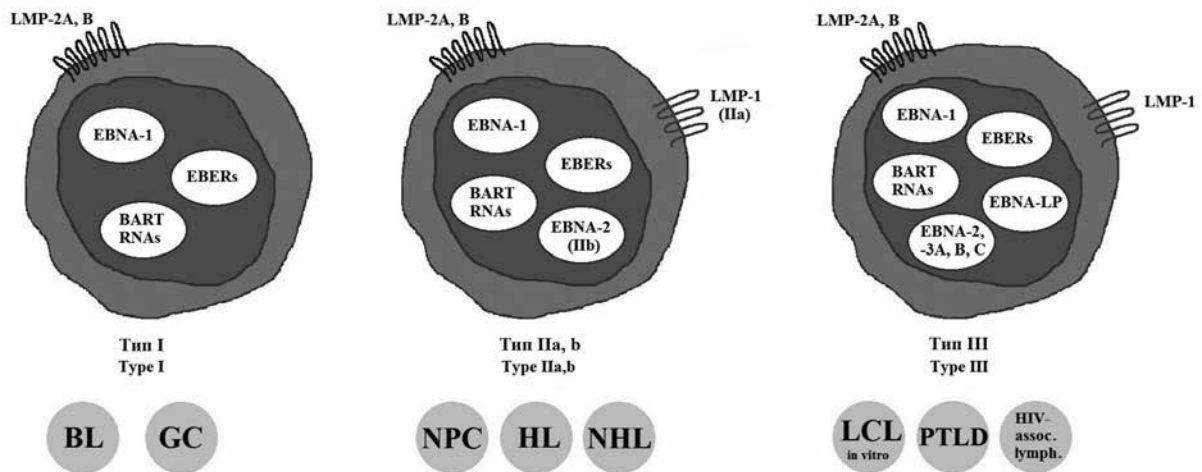
### Литические и латентные вирусные антигены

В разных циклах существования вирус продуцирует ряд литических и латентных антигенов. Большинство известных антигенов генерируются во время активной

репликации ВЭБ в литическом цикле; они условно делятся на группы по времени появления: сверхранние антигены (immediate-early, IE), ранние (early, E) и поздние (late, L). Известно два сверхранных активатора транскрипции: BZLF-1, кодирующий белок ZEBRA, и BRLF-1, кодирующий белок RTA, – оба этих белка способны инициировать литический цикл [25]. Описано около 30 ранних белков репликации вируса, среди которых трансактиваторы транскрипции, гомологи иммуносупрессивных молекул человека (например, интерлейкин-10), РНК-редуктазы, белки ядерной оболочки и т.д. Около 30 поздних белков отвечают за упаковку ДНК в вирионы, в том числе главный белок те-гумента BNRF-1, капсидные белки и факторы созревания, а также все гликопротеины вирусной оболочки. Поздние антигены экспрессируются после репликации вирусного генома. Важно, что весь каскад транскрипции вирусных литических продуктов запускается только после активации двух сверхранных генов (BZLF-1 и BRLF-1) и синтеза соответствующих белков. Существует иерархия иммунодоминантности, согласно которой сверхранные антигены вызывают более сильный иммунный ответ, чем ранние, а те – чем поздние (IE > E > L). Менее интенсивный ответ CD8<sup>+</sup> Т-клеток на поздние антигены вируса связан с прогрессирующим нарушением функции процессинга антигенов в инфицированной клетке – снижением экспрессии поздних L-антигенов по сравнению со сверхранными IE- и ранними E-антигенами. Дополнительный фактор снижения иммуногенности вируса в конце литического цикла – это образование иммуносупрессивных молекул, таких как BNLF-2a, BILF-1, BGLF-5 и гомолога интерлейкина-10 [26, 27]. Снижение уровня «иммунной опасности» микроокружения способствует беспрепятственному установлению латентности во многих инфицированных клетках.

Известно, что количество активных вирусных генов в латентном цикле значительно меньше, чем при литической репродукции. В общей сложности латентный геном ВЭБ экспрессирует шесть кодируемых ВЭБ ядерных антигенов (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP (EBV-encoded nuclear antigens)), три латентных мембранных белка (LMP-1, -2A, -2B (latent membrane protein)), а также ряд некодирующих РНК различных размеров и функций [28]. К латентным некодирующим РНК ВЭБ относятся малые РНК EBEB-1, -2 (EBV-encoded small RNAs), множество микроРНК из областей BART и BHRF-1 и относительно недавно обнаруженные IRES EBNA-1, snoRNA, sisRNA.

В зависимости от паттернов экспрессии антигенов выделяют три типа латентности ВЭБ (рис. 1). Все вышеперечисленные латентные продукты экспрессируются одновременно только при латентности III типа, которая встречается *in vitro* в лимфобластоидных клеточных линиях и *in vivo* при активно пролиферирующих лимфопролиферативных заболеваниях. Латентность II типа характерна для карциномы носоглотки и лимфомы Ходжкина, которые экспрессируют EBNA-1, EBEB-1, -2; LMP-2A, -2B; BART РНК, а также LMP-1 при типе латентности Ia или EBNA-2



**Рис. 1.** Типы латентности вируса Эпштейна–Барр.

BL – лимфома Беркитта; GC – желудочная карцинома; NPC – назофарингеальная карцинома; HL – лимфома Ходжкина; NHL – неходжкинские лимфомы; LCL – лимфопролиферативные клеточные линии *in vitro*; PTLD – посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание; HIV-assoc. lymph. – ВИЧ-ассоциированные лимфомы.

**Fig. 1.** EBV latency types.

BL – Burkitt lymphoma; GC – gastric carcinoma; NPC – nasopharyngeal carcinoma; HL – Hodgkin lymphoma; NHL – non-Hodgkin lymphoma; LCL – lymphoblastoid cell line *in vitro*; PTLD – post-transplant lymphoproliferative disorder; HIV-assoc. lymph. – HIV-associated diffuse lymphomas.

при типе IIb. Ткани лимфомы Беркитта и некоторых карцином желудка, содержащие ВЭБ, демонстрируют латентность I типа с экспрессией EBNA-1, РНК EBNA-1, -2, LMP-2A, -2B, BART РНК. При разных типах латентности промоторы начала транскрипции EBNA-1 могут различаться, хотя в большинстве случаев транскрипция начинается с одного из двух промоторов – Cp или Wp, которые расположены рядом с левым концом вирусного генома. Дополнительным промотором транскрипции EBNA-1 в клетках с латентностью ВЭБ I типа, является Qp, расположенный в области BamHIQ генома вируса. Ключевыми для установления латентности считаются EBNA-1 и LMP-2A, а также EBNA-1, которые экспрессируются при всех типах латентности [9, 29, 30].

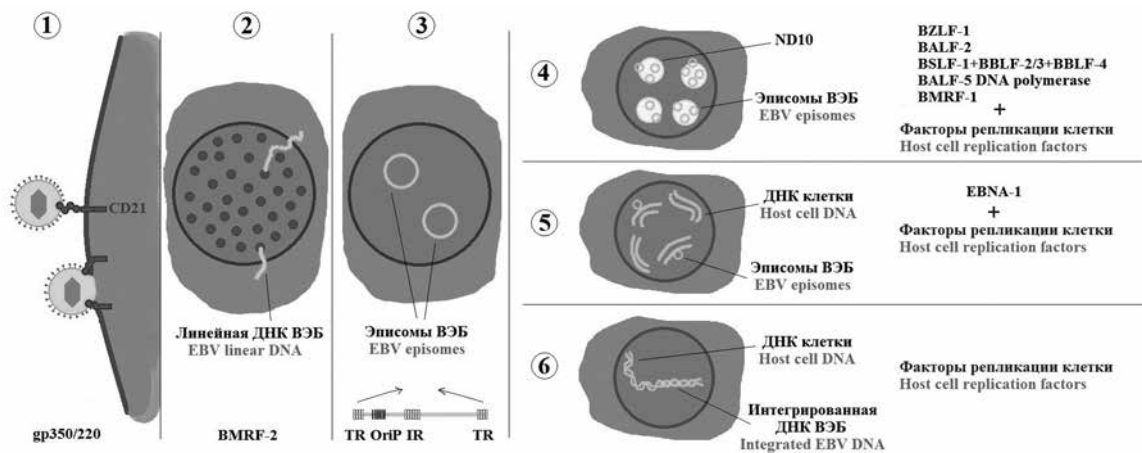
В отдельно взятом образце ткани или 1 мл крови латентный и литический цикл могут происходить в разных клетках одновременно, соответственно возможно выявление как латентных, так и литических антигенов. В то же время, как правило, одна из программ, латентная или литическая, преобладает в образце с учётом внешних факторов и состояния самого организма.

**Литическая репликация**

Впервые ДНК ВЭБ была обнаружена в клетках в линейной форме, сразу после проникновения вируса в клетку в начале литического цикла. Известно, что общий размер генома ВЭБ варьируется от молекулы к молекуле из-за различий в количестве повторяющихся последовательностей нуклеотидов и других часто встречающихся изменений генома [31]. Обычно длина генома ВЭБ составляет около 170–172 т.п.н. Он транспортируется в ядро, проникая через ядерные

поры, предположительно благодаря взаимодействию белка ВЭБ BMRF-2 и трансмембранных белков-интегринов инфицированной клетки. После пенетрации в ядро В-клетки транскрипция РНК с входящего линейного генома начинается в течение 10–12 ч, поскольку инициация транскрипции с вирусного генома не требует синтеза белков клетки-хозяина, которые продуцируются только при определённых условиях [32]. Затем линейная вирусная ДНК ковалентно замыкается концевыми повторами (terminal repeats), которые расположены на концах линейного генома с двух сторон, и становится автономной двунитевой кольцевой молекулой ДНК размером примерно 165 т.п.н. – эписомой. Это происходит через 16–20 ч после заражения, такое время необходимо для вступления клетки в стадию G1 клеточного цикла для синтеза белков *de novo*. После появления круговой эписомы в ядре клетки она считается латентно инфицированной [33]. Впечатляющая скорость этого события иллюстрирует постулат о том, что вирус изначально нацелен на латентный репродуктивный цикл, более выгодный для ВЭБ и других герпесвирусов (рис. 2).

Литическая репликация эписомы задействует цис-регуляторный элемент ВЭБ oriLyt – один из трёх начал или источников репликации ДНК вируса [34, 35]. Цис-регуляторный элемент – область некодирующей ДНК, которая регулирует транскрипцию близко расположенных генов на той же молекуле. Это в некотором роде автономная реплицирующая последовательность. Обычно один кольцевой геном вируса содержит два участка oriLyt с длиной основного элемента 1055 пар нуклеотидов (п.н.), за исключением штамма ВЭБ B95-8 с одним oriLyt. Каждый oriLyt состоит из двух глав-



**Рис. 2.** Репликативные стратегии вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ).

1 – слияние внешней оболочки вириона ВЭБ и клеточной мембраны; 2 – линейная ДНК ВЭБ проникает через ядерные поры за 10–12 ч; 3 – латентно инфицированная клетка с эписомами ВЭБ за 16–20 ч; 4 – литическая репликация ВЭБ (oriLyt); 5 – латентная репликация эписомы ВЭБ (oriP, Raji ori); 6 – интеграция в ДНК клетки.

**Fig. 2.** EBV replication strategies.

1 – fusion of EBV envelope and cell membrane; 2 – EBV linear DNA entering through nuclear pores in 10–12 hours; 3 – latently infected cell with EBV episomes in 16–20 hours; 4 – lytic EBV replication (oriLyt); 5 – latent episome EBV replication (oriP, Raji ori); 6 – integration into cell DNA.

ных компонентов по 530 п.н. и вспомогательных фланкирующих областей по краям, которые усиливают активность главных компонентов [36].

В литической эписомальной репликации ВЭБ непосредственно используются семь белков: oriLyt-связывающий белок BZLF-1; белок, связывающий одноцепочечную ДНК BALF-2; гетеротримерный комплекс геликазы/праймазы BSLF-1 + BBLF-2/3 + BBLF-4; ДНК-полимераза BALF-5 и фактор процессивности ДНК-полимеразы BMRF-1 [37, 38]. На ранних стадиях копирования вирусной ДНК события происходят полуконсервативным способом, полученные в результате геномы циркулярно замыкаются в эписомы. Затем начинает работать механизм по типу «катящегося кольца» для экспоненциального копирования ДНК ВЭБ. Таким образом, белки герпесвируса для связывания с началом репликации необходимы только для инициации процесса. В результате двухфазного способа репликации, специфичного и для других герпесвирусов, включая вирус простого герпеса 1 [39], вирусная ДНК может копироваться от 100 до 1000 раз. Она отправляется в специальные репликационные компартменты (глобулярные области или отсеки между клеточной ДНК в ядре), образованные дисперсной активностью белков BZLF-1 и BMRF-1 вируса вблизи ND10 [40].

Вирусы – облигатные паразиты клетки, и, несмотря на использование набора собственных репликативных факторов, ВЭБ критически зависит от наличия клеточных факторов в ядре. S-фаза митоза наиболее благоприятна для литической репликации, поэтому вирусные белки продлевают её [41].

ВЭБ, как и другие герпесвирусы, реплицирует свою ДНК и осуществляет транскрипцию внутри ядра преимущественно в ND10 [42]. Ядерные компонен-

ты ND10, также известные как PML-тельца (тельца промиелоцитарной лейкемии), или тельца Кремера, представляют собой клеточные сферические компартменты, распределённые по всей нуклеоплазме. В этих областях происходят белок-белковые, белок-РНК или белок-ДНК взаимодействия. Количество и размер ND10 регулируются в случаях вирусной инфекции, повреждения ДНК, трансформации и окислительного стресса. Матричный белок промиелоцитарной лейкемии PML формирует основную структуру ND10, которая также включает крапчатый белок SP100 (speckled protein) молекулярной массой 100 кДа и белок Daxx (Death-associated protein 6). Все эти белки регулируются интерфероном и участвуют в подавлении репликации вируса.

Для успешного размножения многие вирусы продуцируют сверхразнообразные белки для рассеивания (дисперсии) ND10 инфицированной клетки, у ВЭБ эту роль играет BZLF-1 [43]. В последнюю очередь рассеивается белок PML, так как он непосредственно участвует в репродукции вируса. Во время литического цикла вирусный геном образует репликационные компартменты, при этом наблюдается связь между этими компартментами и PML [44]. Тем не менее PML может быть препятствием для дальнейшего копирования, поэтому в определённый момент он тоже должен быть рассеян. Имеются данные об участии EBNA-1 в этом процессе [45].

Другие белки ND10 также необходимы ВЭБ. Белок SP100 является основным медиатором коактивации EBNA-LP, который играет важную роль в immortalization В-клеток, участвуя в активации EBNA-2 [46]. BMRF-1 – главный тегументный белок ВЭБ, он взаимодействует с белком Daxx, предотвращая ремоделирование хроматина комплексом Daxx-ATRAX. Кроме

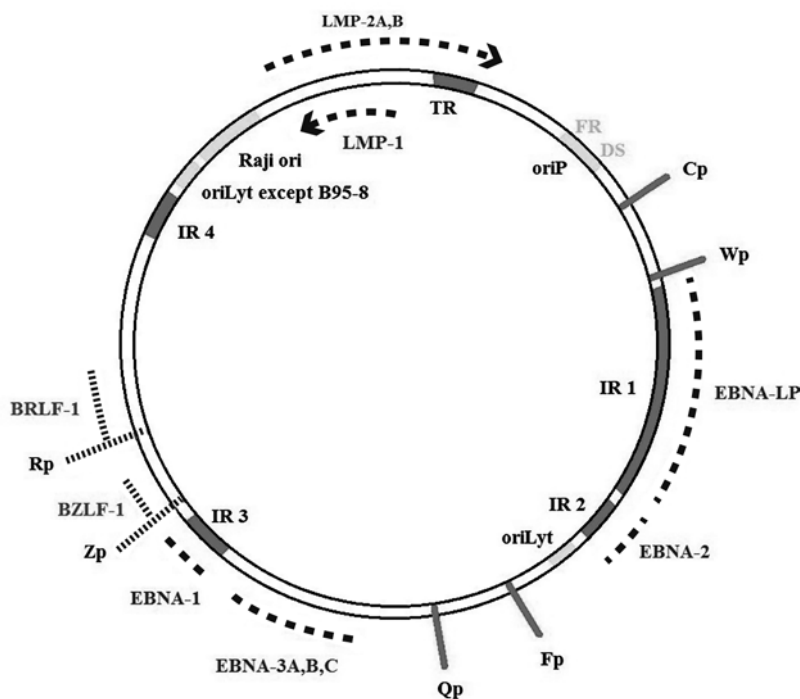


Рис. 3. Эписома ВЭБ.

TR – концевые повторы; IR 1,2,3,4 – внутренние повторы; Cp, Wp, Qp, Fp – промоторы EBNA-1; Rp, Zp – промоторы BRLF-1 и BZLF-1 соответственно; oriLyt – источник литической репликации; oriP – источник латентной репликации; FR, DS – области FR и DS oriP; Raji ori – альтернативный источник латентной репликации; ■■■■ – сайты транскрипции латентных антигенов EBNA-1, -2, -3A, B, C; EBNA-LP; LMP-1, -2A, B; ■■■■■■ – сайты транскрипции литических антигенов BZLF-1, BRLF-1

Fig. 3. EBV episome.

TR – terminal repeats; IR 1, 2, 3, 4 – internal repeats; Cp, Wp, Qp, Fp – EBNA-1-promoters; Rp, Zp – promoters of BRLF-1 and BZLF-1 resp.; oriLyt – origin of lytic replication; oriP – origin of latent plasmid replication; FR, DS – regions FR (family of repeats) and DS (dyad symmetry) of oriP; Raji ori – alternate origin of latent replication; ■■■■ – transcription sites of latent Ag EBNA-1, -2, -3A, B, C; EBNA-LP, LMP-1, -2A, B; ■■■■■■ – lytic BZLF-1, BRLF-1 transcription sites.

того, взаимодействие Дахх-BNRF-1 стимулирует активацию вирусных ранних генов и производство ранних белков для продолжения литической репликации эписомы [47].

В результате дальнейшей обработки копии генома разрезаются на фрагменты и упаковываются в капсидную оболочку. Дальнейшее метилирование ДНК путём присоединения к цитозину в составе CpG нуклеотида метильной группы происходит в ядре другой инфицированной этим вирионом клетки [48].

Редкие В-клетки вступают в литический цикл во время вирусной персистенции. Установлено, что всего лишь 0,1–0,5% всех инфицированных клеток в миндалинах производят вирионы [49]. Во время литического цикла ВЭБ клетка гибнет, а это невыгодно для вируса. Гибель возможна из-за лизиса инфицированной клетки в момент высвобождения вирионов или в результате атаки клеток-киллеров, которые при полноценном иммунном ответе сразу распознают высокоиммуногенные антигены литического цикла. Большая часть инфицированных В-клеток постоянно находится в латентном состоянии, а ВЭБ воспроизводится в латентном цикле.

### Латентная эписомная репликация

В латентно инфицированных В-клетках памяти генетический материал ВЭБ может существовать в двух разных формах: эписомальный или хромосомно-интегрированный геном, называемый провирусом. Для визуализации различных локализаций ДНК наиболее подходит FISH (fluorescent *in situ* hybridization) с использованием смежных и перекрывающихся ДНК-зондов, которые гибридизуются по всему вирусному геному [50]. 84% вирусных эписом реплицируются каждую S-фазу клеточного цикла, при этом они делятся не случайно, а определённым способом, благодаря которому все дефекты синтеза выравниваются [51].

Методом FISH показано отсутствие связи между эписомами ВЭБ и ND10 во время латентности, белки ND10 не нужны вирусу для латентной эписомальной репликации. Из вирусных продуктов фактически только один принимает активное участие в латентной репликации ВЭБ – EBNA-1, это важное отличие от литической репликации. EBNA-1 экспрессируется при всех типах латентности. Доказано, что геном ВЭБ с делецией в гене, кодирующем этот белок, не может существовать как внехромосомная эписома и вынужден интегрироваться [52]. Эписомы в латентно инфицированных клетках не способны свободно перемещаться внутри ядра, оставаясь прикрепленными к интерфазным хромосомам. Они воспроизводятся вместе с хромосомами хозяина при митозе. Однако в случае активации и перехода к литическому циклу эписомы вирусу вновь необходимы белки ND10. Установлено, что только эписомы, связавшиеся с ND10, способны начать литическую репликацию [53] (рис. 3).

Эписома содержит два функционально различных начала или источника латентной репликации ДНК ВЭБ: oriP (origin of plasmid replication) и альтернативный ему Raji ori. Критическое значение для латентной репликации вируса имеет oriP – область размером 1,7 т.п.н., этот источник репликации более эффективен и чаще используется. Кроме того, важен тип молекулярного взаимодействия: цис (на одной стороне) или транс (на другой стороне, напротив). Цис-регуляция подразумевает действие на соседние гены, а транс-регуляция – на отдалённые гены той же молекулы или межмолекулярно. EBNA-1 – транс-действующий элемент, расположенный на противоположной от oriP стороне эписомы, который связывается с oriP и активирует его. OriP содержит два основных компонента: области DS (dyad symmetry) и FR (family of repeats). Область DS длиной 120 п.н., 4 повтора по 30 п.н., имеет четыре сайта связывания EBNA-1. Цис-регуляторные элементы области DS инициируют репликацию вирусной ДНК один раз за клеточный цикл в строгом

согласовании с ним [54, 55]. По краям и посередине области определяются вспомогательные элементы DS, которые повышают эффективность DS в качестве репликатора [56]. Область FR состоит из 20 повторов по 30 п.н., кодирующих другой сайт связывания EBNA-1, чья функция заключается в связывании с конденсированными хромосомами клетки человека во время митоза [57]. Установление такой связи требует цис-регуляторного действия области FR и транс-действия отдаленно расположенного EBNA-1. FR предотвращает утрату эписомы ВЭБ при делении клетки. Белковые продукты гена EBNA-1 совместно с oriP обеспечивают существование эписомы во всех последующих клонах инфицированной клетки [58].

Альтернативный источник латентной репликации ВЭБ – Raji ori. Во многих эукариотических клетках наблюдается избыток сайтов репликативной инициации, что необходимо для поддержания стабильности генома [59]. Для ВЭБ такой дополнительный источник репликации, отличный от oriP, был обнаружен в клеточной линии Raji и получил соответствующее название. Raji ori может быть инициатором репликации не только в этой клеточной линии, он является альтернативным вариантом в случае потери oriP [60]. В то же время Raji ori самостоятельно не способен поддерживать репликацию ВЭБ длительное время при культивировании клеточной линии. В Raji ori не обнаружено сайтов связывания с EBNA-1, аналогичных DS-области oriP, достаточно эффективных для EBNA-1-зависимой инициации синтеза ДНК [61]. В лабораторных условиях удалось добиться репликации ДНК ВЭБ в клетках других клеточных линий (не Raji) при помощи Raji ori, для этого необходимо вывести из игры область DS. При этом всё ещё необходимо цис-регуляторное действие FR-области и транс-действие EBNA-1, как и при oriP-зависимой репликации. Однако скорость потери эписом при делении клетки в случае использования в качестве автономной реплицирующейся последовательности Raji ori выше, чем в случае нормального функционирования oriP. Дополнительно была выявлена область Raji middle неподалеку от Raji ori, которая *in vitro* при соблюдении аналогичных условий также может выполнять роль автономной реплицирующейся последовательности [61]. Без искусственного вмешательства ВЭБ преимущественно использует для латентной репликации oriP.

Латентная репликация эписомы невозможна без многих клеточных факторов репликации – белков и ферментов, которые выполняют основную работу. Критически значимо наличие факторов инициации хромосом ORC2 и Cdt1, ДНК-полимераз, геликаз инфицированной клетки и др. [41]. Вот почему временная регуляция репликации ДНК так важна для персистенции вируса. Эписомы копируются в промежутке от средней до поздней S-фазы митоза, и любое изменение скорости этого процесса критически значимо для их итогового количества. Например, препараты гидроксимочевина ускоряют время репликации ВЭБ, переводя копирование эписом на более раннюю стадию S-фазы. В результате уменьшается количество

копий генома ВЭБ у потомков клетки, теряется часть эписом [62]. Это связано с нарушением влияния клеточного транскрипционного фактора TRF2 (telomere repeat factor 2), который при нормальной скорости процесса связывается с oriP.

### Интеграция в ДНК

Вирус может интегрировать свою ДНК как в здоровую клетку, так и в уже инфицированную, например клетку лимфомы Беркитта или назофарингеальной карциномы [63]. Механизмы интеграции ВЭБ удобно изучать на клеточных линиях, наиболее часто используют линии клеток лимфомы Беркитта Raji [64] и назофарингеальной карциномы C666-1 [65]. Как правило, одно ядро содержит несколько копий вирусного генома, при этом интегрированные и эписомальные формы ДНК ВЭБ сосуществуют [66]. Репродукция интегрированного генома происходит в виде части клеточной ДНК и проходит все обычные этапы как в любой другой клетке организма. Случаи активации ВЭБ и начала его литической репликации из интегрированной формы не описаны [67].

Биологическое влияние интеграции ВЭБ на инфицированную клетку представляет большой интерес. Группа китайских исследователей из Центрального Южного Университета установила наиболее частые сайты интеграции ВЭБ в клетки линии Raji, используя комбинацию методов FISH, полимеразной цепной реакции и Саузерн-блоттинга [68]. 64% таких сайтов были расположены в 4q, 2q, 1q и 7q плечах хромосом, другие сайты интеграции локализовались в 1p, 3p, 3q, 5q, 6q, 7p, 9q, 11p, 14q и 15q плечах хромосом. Не обнаружено интеграции ВЭБ в 16–22-ю или половые (X, Y) хромосомы. Это исследование демонстрирует неслучайный характер интеграции ВЭБ.

Подобное исследование может быть детализировано при помощи технологии NGS, поскольку метод FISH, используемый ранее, позволяет визуализировать только искомые фрагменты ДНК, но не показывает полную последовательность. Высокое метилирование ДНК и интерференция эписомальной ДНК в ядре усложняют поиск сайтов интеграции ВЭБ методом FISH.

В ходе дальнейшей исследовательской работы было проведено NGS-секвенирование всего генома для детального изучения сайтов интеграции ВЭБ [69]. Всего обнаружено 909 мест вставки (350 сайтов в C666-1 и 559 сайтов в Raji). Выявлена разница в количестве копий вирусного генома на один диплоидный человеческий геном. Клетка линии Raji содержит в среднем около 20 копий ВЭБ; это почти в два раза больше, чем в клетках C666-1, где около 12 копий. По другим источникам, на одну клетку Raji может приходиться 50–60 геномов ВЭБ, кольцевой геном вируса линейно интегрируется в геном инфицированной клетки через BamHI-W фрагмент [70]. Согласно наблюдениям, вероятность обнаружения интегрированного генома ВЭБ положительно коррелирует с количеством вирусных копий на один диплоидный набор хромосом человека.

Благодаря использованию NGS удалось найти точные местоположения сайтов вирусной интеграции одновременно с расшифровкой всего генома. Оказалось, что сайты интеграции ВЭБ расположены поблизости или внутри областей структурных вариаций генома – хромосомных аномалий и вариаций числа копий (copy number variations). Авторы предполагают, что обнаруженные области нестабильности генома способствуют интеграции вируса, в то время как часть из них, возможно, возникла благодаря вставке генома ВЭБ.

