

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI: 10.36233

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 открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

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;>
<https://www.ebsco.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: publisher@crie.ru

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Выпускающий редактор:
Архипова Елена Михайловна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.elpub.ru>).

Направляя статью в редакцию,
авторы принимают условия договора
публичной оферты
(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Подписано в печать 30.06.2021.
Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии
«Буки Веди», www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2021

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

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

3

Том 66 • 2021

Редакционная коллегия

Главный редактор: ЛЬВОВ 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)

Глугов 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)

Корзая 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)

Негёсов 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)

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.; 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)

Шестопалов 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)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676 ISSN 0507-4088 (Print) ISSN 2411-2097 (Online) DOI: 10.36233

The journal is presented in the following research databases:

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 (on the Web of Science platform)

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. Phone/fax: +7(925) 011-87-79. E-mail: publisher@crie.ru

Head of the Editorial and Publishing Department: *Olga V. Osokina*

EDITORIAL OFFICE:

111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. Phone/fax: +7(925) 011-87-79. E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Head of Editorial Office:

Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.elpub.ru>;) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement

(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Signed to the press

on June 30, 2021.

Print format 60 × 90^{1/8}.

Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.

115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.

E-mail: info@bukivedi.com.

www.bukivedi.com

© Central Research Institute for Epidemiology, 2021

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

3

Volume 66 • 2021

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,
Professor, Dr. Sci. (Biology)**

Assistant editors in chief: **Grebennikova T.V.,** RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.,** Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.,** RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Barinskiy I.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A. Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Moscow, Russia)

Aliper T.I. – Professor, Dr. Sci. (Biology), (Moscow, Russia)

Antonov V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. – Professor, Dr. Sci. (Chemistry), (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. – Corr. Member of RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. – Dr. Sci. (Biology) (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. – Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Korzaya L.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Sochi, Russia)

Kuzin A.A. – Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. – Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

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

Romanenko V.V. – Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (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

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова* 173

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И.

Маркёры вирусного гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) у импортированных низших обезьян Старого Света 182

Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Руднева И.А., Тимофеев Б.И., Ляшко А.В., Баланова М.А., Артёмов Е.К., Гребенникова Т.В., Тимофеева Т.А.

Моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа A/H7N3 (*Orthomyxoviridae*: *Alphainfluenzavirus*: *Influenza A virus*) 189

Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Рэмзи Э.С., Жилинская И.Н.

Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae*; *Alphainfluenzavirus*) 198

Мазлум А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалкеик А., Власова Н.Н.

Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae*: *Asfivirus*: *African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток* 211

Попова А.А., Домонова Э.А., Покровская А.В., Шипулина О.Ю., Покровский В.В.

Распространённость вируса папилломы человека (*Papillomaviridae*; *Human papillomavirus*) высокого канцерогенного риска по результатам скрининга 3 анатомических локусов у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу 217

Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Каплина Э.Н., Носик Д.Н.

Экспрессия интегринов $\beta 1$, $\alpha 4$ и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 в присутствии дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса (ДНК-Na-Fe) клетками МТ-4, трансформированными Т-лимфотропным вирусом человека 1 типа (*Retroviridae*: *Orthoretrovirinae*: *Deltaretrovirus*: *Human T-lymphotropic virus type 1*). 227

НЕКРОЛОГ

Ханс-Дитер Кленк 233

CONTENTS

ANNIVERSARY DATES

To the 90th birth anniversary of Dmitry Konstantinovich Lvov, Academician of Russian Academy of Sciences* . . . 173

ORIGINAL RESEARCH

Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I.

Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*)

in the imported Old World monkeys 182

Sorokin E.V., Tsareva T.R., Rudneva I.A., Timofeev B.I., Lyashko A.V., Balanova M.A., Artemov E.K., Grebennikova T.V., Timofeeva T.A.

Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae*:

Alphainfluenzavirus: Influenza A virus) 189

Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Y.G., Ramsay E.S., Zhilinskaya I.N.

Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells

in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection 198

Mazloun A., Igoikin A.S., Zinyakov N.G., van Schalkwyk A., Vlasova N.N.

Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*)

associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture* 211

Popova A.A., Domonova E.A., Pokrovskaya A.V., Shipulina O.Yu., Pokrovsky V.V.

Prevalence of human papillomavirus (*Papillomaviridae; Human papillomavirus*) of high carcinogenic risk

based on the results of screening of three anatomical loci in men stratified by sexual behavior and HIV status 217

Kalnina L.B., Selimova L.M., Kaplina E.N., Nosik D.N.