Известно, что ВЭБ-инфекция клетки несёт онкогенный потенциал. Геномная нестабильность, вызванная вирусной интеграцией, определяет и высокий риск развития рака. Другим проонкогенным фактором ВЭБ является его способность встраиваться в ген-супрессор опухоли. Это демонстрируется на примере интеграции вируса в ген *BACH2* на хромосоме 6q15 в клеточной линии Raji, что способствует потере экспрессии *BACH2* и усилению лимфогенеза [70]. Таргетное секвенирование генома клеток назофарингеальной карциномы и других ассоциированных с ВЭБ опухолей позволило идентифицировать 197 точек хромосомного разрыва (breakpoints). Подтверждаются данные об интеграции вируса в уязвимые части человеческого генома, поблизости от генов-супрессоров опухоли и генов, связанных с воспалением [71]. Так, встройка вируса в интроны генов – регуляторов воспаления *TNFAIP3*, *PARK2* и *CDK15* в клетках назофарингеальной карциномы снижает их экспрессию. Разрыв генома ВЭБ часто происходил в области *oriP* или концевых повторах. Приведённые выше данные указывают на то, что интегрированный геном вируса оказывает больший малигирующий эффект по сравнению с эписомальным.

Количество вирусных копий на одну клетку имеет большое значение для прогноза пациента. При обычной латентности все инфицированные клетки содержат примерно одинаковое количество копий – 1–2, в то время как при серьёзном заболевании, например при посттрансплантационном лимфопролиферативном, картина меняется. У пациента имеется два типа В-лимфоцитов: один из них, как при нормальной латентности, содержит 1–2 копии ВЭБ, но второй (приблизительно 28%) содержит гораздо больше геномов вируса – от 20 до 30 [72]. Это может быть как причиной, так и следствием наблюдаемой высокой вирусной нагрузки при тяжёлых формах хронической активной ВЭБ-инфекции.

Интеграция вирусного генома в ДНК клетки – редкое явление среди герпесвирусов человека. Только ВЭБ и вирус герпеса человека 6 А/В на настоящий момент способны на это [49]. Нет сведений о наследственной передаче ДНК ВЭБ, интегрированной в геном половых клеток, поскольку он не может проникнуть в половые клетки и установить латентность в них. Однако такая способность обнаружена у вируса герпеса человека 6 А/В [73], что может быть связано с риском наследственной передачи ВЭБ.

### Заключение

ВЭБ использует гибкие стратегии выживания и репликации в обоих циклах. Эволюционные адаптив-

ные механизмы вируса, масштабное использование клеточных факторов в размножении поражают своей целесообразностью и позволяют глубже понять логику инфекционного процесса. В большинстве случаев вирусная персистенция в организме происходит бессимптомно или со скудной клинической симптоматикой, когда пациента не беспокоит ничего, кроме общей слабости и утомляемости. Однако регулярная активация вируса чревата отсроченным формированием тяжёлых соматических заболеваний, и понимание того, что происходит на микроуровне в клетке, позволяет вовремя диагностировать развивающееся заболевание и начать терапию.

На данный момент существуют простые и эффективные методы диагностики вирусной активации и ВЭБ-ассоциированной патологии. Схемы эффективного лечения ещё разрабатываются; перспективны такие стратегии, как индукция литического цикла во всех инфицированных клетках, ускорение клеточного репродуктивного цикла с целью уменьшения количества эписом, таргетная терапия. Учитывая высочайшую распространённость ВЭБ по всему миру, большие надежды возлагаются на профилактику, активно проводятся исследования по созданию вакцинных препаратов. Таким образом, дальнейшее изучение стратегий выживания и репликации, используемых вирусом, имеет большое значение для создания терапевтических и вакцинных препаратов с дальнейшим применением в реальной клинической практике.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field's virology. Volume 2*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 2343-96.
2. Бошняк Р.Е. *Инфекция, вызванная вирусом Эпштейна-Барр: эпидемиологические проявления и лабораторная диагностика*. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2009.
3. Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 2007; 81(15): 7825-32.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
4. Fearon D.T., Carter R.H. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 127-49.  
DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001015>
5. Fingerhuth J.D., Diamond M.E., Sage D.R., Hayman J., Yates J.L. CD21-Dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 1999; 73(3): 2115-25.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2115-2125.1999>
6. Maruo S., Yang L., Takada K. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 10): 2373-83.  
DOI: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2373>
7. Xiao J., Palefsky J.M., Herrera R., Berline J., Tugizov S.M. EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology*. 2009; 388(2): 335-43.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.030>
8. Rickinson A.B., Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field's virology. Volume 2*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007: 2655-700.
9. Souza T.A., Stollar B.D., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A. Peripheral B cells latently infected with Epstein-Barr virus display molecular hallmarks of classical antigen-selected memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102(50): 18093-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0509311102>
10. Thorley-Lawson D.A. EBV persistence – introducing the virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 390(Pt. 1): 151-209.  
DOI: [http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_8](http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8)

11. Hochberg D., Souza T., Catalina M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A. Acute infection with Epstein-Barr Virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J. Virol.* 2004; 78(10): 5194-204. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5194-5204.2004>
12. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T-cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301-12. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
13. Якушина С.А., Кистенева Л.Б. Влияние персистенции вируса Эпштейна–Барр на развитие иммуноопосредованных соматических заболеваний. *Российский вестник перинатологии и педиатрии.* 2018; 63(1): 22-7. DOI: <http://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-1-22-27>
14. Loebel M., Eckey M., Sotzny F., Hahn E., Bauer S., Grabowski P., et al. Serological profiling of the EBV immune response in Chronic Fatigue Syndrome using a peptide microarray. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0179124. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179124>
15. Handel A.E., Williamson A.J., Disanto G., Handunnetthi L., Giovannoni G., Ramagopalan S.V. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One.* 2010; 5(9): e12496. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
16. Draborg A.H., Duus K., Houen G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013: 535738. DOI: <http://doi.org/10.1155/2013/535738>
17. McGeoch D.J., Gatherer D. Lineage structures in the genome sequences of three Epstein-Barr virus strains. *Virology.* 2007; 359(1): 1-5. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2006.10.009>
18. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.* 2019; 110(4): 1132–9. DOI: <http://doi.org/10.1111/cas.13954>
19. Zeng M.S., Li D.J., Liu Q.L., Song L.B., Li M.Z., Zhang R.H., et al. Genomic sequence analysis of Epstein-Barr virus strain GD1 from a nasopharyngeal carcinoma patient. *J. Virol.* 2005; 79(24): 15323-30. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15323-15330.2005>
20. Tsai M.H., Lin X., Shumilov A., Bernhardt K., Feederle R., Poirey R., et al. The biological properties of different Epstein-Barr virus strains explain their association with various types of cancers. *Oncotarget.* 2016; 8(6): 10238-54. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.14380>
21. Lin Z., Wang X., Strong M.J., Concha M., Baddoo M., Xu G., et al. Whole-genome sequencing of the Akata and Mutu Epstein-Barr virus strains. *J. Virol.* 2013; 87(2): 1172-82. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02517-12>
22. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., et al. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5222-37. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
23. Correia S., Bridges R., Wegner F., Venturini C., Palser A., Middeldorp J.M., et al. Sequence variation of Epstein-Barr Virus: viral types, geography, codon usage, and diseases. *J. Virol.* 2018; 92(22): e01132-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
24. Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.* 2017; 89(3): 373-87. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24633>
25. Adamson A.L., Darr D., Holley-Guthrie E., Johnson R.A., Mauser A., Swenson J., et al. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J. Virol.* 2000; 74(3): 1224-33. DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1224-1233.2000>
26. Abbott R.J., Quinn L.L., Leese A.M., Scholes H.M., Pachnio A., Rickinson A.B. CD8+ T cell responses to lytic EBV infection: late antigen specificities as subdominant components of the total response. *J. Immunol.* 2013; 191(11): 5398-409. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1301629>
27. Kanegane H., Wakiguchi H., Kanegane C., Kurashige T., Tosato G. Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(1): 254-7. DOI: <http://doi.org/10.1086/517260>
28. Kang M.S., Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 2015; 47(1): e131. DOI: <http://doi.org/10.1038/emm.2014.84>
29. Niedobitek G., Agathangelou A., Herbst H., Whitehead L., Wright D.H., Young L.S. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J. Pathol.* 1997; 182: 151-9. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199706\)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3)
30. Niedobitek G., Kremmer E., Herbst H., Whitehead L., Dawson C.W., Niedobitek E., et al. Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood.* 1997; 90(4): 1664-72.
31. Gulley M.L., Raab-Traub N. Detection of Epstein-Barr virus in human tissues by molecular genetic techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993; 117(11): 1115-20.
32. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., et al., eds. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunophylaxis.* Cambridge; 2007.
33. Hurley E.A., Thorley-Lawson D.A. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J. Exp. Med.* 1988; 168(6): 2059-75. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.168.6.2059>
34. Yates J.L. Epstein-Barr virus DNA replication. In: DePamphilis M.L., ed. *DNA Replication in Eukaryotic Cells.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996: 751-74.
35. Hammerschmidt W., Sugden B. Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5(1): a013029. DOI: <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a013029>
36. Hammerschmidt W., Sugden B. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell.* 1988; 55(3): 427-33. DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90028-1](http://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90028-1)
37. Neuhierl B., Delecluse H.J. The Epstein-Barr virus BMRF1 gene is essential for lytic virus replication. *J. Virol.* 2006; 80(10): 5078-81. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5078-5081.2006>
38. Narita Y., Sugimoto A., Kawashima D., Watanabe T., Kanda T., Kimura H., et al. A herpesvirus specific motif of Epstein-Barr virus DNA polymerase is required for the efficient lytic genome synthesis. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11767. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep11767>
39. Schildgen O., Gräper S., Blümel J., Matz B. Genome replication and progeny virion production of herpes simplex virus type 1 mutants with temperature-sensitive lesions in the origin-binding protein. *J. Virol.* 2005; 79(11): 7273-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7273-7278.2005>
40. Daikoku T., Kudoh A., Fujita M., Sugaya Y., Isomura H., Shirata N., et al. Architecture of replication compartments formed during Epstein-Barr virus lytic replication. *J. Virol.* 2005; 79(6): 3409-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3409-3418.2005>
41. Tsurumi T., Fujita M., Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 3-15. DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.441>
42. Maul G.G. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays.* 1998; 20(8): 660-7. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<660::AID-BIES9>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<660::AID-BIES9>3.0.CO;2-M)
43. Rivera-Molina Y.A., Martínez F.P., Tang Q. Nuclear domain 10 of the viral aspect. *World J. Virol.* 2013; 2(3): 110-22. DOI: <http://doi.org/10.5501/wjv.v2.i3.110>
44. Amon W., White R.E., Farrell P.J. Epstein-Barr virus origin of lytic replication mediates association of replicating episomes with promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies and replication compartments. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 5): 1133-7. DOI: <http://doi.org/10.1099/vir.0.81589-0>
45. Sivachandran N., Wang X., Frappier L. Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection. *J. Virol.* 2012; 86(11): 6146-58. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00013-12>
46. Ling P.D., Peng R.S., Nakajima A., Yu J.H., Tan J., Moses S.M., et al. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 2005; 24: 3565-75. DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600820>
47. Tsai K., Thikmyanova N., Wojcechowskyj J.A., Delecluse H.J., Lieberman P.M. EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-ATRAX to activate viral early gene transcription. *PLoS Pathog.* 2011; 7(11): e1002376. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002376>



48. Shaw J.E., Levinger L.F., Carter C.W. Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *J. Virol.* 1979; 29(2): 657-65. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.29.2.657-665.1979>
49. Morissette G., Flamand L. Herpesviruses and chromosomal integration. *J. Virol.* 2010; 84(23): 12100-9. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01169-10>
50. Reisinger J., Rumpfer S., Lion T., Ambros P.F. Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Cancer.* 2006; 118(7): 1603-8. DOI: <http://doi.org/10.1002/ijc.21498>
51. Nanbo A., Sugden A., Sugden B. The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J.* 2007; 26(19): 4252-62. DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601853>
52. Humme S., Reischbach G., Feederle R., Delecluse H.J., Bousset K., Hammerschmidt W., et al. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(19): 10989-94. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1832776100>
53. Bell P., Lieberman P.M., Maul G.G. Lytic but not latent replication of Epstein-Barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11800-10. DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11800-11810.2000>
54. Yates J.L., Guan N. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J. Virol.* 1991; 65(1): 483-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.65.1.483-488.1991>
55. Gahn T.A., Schildkraut C.L. The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell.* 1989; 58(3): 527-35. DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90433-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90433-9)
56. Deng Z., Lezina L., Chen C.J., Shtivelband S., So W., Lieberman P.M. Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Mol. Cell.* 2002; 9(3): 493-503. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00476-8](http://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00476-8)
57. Rawlins D.R., Milman G., Hayward S.D., Hayward G.S. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell.* 1985; 42(3): 859-68. DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90282-x](http://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90282-x)
58. Yates J.L., Camiolo S.M., Bashaw J.M. The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J. Virol.* 2000; 74(10): 4512-22. DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4512-4522.2000>
59. Norio P., Schildkraut C.L. Plasticity of DNA replication initiation in Epstein-Barr virus episomes. *PLoS Biology.* 2004; 2(6): e152. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020152>
60. Norio P., Schildkraut C.L., Yates J.L. Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8563-74. DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8563-8574.2000>
61. Wang C.Y., Sugden B. Identifying a property of origins of DNA synthesis required to support plasmids stably in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(28): 9639-44. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0801378105>
62. Zhou J., Snyder A.R., Lieberman P.M. Epstein-Barr virus episome stability is coupled to a delay in replication timing. *J. Virol.* 2009; 83(5): 2154-62. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02115-08>
63. Chang Y., Cheng S.D., Tsai C.H. Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells. *Head Neck.* 2002; 24(2): 143-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/hed.10039>
64. Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M., Zajac B., Henle G., Henle W. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* 1966; 37(4): 547-59.
65. Cheung S.T., Huang D.P., Hui A.B., Lo K.W., Ko C.W., Tsang Y.S., et al. Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer.* 1999; 83(1): 121-6. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990924\)83:1<121::aid-ijc21>3.0.co;2-f](http://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990924)83:1<121::aid-ijc21>3.0.co;2-f)
66. Delecluse H.J., Bartnizke S., Hammerschmidt W., Bullerdiek J., Bornkamm G.W. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* 1993; 67(3): 1292-9. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.67.3.1292-1299.1993>
67. Traylen C.M., Patel H.R., Fondaw W., Mahatme S., Williams J.F., Walker L.R., et al. Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virol.* 2011; 6(4): 451-63. DOI: <http://doi.org/10.2217/fvl.11.21>
68. Gao J., Luo X., Tang K., Li X., Li G. Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J. Virol. Methods.* 2006; 136(1-2): 193-9. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.013>
69. Xiao K., Yu Z., Li X., Li X., Tang K., Tu C., et al. Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus (EBV) integration and strain in C666-1 and Raji cells. *J. Cancer.* 2016; 7(2): 214-24. DOI: <http://doi.org/10.7150/jca.13150>
70. Takakuwa T., Luo W.J., Ham M.F., Sakane-Ishikawa F., Wada N., Aozasa K. Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(3): 967-74. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63184-7](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63184-7)
71. Xu M., Zhang W.L., Zhu Q., Zhang S., Yao Y.Y., Xiang T., et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics.* 2019; 9(4): 1115-24. DOI: <http://doi.org/10.7150/thno.29622>
72. Rose C., Green M., Webber S., Kingsley L., Day R., Watkins S., et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in peripheral blood B cells from solid-organ transplant recipients by fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2533-44. DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2533-2544.2002>
73. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K., Shelley L.M., Marino A.S., Carnahan J.A., et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics.* 2008; 122(3): 513-20. DOI: <http://doi.org/10.1542/peds.2007-2838>

## REFERENCES

- Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field's virology. Volume 2*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 2343-96.
- Bosh'yan R.E. *Infection caused by the Epstein-Barr virus: epidemiological manifestations and laboratory diagnostics*: Diss. Moscow; 2009. (in Russian)
- Hutt-Fletcher L.M. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 2007; 81(15): 7825-32. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00445-07>
- Fearon D.T., Carter R.H. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13: 127-49. DOI: <http://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001015>
- Fingerth J.D., Diamond M.E., Sage D.R., Hayman J., Yates J.L. CD21-Dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 1999; 73(3): 2115-25. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2115-2125.1999>
- Maruo S., Yang L., Takada K. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 10): 2373-83. DOI: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2373>
- Xiao J., Palefsky J.M., Herrera R., Berline J., Tugizov S.M. EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology.* 2009; 388(2): 335-43. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.03.030>
- Rickinson A.B., Kieff E. Epstein-Barr virus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field's virology. Volume 2*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 2007: 2655-700.
- Souza T.A., Stollar B.D., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A. Peripheral B cells latently infected with Epstein-Barr virus display molecular hallmarks of classical antigen-selected memory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102(50): 18093-8. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0509311102>
- Thorley-Lawson D.A. EBV persistence – introducing the virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2015; 390(Pt. 1): 151-209. DOI: [http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8\\_8](http://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8)



11. Hochberg D., Souza T., Catalina M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Thorley-Lawson D.A. Acute infection with Epstein-Barr Virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J. Virol.* 2004; 78(10): 5194-204. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.10.5194-5204.2004>
12. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T-cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301-12. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
13. Yakushina S.A., Kisteneva L.B. Influence of the Epstein-Barr virus persistence upon the development of the immune mediated somatic diseases. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2018; 63(1): 22-7. DOI: <http://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-1-22-27> (in Russian)
14. Loebel M., Eckey M., Sotzny F., Hahn E., Bauer S., Grabowski P., et al. Serological profiling of the EBV immune response in Chronic Fatigue Syndrome using a peptide microarray. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0179124. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179124>
15. Handel A.E., Williamson A.J., Disanto G., Handunnetthi L., Giovannoni G., Ramagopalan S.V. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One.* 2010; 5(9): e12496. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
16. Draborg A.H., Duus K., Houen G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2013; 2013: 535738. DOI: <http://doi.org/10.1155/2013/535738>
17. McGeoch D.J., Gatherer D. Lineage structures in the genome sequences of three Epstein-Barr virus strains. *Virology.* 2007; 359(1): 1-5. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2006.10.009>
18. Kanda T., Yajima M., Ikuta K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.* 2019; 110(4): 1132-9. DOI: <http://doi.org/10.1111/cas.13954>
19. Zeng M.S., Li D.J., Liu Q.L., Song L.B., Li M.Z., Zhang R.H., et al. Genomic sequence analysis of Epstein-Barr virus strain GD1 from a nasopharyngeal carcinoma patient. *J. Virol.* 2005; 79(24): 15323-30. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15323-15330.2005>
20. Tsai M.H., Lin X., Shumilov A., Bernhardt K., Feederle R., Poirey R., et al. The biological properties of different Epstein-Barr virus strains explain their association with various types of cancers. *Oncotarget.* 2016; 8(6): 10238-54. DOI: <http://doi.org/10.18632/oncotarget.14380>
21. Lin Z., Wang X., Strong M.J., Concha M., Baddoo M., Xu G., et al. Whole-genome sequencing of the Akata and Mutu Epstein-Barr virus strains. *J. Virol.* 2013; 87(2): 1172-82. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02517-12>
22. Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C., Correia S., Ba Abdullah M.M., et al. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5222-37. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.03614-14>
23. Correia S., Bridges R., Wegner F., Venturini C., Palser A., Middeldorp J.M., et al. Sequence variation of Epstein-Barr Virus: viral types, geography, codon usage, and diseases. *J. Virol.* 2018; 92(22): e01132-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01132-18>
24. Neves M., Marinho-Dias J., Ribeiro J., Sousa H. Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J. Med. Virol.* 2017; 89(3): 373-87. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24633>
25. Adamson A.L., Darr D., Holley-Guthrie E., Johnson R.A., Mauser A., Swenson J., et al. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J. Virol.* 2000; 74(3): 1224-33. DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1224-1233.2000>
26. Abbott R.J., Quinn L.L., Leese A.M., Scholes H.M., Pachnio A., Rickinson A.B. CD8+ T cell responses to lytic EBV infection: late antigen specificities as subdominant components of the total response. *J. Immunol.* 2013; 191(11): 5398-409. DOI: <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1301629>
27. Kanegane H., Wakiguchi H., Kanegane C., Kurashige T., Tosato G. Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(1): 254-7. DOI: <http://doi.org/10.1086/517260>
28. Kang M.S., Kieff E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 2015; 47(1): e131. DOI: <http://doi.org/10.1038/emm.2014.84>
29. Niedobitek G., Agathangelou A., Herbst H., Whitehead L., Wright D.H., Young L.S. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J. Pathol.* 1997; 182: 151-9. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199706\)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199706)182:2<151::AID-PATH824>3.0.CO;2-3)
30. Niedobitek G., Kremmer E., Herbst H., Whitehead L., Dawson C.W., Niedobitek E., et al. Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood.* 1997; 90(4): 1664-72.
31. Gulley M.L., Raab-Traub N. Detection of Epstein-Barr virus in human tissues by molecular genetic techniques. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1993; 117(11): 1115-20.
32. Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., et al., eds. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge; 2007.
33. Hurley E.A., Thorley-Lawson D.A. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J. Exp. Med.* 1988; 168(6): 2059-75. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.168.6.2059>
34. Yates J.L. Epstein-Barr virus DNA replication. In: DePamphilis M.L., ed. *DNA Replication in Eukaryotic Cells.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996: 751-74.
35. Hammerschmidt W., Sugden B. Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013; 5(1): a013029. DOI: <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a013029>
36. Hammerschmidt W., Sugden B. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell.* 1988; 55(3): 427-33. DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90028-1](http://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90028-1)
37. Neuhiel B., Delecluse H.J. The Epstein-Barr virus BMRF1 gene is essential for lytic virus replication. *J. Virol.* 2006; 80(10): 5078-81. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5078-5081.2006>
38. Narita Y., Sugimoto A., Kawashima D., Watanabe T., Kanda T., Kimura H., et al. A herpesvirus specific motif of Epstein-Barr virus DNA polymerase is required for the efficient lytic genome synthesis. *Sci. Rep.* 2015; 5: 11767. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep11767>
39. Schildgen O., Gräper S., Blümel J., Matz B. Genome replication and progeny virion production of herpes simplex virus type 1 mutants with temperature-sensitive lesions in the origin-binding protein. *J. Virol.* 2005; 79(11): 7273-8. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.11.7273-7278.2005>
40. Daikoku T., Kudoh A., Fujita M., Sugaya Y., Isomura H., Shirata N., et al. Architecture of replication compartments formed during Epstein-Barr virus lytic replication. *J. Virol.* 2005; 79(6): 3409-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3409-3418.2005>
41. Tsurumi T., Fujita M., Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 3-15. DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.441>
42. Maul G.G. Nuclear domain 10, the site of DNA virus transcription and replication. *Bioessays.* 1998; 20(8): 660-7. DOI: [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<660::AID-BIES9>3.0.CO;2-M](http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<660::AID-BIES9>3.0.CO;2-M)
43. Rivera-Molina Y.A., Martínez F.P., Tang Q. Nuclear domain 10 of the viral aspect. *World J. Virol.* 2013; 2(3): 110-22. DOI: <http://doi.org/10.5501/wjv.v2.i3.110>
44. Amon W., White R.E., Farrell P.J. Epstein-Barr virus origin of lytic replication mediates association of replicating episomes with promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies and replication compartments. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 5): 1133-7. DOI: <http://doi.org/10.1099/vir.0.81589-0>
45. Sivachandran N., Wang X., Frappier L. Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection. *J. Virol.* 2012; 86(11): 6146-58. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00013-12>
46. Ling P.D., Peng R.S., Nakajima A., Yu J.H., Tan J., Moses S.M., et al. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 2005; 24: 3565-75. DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600820>
47. Tsai K., Thikmyanova N., Wojcechowskyj J.A., Delecluse H.J., Lieberman P.M. EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-

- ATRX to activate viral early gene transcription. *PLoS Pathog.* 2011; 7(11): e1002376.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002376>
48. Shaw J.E., Levinger L.F., Carter C.W. Nucleosomal structure of Epstein-Barr virus DNA in transformed cell lines. *J. Virol.* 1979; 29(2): 657-65.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.29.2.657-665.1979>
  49. Morissette G., Flamand L. Herpesviruses and chromosomal integration. *J. Virol.* 2010; 84(23): 12100-9.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01169-10>
  50. Reisinger J., Rumpel S., Lion T., Ambros P.F. Visualization of episomal and integrated Epstein-Barr virus DNA by fiber fluorescence in situ hybridization. *Int. J. Cancer.* 2006; 118(7): 1603-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/ijc.21498>
  51. Nanbo A., Sugden A., Sugden B. The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J.* 2007; 26(19): 4252-62.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601853>
  52. Humme S., Reisbach G., Feederle R., Delecluse H.J., Bousset K., Hammerschmidt W., et al. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100(19): 10989-94.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.1832776100>
  53. Bell P., Lieberman P.M., Maul G.G. Lytic but not latent replication of Epstein-Barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J. Virol.* 2000; 74(24): 11800-10.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.24.11800-11810.2000>
  54. Yates J.L., Guan N. Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J. Virol.* 1991; 65(1): 483-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.65.1.483-488.1991>
  55. Gahn T.A., Schildkraut C.L. The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell.* 1989; 58(3): 527-35.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90433-9](http://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90433-9)
  56. Deng Z., Lezina L., Chen C.J., Shtivelband S., So W., Lieberman P.M. Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Mol. Cell.* 2002; 9(3): 493-503. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00476-8](http://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00476-8)
  57. Rawlins D.R., Milman G., Hayward S.D., Hayward G.S. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell.* 1985; 42(3): 859-68.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90282-x](http://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90282-x)
  58. Yates J.L., Camiolo S.M., Bashaw J.M. The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J. Virol.* 2000; 74(10): 4512-22.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.10.4512-4522.2000>
  59. Norio P., Schildkraut C.L. Plasticity of DNA replication initiation in Epstein-Barr virus episomes. *PLoS Biology.* 2004; 2(6): e152.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020152>
  60. Norio P., Schildkraut C.L., Yates J.L. Initiation of DNA replication within oriP is dispensable for stable replication of the latent Epstein-Barr virus chromosome after infection of established cell lines. *J. Virol.* 2000; 74(18): 8563-74.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/jvi.74.18.8563-8574.2000>
  61. Wang C.Y., Sugden B. Identifying a property of origins of DNA synthesis required to support plasmids stably in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(28): 9639-44.  
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0801378105>
  62. Zhou J., Snyder A.R., Lieberman P.M. Epstein-Barr virus episome stability is coupled to a delay in replication timing. *J. Virol.* 2009; 83(5): 2154-62. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02115-08>
  63. Chang Y., Cheng S.D., Tsai C.H. Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells. *Head Neck.* 2002; 24(2): 143-50.  
DOI: <http://doi.org/10.1002/hed.10039>
  64. Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M., Zajac B., Henle G., Henle W. Morphological and virological investigations on cultured Burkitt tumor lymphoblasts (strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* 1966; 37(4): 547-59.
  65. Cheung S.T., Huang D.P., Hui A.B., Lo K.W., Ko C.W., Tsang Y.S., et al. Nasopharyngeal carcinoma cell line (C666-1) consistently harbouring Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer.* 1999; 83(1): 121-6.  
DOI: [http://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990924\)83:1<121::aid-ijc21>3.0.co;2-f](http://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990924)83:1<121::aid-ijc21>3.0.co;2-f)
  66. Delecluse H.J., Bartnizke S., Hammerschmidt W., Bullerdiel J., Bornkamm G.W. Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J. Virol.* 1993; 67(3): 1292-9. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.67.3.1292-1299.1993>
  67. Traylen C.M., Patel H.R., Fondaw W., Mahatme S., Williams J.F., Walker L.R., et al. Virus reactivation: a panoramic view in human infections. *Future Virol.* 2011; 6(4): 451-63.  
DOI: <http://doi.org/10.2217/fvl.11.21>
  68. Gao J., Luo X., Tang K., Li X., Li G. Epstein-Barr virus integrates frequently into chromosome 4q, 2q, 1q and 7q of Burkitt's lymphoma cell line (Raji). *J. Virol. Methods.* 2006; 136(1-2): 193-9.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.013>
  69. Xiao K., Yu Z., Li X., Li X., Tang K., Tu C., et al. Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus (EBV) integration and strain in C666-1 and Raji cells. *J. Cancer.* 2016; 7(2): 214-24.  
DOI: <http://doi.org/10.7150/jca.13150>
  70. Takakuwa T., Luo W.J., Ham M.F., Sakane-Ishikawa F., Wada N., Aozasa K. Integration of Epstein-Barr virus into chromosome 6q15 of Burkitt lymphoma cell line (Raji) induces loss of BACH2 expression. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(3): 967-74.  
DOI: [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63184-7](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63184-7)
  71. Xu M., Zhang W.L., Zhu Q., Zhang S., Yao Y.Y., Xiang T., et al. Genome-wide profiling of Epstein-Barr virus integration by targeted sequencing in Epstein-Barr virus associated malignancies. *Theranostics.* 2019; 9(4): 1115-24.  
DOI: <http://doi.org/10.7150/thno.29622>
  72. Rose C., Green M., Webber S., Kingsley L., Day R., Watkins S., et al. Detection of Epstein-Barr virus genomes in peripheral blood B cells from solid-organ transplant recipients by fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2533-44.  
DOI: <http://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2533-2544.2002>
  73. Hall C.B., Caserta M.T., Schnabel K., Shelley L.M., Marino A.S., Carnahan J.A., et al. Chromosomal integration of human herpesvirus 6 is the major mode of congenital human herpesvirus 6 infection. *Pediatrics.* 2008; 122(3): 513-20.  
DOI: <http://doi.org/10.1542/peds.2007-2838>

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

### Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса

Акимкин В.Г.<sup>1</sup>, Кузин С.Н.<sup>1</sup>, Семенов Т.А.<sup>2</sup>, Шипулина О.Ю.<sup>1</sup>, Яцышина С.Б.<sup>1</sup>, Тиванова Е.В.<sup>1</sup>, Каленская А.В.<sup>1</sup>, Соловьёва И.В.<sup>1</sup>, Вершинина М.А.<sup>1</sup>, Квасова О.А.<sup>1</sup>, Плоскирева А.А.<sup>1</sup>, Мамошина М.В.<sup>1</sup>, Елькина М.А.<sup>1</sup>, Клушкина В.В.<sup>1</sup>, Андреева Е.Е.<sup>3</sup>, Иваненко А.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 197101, Москва, Россия;

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

<sup>3</sup> Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по г. Москве, 129626, Москва, Россия;

<sup>4</sup> ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве», 129626, Москва, Россия

---

**Цель** исследования – изучить закономерности, свойственные эпидемическому процессу COVID-19, в условиях мегаполиса, в фазах подъёма, стабилизации и снижения заболеваемости, а также оценить эффективность противоэпидемических мероприятий.

**Материал и методы.** Проведено комплексное изучение распространения SARS-CoV-2 в Москве с использованием эпидемиологического, молекулярно-генетического и статистического методов исследования в период пандемии COVID-19.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что применение максимально жёстких организационно-ограничительных мер в масштабах Москвы, обеспечивающих разрыв механизма передачи SARS-CoV-2, и высокая дисциплина населения по исполнению режима самоизоляции позволили не допустить экспоненциального роста заболеваемости COVID-19. Анализ динамики выявления новых случаев COVID-19 показал, что эффект от применения мер по разобщению и режима самоизоляции в условиях мегаполиса наступает через временной промежуток, равный 3,5 инкубационного периода, при его максимальной длительности 14 дней. Установлено, что показатель частоты определения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения и его динамика – важные параметры мониторинга, особенно на фазах роста и стабилизации заболеваемости COVID-19, позволяющие в перспективе 1–2 инкубационных периодов (14–28 дней) прогнозировать развитие эпидемиологической ситуации. Общий коэффициент летальности, рассчитанный за период наблюдения (06.03.2020–23.06.2020) в Москве, составил 1,73%.

**Заключение.** В результате проведённого эпидемиологического анализа ситуации с COVID-19 в Москве определены некоторые закономерности распространения SARS-CoV-2 и оценена эффективность противоэпидемических мероприятий, направленных на разрыв механизма передачи возбудителя.

**Ключевые слова:** РНК SARS-CoV-2; COVID-19; эпидемический процесс; заболеваемость; условно здоровое население.

**Для цитирования:** Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В., Соловьёва И.В., Вершинина М.А., Квасова О.А., Плоскирева А.А., Мамошина М.В., Елькина М.А., Клушкина В.В., Андреева Е.Е., Иваненко А.В. Закономерности эпидемического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 203-211.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211>

**Для корреспонденции:** Кузин Станислав Николаевич, д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 197101, Москва, Россия. E-mail: [drkuzin@list.ru](mailto:drkuzin@list.ru)

**Участие авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

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

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

Поступила 17.07.2020

Принята в печать 04.08.2020

## Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity

Vasily G. Akimkin<sup>1</sup>, Stanislav N. Kuzin<sup>1</sup>, Tatiana A. Semenenko<sup>2</sup>, Olga Yu. Shipulina<sup>1</sup>, Svetlana B. Yatsyshina<sup>1</sup>, Elena V. Tivanova<sup>1</sup>, Anna V. Kalenskaya<sup>1</sup>, Irina V. Solovyova<sup>1</sup>, Marina A. Vershinina<sup>1</sup>, Olga A. Kvasova<sup>1</sup>, Antonina A. Ploskireva<sup>1</sup>, Marina V. Mamoshina<sup>1</sup>, Mariya A. Elkina<sup>1</sup>, Vitalina V. Klushkina<sup>1</sup>, Elena E. Andreeva<sup>3</sup>, Alexandr V. Ivanenko<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, 197101, Russia;

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

<sup>3</sup> Office of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being in Moscow, Moscow, 129626, Russia;

<sup>4</sup> Center for Hygiene and Epidemiology in the City of Moscow, Moscow, 129626, Russia

**The purpose** of the study is to analyze patterns demonstrated by the COVID-19 epidemic process in a megacity during the increase, stabilization and reduction in the incidence, and to evaluate the effectiveness of the epidemic prevention measures.

**Materials and methods.** The comprehensive study incorporating epidemiological, molecular-genetic and statistical research methods was conducted to analyze the spread of SARS-CoV-2 in Moscow during the COVID-19 pandemic.

**Results and discussion.** It was found that the exponential growth in COVID-19 cases was prevented due to the most stringent control and restrictive measures deployed in Moscow to break the chains of SARS-CoV-2 transmission and due to people who were very disciplined in complying with the self-isolation rules. The analysis of the dynamics in detection of new COVID-19 cases showed that in a megacity, the impact of social distancing and self-isolation would become apparent only after 3.5 incubation periods, where the maximum length of the period is 14 days. It was discovered that the detection frequency of SARS-CoV-2 RNA in relatively healthy population and its dynamics are important monitoring parameters, especially during the increase and stabilization in the COVID-19 incidence, and are instrumental in predicting the development of the epidemic situation within a range of 1–2 incubation periods (14–28 days). In Moscow, the case fatality rate was 1.73% over the observation period (6/3/2020–23/6/2020).

**Conclusion.** The epidemiological analysis of the COVID-19 situation in Moscow showed certain patterns of the SARS-CoV-2 spread and helped evaluate the effectiveness of the epidemic prevention measures aimed at breaking the routes of transmission of the pathogen.

**Keywords:** SARS-CoV-2 RNA; COVID-19; epidemic process; incidence; relatively healthy residents.

**For citation:** Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., Solovyova I.V., Vershinina M.A., Kvasova O.A., Ploskireva A.A., Mamoshina M.V., Elkina M.A., Klushkina V.V., Andreeva E.E., Ivanenko A.V. Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 203–211. (In Russ., in Engl.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211>

**For correspondence:** Stanislav N. Kuzin, D. Sci. (Med.), Prof., Head Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: [drkuzin@list.ru](mailto:drkuzin@list.ru)

### Information about the authors:

Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Kuzin S.N., <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

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

Shipulina O.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Yatsyshina S.B., <https://orcid.org/0000-0003-4737-941X>

Tivanova E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1286-2612>

Kalenskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9126-1155>

Solovyova I.V., <https://orcid.org/0000-0002-3136-9500>

Vershinina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-8582-5199>

Kvasova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-4545-1804>

Ploskireva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

Mamoshina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-1419-7807>

Elkina M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4769-6781>

Klushkina V.V., <https://orcid.org/0000-0001-8311-8204>

Andreeva E.E., <https://orcid.org/0000-0001-6687-7276>

Ivanenko A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7122-017X>

**Contribution.** The authors contributed equally to this article.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 17 July 2020  
Accepted 04 August 2020

Главной проблемой для здравоохранения большинства стран мира в 2020 г. стала пандемия COVID-19, вызванная вирусом семейства *Coronaviridae* рода *Betacoronavirus*, получившим название SARS-CoV-2 [1]. Исследования показали, что это новый вирус, который сформировался посредством естественных

природных механизмов в октябре-ноябре 2019 г. на территории Китайской Народной Республики (КНР) и, приобретя возможность связывать ACE2-рецептор человека, проник в человеческую популяцию.

Первый случай инфекции, ассоциированной с новым коронавирусом, зарегистрирован в КНР 17 ноя-

бря 2019 г. в г. Ухань у мужчины 55 лет. До конца 2019 г. в КНР были выявлены ещё 266 человек с респираторным заболеванием, которое, предположительно, связано с новым вариантом коронавируса. В самом конце декабря 2019 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) была проинформирована о вспышке «неизвестной пневмонии». В начале 2020 г. случаи нового заболевания, впоследствии названного COVID-19, начали регистрировать во многих странах мира, главным образом Европы и США [2–5]. Многочисленные смертельные исходы, ущерб здоровью людей, наносимый COVID-19, повсеместное интенсивное распространение коронавирусной инфекции послужили основанием для ВОЗ объявить 11 марта 2020 г. о пандемии [6]. На эту дату в мире было зарегистрировано 123 079 случаев COVID-19 и 4450 смертельных исходов. В России эпидемия COVID-19 стартовала существенно позже, чем в Европе, и на момент объявления пандемии были выявлены всего 18 заболевших.

**Цель работы** – изучить закономерности, свойственные эпидемическому процессу COVID-19, в условиях мегаполиса, в фазах подъёма, стабилизации и снижения заболеваемости, а также оценить эффективность принятых противоэпидемических мероприятий.

### Материал и методы

Работа выполнена в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. Исследование носило комплексный характер и проведено в Москве с 06.03.2020 по 23.06.2020. Используются эпидемиологический, молекулярно-генетический и статистический методы исследования.

Для оценки динамики выявления новых случаев COVID-19 в Москве использовали данные официальной регистрации, представленные на сайте стопкоронавирус.рф.

РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью разработанной и производимой в ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора тест-системы «Ампли-Сенс® Cov-Bat-FL» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2014/1987 от 25.03.2020). С 6 апреля по 23 июня 2020 г. исследованы 89 097 образцов от условно здорового населения Москвы. Молекулярно-генетические исследования проводили в соответствии с Временными правилами учёта информации в целях предотвращения распространения новой коронавирусной инфекции (COVID-19), утверждёнными постановлением Правительства РФ от 31.03.2020 № 373; Методическими рекомендациями МР 3.1.0169-20 «Лабораторная диагностика COVID-19», утверждёнными Главным государственным санитарным врачом РФ 30.03.2020; Временными методическими рекомендациями «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», утверждёнными Минздравом России 08.04.2020.

Величины биномиальных доверительных интервалов (ДИ) для средних значений частоты обнаружения РНК SARS-CoV-2 рассчитывали «точным методом» Клоппера–Пирсона. ДИ для средних значений числа новых случаев COVID-19 определяли с помощью программ-

ного приложения Microsoft Excel. Динамику анализируемых показателей определяли, рассчитывая величину тенденции методом наименьших квадратов. Выраженность тенденций (рост/снижение) оценивали по критериям, предложенным В.Д. Беляковым и соавт. [7].

### Результаты

За весь период наблюдения (06.03.2020–23.06.2020) в Москве зарегистрировано 216 095 случаев COVID-19 (1727,9 на 100 тыс. населения) и 3643 летальных исхода (29,1 на 100 тыс. населения).

Важно отметить, что на всех уровнях государственной власти было чёткое понимание серьёзности угрозы, поэтому первые решения по предупреждению распространения SARS-CoV-2 в Москве и в целом по стране были приняты ещё до выявления первого случая COVID-19 в Российской Федерации. Разработан комплекс документов в рамках Национального плана по предупреждению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции на территории РФ, утверждённого Председателем Правительства РФ: постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 24.01.2020 № 2 «О мероприятиях по недопущению распространения новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV», от 31.01.2020 № 3 «О проведении дополнительных санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по недопущению завоза и распространения новой коронавирусной инфекции, вызванной 2019-nCoV», от 02.03.2020 № 5 «О дополнительных мерах по снижению рисков завоза и распространения COVID-2019», от 13.03.2020 № 6 «О дополнительных мерах по снижению рисков распространения COVID-2019», от 18.03.2020 № 7 «Об обеспечении режима изоляции в целях предотвращения распространения COVID-2019».

В Москве также приняли ряд решений по предотвращению распространения COVID-19. Вначале (2 марта 2020 г.) был издан указ мэра Москвы, который обязывал всех граждан, прибывших из государств с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией по COVID-19, обеспечить самоизоляцию на дому в течение 14 дней. Далее (5 марта 2020 г.) были отменены все массовые мероприятия, закрыты школы и с 26 марта по 14 апреля был введён режим самоизоляции для лиц старше 65 лет, продлённый до 14 июня 2020 г. В Москве, как наиболее вовлечённом в эпидемический процесс мегаполисе, с 30 марта был введён режим самоизоляции для всех граждан, независимо от возраста. Меры по самоизоляции в связи с улучшением эпидемической ситуации были отменены с 9 июня 2020 г.

Первый случай заболевания COVID-19 на территории РФ (в Москве) был выявлен 2 марта у туриста, вернувшегося из Италии. В последующем наблюдалось постоянное нарастание числа новых пациентов с COVID-19. Максимальное число вновь выявленных случаев отмечено в первой половине мая 2020 г., а пиковые величины составили 6703 (7 мая) и 6169 (11 мая). Со второй половины мая отмечено постепенное уменьшение количества ежедневно выявляемых новых случаев COVID-19. На 23.06.2020

общее число пациентов с COVID-19 в Москве составило 216 095 при показателе заболеваемости 1727,9 на 100 тыс. населения. Зарегистрировано 3643 летальных исхода (29,1 на 100 тыс. населения).

Анализ динамики выявления случаев COVID-19 позволил выделить несколько временных периодов, каждый из которых имел особенности, обусловленные закономерностями, присущими эпидемическому процессу COVID-19, а также влиянием принятых противоэпидемических мероприятий (табл. 1).

В начальный период развития эпидемии COVID-19 в Москве (с 6 по 24 марта 2020 г.) регистрировали случаи заболевания, как правило, у людей, возвращающихся из зарубежных поездок. В первые дни заболевших было немного – от 3 до 9 пациентов, а 7, 8 и 15 марта новых случаев не выявлено. В дальнейшем COVID-19 регистрировали ежедневно, и число новых пациентов уже достигало 54 (22 марта) и 71 (23 марта). Необходимо отметить, что на этом этапе развития эпидемии выход в популяцию SARS-CoV-2 ещё только стартовал и интенсивность эпидемического процесса была невелика. При этом общая тенденция динамики выявления новых случаев COVID-19 характеризовалась выраженным ростом (+16,4% в день), а средние показатели числа новых случаев COVID-19 составили 15,3 пациента в день и 0,1 на 100 тыс. населения соответственно.

Отличительной особенностью периода 25.03.2020–01.04.2020 стала значительная интенсификация эпидемического процесса. Ежедневно выявляли от 114 (28 марта) до 387 (31 марта) заболевших при среднем показателе новых случаев COVID-19 171,9 пациента в день, что в 13 раз больше, чем в начальный период эпидемии.

Средний показатель заболеваемости также вырос до 1,6 на 100 тыс. населения. Важно отметить, что учитывали только пациентов с клинически выраженными признаками заболевания. В это же время зарегистрированы первые случаи заражения медицинских работников. Можно предположить, что на данном этапе эпидемии сформировался базовый массив потенциальных источников инфекции (пациенты с бессимптомным течением COVID-19, которые оставались вне медицинского учёта и, соответственно, не соблюдали режим самоизоляции), что обусловило дальнейшее ускоренное распространение SARS-CoV-2 в популяции. Темпы распространения SARS-CoV-2 в этот период соответствовали выраженному росту (+12,9% в день).

В течение следующей недели (02.04.2020–08.04.2020) ежедневно выявляемое количество новых случаев COVID-19 существенно увеличилось и варьировалось от 434 (4 апреля) до 697 (7 апреля). Средний показатель составил 565,9 пациента в день, что в 2,8 раза выше, чем в предыдущие 8 дней. Важно отметить, что в этот период сохранялся выраженный рост числа новых случаев с несколько меньшей интенсивностью (+5,4% в день). Средний показатель заболеваемости увеличился в 3 раза и достиг 4,5% на 100 тыс. населения. С 06.04.2020 в Москве были начаты популяционные исследования по определению РНК SARS-CoV-2 среди условно здоровых лиц (см. рисунок). За 3 дня обследовали 180 человек, у 7 из них выявили РНК SARS-CoV-2 (3,9%; 95% ДИ 1,6–7,9), что оказалось важным прецедентом, доказывающим наличие бессимптомных форм течения COVID-19 (табл. 2).

Необходимо отметить, что выявление инфицированных лиц, не имеющих симптоматики COVID-19,

**Таблица 1.** Динамика средних показателей частоты диагностирования случаев и заболеваемости COVID-19 в Москве в отдельные временные интервалы с 6 марта по 23 июня 2020 г.

**Table 1.** The dynamic of average rates of diagnosed cases and incidence of COVID-19 in Moscow in different time intervals from March 6 to June 23, 2020

Временной интервал Time interval	Средний показатель на 100 тыс. населения Incidence rate per 100 thousand population	Среднее число выявленных пациентов с COVID-19 в день, % (95% доверительный интервал) Average number of daily detected COVID-19 cases, % (95% confidence interval)	Тенденция роста/снижения в день, % Upward/downward trend of daily cases, %
6–24 марта March 6–24	0,1	15,3 (13,0–17,5)	+16,4
25 марта – 1 апреля March 25 – April 1	1,6	171,9 (168,7–175,0)	+12,9
2–8 апреля April 2–8	4,5	565,9 (562,8–569,0)	+5,4
9–16 апреля April 9–16	10,1	1288,1 (1282,6–1293,6)	+6,4
17 апреля – 1 мая April 17 – May	22,0	2743,6 (2738,5–2748,7)	+0,9
2–15 мая May 2–15	44,8	5583,1 (5579,1–5587,2)	-1,3
16–23 мая May 16–23	26,1	3241,6 (3237,0–3246,2)	-2,8
24 мая – 4 июня May 24 – June 4	18,6	2318,1 (2,314,8–2321,4)	-1,7
5–15 июня June 5–15	13,2	1640,9 (1636,8–1645,0)	-3,7
16–23 июня June 16–23	8,9	1103,9 (1101,1–1106,7)	-2,3

исключительно важно с эпидемиологической точки зрения, так как позволяет выявить скрытые и активные источники инфекции, благодаря которым поддерживается высокая активность эпидемического процесса.

В следующие 8 дней (4–16 апреля) количество ежедневно регистрируемых новых случаев COVID-19 существенно возросло, в первую очередь за счёт активно выявляемых пациентов с бессимптомным течением заболевания. Минимум/максимум зарегистрированы 9 и 15 апреля – 857 и 1774 пациента соответственно. Средний показатель достиг 1288,1 пациента в день, а темп роста в этот период составил +6,4% в день. За этот период в Москве обследованы в общей сложности 6624 человека (условно здоровое население), у 510 (7,7%) из них выявлена РНК SARS-CoV-2. В конце данного периода (16 апреля) зарегистрирована максимальная частота обнаружения РНК SARS-CoV-2 – 11,9%. Динамика этого показателя характеризовалась умеренным ростом (+2,4% в день), что дало основания предполагать дальнейшую интенсификацию эпидемического процесса COVID-19 (см. рисунок).

Период 17.04.2020–01.05.2020 характеризовался осложнением эпидемиологической ситуации, что можно было прогнозировать, учитывая динамику анализируемых показателей за предыдущий период. Так, среднее число ежедневно выявляемых случаев COVID-19 составило 2743,6 в день, что в 2,2 раза выше, чем в предыдущий период, а средняя частота определения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения достигла максимального значения – 9,1%. Следует отметить, что в этот период зафиксированы наиболее высокие за всё время наблюдения показатели частоты определения РНК SARS-CoV-2

среди условно здорового населения Москвы: 10,3% (19 апреля), 11,0% (17 апреля) и 11,9% (21 апреля). Основной рост числа пациентов с COVID-19 зарегистрирован в первые дни этого периода (17–19 апреля), когда были выявлены соответственно 1959, 2649 и 3570 больных. В последующие дни количество новых случаев COVID-19 варьировалось от 1959 (23 апреля) до 3561 (1 мая). В этот период впервые зафиксировано изменение тенденции к выраженному росту числа новых случаев COVID-19 до стабильного уровня (+0,9% в день). Вместе с тем в последние дни этого периода прошли так называемые шашлычные выходные, что привело к многочисленным контактам людей и, возможно, послужило причиной значительного роста числа новых случаев COVID-19.

С 2 по 15 мая 2020 г. среднее число ежедневно выявляемых пациентов с COVID-19 увеличилось до 5583,1 в день, что в 2 раза больше, чем в предыдущий период. Рост отмечен с 1 на 2 мая (3561 и 5358 пациентов соответственно); очевидно, это связано с массовым нарушением режима самоизоляции в последние дни апреля. 7 и 11 мая зарегистрировано рекордное количество пациентов с COVID-19 – 6703 и 6169 соответственно. Вместе с тем впервые документировано снижение числа пациентов с COVID-19 (-1,3% в день), что соответствует умеренному темпу. При этом отмечено уменьшение средней частоты обнаружения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения до 7,2% при тенденции к умеренному снижению -4,0% в день.

С 16 по 23 мая 2020 г. впервые снизилось (причём существенно, на 41,8%) среднее количество выявляемых пациентов (3241,6 в день) при сохранении

**Таблица 2.** Динамика частоты обнаружения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения Москвы в отдельные временные интервалы с 2 апреля по 23 июня 2020 г.

**Table 2.** The dynamic of SARS-CoV-2 RNA detection frequency among the conditionally healthy population in Moscow for the period from April 2 to June 23, 2020

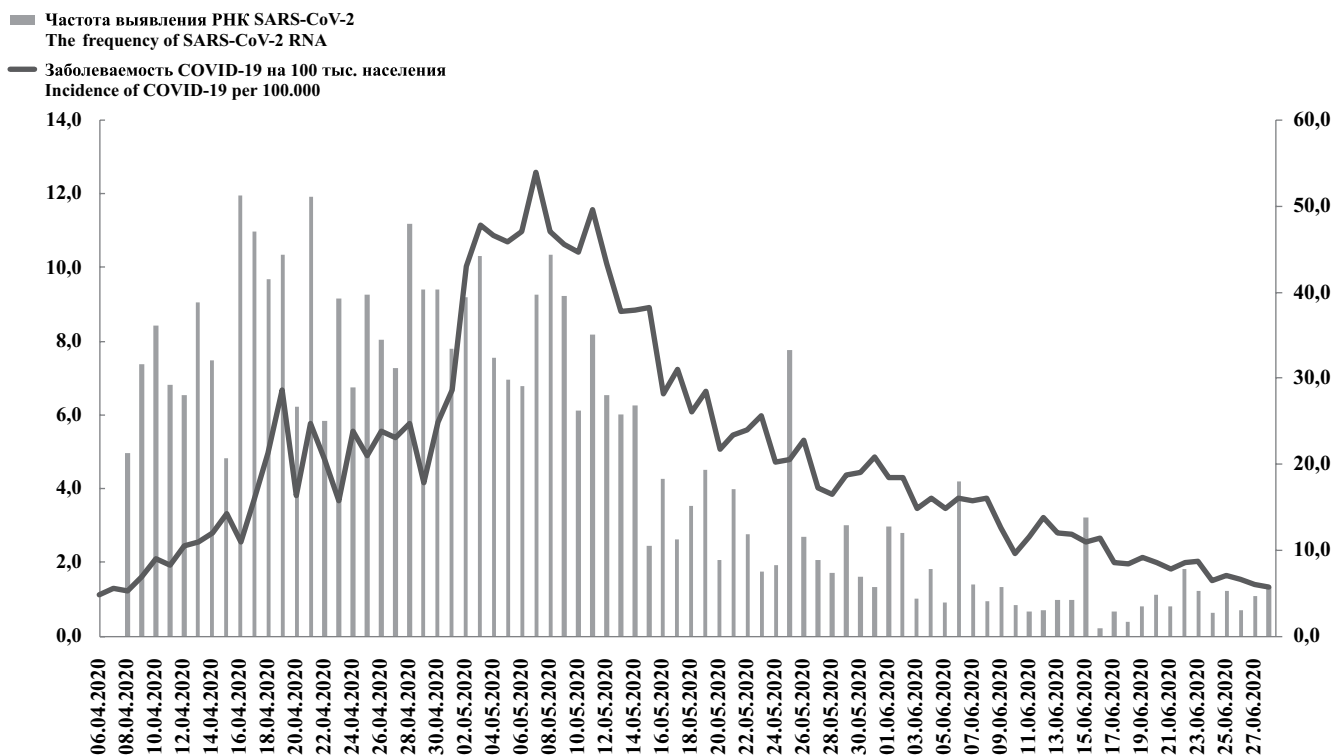
Временной интервал Time interval	<i>n</i>	Средняя частота выявления РНК SARS-CoV-2, % (95% доверительный интервал) Average SARS-CoV-2 RNA detection rate, % (95% confidence interval)	Тенденция роста/снижения в день, % Upward/downward trend of daily cases, %
2–8 апреля April 2–8	180	3,9* (1,6–7,9)	–**
9–16 апреля April 9–16	6624	7,7 (7,1–8,4)	+2,4
17 апреля – 1 мая April 17 – May 1	12 607	9,1 (8,6–9,6)	-0,7
2–15 мая May 2–15	13 469	7,2 (6,8–7,7)	-4,0
16–23 мая May 16–23	9841	3,1 (2,8–3,5)	-5,8
24 мая – 4 июня May 24 – June 4	18 283	2,4 (2,2–2,7)	-1,9
5–15 июня June 5–15	16 702	1,2 (1,0–1,4)	-2,3
16–23 июня June 16–23	9127	0,8 (0,6–1,0)	+16,4

**Примечание.** \* РНК SARS-CoV-2 определяли 06.04.2020–08.04.2020; \*\* динамику частоты определения РНК SARS-CoV-2 не рассчитывали.