Expression of integrins $\beta 1$, $\alpha 4$ and cell adhesion molecule ICAM-1 in the presence of sodium

deoxyribonucleate with ferrum complex (DNA-Na-Fe) by MT-4 cells transformed by human T-lymphotropic

virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*) 227

OBITUARY

Hans-Dieter Klenk 233

* The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ



К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова

М.П. Чумаков: «Из невозможного следует сделать возможное» (1961 г.);
«Где прошёл ДК, другим там делать нечего...» (1965 г.)



Дмитрий Константинович Львов (ДК – среди соратников) – всемирно известный учёный, с именем которого связано создание и развитие новых научных направлений в вирусологии – молекулярной экологии вирусов и популяционной генетики арбовирусов, а также исследований, посвящённых изучению механизмов формирования популяционных генофондов вирусов. Он использовал эволюционный подход и математические методы многофакторного анализа для создания концепции о закономерностях циркуляции вирусов в различных ландшафтно-климатических поясах мира. На протяжении 70 лет его научная и организационная деятельность посвящена проблеме новых и возвращающихся вирусных инфекций, представляющих угрозу биобезопасности.

Д.К. Львов – автор уникального метода экологического зондирования территории Северной Евразии и прогнозирования эпидемических вспышек в различных ландшафтных поясах на территории России. Он выступил в качестве организатора и участника десятков комплексных экспедиций по всему Северо-Евразийскому региону.

Дмитрий Константинович родился 26 июня 1931 г. в Москве. Отец – психолог, педагог, член-корреспондент Академии педагогических наук РСФСР; мать – преподаватель русского языка и литературы. Родители и старший брат (погиб в январе 1942 г. в сражении под Ржевом) оказали большое влияние на гражданское и научное формирование будущего исследователя и патриота. Этому способствовало и многолетнее

общение с семьями академиков А.В. Чаянова, В.А. Энгельгардта, И.П. Разенкова, Е.М. Тареева и других жителей Николиной Горы, уникального посёлка работников науки и искусства (первый дом в нём был построен отцом Дмитрия, К.И. Львовым). В 1949 г. Д.К. Львов поступил в 1-й Московский медицинский институт им И.М. Сеченова, а через 2 года был переведён на третий курс Военно-медицинской Академии им С.М. Кирова (г. Ленинград), которую закончил с отличием в 1955 г. На протяжении всего обучения он получил фундаментальную подготовку по биологии и паразитологии, проводя исследования по переносчикам японского и других вирусных энцефалитов. Спустя почти полвека – в 2004 г. – Д.К. Львов избран почётным доктором этого учреждения.

Научными руководителями Дмитрия Константиновича Львова были известные учёные-академики – Е.Н. Павловский, Ш.Д. Мошковский, М.П. Чумаков. До 1957 г. он работал младшим научным сотрудником в Институте санитарии Министерства обороны СССР, а после демобилизации был принят по конкурсу на должность младшего научного сотрудника в Институт медицинской паразитологии и тропической медицины Министерства здравоохранения СССР. Здесь Д.К. Львов проработал до декабря 1960 г., изучая проблему клещевого энцефалита, после чего был переведён в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов Академии медицинских наук СССР, где последовательно прошёл все стадии научного роста – от младшего научного сотрудника до руководителя лаборатории, проводя крупномасштабные исследования по инактивированной вакцине против клещевого энцефалита и стратегии иммунопрофилактики этой инфекции. Технология производства и применения вакцинного препарата послужила прототипом для ряда других вакцин, в том числе современной «Кови-Вак» против COVID-19.

С октября 1967 г. по сегодняшний день Дмитрий Константинович Львов работает в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, вначале руководителем лаборатории генетики арбовирусов, а с 1969 г. по 1987 г. одновременно руководителем отдела экологии вирусов (по настоящее время) и заместителем директора по науке. С 1987 по 2014 г. академик Львов возглавлял институт.

В 1960 г. молодой учёный защитил кандидатскую диссертацию «Иммунологическая структура населения в очагах клещевого энцефалита», а уже через 5 лет стал доктором медицинских наук с темой

диссертационной работы «Иммунопрофилактика клещевого энцефалита» по специальностям «вирусология» и «эпидемиология».

В 1975 г. Дмитрий Константинович Львов был избран членом-корреспондентом, а в 1984 г. – академиком АМН СССР по специальности «вирусология», с 2013 г. он – академик Российской академии наук (отделение медицинских наук).

С именем Д.К. Львова связано обоснование трансакционного перехода зоонозных вирусов с респираторным путём передачи в популяции человека. Под руководством учёного в результате широкомасштабных полевых и экспериментальных исследований были изолированы десятки зоонозных вирусов различных семейств, многие из которых зарегистрированы в Международном каталоге арбовирусов в качестве новых для науки. Изучена роль выделенных агентов в патологии человека, разработаны диагностические препараты. Описаны неизвестные ранее зоонозные инфекции, передаваемые комарами от птиц (карельская лихорадка), летучими мышами – аэрогенным и алиментарным путём (Иссык-Кульская лихорадка), клещами от птиц и других животных (лихорадка Тамды, долины Сырдарьи и др.). Методом молекулярной экологии установлена генетическая характеристика вирусов Крымской-Конго геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила (ЛЗН), вызвавших обширные эпидемические вспышки с высокой смертностью в 1999–2002 гг. на юге России. Показана идентичность геномов штаммов вируса ЛЗН, изолированных в данный период в России и США.

Экологический подход использован Д.К. Львовым для изучения механизмов появления новых пандемических вирусов гриппа А. Установлена активная циркуляция 15 из 17 известных вирусов гриппа А в природных биоценозах Северной Евразии, в том числе генетических вариантов, которые расцениваются в качестве возможных предшественников новых пандемических агентов. Изучены причины и последствия заноса птичьего гриппа H5N1 в Северо-Евразийский регион и глобальные последствия этого процесса, эволюция возбудителя. Исследованы процессы внедрения нового пандемического гриппа A/H1N1pdm2009 на территорию России и молекулярные механизмы развития летальной пневмонии.

В результате мониторинга распространения в России различных генотипов вируса гепатита С установлено повсеместное доминирование наиболее патогенного из них – 1b. Изучены причины высокого уровня заболеваемости населения Средней Азии гепатитами А, В, Е.

Дмитрий Константинович проводит актуальные для науки и практического здравоохранения исследования, целеустремлённо и плодотворно изучая проблему новых и возвращающихся инфекций (emerging and reemerging infections), представляющих угрозу биологической безопасности страны.

Учёный широкой эрудиции во многих областях – биологии, вирусологии, молекулярной экологии, эпидемиологии, паразитологии, инфекционной патоло-

гии, – Д.К. Львов внёс и продолжает вносить существенный вклад в успешное создание и выполнение научных программ и их практическую реализацию. Им создана школа вирусологов, специалистов в области арбовирусологии, экологии вирусов.

Академик Львов – автор и соавтор более 400 научных трудов, в том числе 11 монографий и руководств по общей и частной вирусологии, уникального атласа, отражающего распространение возбудителей особо опасных и малоизученных вирусных инфекций на территории РФ. Дмитрий Константинович подготовил свыше 50 кандидатов и докторов наук. Индекс Хирша его публикаций в базе РИНЦ – 41, в базе Scopus – 22, Web of Science – 21.

Д.К. Львов – председатель специализированного совета по защите диссертаций по вирусологии и молекулярной биологии (медицинские и биологические науки), долгое время являлся председателем межведомственного научного совета по вирусологии.

На протяжении многих лет Дмитрий Константинович осуществляет широкую научно-координационную работу по вирусологии. Являясь руководителем Центра экологии возбудителей инфекционных заболеваний вирусной природы, он принимал деятельное участие в различных мероприятиях, часть из которых непосредственно организовывал: в ежегодных экспедициях, региональных совещаниях, научных конференциях и семинарах вирусологов, эпидемиологов, инфекционистов практического здравоохранения России и стран СНГ по проблеме арбовирусов и арбовирусных инфекций. Он был организатором и председателем Президиума международных симпозиумов «Арбовирусы», «Вирусные гепатиты» и «100-летие вирусологии».