**Note.** \* Tests for SARS-CoV-2 RNA were performed on 6/4/2020–8/4/2020; \*\* The dynamics of detection frequency for SARS-CoV-2 RNA was not estimated.

Частота выявления РНК SARS-CoV-2, %  
The frequency of SARS-CoV-2 RNA detection, %

Заболееваемость COVID-19 на 100 тыс. населения  
Incidence of COVID-19 per 100.000



Частота выявления РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения и заболеваемость COVID-19 в Москве с 06.04.2020 по 28.06.2020.

The SARS-CoV-2 RNA detection frequency among relatively healthy residents and COVID-19 incidence in Moscow from 6/4/2020 to 28/6/2020.

умеренной тенденции к снижению числа ежедневно выявляемых пациентов (-2,8% в день). Можно констатировать, что на фоне соблюдения режима самоизоляции развитие эпидемии COVID-19 в Москве приобрело устойчивый регрессивный характер. Средняя частота обнаружения РНК SARS-CoV-2 также существенно снизилась и составила 3,1% при ускорении тенденции к снижению, достигнутому -5,8% в день (выраженное снижение).

С 24 мая по 4 июня 2020 г. число выявляемых случаев COVID-19 продолжило снижаться с умеренной интенсивностью (-1,7% в день), средний показатель составил 2318,1 в день, что на 28,5% меньше, чем в предыдущий период. Средняя частота обнаружения РНК SARS-CoV-2 также снизилась (2,4%).

Период с 5 по 15 июня также характеризовался снижением среднего числа выявленных случаев COVID-19 и средней частоты обнаружения РНК SARS-CoV-2, составившими 1640,9 в день и 1,2% соответственно. Для обоих показателей снижение было умеренным и составляло -3,7 и -2,3% в день соответственно.

В заключительный временной интервал анализируемого периода (16.06.2020–23.06.2020) также зафиксировано снижение средних показателей. Среднее

число новых случаев COVID-19 составило 1103,9 в день, РНК SARS-CoV-2 выявлена в 0,8% случаев среди условно здоровой популяции. Динамика числа новых случаев COVID-19 характеризовалась умеренным снижением (-2,3% в день), но для показателя частоты определения РНК SARS-CoV-2 тенденция сменилась на противоположную – зафиксирован выраженный рост (+16,4% в день). Вместе с тем такой рост на фоне стабильного снижения как числа новых случаев COVID-19, так и удельного веса лиц с РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения при его низком среднем значении (0,8%) может быть не столь значимым показателем. Следует отметить, что средний показатель заболеваемости в этот период составил 8,9 на 100 тыс. населения, что нужно расценивать как относительно высокий уровень, особенно с учётом незначительных темпов снижения.

### Обсуждение

Эпидемия COVID-19, продолжающаяся в настоящее время в Российской Федерации, стала наиболее значимым событием 2020 г. Уже сейчас можно констатировать, что здоровью населения страны нанесён огромный ущерб, а масштаб экономических потерь и связанное с ними падение уровня жизни ещё предстоит оценить.



В динамике нарастания случаев COVID-19 в Москве можно отметить, с одной стороны, относительно невысокий темп (не было экспоненциального роста), а с другой – несколько скачкообразных подъёмов с резким увеличением числа новых случаев заболевания. Наиболее значительные подъёмы зафиксированы с 16 на 17 апреля (с 1370 до 1959 новых случаев COVID-19) и с 1 на 2 мая 2020 г. (с 3561 до 5358 случаев). Важно отметить, что в это время уже проводили исследования среди условно здорового населения и значительное количество выявленных пациентов не имели симптоматики COVID-19 (до 40% в отдельные дни). Опыт активного выявления пациентов с бессимптомным течением COVID-19 с помощью тестирования на РНК SARS-CoV-2 с последующим их переводом в режим самоизоляции показал, что это высокоэффективный инструмент ограничения распространения вируса. В ранее опубликованном нашем сообщении высказывалось мнение, что мониторинг в ежедневном режиме показателя удельного веса лиц с РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения может быть важным элементом системы эпидемиологического надзора за COVID-19 [8].

Необходимо отметить, что, несмотря на режим самоизоляции, в Москве значительное количество людей вынужденно выходят на работу, обеспечивая необходимый уровень жизнедеятельности города, пользуются общественным транспортом, посещают магазины и аптеки, неизбежно контактируя с источниками инфекции. При этом столь высокая частота инфицированных (каждый 13-й) в условно здоровой популяции, очевидно, обеспечивает интенсификацию эпидемического процесса и дальнейший рост числа новых случаев заболевания. Есть основания полагать, что пациенты с бессимптомным течением COVID-19, которых невозможно было выявить, невольно послужили движущей силой для дальнейшего распространения SARS-CoV-2. Вместе с тем значительные объёмы тестирования на РНК SARS-CoV-2 в Москве позволили в перспективе существенно уменьшить уровень циркуляции вируса и обусловили общее снижение числа новых случаев COVID-19. Такие исследования позволяют получить положительный эффект, который проявится по прошествии времени и определяется степенью охвата и инкубационным периодом COVID-19. Согласно сегодняшним представлениям, основанным на предварительных расчётах, длительность инкубационного периода COVID-19 составляет от 0 до 14 дней, притом, что ряд авторов допускают его бо́льшую продолжительность [9, 10].

Есть основания утверждать, что на развитие эпидемии COVID-19 в Москве оказали значительное влияние своевременно принятые противоэпидемические меры, в основе которых – социальное разобщение и самоизоляция. В результате в Москве не было взрывообразного роста заболеваемости и за счёт связанного с этим выигрыша во времени удалось подготовить медицинскую инфраструктуру для оказания профессиональной и эффективной помощи заболевшим. На фоне режима самоизоляции переломный момент

в развитии эпидемии COVID-19 в Москве, по нашему мнению, наступил 16 мая 2020 г., когда зафиксировали первое существенное уменьшение числа новых случаев с 4748 до 3505 со стабилизацией на достигнутом уровне и последующим снижением. Можно констатировать, что снижение показателей заболеваемости COVID-19, обусловленное предпринятыми противоэпидемическими мерами началось через временной промежуток, равный 3,5 максимального инкубационного периода, который в настоящее время принимается за 14 дней [9].

По нашему мнению, частота обнаружения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения в период текущей эпидемии COVID-19, – весьма информативный параметр мониторинга эпидемиологической ситуации. Этот показатель даёт важную информацию об удельном весе лиц с бессимптомным течением заболевания, которые являются скрытыми источниками инфекции. По динамике его изменения можно обоснованно судить об интенсивности эпидемического процесса, о направлении его развития в перспективе 1–2 инкубационных периодов и об эффективности противоэпидемических мероприятий.

В настоящее время эпидемиологический анализ ситуации по COVID-19 вынужденно сопряжён с некоторыми допущениями, обусловленными отсутствием точных количественных характеристик эпидемического процесса. Так, имеются указания на то, что максимальная длительность инкубационного периода может превышать 14 дней [9]. Кроме того, известны только предварительные расчёты базового репродуктивного числа ( $R_0$ ) – основной величины, характеризующий эпидемический потенциал источника инфекции при COVID-19. По данным разных исследователей,  $R_0$  варьирует от 2,2 до 4,7 [11–15].

Важной характеристикой тяжести последствий эпидемии COVID-19 является общий коэффициент летальности (CFR), который обозначает удельный вес летальных исходов по отношению к общему числу пациентов с этим заболеванием. Для Москвы он составил 1,73%. Необходимо отметить, что сегодня на фоне пандемии величина этого коэффициента для COVID-19 в разных странах значительно различается, это связано с особенностями регистрации пациентов и установления причин смерти [16]. Так, в КНР общий CFR составил 1,38% [17, 18]. В обзоре Е. Руса и соавт. [19] приведены величины CFR, рассчитанные для 11 европейских стран. Максимальные значения составили 4,6–4,8% (Албания, Болгария, Греция), тогда как минимальные – 1,4–1,5% (Черногория, Хорватия). В Канаде и США скорректированные CFR составили 1,6 и 1,78% соответственно [20].

Уже сейчас можно констатировать, что пандемия COVID-19 нанесла огромный ущерб здоровью населения многих стран мира, в том числе и России, притом, что спрогнозировать время её окончания невозможно. В конце июня 2020 г. появились сообщения об активизации эпидемического процесса COVID-19 в некоторых странах (в Германии, Южной Корее, Испании), где, казалось бы, проблема была решена.

Кроме того, многие специалисты считают весьма вероятной вторую волну эпидемии COVID-19 [21–24].

Значительное улучшение эпидемиологической ситуации в Москве позволило снять режим самоизоляции и рекомендовать гражданам соблюдать социальную дистанцию в транспорте, магазинах и других общественных местах, использовать маски и перчатки. Вынужденное применение жёстких мер социального разобщения привело к ряду проблем медицинского и социального порядка, тяжесть которых ещё только предстоит оценить. К их числу следует отнести стресс, который испытали дисциплинированные граждане, находящиеся в самоизоляции. Последствиями такого стресса стали обострение хронических заболеваний, снижение естественной резистентности организма, развитие депрессивных состояний. В настоящий момент трудно оценить масштаб проблемы, поскольку эпидемия в России, в том числе в Москве, продолжается, несмотря на очевидное снижение остроты ситуации.

### Выводы

Основываясь на динамике частоты регистрации новых случаев COVID-19 и результатов активного выявления РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения, можно сделать несколько выводов.

1. Своевременное принятие максимально жёстких организационно-ограничительных мер в Москве, обеспечивающих разрыв механизма передачи SARS-CoV-2, и высокая дисциплина населения по исполнению режима самоизоляции позволили не допустить экспоненциального роста заболеваемости COVID-19, как это было во многих странах [24–27].

2. Эффект мер по разобщению и режима самоизоляции в условиях мегаполиса наступает через временной промежуток, равный 3,5 инкубационных периода, максимальная длительность которого – 14 дней.

3. Исследования по определению РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения на фазах подъёма и стабилизации (плато) заболеваемости COVID-19 являются важной противоэпидемической мерой, способствующей выявлению людей с бессимптомными формами заболевания и переводу их в режим самоизоляции, что позволяет значительно уменьшить количество скрытых источников инфекции.

4. Частота определения РНК SARS-CoV-2 среди условно здорового населения и её динамика являются важными параметрами мониторинга, особенно на фазах роста и стабилизации заболеваемости COVID-19, как предиктор развития эпидемиологической ситуации.

5. На основании оценки динамики нарастания числа новых случаев COVID-19 в Москве можно предположить, что длительность инкубационного периода COVID-19 у некоторой части пациентов превышает 14 дней.

6. Общий коэффициент летальности, рассчитанный в период с начала эпидемии до 23.06.2020 на фоне постепенного снижения числа новых случаев COVID-19 в Москве, составил 1,73%.

Тот факт, что за короткий промежуток времени (с 2002 по 2019 г.) трижды возникли тяжёлые эпиде-

мические ситуации, связанные с рекомбинантными вариантами коронавирусов, причём не только в КНР, но и в Саудовской Аравии (MERS), даёт основания с высокой степенью вероятности предполагать, что в последующем подобные ситуации могут воспроизводиться. Полученный опыт может быть полезен для купирования будущих вспышек, так как отработаны необходимые мероприятия и их реализация станет легче. Однако для предотвращения ситуаций, подобных пандемии, нужен системный подход, в основе которого будут результаты фундаментальных исследований по изучению эволюции вирусов внутри семейств и родов [28].

### ЛИТЕРАТУРА

- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224): 565-74. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Romagnani P., Gnone G., Guzzi F., Negrini S., Guastalla A., Annunziato F., et al. The COVID-19 infection: lessons from the Italian experience. *J. Public Health Policy*. 2020; 41(3): 238-44. DOI: <http://doi.org/10.1057/s41271-020-00229-y>
- Sebastiani G., Massa M., Riboli E. Covid-19 epidemic in Italy: evolution, projections and impact of government measures. *Eur. J. Epidemiol.* 2020; 35(4): 341-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10654-020-00631-6>
- Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 970-1. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMc200146>
- Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
- WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf>
- Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. *Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий*. Л.: Медицина; 1981.
- Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., Каленская А.В. и др. Эпидемиологическое значение определения РНК SARS-CoV-2 среди различных групп населения Москвы и Московской области в период эпидемии COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(3): 197-201. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-197-201>
- Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (Covid-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(9): 577-82. DOI: <http://doi.org/10.7326/M20-0504>
- Backer J.A., Klinkenberg D., Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travelers from Wuhan, China, 20–28 January 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(5): 2000062. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.2000062>
- Liu T., Hu J., Kang M., Lin L., Zhong H., Xiao J., et al. Transmission dynamics of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *J. Med. Virol.* 2020; 92(5): 501-11. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.25.919787>
- Read J.M., Bridgen J.R.E., Cummings D.A.T., Ho A., Jewell C.P. Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. *medRxiv*. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.23.20018549>
- Riou J., Althaus C.L. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(4): 2000058. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.4.2000058>
- Shen M., Peng Z., Xiao Y., Zhang L. Modelling the epidemic trend of the 2019 novel coronavirus outbreak in China. *bioRxiv*. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.23.916726>
- Wu J.T., Leung K., Leung G.M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*. 2020; 395(10225): 689-97. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9)
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2020; 52(5): 737-41. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>

17. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669-77. DOI: <http://doi.org/10.1016/S1473>
18. Wu J.T., Leung K., Bushman M., Kishore N., Niehus R., de Salazar P.M., et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 506-10. DOI: [http://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7-3099\(20\)30243-7](http://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7-3099(20)30243-7)
19. Puca E., Čivljak R., Arapović J., Popescu C., Christova I., Raka L., et al. Short epidemiological overview of the current situation on Covid-19 pandemic in Southeast European (SEE) countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2020; 14(5): 433-7. DOI: <http://doi.org/10.3855/jidc.12814>
20. Abdollahi E., Champredon D., Langley J.M., Galvani A.P., Moghadas S.M. Temporal estimates of case-fatality rate for COVID-19 outbreaks in Canada and the United States. *CMAJ.* 2020; 192(25): E666-70. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.200711>
21. Xu S., Li Y. Beware of the second wave of COVID-19. *Lancet.* 2020; 395(10233): 1321-2. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30845-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30845-X)
22. de Brouwer R., van Veldhuisen D.J., de Boer R.A. Surviving the first COVID-19 wave and learning lessons for the second. *Eur. J. Heart Fail.* 2020; 22(6): 975-7. DOI: <http://doi.org/10.1002/ehf.1938>
23. Vogel L. Is Canada ready for the second wave of COVID-19? *CMAJ.* 2020; 192(24): E664-5. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.1095875>
24. Ceylan Z. Estimation of COVID-19 Prevalence in Italy, Spain, and France. *Sci. Total Environ.* 2020; 729: 138817. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138817>
25. Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(13): 1199-207. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
26. Chatterjee A., Gerdes M.W., Martinez S.G. Statistical Explorations and Univariate timeseries analysis on COVID-19 datasets to understand the trend of disease spreading and death. *Sensors (Basel).* 2020; 20(11): 3089. DOI: <http://doi.org/10.3390/s20113089>
27. Abdollahi E., Champredon D., Langley J.M., Galvani A.P., Moghadas S.M. Temporal estimates of case-fatality rate for COVID-19 outbreaks in Canada and the United States. *CMAJ.* 2020; 192(25): E666-70. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.200711>
28. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 62-70. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70>
- DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-3-197-201> (in Russian).
9. Lauer S.A., Grantz K.H., Bi Q., Jones F.K., Zheng Q., Meredith H.R., et al. The incubation period of coronavirus disease 2019 (Covid-19) from publicly reported confirmed cases: estimation and application. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(9): 577-82. DOI: <http://doi.org/10.7326/M20-0504>
10. Backer J.A., Klinkenberg D., Wallinga J. Incubation period of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infections among travelers from Wuhan, China, 20–28 January 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(5): 2000062. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.5.2000062>
11. Liu T., Hu J., Kang M., Lin L., Zhong H., Xiao J., et al. Transmission dynamics of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *J. Med. Virol.* 2020; 92(5): 501-11. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.25.919787>
12. Read J.M., Bridgen J.R.E., Cummings D.A.T., Ho A., Jewell C.P. Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. *medRxiv.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.23.20018549>
13. Riou J., Althaus C.L. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(4): 2000058. DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.4.2000058>
14. Shen M., Peng Z., Xiao Y., Zhang L. Modelling the epidemic trend of the 2019 novel coronavirus outbreak in China. *bioRxiv.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1101/2020.01.23.916726>
15. Wu J.T., Leung K., Leung G.M. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet.* 2020; 395(10225): 689-97. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30260-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30260-9)
16. Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5): 737-41. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
17. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669-77. DOI: <http://doi.org/10.1016/S1473>
18. Wu J.T., Leung K., Bushman M., Kishore N., Niehus R., de Salazar P.M., et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 506-10. DOI: [http://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7-3099\(20\)30243-7](http://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7-3099(20)30243-7)
19. Puca E., Čivljak R., Arapović J., Popescu C., Christova I., Raka L., et al. Short epidemiological overview of the current situation on Covid-19 pandemic in Southeast European (SEE) countries. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2020; 14(5): 433-7. DOI: <http://doi.org/10.3855/jidc.12814>
20. Abdollahi E., Champredon D., Langley J.M., Galvani A.P., Moghadas S.M. Temporal estimates of case-fatality rate for COVID-19 outbreaks in Canada and the United States. *CMAJ.* 2020; 192(25): E666-70. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.200711>
21. Xu S., Li Y. Beware of the second wave of COVID-19. *Lancet.* 2020; 395(10233): 1321-2. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30845-X](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30845-X)
22. de Brouwer R., van Veldhuisen D.J., de Boer R.A. Surviving the first COVID-19 wave and learning lessons for the second. *Eur. J. Heart Fail.* 2020; 22(6): 975-7. DOI: <http://doi.org/10.1002/ehf.1938>
23. Vogel L. Is Canada ready for the second wave of COVID-19? *CMAJ.* 2020; 192(24): E664-5. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.1095875>
24. Ceylan Z. Estimation of COVID-19 Prevalence in Italy, Spain, and France. *Sci. Total Environ.* 2020; 729: 138817. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138817>
25. Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(13): 1199-207. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
26. Chatterjee A., Gerdes M.W., Martinez S.G. Statistical Explorations and Univariate timeseries analysis on COVID-19 datasets to understand the trend of disease spreading and death. *Sensors (Basel).* 2020; 20(11): 3089. DOI: <http://doi.org/10.3390/s20113089>
27. Abdollahi E., Champredon D., Langley J.M., Galvani A.P., Moghadas S.M. Temporal estimates of case-fatality rate for COVID-19 outbreaks in Canada and the United States. *CMAJ.* 2020; 192(25): E666-70. DOI: <http://doi.org/10.1503/cmaj.200711>
28. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus). *Voprosy virusologii.* 2020; 65(2): 62-70. DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70> (in Russian)

## REFERENCES

1. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet.* 2020; 395(10224): 565-74. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
2. Romagnani P., Gnone G., Guzzi F., Negrini S., Guastalla A., Annunziato F., et al. The COVID-19 infection: lessons from the Italian experience. *J. Public Health Policy.* 2020; 41(3): 238-44. DOI: <http://doi.org/10.1057/s41271-020-00229-y>
3. Sebastiani G., Massa M., Riboli E. Covid-19 epidemic in Italy: evolution, projections and impact of government measures. *Eur. J. Epidemiol.* 2020; 35(4): 341-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10654-020-00631-6>
4. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., et al. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 970-1. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMc200146>
5. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
6. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 51. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200311-sitrep-51-covid-19.pdf>
7. Belyakov V.D., Degtyarev A.A., Ivannikov Yu.G. *The Quality and Effectiveness of Anti-Epidemic Measures [Kachestvo i effektivnost' protivoepidemicheskikh meropriyatiy]*. Leningrad: Meditsina; 1981. (in Russian)
8. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., Kalenskaya A.V., et al. Epidemiological significance of detection of SARS-CoV-2 RNA among different groups of population of Moscow and Moscow Region during the COVID-19 outbreak. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(3): 197-201.



# Разработка инактивированной культуральной вакцины против жёлтой лихорадки

Иванов А.П.<sup>1</sup>, Клеблеева Т.Д.<sup>1</sup>, Рогова Ю.В.<sup>1</sup>, Иванова О.Е.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 11999, Москва, Россия

**Введение.** Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – одно из самых распространённых вирусных заболеваний человека. Единственная на сегодняшний день доступная живая вакцина против ЖЛ на основе куриных эмбрионов, инфицированных аттенуированным штаммом 17D вируса ЖЛ, относится к наиболее эффективным вакцинным препаратам. Однако живая вакцина ассоциирована с тяжёлыми поствакцинальными осложнениями, в том числе с висцеротропным синдромом (примерно 0,4 случая на 100 тыс. вакцинированных). В связи с этим разработка и внедрение высокоочищенной инактивированной вакцины против ЖЛ призвана обеспечить максимальную безопасность вакцинации.

**Цель исследования** – разработка и оценка иммуногенности культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ на уровне лабораторной модели.

**Материал и методы.** В ходе исследования проведены адаптация штамма 17D вируса ЖЛ к культуре клеток Vero, культивирование, удаление клеточной ДНК, инактивация β-пропиолактоном, концентрирование, хроматографическая очистка, определение белка и антигена вируса ЖЛ, оценка иммуногенности на мышах параллельно с коммерческой живой вакциной.

**Результаты и обсуждение.** Определение специфических антител класса G (IgG) и вируснейтрализующих антител в сыворотках крови иммунизированных мышей показало высокий уровень антител, превышающий таковой при иммунизации коммерческой живой вакциной. Оптимальная доза антигена в вакцине по общему белку составила 50 мкг/мл (5 мкг/0,1 мл – доза и объём на 1 вакцинацию мышей). Таким образом, лабораторный вариант культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ по эффективности не уступает коммерческой живой вакцине и даже превосходит её.

**Заключение.** Разработан лабораторный вариант культуральной инактивированной вакцины против ЖЛ, не уступающий по иммуногенности (на модели животных) коммерческой живой вакцине.

**Ключевые слова:** штамм 17D вируса жёлтой лихорадки; культуральная инактивированная вакцина против жёлтой лихорадки; живая вакцина против жёлтой лихорадки; культура клеток Vero; очистка вируса жёлтой лихорадки; иммуногенность; мыши BALB/c.

**Для цитирования:** Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Рогова Ю.В., Иванова О.Е. Разработка инактивированной культуральной вакцины против жёлтой лихорадки. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 212-217. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-212-217>.

**Для корреспонденции:** Иванов Александр Петрович, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник лаб. молекулярной биологии вирусов ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва. E-mail: [ivanovalexander1@gmail.com](mailto:ivanovalexander1@gmail.com)

**Участие авторов:** Иванов А.П. – концепция, эксперименты, анализ данных, написание статьи; Клеблеева Т.Д. – экспериментальная часть; Рогова Ю.В. – работа с животными; Иванова О.Е. – анализ данных, написание и редактирование текста.

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

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

Поступила 27.07.2020

Принята в печать 11.08.2020

## Development of inactivated cultural yellow fever vaccine

Alexander P. Ivanov<sup>1</sup>, Tatiana D. Klebleeva<sup>1</sup>, Yulia V. Rogova<sup>1</sup>, Olga E. Ivanova<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia;

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 11999, Russia

**Introduction.** The only currently available live vaccine against yellow fever (YF) based on chicken embryos infected with an attenuated 17D strain of the YF virus is one of the most effective vaccine preparations. However, the live vaccine is associated with “viscerotropic syndrome” (approximately 0.4 cases per 100 000 vaccinated). Therefore, the development and introduction of highly purified inactivated vaccine against YF is intended to ensure the maximum safety of vaccination against one of the most common human viral diseases.

**Goals and objectives.** Development and evaluation of immunogenicity of the cultural inactivated vaccine against YF at the laboratory model level.

**Material and methods.** Adaptation of 17D strain of YF virus to *Vero* cell culture, cultivation, removal of cellular DNA, inactivation with  $\beta$ -propiolactone, concentration, chromatographic purification, determination of protein and antigen of YF virus, assessment of immunogenicity in mice in parallel with commercial live vaccine.

**Results and discussion.** Immunogenicity: the determination of specific antibodies of class G (IgG) and virus neutralizing antibodies in the sera of immunized mice showed high level of antibodies exceeding that of immunized with commercial live vaccine. The optimal dose of antigen in the vaccine (total protein) was 50  $\mu$ g/ml (5  $\mu$ g/0.1 ml – dose and volume per 1 vaccination of mice). Thus, the laboratory version of cultural inactivated vaccine against YF is as effective (and even superior) as the commercial live vaccine.

**Conclusion.** Laboratory version of cultural inactivated vaccine against YF, which is not inferior in immunogenicity (in animal model) to commercial live vaccine, has been developed.

**Keywords:** strain 17D of yellow fever virus; cultural inactivated vaccine against yellow fever; live vaccine against yellow fever; *Vero* cell culture; purification of yellow fever virus; immunogenicity; BALB/c mice.

**For citation:** Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Rogova Yu.V., Ivanova O.E. Development of inactivated cultural yellow fever vaccine. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 212-217. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-212-217>

**For correspondence:** Alexander P. Ivanov, D. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of molecular biology of viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia. E-mail: [ivanovalexander1@gmail.com](mailto:ivanovalexander1@gmail.com)

#### Information about authors:

Ivanov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Klebleeva T.D., <http://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Rogova Y.V., <http://orcid.org/0000-0002-4655-5330>

Ivanova O.E., <http://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

**Contribution:** Ivanov A.P. – concept, experiments, data analysis, writing; Klebleeva T.D. – experimental part; Rogova Yu.V. – work with animals; Ivanova O.E. – data analysis, writing, editing.

Received 27 July 2020  
Accepted 11 August 2020

## Введение

Жёлтая лихорадка (ЖЛ) – острое геморрагическое трансмиссивное заболевание вирусной этиологии (возбудитель – флавивирус; род *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*). ЖЛ является тропическим зооантропонозом Африки и Южной Америки. Вирус передаётся человеку через укусы комаров определённых видов, преимущественно *Aedes aegypti*, уровень летальности составляет 20–50% и выше. Поскольку большинство случаев ЖЛ остаётся вне регистрации, специалисты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) определили, что истинный уровень заболеваемости в год может достигать 200 тыс. случаев [1].

Единственная на сегодняшний день доступная живая вакцина против ЖЛ на основе куриных эмбрионов, инфицированных аттенуированным штаммом 17D вируса ЖЛ, была разработана в 1936 г. М. Theiler и Н.Н. Smith [2]. Это один из наиболее эффективных вакцинных препаратов за всю историю вакцинологии – протективный иммунный ответ наблюдается у 99% вакцинированных [1]. Вакцину выпускают во Франции (Sanofi Pasteur), в Сенегале (Institut Pasteur de Dakar), Бразилии (Bio-Manguinhos) и в Российской Федерации (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»), она пользуется устойчивым спросом в эндемичных по ЖЛ регионах [3].