Многогранная научная деятельность Дмитрия Константиновича получила большое национальное и мировое признание. Д.К. Львов пользуется высоким научным авторитетом в мире. Об этом свидетельствуют его избрание международным советником Американского национального Комитета по арбовирусам (1976 г.), членом Международного комитета по изучению вирусов в высоких широтах, участие в работе таксономических групп по буньявирусам и тогавирусам. Академик Львов состоял членом Международного комитета по таксономии вирусов, куратором (с российской стороны) исследований по гриппу в рамках российско-американского сотрудничества по проблеме гриппа, экспертом ВОЗ по гриппу (с 1989 г.), председателем Комитета по медицинским наукам и здравоохранению Тихоокеанской научной ассоциации (1974–1982 гг.), а также членом редколлегии двух международных журналов. С 1996 г. по настоящее время академик Львов – главный редактор журнала «Вопросы вирусологии», входящего в Q4 рейтинга базы отчётов Journal Citation Reports – JCR (импакт-фактор РИНЦ 0,646).

Многолетняя научно-организационная работа Дмитрия Константиновича Львова, его вклад в становление и развитие вирусологической науки в нашей стране были высоко оценены Президиумом РАМН, Правительством РФ, Президентом РФ. Д.К. Львов – трижды лауреат премии им. Д.И. Ивановского, обладатель пре-

мии им. академика Н.Ф. Гамалеи. В 1976 г. он награждён орденом «Знак Почёта», в 1991 г. – орденом Ленина (за создание в стране нового научного направления – экология вирусов – и разработку его теоретических оснований), а в 2012 г. – орденом Почёта. В 1999 г. Дмитрий Константинович был удостоен Государственной премии РФ в области науки (за проведение в масштабе страны исследований по проблеме новых и возвращающихся инфекций и создание «Атласа распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории РФ»).

На протяжении многих лет теоретическая и практическая административно-организационная

и общественная деятельность Дмитрия Константиновича является примером честного и беззаветного служения Отечеству. Своей душевной теплотой и щедростью к людям Д.К. Львов снискал уважение и глубокую признательность всех, кто работал и работает с ним.

От всей души поздравляем академика РАН Дмитрия Константиновича Львова со знаменательным юбилеем и искренне желаем оптимизма, здоровья, свершения всех намеченных планов на благо отечественной и мировой науки!

Целесообразно привести основные блоки научных исследований Д.К. Львова (**Таблица**).

Основные блоки научных исследований Д.К. Львова

№ п/п	Направление	Где, когда	Основные результаты	Основные публикации
1.	Таксономия переносчиков арбовирусных инфекций, установление основных закономерностей их взаимоотношений с вирусами	Военно-медицинская Академия им. С.М. Кирова (Ленинград), 48 Центральный НИИ Минобороны РФ (ранее Институт санитарии МО СССР) (Сергиев Посад, Московская обл.) 1952–1956	Установлена таксономия переносчика японского энцефалита комара <i>Aedes esoensis</i> Jam. Вирусологические исследования. 2 статьи	Львов Д.К. О видовой самостоятельности переносчика японского энцефалита <i>Aedes esoensis</i> Jam. (<i>Diptera, Culicidae</i>). <i>Энтомологическое обозрение АН СССР</i> . 1956; 35(4): 929–34. Львов Д.К. Справка № 2334 от 8 декабря 1956 г. М.: Институт санитарии МО СССР; 1956.
2.	Установление популяционного иммунитета к вирусу клещевого энцефалита (КЭ) среди различных возрастных групп населения Западной Сибири в разных ландшафтных поясах	Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского (Минздрав РФ), Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Западная Сибирь 1957–1960	Выявлен риск заражения КЭ среди населения различных ландшафтных поясов Западной Сибири. Наибольший риск в южнотаёжном поясе (сумма эффективных температур 1200–1600 °С). 9 статей Диссертация кандидата мед. наук (эпидемиология, вирусология).	Львов Д.К. Иммунологическая структура населения двух типов южнотаёжных очагов клещевого энцефалита. <i>Медицинская паразитология и паразитарные болезни</i> . 1962; (4): 387–92. Львов Д.К., Никифоров Л.П., Беклемишев В.В., Фастовская Э.И. Количественные показатели в эпизоотологии и эпидемиологии клещевого энцефалита. <i>Журнал гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии (Прага)</i> . 1963; 7(3): 267–72. Львов Д.К., Чумаков М.П., Гольдфарб Л.Г. Характер иммунологической структуры населения в отношении клещевого энцефалита в различных ландшафтных зонах Западной Сибири. В кн.: <i>Эндемические вирусные инфекции</i> . М.; 1968: 195–201.
3.	Изучение новой (культуральной) вакцины против КЭ в условиях контролируемого эпидемиологического опыта (~2 млн человек) в гиперэндемичном регионе Западной Сибири (Кемеровская область)	Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН (Московская обл.), Западная Сибирь, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Математический институт им. В.А. Стеклова РАН (Москва) 1961–1967	Внедрена в широкую практику безопасная и высокоэффективная вакцина, разработана стратегия иммунопрофилактики КЭ в СССР. 14 статей Диссертация доктора мед. наук (вирусология, эпидемиология).	Львов Д.К., Чумаков М.П., Заклинская В.А. Скорость накопления антител у людей в ранние сроки после вакцинации и ревакцинации против клещевого энцефалита. <i>Вопросы вирусологии</i> . 1964; 9(5): 601–4. Чумаков М.П., Львов Д.К., Гагарина А.В., Вильнер Л.М., Родин И.М., Заклинская В.А. Условия, влияющие на эффективность вакцинации против клещевого энцефалита. <i>Вопросы вирусологии</i> . 1965; 10(2): 168–72. Львов Д.К., Чумаков М.П., Гольдфарб Л.Г. Эпидемиологическая эффективность инактивированной культуральной вакцины против клещевого энцефалита по данным контролируемого эпидемиологического опыта 1961–1964 гг. В кн.: <i>Эндемические вирусные инфекции</i> . М.: 1968; 195–201.