За почти 80-летнюю историю применения данной вакцины число вакцинированных превысило 550 млн человек [1]. Однако применение живой вакцины ассоциировано с рядом тяжёлых поствакцинальных

осложнений – висцеротропным синдромом (примерно 0,4 случая на 100 тыс. вакцинированных), нейротропным синдромом и аллергическими реакциями на яичный белок [4, 5]. Учитывая тот факт, что вакцинации подлежат все лица с 9-месячного возраста (в случае эпидемии – с 6-месячного возраста), проживающие в регионах риска [1], а также лица, выезжающие в эти регионы (работа, туризм и т.д.), разработка и внедрение высокоочищенной инактивированной вакцины против ЖЛ призвана обеспечить максимальную безопасность вакцинации против одного из самых распространённых вирусных заболеваний человека. За последние 10 лет исследователями США и Бразилии опубликованы материалы по разработке принципиальных подходов к созданию инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ [1, 6], которые наряду с собственными методическими приёмами использовали авторы данной статьи.

**Цель исследования** – разработка и оценка иммуногенности инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ на уровне лабораторной модели.

## Материал и методы

**Вирус.** Использовали штамм 17D вируса ЖЛ – рабочий посевной вирус, полученный из отделения вакцины жёлтой лихорадки ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

**Клетки.** Клетки *Vero* культивировали в среде DMEM с 5% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, Великобритания).

*Приготовление инактивированной вакцины вируса ЖЛ.* Клетки *Vero* заражали вирусом ЖЛ, штамм 17D (оптимальная множественность заражения – 0,01 БОЕ/кл.). Культивировали в среде Игла MEM с L-глутамином, двойным набором аминокислот и витаминов (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН») в культуральных флаконах с площадью рабочей поверхности 225 см<sup>2</sup>. Кроме того использовали роллерное культивирование: ёмкость флаконов – 1,7 л, объём среды – 300 мл. Титр вируса по методу бляшек [6] составлял ( $\pm$ ) 6,0 Ig БОЕ/мл. Вирусодержащую культуральную жидкость в количестве 4,5 л осветляли центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин при температуре +4 °С, затем с помощью фильтра Sartobran® 300, 0,45 + 0,2 мкм (Sartorius, Германия). Для удаления клеточной ДНК обрабатывали нуклеазой Benzonase® (Novagen®, Дания): 50 ЕД/мл + 2 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 24 ч при температуре 37 °С, перемешивая. Затем инактивировали 0,1%  $\beta$ -пропиолактоном (Serva, Германия) в течение 16 ч при комнатной температуре с периодическим перемешиванием и контролем pH, не допуская закисления в результате образования кислых продуктов гидролиза  $\beta$ -пропиолактона [1]. Остаточную инфекционность контролировали в соответствии с [6].

Инактивированную культуральную жидкость концентрировали в 200 раз методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке с использованием установки Vivaflow 200 (Sartorius, Германия). В полученном концентрате определяли титр антигена вируса ЖЛ с помощью собственной системы иммуноферментного анализа (ИФА) по ранее опубликованной методике [7].

Для очистки инактивированного вируса ЖЛ использовали гель Capto™ Core 700 (GE Healthcare, Швеция), позволяющий проводить гель-фильтрацию с более высоким уровнем разделения за счёт связывания низкомолекулярных соединений с «ядром» геля. На колонку с гелем Capto™ Core 700 (30×1,5 см), уравновешенную 0,01 М фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,2, наносили 5 мл концентрата инактивированного вируса ЖЛ, элюировали тем же буфером со скоростью 5–7 мл/мин, собирая фракции объёмом 5 мл. Измеряли оптическую плотность (ОП) фракций при 280 и 260 нм, а также определяли наличие антигена вируса ЖЛ с помощью ИФА, как указано выше [7]. Фракции с максимальным содержанием антигена вируса ЖЛ по данным ИФА представляли собой лабораторный вариант инактивированной вакцины против ЖЛ. Их стерилизовали фильтрацией (фильтры диаметром 0,45 мкм), определяли концентрацию белка по методу Бредфорда [8], хранили при +4 °С.

*Оценка иммуногенности лабораторных серий инактивированной вакцины против вируса ЖЛ.* Иммуногенность оценивали на модели мышей BALB/c (самки 4–6-недельного возраста) согласно T. Monath и соавт. [1]. Мышей (7 животных в группе) иммунизировали различными дозами вакцины (по концентрации общего белка – 12,5, 25 и 50 мкг/мл) без адьюванта внутримышечно (бедренные мышцы, по 0,05 мл в каждую конечность, всего 0,1 мл на иммунизацию) 3 раза с интервалом 2 нед. Через 2 нед после 3-й иммунизации

брали кровь из яремной вены. В качестве положительного контроля использовали коммерческую живую вакцину против ЖЛ производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в дозе, предписанной для вакцинации людей (3,2 Ig БОЕ / 0,5 мл) по аналогичной схеме (0,1 мл на одну иммунизацию). В качестве негативного контроля животным вводили ФСБ.

*Определение специфических антител (против вируса ЖЛ) класса G (IgG) в сыворотках крови иммунизированных мышей.* Использовали собственный вариант ИФА: препарат инактивированной вакцины против вируса ЖЛ сорбировали в лунки иммунопанели (Costar, кат. № 9018, США) в концентрации 10 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP) по 0,1 мл/лунка, инкубировали 18 ч при +4 °С. После 3-кратной отмывки 0,05% Tween-20 ФСБ (Т-ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% сывороткой крови телёнка (Gibco, Великобритания) по 0,2 мл/лунка в течение 1 ч при +4 °С и 3-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) разведения анализируемых сывороток мышей, начиная с 1 : 100 в Т-ФСБ.

Положительный контроль: референс-сыворотка крови зелёной мартышки, полученная из ВОЗ (WHO Reference Reagent, The 1<sup>st</sup> International Reference Preparation for Anti-Yellow Fever, Serum, Monkey, NIBSC code: YF, Великобритания).

Отрицательный контроль: сыворотки крови невакцинированных мышей линии BALB/c. Инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) соответствующий пероксидазный конъюгат – против IgG мыши (Sigma, кат. № A4416-1 ml, США) и против IgG обезьяны для референс-сыворотки (Sigma, кат. № A2054-1 ml, США) в оптимальном разведении (в Т-ФСБ), подобранном шахматным титрованием. Инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100 ml, США), инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 2М раствором серной кислоты (0,05 мл/лунка). ОП измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiscan FC ELISA reader, Thermo LabSystems, Финляндия). Результат считали положительным при значении P/N (ОП опыта / ОП контроля в максимальных разведениях сыворотки крови)  $\geq$  2,1 [9].

*Определение специфических вирус-нейтрализующих антител (против вируса ЖЛ) в сыворотках крови иммунизированных мышей* проводили методом редукции числа бляшек, согласно S. Mercier-Delague и соавт. [10]. Разрешающая доза вируса – 100 БОЕ / 0,1 мл. Параллельно тестировали анти-ВЖЛ референс-сыворотку обезьяны и сыворотки крови невакцинированных мышей линии BALB/c.

*Статистическую обработку результатов* проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

## Результаты

Всего изготовлено и охарактеризовано 8 лабораторных серий вакцины. На рисунке представлен

результат очистки ЖЛ – типичный профиль элюции инактивированного концентрата вируса ЖЛ на колонке с Capto™ Core 700. Из данных рисунка следует, что только фракции 3 и 4 первого пика содержат специфический антиген вируса ЖЛ по данным ИФА (450 нм). Фракции второго (7–13) и третьего пика (18) свободны от специфического антигена. Таким образом, объединённые фракции 3 и 4 представляют собой препарат инактивированной вакцины от ЖЛ. Концентрация общего белка в препаратах вакцины от ЖЛ после очистки на колонке с Capto™ Core 700 составляла в среднем 200 мкг/мл.

В табл. 1 представлены результаты (средние значения) оценки иммуногенности одной из экспериментальных серий инактивированной вакцины от ЖЛ (№ 4) на мышах BALB/c в зависимости от вводимой дозы – количества общего белка.

В качестве положительного контроля использовали референс-сыворотку ВОЗ (YF): титр специфического IgG 1 : 25 600, титр в реакции нейтрализации – 1 : 160. Средний титр вируснейтрализующих антител против коммерческой живой вакцины от ЖЛ составил 1 : 20. Сыворотки мышей линии BALB/c, которым вводили ФСБ в качестве негативного контроля, отрицательны: титры IgG < 1 : 100; титры в реакции нейтрализации < 1 : 10).

Как следует из данных табл. 1, максимальные титры IgG и вируснейтрализующих антител соответствуют дозе общего белка 5,0 мкг / 0,1 мл, т. е. 50,0 мкг/мл или 25 мкг / 0,5 мл (принятый вводимый объём коммерческой живой вакцины от ЖЛ). Протективный вируснейтрализующий титр против вируса ЖЛ ≥ 1 : 10 [10].

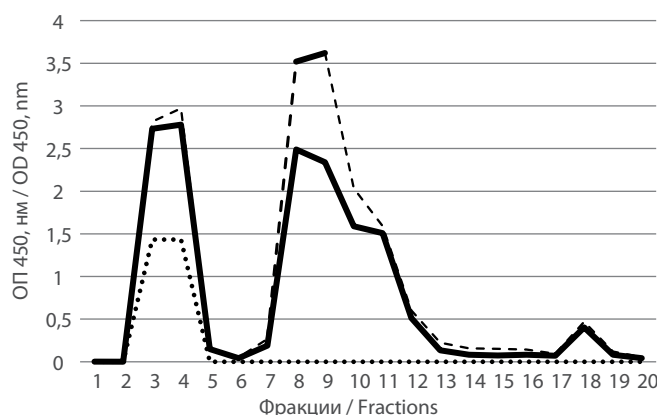
В табл. 2 представлены результаты параллельного титрования (определение специфического IgG в ИФА) сывороток крови мышей линии BALB/c, иммунизированных лабораторной серией № 5 инактивированной вакцины от ЖЛ (5,0 мкг / 0,1 мл) и коммерческой живой вакциной против ЖЛ в предписанной для иммунизации людей дозе (3,2 lg БОЕ / 0,5 мл), но в объёме 0,1 мл на одну иммунизацию (или по общему белку примерно 50 мкг / 0,1 мл).

Из данных табл. 2 следует, что средний уровень титров специфического IgG в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации лабораторной серией инактивированной вакцины против ЖЛ более

чем в 2 раза выше титров IgG после иммунизации коммерческой живой вакциной против ЖЛ.

### Обсуждение

Первые попытки создания инактивированной вакцины против ЖЛ были предприняты в 1928 г. (химически инактивированные суспензии селезёнки или печени обезьян, инфицированных диким типом вируса ЖЛ) и в 1935 г. (инактивированные нагреванием, ультрафиолетом или формалином суспензии мозга мышей, куриных эмбрионов, а также сыворотки мышей, инфицированных вирусом ЖЛ), однако они не увенчались успехом вследствие остаточной инфекционности либо низкой иммуногенности вакцинных препаратов [1]. С появлением живой вакцины на основе штамма 17D, которая широко используется до настоящего времени, интерес к разработке инактивированной вакцины резко снизился [1]. Достоинства и недостатки живой вакцины против ЖЛ хорошо изучены, однако новые исследования по разработке инактивированной вакцины против этого заболевания, причём на основе



Профиль элюции инактивированного концентрата вируса жёлтой лихорадки на колонке с гелем Capto™ Core 700.

Непрерывная линия – профиль при 280 нм; пунктирная линия – профиль при 260 нм; точечная линия – профиль при 450 нм (антиген вируса жёлтой лихорадки по данным ИФА).

Elution profile of inactivated yellow fever virus concentrate on Capto™ Core 700 column.

Continuous line – profile at 280 nm; dashed line – profile at 260 nm; dotted line – profile at 450 nm (yellow fever virus antigen according to ELISA).

**Таблица 1.** Средние значения специфических титров IgG (ИФА) и вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей линии BALB/c в зависимости от дозы вакцины

**Table 1.** The average values of specific titers of IgG (ELISA) and virus-neutralizing antibodies in sera of BALB/c mice depending on the vaccine dose

Доза вакцины по белку на 0,1 мл Protein dose of the vaccine per 0.1 ml	Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	
	ИФА, специфический IgG ELISA, specific IgG	реакция нейтрализации The neutralization test
5,0 мкг/0,1 мл 5.0 µg/0.1 ml	1 : 11 937	1 : 65,34
2,5 мкг/0,1 мл 2.5 µg/0.1 ml	1 : 5748	1 : 19,97
1,25 мкг/0,1 мл 1.25 µg/0.1 ml	1 : 2990	1 : 9,99



**Таблица 2.** Определение уровней специфических IgG (ИФА) в сыворотках крови мышей линии BALB/c, иммунизированных лабораторной серией инактивированной вакцины и коммерческой живой вакциной против жёлтой лихорадки (ЖЛ)

**Table 2.** Determination of specific IgG (ELISA) levels in sera of BALB/c mice immunized with laboratory series of inactivated vaccine and commercial live vaccine against yellow fever (YF)

Образец, № Sample #	Титр IgG: инактивированная вакцина против ЖЛ IgG titer: inactivated vaccine against YF	Образец, № Sample #	Титр IgG: коммерческая живая вакцина против ЖЛ IgG titer: commercial live vaccine against YF
1	1 : 25 600	1	1 : 6400
2	1 : 25 600	2	1 : 12 800
3	1 : 25 600	3	1 : 12 800
4	1 : 12 800	4	1 : 12 800
5	1 : 25 600	5	1 : 6400
6	1 : 25 600	6	1 : 3200
7	1 : 12 800	7	1 : 12 800
Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	1 : 21 619	Средняя геометрическая титра Geometric mean titer	1 : 8192

культур клеток, начались относительно недавно, примерно 10 лет назад [1, 5, 6]. Основная цель данных разработок – создание максимально безопасного вакцинного препарата, свободного от побочных нежелательных явлений, которые могут превышать пользу от самой вакцинации, особенно для детей в возрасте до 1 года и людей старше 60 лет [11]. Тенденция к отказу от живых вакцин в пользу инактивированных характерна для современной вакцинопрофилактики. В качестве примера можно привести разработку и внедрение инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) взамен пероральной живой полиовирусной вакцины на основе этих же штаммов, которая с начала 1960-х годов доказала свою эффективность практически во всём мире, но продемонстрировала крайне нежелательные побочные эффекты и создала ряд серьёзных проблем масштабного характера (случаи вакциноассоциированного полиомиелита, формирование нейровирулентных вакцинородственных штаммов) [12].

Представленные в данном сообщении результаты по разработке инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ демонстрируют эффективность данного препарата, по крайней мере на уровне оценки иммуногенности с использованием одной модели лабораторных животных – мышей BALB/c. Основываясь на работе Т. Monath и соавт. [1], мы использовали и собственные методические подходы: концентрирование и очистку вируса ЖЛ, определение уровня специфического IgG в сыворотках крови иммунизированных животных (мышей BALB/c) и т.д. Высокая иммуногенность, присущая штамму 17D, которая обеспечила эффективность применения живой вакцины против ЖЛ в эндемичных регионах мира, позволила создать вакцинный препарат на лабораторном уровне с удовлетворительной иммуногенностью. Сравнительный анализ иммуногенности показал, что лабораторный вариант инактивированной вакцины против ЖЛ превосходит коммерческую живую вакцину против ЖЛ как по уровню индуцированных специфических антител класса G (IgG по данным ИФА), так и по уровню вируснейтрализующих антител. Это связано с высокой

степенью очистки полученного вакцинного препарата по сравнению с коммерческой живой вакциной. Важно, что доза инактивированной вакцины по общему белку составляла не более 50 мкг/мл (или 5 мкг / 0,1 мл на одну иммунизацию), что в 10 раз меньше дозы по общему белку для живой коммерческой вакцины (примерно 50 мкг / 0,1 мл на одну иммунизацию) (см. табл. 1). Разумеется, одной лабораторной модели (мыши) недостаточно для завершения доклинических испытаний вакцины. Необходимы исследования иммуногенности с использованием других лабораторных животных, включая приматов [1, 6].

Важно отметить, что культуральная высокоочищенная инактивированная вакцина против ЖЛ даже на лабораторном уровне существенно дороже живой вакцины, поскольку для её производства используются затратные и тонкие технологические подходы – культивирование вируса в культуре клеток, осветление и концентрирование вирусосодержащей культуральной жидкости, инаktivация вируса, хроматографическая очистка и т.д. Технология производства живой вакцины против ЖЛ значительно проще, а следовательно существенно дешевле. Однако оправданная тенденция к замене живой вакцины против ЖЛ инактивированной вакциной требует поиска компромисса между стоимостью вакцинного препарата и его безопасностью (по аналогии с живой полиовирусной вакциной на основе штаммов Сэбина и инактивированной полиовирусной вакциной).

### Заключение

Таким образом, представленные результаты по разработке лабораторного варианта инактивированной культуральной вакцины против ЖЛ и оценка её иммуногенности с использованием типичной лабораторной модели (мыши BALB/c) продемонстрировали эффективность полученного препарата.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Monath T.P., Lee C.K., Julander J.G., Brown A., Beasley D.W., Watts D.M., et al. Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. *Vaccine*. 2010; 28(22): 3827-40.



- DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.023>
2. Theiler M., Smith H.H. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65(6): 787-800.  
DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>
  3. Yellow fever vaccine – current supply outlook. UNICEF Supply Division; 2016. Available at: <https://www.unicef.org/supply/sites/unicef.org/supply/files/2019-06/yellow-fever-vaccine-supply-outlook.pdf>
  4. Whittembury A., Ramirez G., Hernandez H., Roper A.M., Waterman S., Ticona M., et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine.* 2009; 27(43): 5974-81.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.082>
  5. Hayes N.B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine.* 2010; 28(51): 8073-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.015>
  6. Pereira R.C., Silva A.N., Souza M.C., Silva M.V., Neves P.P., Silva A.A., et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell culture. *Vaccine.* 2015; 33(35): 4261-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.077>
  7. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 21-6.  
DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>
  8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.  
DOI: <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
  9. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
  10. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF, et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177882.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
  11. Lindsey N.P., Schroeder B.A., Miller E.R., Braun M.M., Hinkley A.F., Marano N., et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(48): 6077-82.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.009>
  12. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanez T.A., Pallansch M.A., Kew O.M., Prevots D.R., et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004; 292(14): 1696-701.  
DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.292.14.1696>
- REFERENCES**
1. Monath T.P., Lee C.K., Julander J.G., Brown A., Beasley D.W., Watts D.M., et al. Inactivated yellow fever 17D vaccine: Development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity. *Vaccine.* 2010; 28(22): 3827-40.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.023>
  2. Theiler M., Smith H.H. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65(6): 787-800.  
DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.65.6.787>
  3. Yellow fever vaccine – current supply outlook. UNICEF Supply Division; 2016. Available at: <https://www.unicef.org/supply/sites/unicef.org/supply/files/2019-06/yellow-fever-vaccine-supply-outlook.pdf>
  4. Whittembury A., Ramirez G., Hernandez H., Roper A.M., Waterman S., Ticona M., et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine.* 2009; 27(43): 5974-81.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.082>
  5. Hayes N.B. Is it time for a new yellow fever vaccine? *Vaccine.* 2010; 28(51): 8073-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.015>
  6. Pereira R.C., Silva A.N., Souza M.C., Silva M.V., Neves P.P., Silva A.A., et al. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell culture. *Vaccine.* 2015; 33(35): 4261-8.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.077>
  7. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E. Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnosis of viral infections. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 21-6.  
DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26> (in Russian)
  8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.  
DOI: <http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
  9. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4.  
DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
  10. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF, et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177882.  
DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
  11. Lindsey N.P., Schroeder B.A., Miller E.R., Braun M.M., Hinkley A.F., Marano N., et al. Adverse event reports following yellow fever vaccination. *Vaccine.* 2008; 26(48): 6077-82.  
DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.009>
  12. Alexander L.N., Seward J.F., Santibanez T.A., Pallansch M.A., Kew O.M., Prevots D.R., et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004; 292(14): 1696-701.  
DOI: <http://doi.org/10.1001/jama.292.14.1696>



## Серопревалентность вируса гепатита E (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) среди беременных женщин в эндемичном регионе Кыргызстана

Алаторцева Г.И.<sup>1</sup>, Бакирова З.<sup>2</sup>, Лухверчик Л.Н.<sup>1</sup>, Нурматов З.Ш.<sup>3</sup>, Нурматов А.З.<sup>3</sup>, Ташов К.Э.<sup>4</sup>, Нестеренко Л.Н.<sup>1</sup>, Малинникова Е.Ю.<sup>1,5</sup>, Касымов О.Т.<sup>3</sup>, Михайлов М.И.<sup>1,5</sup>, Зверев В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Ошский центр профилактики заболеваний и госсанэпиднадзора, 714000, Ош, Кыргызстан;

<sup>3</sup> НПО «Профилактическая медицина» Минздрава Кыргызской Республики, 720005, Бишкек, Кыргызстан;

<sup>4</sup> Ошская межобластная объединенная клиническая больница, 714000, Ош, Кыргызстан;

<sup>5</sup> ФГБНУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

**Введение.** Гепатит E (ГЕ) является важной проблемой общественного здравоохранения во всём мире, и особенно опасен для беременных, среди которых летальность достигает 25%. Распространение серомаркеров ГЕ среди беременных в эндемичных регионах стран Центральной Азии мало изучено.

**Цель** исследования – изучение серопревалентности вируса гепатита E (ВГЕ) среди беременных в регионе Кыргызстана с повышенной заболеваемостью ГЕ.

**Материал и методы.** Сыворотки крови беременных, полученные из лечебно-профилактических учреждений Бишкека, Оша и Ошской области с сентября 2016 г. по октябрь 2019 г., и здоровых небеременных женщин группы сравнения тестировали с помощью тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия).

**Результаты.** IgG-антитела к ВГЕ выявлены у 87 (5,9%) из 1472 обследованных беременных, IgM-антитела – у 64 (4,8%) из 1378; 5 (0,34%) проб были одновременно позитивны по IgG- и IgM-антителам. Антитела к ВГЕ у женщин трёх возрастных категорий от 17 до 36 лет исследуемой группы и группы сравнения выявлялись со схожими значениями частоты. Изучение сезонной динамики серопревалентности ВГЕ у беременных с февраля по сентябрь 2019 г. показало тенденцию к повышению коэффициента позитивности специфических IgM-антител к началу осени. Антитела к ВГЕ чаще выявлялись у жительниц Ошской области.

**Заключение.** Показан высокий риск инфицирования ВГЕ беременных в обследованном регионе Кыргызстана.

**Ключевые слова:** гепатит E; вирус гепатита E; сероэпидемиология; серопревалентность; антитела; иммуноферментный анализ; беременные.

**Для цитирования:** Алаторцева Г.И., Бакирова З., Лухверчик Л.Н., Нурматов З.Ш., Нурматов А., Ташов К.Э., Нестеренко Л.Н., Малинникова Е.Ю., Касымов О.Т., Михайлов М.И., Зверев В.В. Серопревалентность вируса гепатита E (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) среди беременных женщин в эндемичном регионе Кыргызстана. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 218-227.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-218-227>

**Для корреспонденции:** Алаторцева Галина Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва.

E-mail: [alatorseva@gmail.com](mailto:alatorseva@gmail.com)

**Участие авторов:** Алаторцева Г.И. – концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала, статистический анализ; Бакирова З., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Ташов К.Э. – сбор и обработка материала; Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Касымов О.Т., Зверев В.В. – концепция и дизайн исследования.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1481 от 15.08.2019 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

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

Поступила 24.07.2020

Принята в печать 21.08.2020

## Seroprevalence of hepatitis E virus (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) among pregnant women in the highly endemic region of Kyrgyzstan

Galina I. Alatorseva<sup>1</sup>, Zarina Bakirova<sup>2</sup>, Lyudmila N. Likhverchik<sup>1</sup>, Asilbek Z. Nurmatov<sup>3</sup>, Zuridin S. Nurmatov<sup>3</sup>, Kursan E. Tashov<sup>4</sup>, Lyubov N. Nesterenko<sup>1</sup>, Elena Yu. Malinnikova<sup>1,5</sup>, Omor T. Kasymov<sup>3</sup>, Mikhail I. Mikhailov<sup>1,5</sup>, Vitaliy V. Zverev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

<sup>2</sup> Osh Center for Disease Prevention and State Sanitary and Epidemiological Surveillance, Osh, 714000, Kyrgyz Republic;

<sup>3</sup> Scientific Production Association «Preventive Medicine» Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic;

<sup>4</sup> Osh Interregional Joint Clinical Hospital, Osh, 714000, Kyrgyz Republic;

<sup>5</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, 125993, Russia

**Introduction.** Hepatitis E (HE) is an important public health problem worldwide and is especially significant for pregnant women, among whom the associated mortality rate reaches 25%. The distribution of HE serological markers in this cohort in the endemic regions of Central Asia is poorly understood. The aim of the study was to assess the seroprevalence of HEV among pregnant women in the region of Kyrgyzstan where an increased incidence of HE is reported.

**Material and methods.** Blood serum of pregnant women, obtained from medical institutions in Bishkek, city of Osh and Osh region in the period from September 2016 to October 2019, and the control group of clinically healthy women were tested using the test systems “DS-IFA-ANTI-HEV-G” and “DS-IFA-ANTI-HEV-M” (NPO “Diagnostic Systems”, Russia).

**Results.** IgG antibodies to HEV were detected in 87 (5.9%) of 1472 examined pregnant women, IgM antibodies – in 64 (4.8%) of 1378, while 5 (0.34%) samples were simultaneously positive for IgG and IgM antibodies. The rates of detection of antibodies to HEV in women of three age categories from 17 to 36 years old in the studied and control groups were similar. The analysis of the seasonal dynamics of HEV seroprevalence in pregnant women in the period from February to September 2019 showed a tendency towards an increase in the values of the positivity coefficient of specific IgM antibodies by the beginning of the autumn. Antibodies to HEV were detected with highest frequency in women from Osh region.

**Conclusions.** A high risk of HEV infection for pregnant women in the surveyed region had been shown.

**Keywords:** hepatitis E; hepatitis E virus; seroepidemiology, seroprevalence, antibodies, pregnant.

**For citation:** Alatorseva G.I., Bakirova Z., Likhverchik L.N., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Tashov K.E., Nesterenko L.N., Malinnikova E.Yu., Kasymov O.T., Mikhailov M.I., Zverev V.V. Seroprevalence of hepatitis E virus (*Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) among pregnant women in the highly endemic region of Kyrgyzstan. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 218-227. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-218-227>

**For correspondence:** Galina I. Alatorseva, PhD (Biol.), Lead researcher, Head of the laboratory for Cloning of Viral Genomes I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.

E-mail: [alatorseva@gmail.com](mailto:alatorseva@gmail.com)

### Information about authors:

Alatorseva G.I., <http://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Bakirova Z., <https://orcid.org/0000-0002-5626-4940>

Likhverchik L.N., <http://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Nurmatov Z.S., <https://orcid.org/0000-0003-3481-227X>

Nurmatov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-0717-4172>

Tashov K.E., <https://orcid.org/0000-0002-3059-3834>

Nesterenko L.N., <http://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Malinnikova E.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5501-5707>

Kasymov O.T., <https://orcid.org/0000-0002-3304-7409>

Zverev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

**Contribution:** Alatorseva G.I. – research concept and design, literature data collection, material collection and processing, statistic analysis, text writing; Bakirova Z., Likhverchik L.N., Nesterenko L.N., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Tashov K.E. – material collection and processing; Mikhailov M.I., Malinnikova E.Yu., Kasymov O.T., Zverev V.V. – concept and research design.

**Acknowledgments.** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2019-1481 from 15.08.2019, unique identifier of the project RFMEFI61319X0091).

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

Received 24 July 2020

Accepted 21 August 2020

## Введение

Гепатит Е (ГЕ) является значимой проблемой общественного здравоохранения как в развивающихся, так и в промышленно развитых странах. Ежегодно в мире регистрируется до 20 млн случаев заболевания. В 2015 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сообщила о 44 тыс. летальных исходов ГЕ в мире, что составило 3,3% смертности от вирусных гепатитов [1]. В среднем летальность при ГЕ варьирует от 0,2 до 4% [2], но этот показатель может быть значительно выше в группах риска, таких как дети младшего возраста [3, 4], пациенты с ранее диагностированными печёночными патологиями [5] и беременные [6], смертность которых при ГЕ на третьем триместре беременности достигает 25% [2].

Инкубационный период ГЕ варьирует от 2 до 10 нед, симптомы включают анорексию, лихорадку, желтуху, миалгию, абдоминальные боли, боли в спине, сыпь, артралгию, тошноту, рвоту [1, 7]. По некоторым данным, на долю ГЕ приходится от 30 до 70% всех случаев острого спорадического гепатита [8] и он является одной из основных причин острой печёночной недостаточности [9]. Передача возбудителя заболевания – вируса гепатита Е (ВГЕ) осуществляется в основном фекально-оральным путём через употребление загрязнённой питьевой воды и пищи, доказана также зоонозная передача [10, 11]. Кроме того, были зафиксированы вертикальная [6] и парентеральная передача вируса [12, 13]. Серологическим маркером острого или недавно перенесённого ГЕ служат IgM-антитела к ВГЕ, они появляются в крови заболевших в течение первых 2 нед желтушного периода и могут обнаруживаться в течение 5 мес после начала заболевания [14]. Специфические IgG-антитела, которые в острой фазе ГЕ появляются одновременно или вскоре после IgM-антител и могут длительно персистировать в крови переболевших [15], в основном рассматриваются как индикатор перенесённой инфекции и обычно служат маркером серопревалентности ВГЕ. Важный диагностический признак острого ГЕ – обнаружение вирусной РНК в биологических и клинических образцах (в сыворотке крови, фекалиях, биоптатах печени), однако молекулярно-биологические методы диагностики имеют ограничения в связи с коротким периодом вирусемии при ГЕ. Европейская ассоциация по изучению печени (EASL) рекомендует следующие критерии для клинической диагностики острого ГЕ: одновременное присутствие в пробах РНК ВГЕ и специфических IgM- и/или IgG-антител, а также повышение титров IgG-антител на фоне присутствия IgM-антител, выявление антигена ВГЕ. В качестве критериев хронического ГЕ рассматривают обнаружение РНК ВГЕ и антигена ВГЕ в течение более 3 мес. О перенесённой инфекции судят по присутствию IgG в образцах [16].

Подобно другим странам Центральной Азии – бывшим республикам СССР, Кыргызстан относится к гиперэндемичным по ГЕ регионам. Истинные масштабы распространения этой инфекции в стране ма-

ло изучены. Данные дозорного эпидемиологического надзора за острым вирусным гепатитом (ОВГ), организованного на базе Республиканского научно-практического центра по контролю вирусных гепатитов при Научно-производственном объединении «Профилактическая медицина» (Бишкек, Кыргызстан), свидетельствуют об увеличении доли случаев вирусных гепатитов неизвестной этиологии с 12,9% в 2012 г. до 17,8% в 2014 г. Сероэпидемиологические исследования, проведённые в разные годы, показали, что на ГЕ приходится от 0,9% [17] до 32% [18] случаев ОВГ в Кыргызской Республике. Распределение частоты обнаружения антител к ВГЕ по регионам республики неоднородно: высокий уровень серопревалентности среди пациентов с диагнозом ОВГ и среди условно здорового населения выявлен в Бишкеке и регионах, граничащих с Узбекистаном и Таджикистаном – Баткенской, Джалал-Абадской, Ошской областях, низкий уровень – в северных регионах Кыргызстана [19–21]. Данные о распространении серомаркеров инфицирования ВГЕ среди беременных в Кыргызстане, как и на других гиперэндемичных территориях стран Центральной Азии, весьма ограничены.

**Цель исследования** – изучение серопревалентности ВГЕ среди беременных в регионах Кыргызстана с ранее установленным высоким уровнем распространения маркеров инфицирования ВГЕ.

## Материал и методы

Проанализировано 1472 образца сывороток крови беременных в возрасте от 18 до 57 лет, находившихся под наблюдением в лечебно-профилактических учреждениях Бишкека, Оша и Ошской области. Коллекция образцов от жительниц Оша и Ошской области включала пробы, собранные с сентября 2015 г. по февраль 2016 г. ( $n=37$ ), с января по июль 2017 г. ( $n=78$ ), с июля по август 2018 г. ( $n=168$ ), с декабря 2018 г. по октябрь 2019 г. ( $n=1160$ ). Кроме того, исследовано 29 образцов крови беременных из Бишкека, собранных в январе 2016 г., и 397 образцов, полученных в 2016–2017 гг. от клинически здоровых женщин группы сравнения, проживающих в Оше ( $n=58$ ), Бишкеке ( $n=112$ ), в Баткенской ( $n=84$ ), Чуйской ( $n=67$ ) и Ошкой ( $n=76$ ) областях. Антитела IgG и IgM к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (РУ № ФСР 2010/07840, РУ № ФСР 2010/07686, ООО НПО «Диагностические системы», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый образец исследовали в повторях. Для каждого положительного образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$КП_{обр.} = \frac{ОП_{обр.}}{ОП_{крит.}}$$

где ОП<sub>обр.</sub> – оптическая плотность образца, ОП<sub>крит.</sub> – пороговое значение оптической плотности, рассчитанное в соответствии с инструкциями производителя. Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel (2013).

## Результаты

Количество сывороток крови беременных, протестированных на наличие IgG- и IgM-антител к ВГЕ, по возрастным группам представлено в **табл. 1**. Проведённое исследование позволило получить данные о распространении серологических маркеров инфицирования ВГЕ у беременных от 17 до 57 лет, проживающих в Оше и Ошской области – регионах Кыргызской Республики с высокими уровнями серопревалентности ВГЕ и заболеваемости ГЕ [19–21]. Размеры выборки образцов, исследованных на IgG- и IgM-антитела, различались незначительно ( $p \leq 0,05$ ): на специфические IgG-антитела проанализировано 1472 образца сывороток, из которых на IgM-антитела исследовано 1328 проб. Наиболее многочисленную группу среди обследованных (1004 из 1472 проб) составляли женщины от 17 до 36 лет из Ошской области.

Антитела к ВГЕ были выявлены у 146 беременных: в 87 (5,97%) образцах обнаружены IgG-антитела, в 64 (4,82%) – IgM, в 5 (0,34%) пробах одновременно присутствовали IgG- и IgM-антитела (**табл. 2**).

**Таблица 1.** Количество исследованных образцов сывороток крови в зависимости от возраста беременных

**Table 1.** The number of examined blood serum samples from pregnant women by age group

Возраст, годы Age, years	Количество исследованных проб, абс. (%)* Number of tested samples, abs. (%)*	
	IgG-антитела IgG antibodies	IgM-антитела IgM antibodies
17–23	589 (40,0)	547 (41,2)
24–30	555 (37,7)	505 (38,0)
31–36	253 (17,2)	217 (16,3)
37–43	67 (4,6)	54 (4,1)
>44	8 (0,5)	5 (0,4)
Всего... Total...	1472 (100)	1328 (90,2)

**Примечание.** \* Здесь и в табл. 2–5: абс. – количество образцов; % – доля в исследуемой выборке.

**Note.** \* Here and in tables 2–5: abs. – number of samples; % – percentage of the share in the sample under study.

В образцах сывороток крови беременных из Ошской области антитела выявлялись чаще, чем у проживающих в Оше: IgG-антитела – 6,22% против 4,84% соответственно, IgM-антитела – 5,64% против 3,17%. На ограниченной выборке образцов от беременных из Бишкека ( $n=29$ ) показана высокая выявляемость специфических IgG-антител (17,24%). Сравнение выборки образцов крови беременных из Бишкека с выборками из Оша и Ошской области не вполне корректно в связи с недостаточностью её объема. Однако по результатам проведённых нами ранее исследований Бишкек относится к высокоэндемичным регионам [21], поэтому мы включили данные по серопревалентности ВГЕ среди беременных Бишкека в общую статистику. Группа сравнения включала небеременных клинически здоровых женщин в возрасте от 20 до 57 лет, проживающих в регионах Кыргызской Республики с ранее установленной повышенной выявляемостью серомаркеров инфицирования ВГЕ у населения. В 52 (13,1%) из 397 образцов группы сравнения выявлены IgG-антитела, в 7 (4,2%) из 166 проб – IgM-антитела к ВГЕ, в 1 (0,6%) образце показано одновременное присутствие специфических IgG и IgM.

Результаты исследования зависимости выявления IgG- и IgM-антител к ВГЕ от возраста обследованных беременных в сопоставлении с группой сравнения приведены в **табл. 3** и на **рис. 1**.

Следует отметить статистически достоверное повышение уровня выявляемости IgG-антител с увеличением возраста с 4,24% в группе от 17 до 23 лет до 10,67 и 22,38% у беременных в возрасте от 31 года до 36 лет и от 37 до 43 лет соответственно. В группе сравнения, так же, как и у обследованных беременных женщин, IgG-антитела чаще обнаруживались у лиц старше 30 лет, и, напротив, IgM-антитела выявлялись чаще в возрастных группах от 17 до 23 и от 24 до 30 лет. IgG- и IgM-антитела к ВГЕ у женщин от 17 до 36 лет в обеих группах выявлялись с близкими значениями частоты. Провести корректное сравнение результатов анализа образцов крови от женщин обеих групп старше 36 лет затруднительно в связи с недостаточностью и несопоставимостью размеров выборок этих образцов, однако

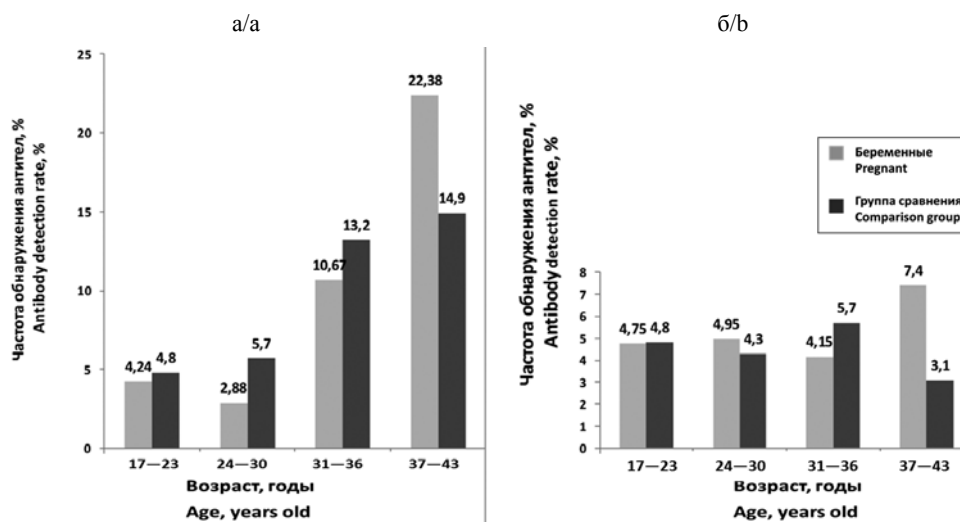
**Таблица 2.** Частота выявления IgG- и IgM-антител у беременных женщин, проживающих в обследуемых регионах

**Table 2.** Prevalence of IgG and IgM antibodies to HEV in pregnant women living in the surveyed regions

Регион проживания Region of residence	IgG-антитела IgG antibodies		IgM-антитела IgM antibodies	
	количество исследованных образцов, абс. Number of tested samples	количество позитивных образцов, абс. (%) Number of positive samples abs. (%)	количество исследованных образцов, абс. Number of tested samples	количество позитивных образцов, абс. (%) Number of positive samples abs. (%)
Ош Osh city	495	24 (4,84)	442	14 (3,17)
Ошская область Osh region	948	58 (6,22)	886	50 (5,64)
Бишкек Bishkek city	29	5 (17,24)	-	-
Всего... Total...	1472	87 (5,97)	1328	64 (4,82)

**Таблица 3.** Частота определения IgG- и IgM-антител к вирусу гепатита E у беременных и женщин группы сравнения разного возраста  
**Table 3.** Prevalence of IgG and IgM antibodies to HEV in pregnant women and women in the comparison group of different age categories

Возраст, годы Age, years	Беременные Pregnant women		Группа сравнения Comparison group	
	количество обследованных образцов, абс. (%) Nunbe of examined probs, abs. (%)	количество положительных образцов, абс. (%) Number of positive samples, abs. (%)	количество обследованных образцов, абс. (%) Nunbe of examined probs, abs. (%)	количество положительных образцов, абс. (%) Number of positive samples, abs. (%)
IgG-антитела к вирусу гепатита E IgG antibodies to HEV				
17–23	589	25 (4,24)	41	2 (4,8)
24–30	555	16 (2,88)	35	2 (5,7)
31–36	253	27 (10,67)	76	10 (13,2)
37–43	67	15 (22,38)	74	11 (14,9)
>44	8	4 (50)	171	27 (15,8)
Всего... Total...	1472	87 (5,91)	397	52 (13,1)
IgM-антитела к вирусу гепатита E IgM antibodies to HEV				
17–23	547	26 (4,75)	21	1 (4,8)
24–30	505	25 (4,95)	23	1 (4,3)
31–36	217	9 (4,15)	35	2 (5,7)
37–43	54	4 (7,4)	32	1 (3,1)
>44	5	–	55	2 (3,6)
Всего... Total...	1328	64 (4,82)	166	7 (4,2)



**Рис. 1.** Частота обнаружения IgG- (а) и IgM-антител (б) к ВГЕ в образцах сывороток крови обследованных беременных и женщин группы сравнения разного возраста.

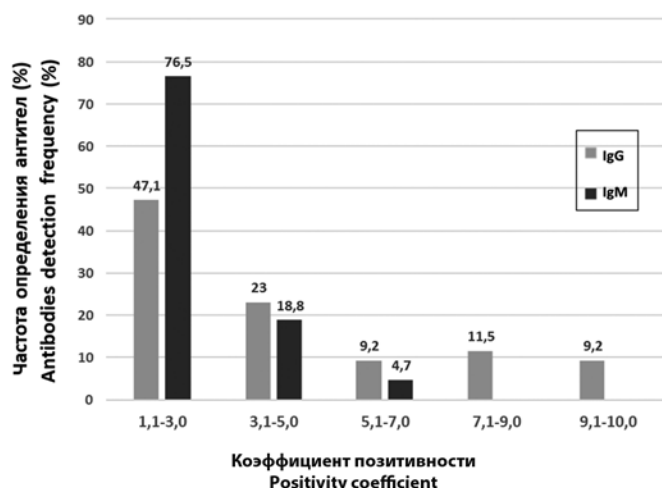
**Fig. 1.** The detection frequency of IgG- (A) and IgM- (B) antibodies to HEV in blood serum samples of the age categories of the examined pregnant women and women of the comparison group.

можно заметить, что у женщин данной возрастной категории IgG-, и IgM-антитела обнаруживались с максимальной частотой.

Результаты анализа значений КП положительных по IgG- и IgM-антителам к ВГЕ сывороток крови беременных представлены в табл. 4 и на рис. 2, 3. Показано преобладание образцов с КП < 3 (47,1% IgG-положительных проб и 76,5% IgM-положительных, см. рис. 2).

Пробы с низкими и средними значениями КП по IgG-антителам чаще выявлялись у беременных и группы сравнения в возрасте от 17 до 30 лет, со средними и высокими значениями – у женщин более старшего возраста. Зависимости величины КП IgM-положительных образцов от возраста беременных не обнаружено (см. табл. 4 и рис. 3).

Изучена сезонная динамика серопревалентности ВГЕ у проживающих в Оше и Ошской области



**Рис. 2.** Коэффициенты позитивности положительных по антителам IgG и IgM к вирусу гепатита E образцов сыворотки крови беременных.

**Fig. 2.** Positivity coefficients of positive on antibodies IgG and IgM to HEV blood serum samples of pregnant women.

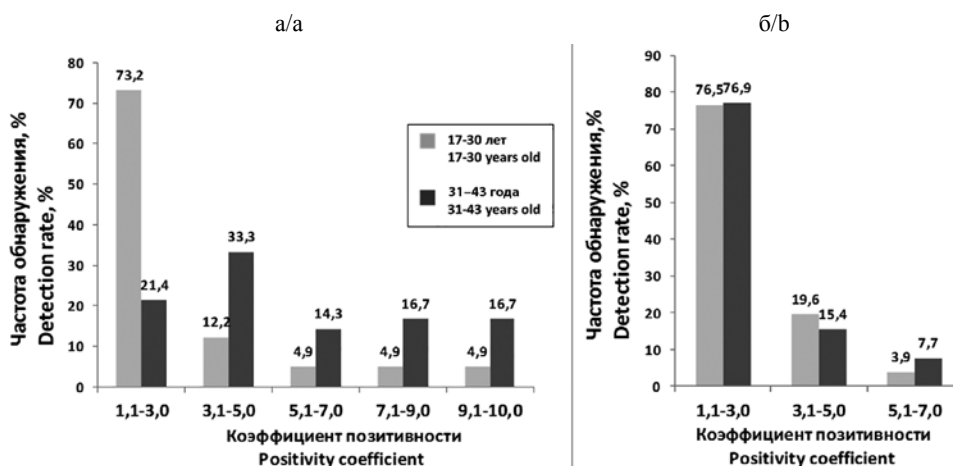
беременных с февраля по сентябрь 2019 г. По данным, представленным в **табл. 5** и на **рис. 4**, заметно повышение выявляемости IgG-антител в феврале до 7,61% и IgM-антител в феврале и марте до 5,71 и 6,9% соответственно, а также повышенные КП IgM-положительных образцов, собранных в феврале, августе и сентябре 2019 г. Заметной тенденции к сезонному изменению КП по IgG-антителам в исследуемых образцах не выявлено.

### Обсуждение

Несмотря на обширные эпидемиологические исследования, изучение патогенеза и клинических проявлений ГЕ, эта инфекция остаётся недооценённой в связи с диагностическими ошибками и отсутствием настороженности со стороны клиницистов. В послед-

ние годы много внимания уделялось изучению сероэпидемиологии ГЕ как в развивающихся, так и в развитых странах. Тем не менее в научной литературе остались значительные пробелы в области оценки распространённости антител к ВГЕ у беременных, в частности полностью отсутствует информация о серопревалентности вируса среди данной категории населения стран Центральной Азии – бывших республик СССР, относящихся к числу гиперэндемичных по ГЕ территорий. В данной работе исследована частота обнаружения IgG- и IgM-антител к ВГЕ у беременных из регионов Кыргызской Республики с ранее установленной повышенной заболеваемостью ГЕ и высоким уровнем серопревалентности ВГЕ [19–21].

Для получения достоверной информации о сероэпидемиологии инфекционных заболеваний необходимы исследования с применением высокоэффективных диагностических тестов. Лабораторная диагностика ГЕ основана на обнаружении специфических антител с помощью иммуноферментного анализа или детекции вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции [22]. IgM-антитела в типичных случаях обнаруживаются с первых до 5 мес после начала заболевания. IgG-антитела появляются вскоре после IgM-антител и могут персистировать в крови переболевших ГЕ в течение длительного времени. Диагностическая эффективность различных коммерческих иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения IgG- и/или IgM-антител к ВГЕ, варьирует в широком диапазоне [23], поэтому данные о распространённости инфекции ВГЕ в одних и тех же регионах, полученные разными авторами, различаются. Выбранные нами для проведения сероэпидемиологических исследований тест-системы по итогам независимых сравнительных испытаний относятся к наиболее чувствительным и специфичным [24], поэтому можно с уверенностью утверждать, что полученные нами результаты достоверно отражают реальную эпидемиологическую ситуацию в обследованных регионах.



**Рис. 3.** Коэффициенты позитивности IgG- (а) и IgM-антител (б) у беременных в возрасте от 17 до 30 лет и от 31 до 43 лет.

**Fig. 3.** Positivity coefficient values of IgG- (A) and IgM- (B) antibodies among pregnant women aged from 17 to 30 years and from 31 to 43 years.

**Таблица 4.** Коэффициенты позитивности положительных образцов сывороток крови беременных и женщин группы сравнения разных возрастных категорий

**Table 4.** Positivity Coefficients for positive blood sera samples from pregnant women and women in comparison group of different age categories

Возраст, годы Age	Коэффициенты позитивности положительных образцов сывороток Positivity Coefficients of positive blood sera samples										
	Беременные Pregnant women					Группа сравнения Comparison group					
	количество положительных образцов Number of positive samples	КП, абс. (%)* PC, abs (%)*					количество положительных образцов Number of positive samples	КП, абс. (%) PC, abs (%)			
		1,1–3,0	3,1–5,0	5,1–7,0	7,1–9,0	9,1–10,0		1,1–3,0	3,1–5,0	5,1–7,0	7,1–9,0
IgG-антитела к вирусу гепатита E IgG antibodies to HEV											
17–23	25	18 (72)	3 (12)	2 (8)	1 (4)	1 (4)	2	2 (100)	–	–	–
24–30	16	12 (75)	2 (12,5)	–	1 (6,25)	1 (6,25)	2	2 (100)	0	–	–
31–36	27	7 (26)	7 (26)	6 (22)	2 (7,4)	5 (18,6)	10	4 (40)	3 (30)	3 (30)	–
37–43	15	2 (13)	7 (47)	–	5 (33,3)	1 (6,7)	11	–	4 (33,3)	7 (66,7)	–
>44	4	2 (50)	1 (25)	–	1 (25)	–	27	–	8 (29,6)	11 (40,8)	8 (29,6)
Всего...	87	41 (47,1)	20 (23)	8 (9,2)	10 (11,5)	8 (9,2)	52	8 (15,4)	15 (28,8)	21 (40,4)	8 (15,4)
IgM-антитела к вирусу гепатита E IgM antibodies to HEV											
17–23	26	20 (76,9)	5 (19,2)	1 (3,9)	–	–	1	–	–	1 (100)	–
24–30	25	19 (76)	5 (20)	1 (4)	–	–	1	1 (100)	–	–	–
31–36	9	7 (77,8)	1 (11,1)	1 (11,1)	–	–	2	1 (50)	1 (50)	–	–
37–43	4	3 (75)	1 (25)	–	–	–	1	1 (100)	–	–	–
>44	–	–	–	–	–	–	2	1 (50)	1 (50)	–	–
Всего...	64	49 (76,5)	12 (18,8)	3 (4,7)	–	–	7	4 (57,1)	2 (28,6)	1 (14,3)	–

**Примечание.** \* КП – коэффициент позитивности.

**Note.** \* PC - positivity coefficient.

**Таблица 5.** Сезонная динамика серопревалентности ВГЕ у беременных

**Table 5.** Seasonal dynamics of HEV seroprevalence in pregnant women

Месяц Month	Количество исследованных образцов Number of tested samples	Количество IgG-положительных образцов, абс. (%) Number of IgG-positive samples, abs (%)	КП <sub>СРЕД</sub> * PC <sub>AVERAGE</sub> *	Количество IgM-положительных образцов, абс. (%) Number of IgM-positive samples, abs (%)	КП <sub>СРЕД</sub> PC <sub>AVERAGE</sub>
Февраль February	105	8 (7,61)	5,04	6 (5,71)	2,7
Март March	116	5 (4,31)	3,98	8 (6,9)	2,08
Апрель April	109	4 (3,67)	7,78	5 (4,59)	2,53
Май May	89	5 (5,62)	5,19	4 (4,49)	1,73
Июнь June	124	4 (3,23)	3,48	7 (5,65)	1,72
Июль July	104	6 (5,77)	4,97	6 (5,77)	1,76
Август August	235	8 (3,4)	4,59	14 (5,96)	3,56
Сентябрь September	161	7 (4,34)	4,96	4 (2,48)	3,59
Всего... Total...	1043	47 (4,5)		54 (5,2)	

**Примечание.** \* КП<sub>СРЕД</sub> – среднее значение коэффициента позитивности.

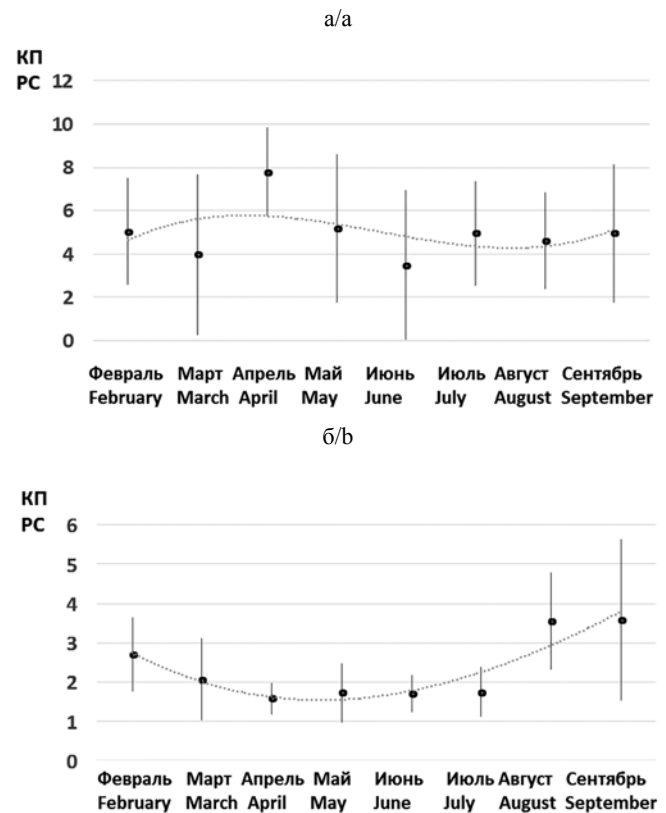
**Note.** \* PC<sub>AVERAGE</sub> – the average value of positivity coefficient.



Согласно полученным результатам, в обследованных регионах Кыргызстана у беременных серопревалентность ВГЕ по IgG-антителам составляет 5,97%, по IgM-антителам – 4,82%. Эти данные соответствуют результатам метанализа распространённости IgG-антител к ВГЕ у беременных, согласно которым выявляемость IgG-антител к ВГЕ в разных регионах в среднем составляет 16,51% [25], при этом в странах Ближнего Востока, близких к изучаемому региону, она схожа с полученными нами значениями: в Пакистане – 8,86%, в Иране – 6,2%. Данные по частоте обнаружения IgM-антител у населения гиперэндемичных регионов ограничены. Полученные нами на большой выборке образцов сведения о распространении IgG- и IgM-антител к ВГЕ у беременных в отдельных высокоэндемичных регионах Кыргызской Республики показали повышение процента выявляемости IgG-антител с увеличением возраста обследованных и практически одинаковую частоту обнаружения IgM-антител во всех возрастных группах, что свидетельствует об уязвимости беременных всех возрастов по отношению к ВГЕ-инфекции. Преобладание образцов с высоким КП среди IgG-положительных проб у представительниц старше 30 лет указывает на сформированный у них напряжённый иммунный ответ вследствие ранее перенесённой инфекции.

Исследование сезонной динамики показало в целом относительно равномерный характер частоты обнаружения IgG- и IgM-положительных проб, что может свидетельствовать об отсутствии вспышечной заболеваемости и характеризует исследуемый период с 2015 по 2019 г. как межэпидемический. В подтверждение этого предположения может свидетельствовать отсутствие заметной тенденции к сезонному изменению КП по IgG-антителам в серопозитивных пробах. Повышение КП IgM-положительных образцов, собранных в августе-сентябре 2019 г., вероятно, отражает активизацию эпидемического процесса к началу осенне-зимнего периода, что в целом характерно для эпидемиологии ГЕ в Центральной Азии [26].

Для оценки специфичности обнаружения антител к ВГЕ у беременных нами была сформирована контрольная панель из образцов, полученных от небеременных женщин из регионов Кыргызской Республики с повышенной эндемичностью по ГЕ: Бишкека, Оша, Баткенской, Чуйской и Ошской областей. Сравнение результатов, полученных при исследовании сывороток крови беременных и женщин группы сравнения показало, что в целом IgG-антитела в группе сравнения выявлялись относительно чаще, чем у беременных (13,1% против 5,1%). Более редкое определение IgG-антител в образцах от беременных женщин, чем в образцах группы сравнения, может объясняться более широким географическим охватом, с одной стороны, а с другой – более напряжённой эпидемиологической ситуацией по ГЕ в период сбора образцов группы сравнения и/или большим количеством образцов старшей возрастной категории (15,8% против 0,5% от объёма выборок группы сравнения и группы обследованных беремен-



**Рис. 4.** Сезонная динамика средних значений коэффициента позитивности (КП, дисперсий) IgG- (а) и IgM-положительных (б) образцов сывороток крови беременных (добавлена линия тренда, полученная при аппроксимации значений КП полиномом третьего порядка).

**Fig. 4.** Seasonal dynamics of changes in mean values of positivity coefficients (PC, dispersions) of IgG- (A) and IgM-positive (B) serum samples of pregnant women (it was added the trend line obtained by approximating KP values by a third-order polynomial).

ных соответственно). Вместе с тем частота обнаружения IgM-антител у беременных (4,82%) и женщин группы сравнения (4,2%) в целом различалась незначительно. Одновременное присутствие IgG- и IgM-антител к ВГЕ выявлено в 0,38% образцов сывороток крови беременных и в 0,6% – женщин группы сравнения. Несмотря на ограниченность выборки образцов группы сравнения, полученные результаты позволили предположить, что беременность не относится к эндогенным факторам, влияющим на результаты определения IgG- и IgM-антител к ВГЕ в данном исследовании.

Выявлено некоторое превышение серопревалентности ВГЕ у беременных, проживающих в Ошской области. Так, в образцах, полученных из Оша, IgG-антитела выявлялись в среднем с частотой 4,84%, IgM-антитела – с частотой 3,17%; в пробах из Ошской области IgG-антитела определялись в 6,22% случаев, IgM-антитела – в 5,64%. Несмотря на то что анализ этих результатов не показал статистической значимости выявленных различий (значения критерия  $\chi^2$  для IgG- и для IgM-положительных проб меньше критического,  $p < 0,05$ ), мы полагаем, что жительницы Ошской области подвержены большому риску заражения ВГЕ.

Проведённые нами исследования носили наблюдательный характер, включали анализ совокупных данных по неоднородным выборкам образцов и отдельным периодам в течение 2016–2019 гг. Для более глубокого понимания данных о степени инфицированности ВГЕ беременных в гиперэндемичных регионах стран Центральной Азии требуется проведение не только сероэпидемиологических, но и клинических и социологических исследований, а также оценка влияния ВГЕ-инфекции на материнскую и детскую заболеваемость и смертность.

Выявленный высокий риск инфицирования ВГЕ беременных всех возрастных групп в обследованном регионе свидетельствует о необходимости разработки эффективной стратегии проведения санитарно-гигиенических и профилактических мероприятий по контролю и предотвращению распространения инфекции ВГЕ в целом и особенно у беременных в регионах Центральной Азии.

### Выводы

1. Показан высокий риск инфицирования ВГЕ беременных всех возрастных групп в Оше и Ошской области (Кыргызская Республика). Специфические IgG-антитела обнаруживались в зависимости от возраста женщин с частотой от 2,88 до 22,38%, IgM-антитела к ВГЕ – от 4,15 до 4,95%, что свидетельствует о высокой эндемичности обследованных территорий Кыргызстана.

2. Частота обнаружения IgG-положительных образцов была выше в старших возрастных группах, также у данной категории обследованных чаще выявлялись IgG-антитела с высокими значениями КП, что указывает на ранее перенесённую инфекцию.

3. Установлена тенденция к повышению значений КП IgM-положительных образцов в осенне-зимний период, что согласуется с сезонным характером заболеваемости ГЕ в обследованном регионе. Относительно равномерная частота обнаружения IgG- и IgM-позитивных проб, установленная при изучении сезонной динамики выявляемости антител, характеризует исследуемый период как межэпидемический.

### ЛИТЕРАТУРА

- WHO. Fact sheet. Hepatitis E. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
- Khuroo M.S., Teli M.R., Skidmore S., Sofi M.A., Khuroo M.I. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am. J. Med.* 1981; 70(2): 252-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90758-0](http://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90758-0)
- Sharapov M.B., Favorov M.O., Yashina T.L., Brown M.S., Onischenko G.G., Margolis H.S., et al. Acute viral hepatitis morbidity and mortality associated with hepatitis E virus infection: Uzbekistan surveillance data. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 35. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2334-9-35>
- Teshale E.H., Howard C.M., Grytdal S.P., Handzel T.R., Barry V., Kamili S., et al. Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16: 126-9. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1601.090764>
- Acharya S.K., Sharma P.K., Singh R., Mohanty S.K., Madan K., Jha J.K., et al. Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *J. Hepatol.* 2007; 46(3): 387-94. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.09.016>

- Kumar A., Beniwal M., Kar P., Sharma J.B., Murthy N.S. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2004; 85(3): 240-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijgo.2003.11.018>
- Dalton H.R., Stableforth W., Thurairajah P., Hazeldine S., Remnarace R., Usama W., et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 20(8): 784-90. DOI: <http://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f5195a>
- Panda S.K., Thakral D., Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2007; 17(3): 151-80. DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.522>
- Acharya S.K., Panda S.K., Saxena A., Gupta S.D. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15(5): 473-9. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02073.x>
- Yugo D.M., Meng X.J. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013; 10(10): 4507-33. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijerph10104507>
- Meng X.J. Zoonotic and foodborne transmission of Hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.* 2013; 33(1): 41-9. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0033-1338113>
- Sakata H., Matsubayashi K., Takeda H., Sato S., Kato T., Hino S., et al. A nationwide survey for Hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion.* 2008; 48(12): 2568-76. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01910.x>
- Adlhoeh C., Kaiser M., Pauli G., Koch J., Meisel H. Indigenous Hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sang.* 2009; 97(4): 303-8. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01211.x>
- Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
- Khudyakov Y., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
- EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
- Алаторцева Г.И., Федорова О.Е., Замятина Н.А., Титаев А.В., Нестеренко Л.Н., Амиантова И.И. и др. Применение тест-системы «ВГЕ-скрин» для определения удельного веса гепатита Е в структуре вирусных гепатитов на территории Киргизии. В кн.: *Материалы конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней»*. М.; 2006: 76-9.
- Абдикаримов С.Т., Усманов Р.К., Махмануров А.А., Касымова Р.О., Карагулова А.Ш., Ырысова М.Б. и др. Гепатит Е в Кыргызской Республике в межэпидемический период. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2013; (2): 3-6.
- Лухверчик Л.Н., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Доценко В.В. и др. Роль вируса гепатита Е в этиологии острых вирусных гепатитов на территории Кыргызстана. *Здравоохранение Кыргызстана*. 2018; (2): 152-61.
- Лухверчик Л.Н., Алаторцева Г.И., Нестеренко Л.Н., Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Жукина М.В. и др. Исследование серопревалентности вируса гепатита Е и его роли в этиологии вирусных гепатитов на территории Кыргызстана. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2017; (3): 59-67. DOI: <http://doi.org/10.14427/jirai.2017.3.59>
- Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И., Михайлов М.И. и др. Определение доли гепатита Е в этиологической структуре острых вирусных гепатитов в отдельных регионах Кыргызстана. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(12): 740-6. DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746>
- Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 116-38. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
- Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses*. 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
- Pas S.D., Streefkerk R.H., Pronk M., de Man R.A., Beersma M.F., Osterhaus A.D., et al. Diagnostic performance of selected commer-

- cial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(4): 629-34. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.010>
25. Ahmad T., Hui J., Hussain M., Behzadifar M., Baig M. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Saudi Med.* 2020; 40(2): 136-46. DOI: <http://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.136>
  26. Кузин С.Н., Алатортсева Г.И., Буриев А.Я., Умиров С.Э., Хасанов А.Х. и др. Особенности распространения вируса гепатита E в эндемичном и неэндемичном регионах. *Вопросы вирусологии.* 2002; 47(2): 18-21.
- ### REFERENCES
1. WHO. Fact sheet. Hepatitis E. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>
  2. Khuroo M.S., Teli M.R., Skidmore S., Sofi M.A., Khuroo M.I. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. *Am. J. Med.* 1981; 70(2): 252-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/0002-9343\(81\)90758-0](http://doi.org/10.1016/0002-9343(81)90758-0)
  3. Sharapov M.B., Favorov M.O., Yashina T.L., Brown M.S., Onischenko G.G., Margolis H.S., et al. Acute viral hepatitis morbidity and mortality associated with hepatitis E virus infection: Uzbekistan surveillance data. *BMC Infect. Dis.* 2009; 9: 35. DOI: <http://doi.org/10.1186/1471-2334-9-35>
  4. Teshale E.H., Howard C.M., Grytdal S.P., Handzel T.R., Barry V., Kamili S., et al. Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16: 126-9. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1601.090764>
  5. Acharya S.K., Sharma P.K., Singh R., Mohanty S.K., Madan K., Jha J.K., et al. Hepatitis E virus (HEV) infection in patients with cirrhosis is associated with rapid decompensation and death. *J. Hepatol.* 2007; 46(3): 387-94. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.09.016>
  6. Kumar A., Beniwal M., Kar P., Sharma J.B., Murthy N.S. Hepatitis E in pregnancy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 2004; 85(3): 240-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijgo.2003.11.018>
  7. Dalton H.R., Stableforth W., Thurairajah P., Hazeldine S., Remnarace R., Usama W., et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; 20(8): 784-90. DOI: <http://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3282f5195a>
  8. Panda S.K., Thakral D., Rehman S. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 2007; 17(3): 151-80. DOI: <http://doi.org/10.1002/rmv.522>
  9. Acharya S.K., Panda S.K., Saxena A., Gupta S.D. Acute hepatic failure in India: a perspective from the East. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 15(5): 473-9. DOI: <http://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2000.02073.x>
  10. Yugo D.M., Meng X.J. Hepatitis E virus: foodborne, waterborne and zoonotic transmission. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013; 10(10): 4507-33. DOI: <http://doi.org/10.3390/ijerph10104507>
  11. Meng X.J. Zoonotic and foodborne transmission of Hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.* 2013; 33(1): 41-9. DOI: <http://doi.org/10.1055/s-0033-1338113>
  12. Sakata H., Matsubayashi K., Takeda H., Sato S., Kato T., Hino S., et al. A nationwide survey for Hepatitis E virus prevalence in Japanese blood donors with elevated alanine aminotransferase. *Transfusion.* 2008; 48(12): 2568-76. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01910.x>
  13. Adlhoc C., Kaiser M., Pauli G., Koch J., Meisel H. Indigenous Hepatitis E virus infection of a plasma donor in Germany. *Vox Sang.* 2009; 97(4): 303-8. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01211.x>
  14. Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
  15. Khudyakov Y., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
  16. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
  17. Alatoritseva G.I., Fedorova O.E., Zamyatina N.A., Titaev A.V., Nesterenko L.N., Amiantova I.I., et al. The application of the test-system «HEV-screen» to determine the proportion of hepatitis E in the structure of viral hepatitis in Kyrgyzstan. In: *Materials of the Conference «Current Issues of Epidemiology of Infectious Diseases» [Materialy konferentsii «Aktual'nye voprosy epidemiologii i infeksionnykh bolezney»]*. Moscow; 2006: 76-9. (in Russian)
  18. Abdikarimov S.T., Usmanov R.K., Makhmanurov A.A., Kasyanova R.O., Karagulova A.Sh., Yrysova M.B., et al. Hepatitis E in the Kyrgyz Republic in interepidemic period. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki.* 2013; (2): 3-6. (in Russian)
  19. Lukhverchik L.N., Alatoritseva G.I., Nesterenko L.N., Mikhaylov M.I., Kyuregyan K.K., Dotsenko V.V., et al. The role of hepatitis E virus in the acute viral hepatitis etiology in the Kyrgyzstan territory. *Zdravookhranenie Kyrgyzstana.* 2018; (2): 152-61. (in Russian)
  20. Lukhverchik L.N., Alatoritseva G.I., Nesterenko L.N., Mikhaylov M.I., Kyuregyan K.K., Zhukina M.V., et al. Investigations of hepatitis E virus seroprevalence and its role in the acute viral hepatitis etiology on the Kyrgyzstan territory. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya.* 2017; (3): 59-67. DOI: <http://doi.org/10.14427/jipai.2017.3.59> (in Russian)
  21. Alatoritseva G.I., Lukhverchik L.N., Nesterenko L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., Mikhaylov M.I., et al. The estimation of the hepatitis E proportion in the etiological structure of acute viral hepatitis in certain regions of of Kyrgyzstan. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2019; 64(12): 740-6. DOI: <http://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-12-740-746> (in Russian)
  22. Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014; 27: 116-38. DOI: <http://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
  23. Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Virus-es.* 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
  24. Pas S.D., Streefkerk R.H., Pronk M., de Man R.A., Beersma M.F., Osterhaus A.D., et al. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(4): 629-34. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.10.010>
  25. Ahmad T., Hui J., Hussain M., Behzadifar M., Baig M. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Saudi Med.* 2020; 40(2): 136-46. DOI: <http://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.136>
  26. Kuzin S.N., Alatoritseva G.I., Buriev A.Ya., Umirov S.E., Khasanov A.Kh., et al. Propagation of hepatitis E virus in an endemic and nonendemic regions. *Voprosy virusologii.* 2002; 47(2): 18-21. (in Russian)

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



### Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro*

Алимбарова Л.М.<sup>1</sup>, Керимов Т.З.<sup>2</sup>, Борзенко С.А.<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Фёдорова» Минздрава России, 127486, Москва, Россия

**Цель** исследования – изучить противовирусную активность 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*.

**Материал и методы.** Изучена противовирусная активность 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы (ОСХР) на модели герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), штамм ЕС, в культуре клеток Vero с использованием вирусологического и статистического методов исследования.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что все исследуемые образцы среды для хранения роговицы, в том числе и базовая среда Борзенко–Мороз, не оказывают цитотоксического действия на культуру клеток Vero. Установлено, что 4 из 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы обладают достоверной противовирусной активностью в отношении ВПГ-1 при использовании по терапевтической (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам. Противовирусная активность установлена у 2 образцов, содержащих индуктор интерферона циклоферон в концентрации 10 и 30 мг/кг (ОСХР 2, 3 соответственно); у образца, содержащего индуктор интерферона гамапрен 15 мг/кг (ОСХР 5), и у образца, содержащего комбинацию препаратов: циклоферон 10 мг/кг и ациклический аналог нуклеозида – ацикловир 10 мг/кг (ОСХР 6). Максимальный статистически достоверный ингибиторный эффект по отношению к ВПГ-1 по результатам двух схем испытаний был выявлен у ОСХР 6, содержащего комбинацию препаратов. На фоне его применения инфекционная активность тест-вируса снижалась в среднем на 3,2 lg, коэффициент ингибиции составил 54,5%.

**Заключение.** Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования образцов противовирусных сред для хранения донорских роговиц (образцы 2, 3, 5 и 6) с целью повышения эффективности кератопластики у больных офтальмогерпесом.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса 1-го типа; офтальмогерпес; герпесвирусная инфекция; жидкая среда для хранения роговицы; консервация роговицы; противовирусная активность.

**Для цитирования:** Алимбарова Л.М., Керимов Т.З., Борзенко С.А. Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 228-236. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>

**Для корреспонденции:** Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, вед. науч. сотрудник лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Участие авторов.** Все авторы внесли эквивалентный вклад в подготовку публикации.

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

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

Поступила 14.08.2020

Принята в печать 21.08.2020

### Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro*

Lyudmila M. Alimbarova<sup>1</sup>, Timur Z. Kerimov<sup>2</sup>, Sergei A. Borzenok<sup>3</sup>

<sup>1</sup> National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>2</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, 127473, Russia;

<sup>3</sup> S. Fyodorov Eye Microsurgery Complex Federal State Institution, Moscow, 127486, Russia

**The aim** of the study was to assess the antiviral activity of the 7 types of liquid corneal storage medium on an experimental model of herpesvirus infection *in vitro*.

**Material and methods.** The study of antiviral activity of 7 samples of liquid corneal storage medium on a model of herpesvirus infection caused by the herpes simplex virus type 1 in Vero-cell using virological and statistical research methods was carried out.

**Results and discussion.** All the studied images of the corneal storage medium, including the Borzenka-Moroz base medium, did not have a cytotoxic effect on Vero cell culture. Out of 7 samples of liquid corneal storage medium, 4 samples had reliable antiviral activity against HSV-1 when used under the therapeutic regimen (1 hour after infection) and under the preventive regimen (2 hours before infection). Antiviral activity was established in 2 samples containing the interferon inducer cycloferon at a concentration of 10 mg/kg and 30 mg/kg (sample 2, 3), in a sample containing the interferon inducer gamapren 15 mg/kg (sample 5), and in a sample containing a combination of drugs – 10 mg/kg cycloferon and an acyclic nucleoside analog-acyclovir 10 mg/kg (sample 6). According to the results of 2 test regimens, the maximum statistically significant inhibitory effect in relation to HSV-1 was detected in sample 6, containing a combination of drugs. Against the background of sample 6, the infectious activity of the test virus decreased by an average of 3.2 lg, the inhibition coefficient was 54.5%.

**Conclusion.** The results of the study indicate the prospects of using types of media with antiviral activity (samples 2, 3, 5, 6) for storing donor corneas in order to increase the effectiveness of keratoplasty in patients with ophthalmic herpes.

**Keywords:** herpes simplex virus type 1; HSV-1; herpesvirus infection; liquid corneal storage medium; cornea preservation; antiviral activity.

**For citation:** Alimbarova L.M., Kerimov T.Z., Borzenok S.A. Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(4): 228-236. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>

**For correspondence:** Lyudmila M. Alimbarova, PhD (Med.), associate professor, Leading researcher of the Laboratory of comparative virology with the Russian centre for herpes National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia.  
E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Information about the authors:**

Alimbarova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-8972-3111>

Kerimov T.Z., <https://orcid.org/0000-0001-8967-6370>

Borzenok S.A., <http://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

**Contribution.** The authors contributed equally to this article.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 14 August 2020  
Accepted 21 August 2020

## Введение

Лечение офтальмогерпеса (ОФТГ) является одним из наиболее сложных и актуальных аспектов офтальмологии, несмотря на существенный прогресс медикаментозных технологий. Терапия больных ОФТГ предусматривает применение консервативной фармакотерапии, кератопластики или комбинации этих методов [1].

Консервативная фармакотерапия с использованием этиотропных противовирусных препаратов прямого действия, иммунотропных, метаболических лекарственных средств, как в режиме монотерапии, так и при комбинированном назначении, требует длительного времени и не всегда гарантирует восстановление исходных свойств роговицы и зрительных функций у больных ОФТГ [1]. Причиной неудачного лечения могут быть трудности доставки лекарственных агентов к внутриклеточно расположенному вирусу простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) – основному возбудителю ОФТГ; устойчивость вируса к противовирусным препаратам; иммунодефицит, а также осложнённое течение заболевания, приводящее к истончению, перфорации, эрозии, язве роговицы, её помутнению

и т.д. По данным Всемирной организации здравоохранения, заболевания роговицы занимают 4-е место в структуре основных причин слепоты и слабовидения в мире после глаукомы, возрастной макулярной дегенерации и катаракты; причём более половины из них связаны с ОФТГ [2].

Кератопластика – это хирургическая операция на роговице, применяемая с целью восстановления её функций и устранения приобретённых дефектов у больных ОФТГ, которым не помогла консервативная терапия [3]. Кератопластика предусматривает пересадку трупной донорской роговицы [4]. В зависимости от размеров и толщины пересаженного гистологического комплекса роговицы выделяют сквозную и послойную кератопластику [5]. Вероятность прозрачного приживления пересаженной роговицы очень высока и зависит от типа кератопластической операции. Несмотря на то что прозрачное приживление роговицы в течение первых 5 лет после сквозной кератопластики наблюдается у 82–93% реципиентов, при данном виде терапии наблюдаются неудачи [6]. Среди причин неудачной пересадки роговицы необходимо отметить проблемы гистосовместимости

доноров роговицы и реципиентов; функциональную неполноценность роговиц, полученных в результате трупного тканевого донорства; биологические особенности ВПГ у доноров и реципиентов; нарушения в различных звеньях иммунитета у реципиента, а также степень вовлечённости других структур глаза в патологический процесс и т.д. Установлено, что в возникновении ранних неблагоприятных исходов пересадки роговицы участвуют аутоиммунные и инфекционные факторы, а отдалённых – инфекционные. Исход кератопластики зависит также от характеристики донорского материала [7]. Первичная несостоятельность кератотрансплантата чаще наблюдается при заборе донорского материала более чем через 12 ч после смерти донора, при его хранении более 7 сут, при пересадке роговицы от донора старше 70 лет, а также при инфицировании донора и/или реципиента ВПГ-1 [8]. Рецидивы ОФТГ отмечаются у 15–47% больных после трансплантации и в 50–60% случаев приводят к отторжению трансплантата [8].

Из большого числа методов консервации роговицы с гарантией сохранения её витальных свойств в широкой практике нашли применение только три: гипотермическая консервация, нормотермическое культивирование и криоконсервация [9]. В настоящее время гипотермическая консервация является наиболее распространённой методикой хранения роговицы в глазных тканевых банках мира [10]. Сохранение целостности и витальности тканевых структур трупных донорских роговиц, повышение их жизнеспособности на этапе консервации и подготовки к трансплантации, увеличение допустимых сроков применения донорских тканей, повышение эффективности пересадок роговицы и снижение инфекционных рисков трансплантации, заключающихся в предупреждении передачи ВПГ-1 через трансплантат роговицы, требуют совершенствования методов консервации [9, 11].

По данным отечественной литературы, 21,7% донорских роговиц инфицированы вирусами группы герпеса [12]. Зарубежные авторы сообщают, что ВПГ-1 инфицировано 5,7% донорских роговиц [13].

До сих пор отсутствуют технологии консервации, позволяющие проводить эффективную вирусную деконтаминацию на предоперационном этапе в условиях глазного тканевого банка.

**Цель** настоящей работы – изучение активности 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы на модели герпесвирусной инфекции *in vitro*.

### Материал и методы

**Культура клеток.** Исследование проводили на пересаживаемой культуре клеток почек африканских зелёных марьшшек (Vero), полученной из коллекции культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва). В качестве ростовой среды и среды поддержки использовали среду DMEM (ООО «ПанЭко», Россия), содержащую 10 и 2% инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «ПанЭко», Россия) соответственно, а также 2 мМ L-глутамина (Sigma, США) и антибиотики

(100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 40 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия)). Клеточную культуру в концентрации  $\sim 1,0 \cdot 10^5$  кл/мл рассеивали в 96-луночные пластиковые культуральные планшеты (Costar, Великобритания) и культивировали в термостате при температуре  $+37 \pm 0,5$  °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. В работе использовали однодневный клеточный монослой.

**Вирус.** В исследовании использовали тест-вирус ВПГ-1, штамм ЕС, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва). Вирус пассировали и титровали на монослойной культуре клеток Vero. Инфекционные титры ВПГ-1 определяли стандартным методом титрования и рассчитывали по методу Рида и Менча [14], выражая в логарифмических единицах (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл). Лизат культуральной вируссодержащей жидкости разливали по аликвотам и сохраняли до проведения опытов при  $-70 \pm 10,0$  °С.

**Препараты.** Исследовали 7 образцов жидкой среды для хранения роговицы (далее – ОСХР) производства ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» ООО «НЭП МГ» (Москва). Базовым компонентом всех исследуемых ОСХР является среда Борзенка–Мороз. С 1990 г. её применяют для гипотермической консервации жизнеспособных трупных роговиц глаза человека (с целью обеспечения стабилизации клеточных мембран, сохранности макроэргических соединений и стабильности плотности эндотелиальных клеток в процессе холодного хранения) в глазных банках и лабораториях консервации роговиц РФ [7]. Основными компонентами среды Борзенка–Мороз являются среды М-199, F12 и DMEM в соотношении 1 : 1 : 2, хондроитина сульфат – 2,7 мас.%, декстран – 40–2,0 мас.%, антибиотик гентамицина сульфат – 0,00014 мас.%, противогрибковый антибиотик амфотерицин В – 0,00015 мас.%. Наряду с базовым компонентом в состав исследуемых ОСХР были включены различные фармакологические препараты, характеристика которых представлена в **табл. 1**.

ОСХР разливали по аликвотам и сохраняли до проведения опытов при  $+4$  °С.

**Дизайн исследования.** Противовирусную активность исследуемых ОСХР оценивали по стандартной методике в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета РФ [15].

Исследование включало две схемы: изучение цитотоксического действия ОСХР в интактной культуре клеток Vero, а также изучение их противовирусной активности [16, 17].

Цитотоксическое действие ОСХР оценивали на культуре неинфицированных клеток Vero по влиянию на их морфологию и жизнеспособность. Для этого в суточные культуры клеток Vero, предварительно освобождённые от ростовой среды и трижды отмытые тёплым раствором Хенкса, вносили исследуемые ОСХР. В качестве контроля состояния клеточной культуры использовали питательную среду DMEM (отрицательный контроль). Культуру клеток в присутствии ОСХР и без них инкубировали при  $+37 \pm 0,5$  °С

в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Результаты учитывали визуально методом световой микроскопии с помощью инвертированного микроскопа ежедневно в течение 96 ч по появлению цитодеструктивных изменений и изменению морфологии клеточного монослоя.

Также ежедневно определяли количество жизнеспособных клеток методом исключения витального красителя трипанового синего. Для этого клетки ежедневно в течение 96 ч снимали смесью трипсина и версена и прижизненно окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в течение 5 мин при  $+37 \pm 0,5$  °C. Затем подсчитывали число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (голубых) клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в популяции оценивали по количеству неокрашенных клеток в процентах от общего числа клеток.

Для дальнейшего исследования использовали ОСХР, которые либо не вызывали видимых цитодеструктивных изменений клеточного монослоя или гибели клеток по сравнению с контролем, либо вызывали видимые при микроскопии изменения морфологии или гибель менее чем 50% клеток Vero в популяции [15].

Система оценки противовирусного действия включала изучение подавления ОСХР цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток, а также их влияния на репродукцию вируса в культурах клеток. Противовирусную активность ОСХР изучали по терапевтической (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам.

При исследовании образцов среды по терапевтической схеме культуру клеток культивировали в 96-луночных панелях, как было описано ранее, затем среду роста удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Далее культуры клеток инкубировали

в течение 1 ч в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C, после чего вирус удаляли, культуры клеток трижды отмывали раствором Хенкса от неадсорбированного вируса и добавляли исследуемые ОСХР.

При исследовании образцов среды по профилактической схеме культуру клеток культивировали в 96-луночных панелях, как было описано ранее, затем среду роста удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и инкубировали в течение 2 ч до инфицирования в различных образцах среды для хранения роговицы. Затем среду удаляли, клетки трижды отмывали тёплым раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦД<sub>50</sub>. Далее культуры клеток инкубировали в течение 1 ч в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C, после чего вирус удаляли, культуры клеток трижды отмывали раствором Хенкса от неадсорбированного вируса и добавляли среду поддержки DMEM.

Эксперименты сопровождали соответствующим контролем. В качестве позитивного контроля использовали инфицированные культуры клеток, к которым добавляли поддерживающую среду DMEM; в качестве негативного контроля – неинфицированные культуры клеток, к которым добавляли поддерживающую среду DMEM; в качестве контроля цитотоксичности – неинфицированные культуры клеток, инкубируемые в присутствии исследуемых ОСХР.

Клетки (независимо от схемы испытания) инкубировали в термостате при  $+37 \pm 0,5$  °C в течение 4 сут, ежедневно визуально оценивая целостность монослоя и характер вирусспецифического ЦПД в опытных и контрольных культурах клеток методом световой микроскопии по общепринятому способу [15]. Результаты учитывали при появлении выраженного (100%) ЦПД в контрольных пробах.

Оценка противовирусного действия предусматривала также изучение инфекционной активности вируса, образовавшегося в присутствии ОСХР. Для этого

**Таблица 1.** Состав исследуемых образцов жидкой среды для хранения роговицы\*

**Table 1.** Compositions of experimental cornea storage liquid media\*

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Срок годности, серийный номер Shelf life, serial number
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	14.08.2019–14.08.2021 № 1232019
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	23.07.2019–23.07.2021 № 1192019
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	18.07.2019–18.07.2021 № 1162019
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	25.07.2019–25.07.2021 № 1202019
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	14.08.2019–14.08.2021 № 1222019

**Примечание.** \* Среда Борзенка–Мороз для хранения роговицы приготовлена в соответствии с ТУ «9328-013-29039396-2008» ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» ООО «НЭП МГ».

**Note.** \* Borzenka–Moroz cornea storage medium produced according to TU «9328-013-29039396-2008» Federal State Institution «S.N. Fyodorov Eye Microsurgery Complex» LLC «SEP» EMC».

на 4-е сутки после совместного инкубирования инфицированных культур клеток с ОСХР отбирали соответствующие пробы вирусосодержащей жидкости из опытных и контрольных лунок и титровали их на перевиваемых культурах клеток Vero по стандартной методике.

Вирусингибирующий эффект ОСХР оценивали по общепринятым показателям [15]: по снижению уровня накопления вируса под воздействием препарата и коэффициенту ингибирования.

Снижение уровня накопления вируса под влиянием ОСХР ( $\Delta$ , lg) определяли по формуле 1:

$$\Delta = A_k - A_o \quad (1)$$

где  $A_k$  – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в питательную среду ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл);  $A_o$  – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл).

Коэффициент ингибирования (КИ, %) рассчитывали по формуле (2):

$$КИ = ((A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}) / A_{\text{контр}}) \cdot 100\% \quad (2)$$

где  $A_{\text{контр}}$  – уровень накопления вируса при культивировании в питательной среде, не содержащей ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл);  $A_{\text{оп}}$  – уровень накопления вируса

при культивировании в среде, содержащей ОСХР (lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл).

**Статистическая обработка данных.** Для получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили трижды. Статистический анализ результатов выполняли общепринятыми для биологических исследований методами с применением прикладных программ анализа данных Microsoft Excel 5.0 и Statistica 7. Достоверность различий определяли по величине  $p$ . Различия признавали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Результаты изучения цитотоксического действия 7 растворов для хранения роговицы на перевиваемой линии неинфицированных клеток Vero представлены в **табл. 2**.

По данным световой микроскопии и теста с трипановым синим было установлено, что базовая среда для хранения роговицы Борзенка–Мороз (ОСХР 7) и её варианты (ОСХР 1–6), содержащие различные фармакологические препараты, не оказывали выраженного цитотоксического действия на перевиваемую линию неинфицированных клеток VERO. Жизнеспособность клеток Vero при выращивании на средах, содержащих циклоферон в концентрации 5, 10 или 30 мг/кг (ОСХР 1, 2 и 3), составила 99,4–99,3%; на среде, содержащей циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг

**Таблица 2.** Цитотоксическое действие растворов для хранения роговицы № 1–7 на перевиваемую линию неинфицированных клеток Vero  
**Table 2.** Cytotoxic effect of cornea storage media #1-7 on the continuous line of uninfected Vero cells

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Данные метода световой микроскопии Light microscopy data		Данные метода исключения витального красителя Trypan blue exclusion test of cell viability		
		цитотоксическое действие на клетки, % cytotoxic effect on cells, %	цитотоксическое действие на клетки cytotoxic effect on cells	количество живых клеток <sup>1</sup> number of viable cells <sup>1</sup>		
				%	млн, $M \pm m^2$ mln, $M \pm m^2$	%
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	0,0	0,6	2,04±0,36	99,4 <sup>4</sup>	
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	0,0	0,6	2,03±0,32	99,4 <sup>4</sup>	
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	0,0	0,7	2,03±0,30	99,3 <sup>4</sup>	
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	0,0	1,4	2,0±0,2	98,6 <sup>4</sup>	
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka – Moroz medium + Gamapren, 15	5,0 <sup>4</sup>	7,9	1,9±0,25	92,1 <sup>4</sup>	
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	0,0	0,54	2,05±0,30	99,46 <sup>4</sup>	
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	0,0	0,1	2,04±0,25	99,9 <sup>4</sup>	
Контроль Control	Среда DMEM <sup>3</sup> DMEM medium <sup>3</sup>	0,0	0,0	2,05±0,2	100,0	

**Примечание.** <sup>1</sup> Определено методом исключения витального красителя трипанового синего; <sup>2</sup> средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>3</sup> интактные клетки Vero служили в качестве контроля; <sup>4</sup> достоверность по отношению к контролю – клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p > 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> According to trypan blue exclusion test of cell viability; <sup>2</sup> mean values from three independent experiments; <sup>3</sup> intact Vero cells served as control; <sup>4</sup> reliability in relation to control (Vero cells incubated in DMEM medium),  $p > 0.05$ .



(ОСХР 6), – 99,46%; на средах, содержащих гамапрен 2 и 15 мг/кг (ОСХР 4, 5), – 98,6–92,1%; и статистически достоверно не отличалась от жизнеспособности клеток, инкубируемых в питательной среде DMEM или в базовой среде Борзенка–Мороз.

В следующей серии экспериментов мы оценивали противовирусную активность ОСХР в отношении герпесвирусной инфекции, обусловленной ВПГ-1, в культуре клеток Vero. Противовирусную активность ОСХР исследовали по лечебной (через 1 ч после инфицирования) и по профилактической (за 2 ч до инфицирования) схемам. Результаты изучения противовирусной активности ОСХР представлены в табл. 3 и 4.

Как видно из данных табл. 3, ОСХР 7 не обладала противовирусной активностью в отношении тест-вируса при использовании по терапевтической схеме. Титры вируса на фоне её применения составили  $5,2 \pm 0,2$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл и статистически достоверно не отличались от таковых при использовании контрольной питательной среды DMEM ( $5,5 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл). Базовая среда Борзенка–Мороз также, как и контрольная среда DMEM, не влияла на время появления специфического ЦПД тест-вируса.

Представляло интерес исследование возможности повышения противовирусной активности базовой среды для хранения роговицы путём введения в её состав различных фармакологических препаратов, таких как циклоферон, гамапрен, а также циклоферон в сочетании с ацикловиром.

Исследование показало, что введение в состав базовой среды различных фармакологических препаратов по-разному влияет на её противовирусную активность.

Установлено, что показатель противовирусной активности варьирует не только среди ОСХР, содержащих разные фармакологические препараты, но и в пределах одного вида образцов, содержащих разные концентрации одного активного компонента. Так, добавление в базовую среду циклоферона 5 мг/кг (ОСХР 1), приводило к незначимому снижению инфекционной активности тест-вируса на 0,9 lg по сравнению с контролем вируса ( $p > 0,05$ ). Увеличение концентрации циклоферона до 10 мг/кг (ОСХР 2) способствовало статистически достоверному снижению инфекционной активности вируса на 1,98 lg. Дальнейшее увеличение концентрации циклоферона до 30 мг/кг, хотя и приводило к достоверному подавлению активности вируса на 1,5 lg по сравнению с контролем, но менее выраженному, чем при использовании циклоферона в концентрации 10 мг/кг. По степени убывания противовирусной активности ОСХР, содержащие разные концентрации циклоферона, можно расположить следующим образом: ОСХР 2 (КИ = 36%) > ОСХР 3 (КИ = 27,3%) > ОСХР 1 (КИ = 16,4%).

Введение в состав среды комбинации препаратов с разным механизмом действия (циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг) приводило к статистически значимому увеличению её противовирусной активности (КИ = 56,4%). На фоне применения ОСХР 6 инфекционная активность вируса была достоверно ниже, чем при использовании среды, содержащей 10 мг/кг циклоферона или базовой среды. Титры вируса при использовании вышеперечисленных сред составили  $2,4 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл;  $3,52 \pm 0,15$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл;  $5,2 \pm 0,2$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл соответственно.

**Таблица 3.** Влияние среды для хранения роговицы, содержащей различные фармакологические препараты, на течение герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа, штамм ЕС, в культуре клеток Vero при использовании по лечебной схеме

**Table 3.** Influence of cornea storage media with various pharmacological preparations on the course of herpesvirus infection caused by HSV-1, «ES» strain, in Vero cell culture when used according to the treatment regimen

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Уровень накопления вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,1 мл, $M \pm m^1$ Virus accumulation rate, lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml, $M \pm m^1$	Подавление репродукции вируса, Δ, lg Suppression of virus reproduction, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	4,6±0,1	0,9	16,4
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	3,52±0,15 <sup>2</sup>	1,98 <sup>2</sup>	36,0 <sup>2</sup>
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	4,0±0,25 <sup>2</sup>	1,5 <sup>2</sup>	27,3 <sup>2</sup>
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	4,6±0,2	0,9	16,4
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	3,62±0,15 <sup>2</sup>	1,88 <sup>2</sup>	34,2 <sup>2</sup>
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	2,4±0,25 <sup>2</sup>	3,1 <sup>2</sup>	56,4 <sup>2</sup>
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	5,2±0,2	0,3	5,45
Вирус Virus	Среда DMEM (контроль) DMEM medium (control)	5,5±0,15	–	–

**Примечание.** <sup>1</sup> Средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>2</sup> достоверность по отношению к контролю – инфицированные клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p < 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> Mean values from three independent experiments; <sup>2</sup> reliability in relation to control (infected Vero cells incubated in DMEM medium),  $p < 0,05$ .

Добавление в состав базовой среды индуктора интерферона гамапрена в концентрации 2 мг/кг (ОСХР 4) приводило к статистически недостоверному снижению инфекционной активности вируса на 0,9 lg по сравнению с контролем вируса, в то время как увеличение концентрации до 15 мг/кг (ОСХР 5) – к статистически достоверному снижению активности вируса на 1,88 lg. КИ составил 34,2% и достоверно превышал КИ базовой среды Борзенка–Мороз (5,45%), однако был сопоставим с таковым у ОСХР 2, содержащего 10 мг/кг циклоферона (36%).

Согласно данным литературы, критерием оценки активности препарата *in vitro* является снижение титра вируса не менее чем на 1,5–2,0 lg, подавление уровня накопления вируса в условиях одноциклового исследования под влиянием препарата на 1,25–2,0 lg и больше [15]. Представленные выше результаты свидетельствуют о наличии у 4 из 7 образцов для хранения роговицы (ОСРХ 2, 3, 5, 6) достоверной противовирусной активности в отношении ВПГ-1.

Введение фармакологических препаратов в состав ОСХР 2, 3, 5, и 6 способствовало также замедлению появления специфического ЦПД вируса в среднем на 48 ч по сравнению с таковым у контрольного вируса.

В следующей серии экспериментов мы исследовали противовирусную активность модифицированных растворов для хранения роговицы по профилактической схеме – за 2 ч до инфицирования (см. табл. 4).

Как видно из данных табл. 4, при профилактической схеме применения базовая среда для хранения

роговицы, как и в предыдущей серии опытов, достоверной противовирусной активностью в отношении тест-вируса не обладала. Титры вируса на фоне её применения составили  $5,5 \pm 0,3$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл и статистически достоверно не отличались от таковых при использовании контрольной питательной среды DMEM ( $6,0 \pm 0,25$  lg ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл). Изменение схемы применения базовой среды не повлияло и на время появления специфического ЦПД тест-вируса.

Иная картина наблюдалась при исследовании модифицированных ОСХР. В профилактической схеме применения противовирусная активность образцов, содержащих циклоферон в концентрации 5 мг/кг (ОСХР 1), 10 мг/кг (ОСХР 2) или 30 мг/кг (ОСХР 3), была выше, чем при использовании по лечебной схеме. Однако данное изменение не было статистически достоверным. По степени убывания активности образцы, содержащие разные концентрации циклоферона, можно расположить следующим образом: ОСХР 2 (КИ = 41,3%) > ОСХР 3 (КИ = 33,3%) > ОСХР 1 (КИ = 21,7%).

Инкубация клеток в течение 2 ч до инфицирования в среде, содержащей циклоферон 10 мг/кг и ацикловир 10 мг/кг, приводила к статистически достоверному снижению инфекционной активности тест-вируса на 3,4 lg по сравнению с контролем. КИ ОСХР 6 составил 51,7% и статистически достоверно не отличался от аналогичного показателя, полученного при использовании образца по лечебной схеме.

**Таблица 4.** Влияние среды для хранения роговицы, содержащей различные фармакологические препараты, на течение герпесвирусной инфекции, обусловленной вирусом простого герпеса 1-го типа, штамм ЕС, в культуре клеток Vero<sup>1</sup> при использовании по профилактической схеме

**Table 4.** Influence of cornea storage media with various pharmacological preparations on the course of herpesvirus infection caused by HSV-1, «ES» strain, in Vero<sup>1</sup> cell culture when used according to the prophylactic regimen

Среда, № Sample number	Состав среды для хранения роговицы, мг/кг Cornea storage medium composition, mg/kg	Уровень накопления вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /0,1 мл, $M \pm m^1$ Virus accumulation rate, lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml, $M \pm m^1$	Подавление репродукции вируса, lg Suppression of virus reproduction, Δ, lg	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
1	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 5 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 5	4,7±0,1	1,3	21,7
2	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10	3,52±0,25	2,48 <sup>2</sup>	41,3 <sup>2</sup>
3	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 30 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 30	4,0±0,25	2,0 <sup>2</sup>	33,3 <sup>2</sup>
4	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 2 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 2	5,0±0,2	1,0	16,7
5	Среда Борзенка–Мороз + гамапрен, 15 Borzenka–Moroz medium + Gamapren, 15	4,3±0,25 <sup>2</sup>	1,7 <sup>2</sup>	28,3 <sup>2</sup>
6	Среда Борзенка–Мороз + циклоферон, 10 + ацикловир, 10 Borzenka–Moroz medium + Cycloferon, 10 + Acyclovir, 10	2,61±0,25 <sup>2</sup>	3,4 <sup>2</sup>	51,7 <sup>2</sup>
7	Среда Борзенка–Мороз Borzenka–Moroz medium	5,5±0,3	0,5	8,33
Вирус Virus	Среда DMEM DMEM medium	6,0±0,25	-	-

**Примечание.** <sup>1</sup> Средние значения по результатам трёх независимых опытов; <sup>2</sup> достоверность по отношению к контролю – инфицированные клетки Vero, инкубируемые в питательной среде DMEM,  $p < 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> mean values from three independent experiments; <sup>2</sup> reliability in relation to control (infected Vero cells incubated in DMEM medium),  $p < 0,05$ .

Инкубация клеток в среде, содержащей гамапрен 2 или 15 мг/кг, приводила к подавлению инфекционной активности тест-вируса на 1,0 и 1,7 lg соответственно. КИ ОСХР 4 составил 16,7%, ОСХР 5 – 28,3%.

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, 4 из 7 исследуемых образцов среды для хранения роговицы обладают достоверной противовирусной активностью в отношении тест-вируса, независимо от схемы их использования.

### Обсуждение

ВПГ-1 может вызывать различные патологические изменения в роговице. Так, в клинической офтальмологии герпетические кератиты – одна из самых распространённых патологий роговицы [18]. При этом именно пересадка роговичной ткани в ходе сквозных и послойных кератопластических операций считается наиболее популярным типом трансплантации [18]. Подсчитано, что с августа 2012 г. по август 2013 г. в мире было проведено 184 576 кератопластических операций с использованием 283 530 роговиц, полученных из 742 глазных тканевых банков [18].

Выживаемость трансплантатов может составлять 82–93% в отсутствие неблагоприятных последствий пересадки [19]. Однако, как и любое хирургическое вмешательство, сквозная кератопластика сопряжена с некоторыми рисками. Значительную часть из них составляют инфекционные осложнения, в том числе развитие герпетического кератита в трансплантате роговицы в послеоперационном периоде. Крайне важно, что данное состояние возникает на фоне обязательных инстилляций иммуносупрессивных препаратов. Подобные ситуации представляют угрозу для состоятельности трансплантата роговицы. К сожалению, в настоящее время в глазных тканевых банках мира отсутствуют методы профилактики развития подобных состояний. Проведённое нами экспериментальное исследование демонстрирует, что базовая консервационная среда, а также питательная среда для культивирования не оказывают противовирусного эффекта на ВПГ-1 и, следовательно, не препятствуют его распространению в роговичной ткани. В литературе описаны случаи развития герпетического кератита в трансплантате роговицы, хранящемся в среде Optisol GS в условиях гипотермической консервации [20].

Одной из главных задач в процессе разработки многокомпонентных сред для вирусной деконтаминации трансплантата роговицы на консервационном этапе является оценка противовирусной эффективности предлагаемых растворов. В данном экспериментальном исследовании в качестве базового консервационного раствора нами использована отечественная среда для консервации трупных донорских роговиц (Борзенка–Мороз), к которой были добавлены препараты, обладающие противогерпетической активностью, в авторских концентрациях, не оказывающих цитотоксического действия. Применение индукторов интерферонов (таких как циклоферон, гамапрен) в различных количествах позволило обозначить диапазоны концентраций, в которых использованные

препараты обладают наибольшей противовирусной активностью при незначительном цитотоксическом эффекте. Согласно данным литературы, использование препаратов фармакологической группы интерферонов и индукторов интерферонов совместно с аномальными нуклеозидами (например, с ацикловиром) может оказывать синергетическое противовирусное действие [21]. В проведённом экспериментальном исследовании сочетание препаратов данных фармакологических групп показало наиболее выраженный противовирусный эффект. При использовании среды, содержащей комбинацию препаратов, по терапевтической и профилактической схемам применения КИ составил 56,4 и 51,7% соответственно.

По нашему мнению, вирусная деконтаминация донорских роговиц на консервационном этапе в условиях глазного тканевого банка может стать основным способом профилактики передачи ВПГ-1 от донора к реципиенту в ходе сквозной кератопластики, а также способна снизить вероятность реактивации латентной герпетической инфекции в трансплантате роговицы в раннем послеоперационном периоде и развития связанных с ней осложнений.

### Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования образцов противовирусных сред для хранения донорских роговиц (2, 3, 5, 6) с целью повышения эффективности кератопластики у больных офтальмогерпесом.

### ЛИТЕРАТУРА

- Исаков В.А., ред. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит; 2013.
- Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82(11): 844-51.
- Каспаров А.А. *Офтальмогерпес*. М.: Медицина; 1994.
- Amiri F., Ghiyasvandian S., Navab E., Zakerimoghadam M. Corneal transplantation: A new view of life. *Electron. Physician.* 2017; 9(4): 4055-63.  
DOI: <http://doi.org/10.19082/4055>
- Spadea L., De Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus. *Saudi Med. J.* 2016; 37(2): 127-36.  
DOI: <http://doi.org/10.15537/smj.2016.2.12985>
- Rahman I., Carley F., Hillarby C., Brahma A., Tullo A.B. Penetrating keratoplasty: indications, outcomes, and complications. *Eye (Lond.)*. 2009; 23(6): 1288-94.  
DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.2008.305>
- Борзенко С.А. *Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы*: Дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 2008.
- Кагушева А.Э. *Прогнозирование, профилактика и лечение персистирующих эрозий и язв трансплантата роговицы при сквозной кератопластике высокого риска*: Дисс. ... канд. мед. наук. М.; 2013.
- Борзенко С.А., Ролик О.И., Онищенко Н.А., Комах Ю.А. Методы консервации донорских роговиц и применение гомологичных клеточных пептидов. *Офтальмология*. 2011; (4): 75-8.
- Armitage W.J. Preservation of human cornea. *Transfus. Med. Hemother.* 2011; 38(2): 143-7.  
DOI: <http://doi.org/10.1159/000326632>
- Керимов Т.З., Борзенко С.А., Гаврилова Н.А., Тонаева Х.Д. Герпесвирусная инфекция трансплантата роговицы: подходы к вирусной деконтаминации на этапе консервации. *Практическая медицина*. 2018; 16(3): 89-92.

12. Миронкова Е.А., Макаров П.В., Слепова О.С., Гундорова Р.А., Кутушева А.З., 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; 14(4): 48-51. DOI: <http://doi.org/10.15825/1995-1191-2012-4-48-51>
13. Shimomura Y., Deai T., Fukuda M., Higaki S., Hooper L.C., Hayashi K. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea*. 2007; 26(2): 190-3. DOI: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31802eae6>
14. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493-7.
15. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлёва М.В., Лепакхин В.К. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1*. М.: Гриф и К; 2012.
16. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2003; 17(1): 41-7. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](http://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
17. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cercenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
18. Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(2): 167-73. DOI: <http://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
19. Williams K.A., Muehlberg S.M., Lewis R.F., Coster D.J. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register. *Eye (Lond)*. 1995; 9(Pt. 2): 219-27. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.1995.43>
20. Kaye R., Steger B., Chen J.Y., Romano V. A serious adverse surgical event: Management of suspected HSV-1 keratitis in a donor cornea. *Spektrum Augenheilkd.* 2017; 31(1): 19-22. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00717-016-0325-6>
21. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 1: CD002898. DOI: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub5>
6. Rahman I., Carley F., Hillarby C., Brahma A., Tullo A.B. Penetrating keratoplasty: indications, outcomes, and complications. *Eye (Lond)*. 2009; 23(6): 1288-94. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.2008.305>
7. Borzenok S.A. *Medico-technological and methodological bases of effective activity of ocular tissue banks of Russia in providing operations for end-to-end corneal transplantation*: Diss. Moscow; 2008. (in Russian)
8. Kagusheva A.E. *Prediction, prevention and treatment of persistent erosions and corneal graft ulcers in high-risk end-to-end keratoplasty*: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
9. Borzenok S.A., Rolik O.I., Onishchenko N.A., Komakh Yu.A. Methods of conservation of donor corneas and application of homologous cell peptides. *Ofital'mologiya*. 2011; (4): 75-8. (in Russian)
10. Armitage W.J. Preservation of human cornea. *Transfus. Med. Hemother.* 2011; 38(2): 143-7. DOI: <http://doi.org/10.1159/000326632>
11. Kerimov T.Z., Borzenok S.A., GavriloVA N.A., Tonaeva Kh.D. Herpesvirus infection in cornea graft: current approaches to therapy and viral decontamination during storage. *Prakticheskaya meditsina*. 2018; 16(3): 89-92. (in Russian)
12. Mironkova E.A., Makarov P.V., Slepova O.S., Gundorova P.A., Kugusheva A.Z., Demkin V.V., et al. Herpes virus contamination of donor's tissue as a potential etiology of corneal graft disease after penetrating keratoplasty. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2012; 14(4): 48-51. DOI: <http://doi.org/10.15825/1995-1191-2012-4-48-51> (in Russian)
13. Shimomura Y., Deai T., Fukuda M., Higaki S., Hooper L.C., Hayashi K. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea*. 2007; 26(2): 190-3. DOI: <http://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31802eae6>
14. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493-7.
15. Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'ev A.N., VerstaKova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., et al. *Guidelines for Conducting Preclinical Research of Medicines. Part 1 [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
16. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2003; 17(1): 41-7. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](http://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
17. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cercenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705-8. DOI: <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
18. Gain P., Jullienne R., He Z., Aldossary M., Acquart S., Cognasse F., et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016; 134(2): 167-73. DOI: <http://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
19. Williams K.A., Muehlberg S.M., Lewis R.F., Coster D.J. How successful is corneal transplantation? A report from the Australian Corneal Graft Register. *Eye (Lond)*. 1995; 9(Pt. 2): 219-27. DOI: <http://doi.org/10.1038/eye.1995.43>
20. Kaye R., Steger B., Chen J.Y., Romano V. A serious adverse surgical event: Management of suspected HSV-1 keratitis in a donor cornea. *Spektrum Augenheilkd.* 2017; 31(1): 19-22. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00717-016-0325-6>
21. Wilhelmus K.R. Antiviral treatment and other therapeutic interventions for herpes simplex virus epithelial keratitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015; 1: CD002898. DOI: <http://doi.org/10.1002/14651858.CD002898.pub5>

## REFERENCES

1. Isakov V.A., ed. *Human Herpesvirus Infections: A Guide for Physicians [Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
2. Resnikoff S., Pascolini D., Etya'ale D., Kocur I., Pararajasegaram R., Pokharel G.P., et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Organ.* 2004; 82(11): 844-51.
3. Kasparov A.A. *Ophthalmogерpes [Ofital'mogerpes]*. Moscow: Meditsina; 1994. (in Russian)
4. Amiri F., Ghiyasvandian S., Navab E., Zakerimoghadam M. Corneal transplantation: A new view of life. *Electron. Physician*. 2017; 9(4): 4055-63. DOI: <http://doi.org/10.19082/4055>
5. Spadea L., De Rosa V. Current techniques of lamellar keratoplasty for keratoconus. *Saudi Med. J.* 2016; 37(2): 127-36. DOI: <http://doi.org/10.15537/smj.2016.2.12985>