№ п/п	Направление	Где, когда	Основные результаты	Основные публикации
4.	Исследования в очагах жёлтой лихорадки и других 60 тропических вирусов в экваториальном бассейне Амазонки	Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН (Московская обл.), лаборатория Рокфеллеровского фонда (г. Белем, Бразилия) 1967	Установлена высокая степень корреляции между уровнем циркуляции ряда арбовирусов и абиотическими факторами среды обитания (температура, осадки). 3 статьи	Львов Д.К., Мошкин А.В., Пузаченко Ю.Г. Информационный анализ ареалов арбовирусов. <i>Вестник МГУ. Географическая секция</i> . 1967; (3): 78–86. Львов Д.К. Особенности распространения некоторых арбовирусов в Бразильской Амазонии. <i>Вопросы вирусологии</i> . 1968; 13(2): 187–92. Львов Д.К., Оттис Р., Кози К. Особенности распространения арбовирусов в экваториальном климате (на модели арбовирусов бассейна Амазонки). В кн.: <i>Материалы XIII сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР</i> . М.: 1967; 228–30.
5.	Проблема вирусных гепатитов Мониторинг распространения генотипов вируса гепатита С («ласковый убийца»)	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), территория РФ и сопредельные территории 1979–1997	Проведён анализ причин высокой заболеваемости вирусным гепатитом С в среднеазиатских республиках и разработана программа по её снижению. Организован в г. Ташкент филиал Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, в дальнейшем трансформированный в самостоятельный институт, изучающий вирусные гепатиты в Узбекистане. Осуществлён мониторинг циркуляции различных генотипов вируса гепатита С в РФ. Установлено повсеместное доминирование наиболее патогенного генотипа 1b. Даны рекомендации по обследованию и лечению больных. 17 статей	L'vov D.K. Viral Hepatitis. In: <i>Man against Viruses</i> . Venice: UNESCO; 1994: 159–205. Львов Д.К., Миширо С., Селиванов Н.А. Распространение генотипов вируса гепатита С, циркулирующих на территории Северо-Западной и Центральной частей России. <i>Вопросы вирусологии</i> . 1995; 40(6): 251–3. Львов Д.К. Вирусный гепатит С – «ласковый убийца». <i>Российский гастроэнтерологический журнал</i> . 1995; (1): 4–6. L'vov D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F., Selivanov N.A., Okamoto H., Stakhanova V.M., et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia. <i>Arch Virol</i> . 1996; 141(9): 1613–22. Львов Д.К. Вирусные гепатиты. <i>Вестник Академии медицинских наук</i> . 1996; (6): 25–31. Львов Д.К., Самохвалов Е.И., Миширо С., Тсуда Ф., Селиванов Н.А., Окамото Х. Закономерности распространения вируса гепатита С и его генотипов в России и странах СНГ. <i>Вопросы вирусологии</i> . 1997; 42(4): 157–62.
6.	Разработка теоретических основ для проведения мониторинга в пределах различных ландшафтно-климатических поясов вирусов, представляющих угрозу национальной биологической безопасности. Реализация программы на территории Советского Союза и ряда сопредельных стран	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), 20 опорных баз в ключевых точках СССР На территории СССР и сопредельных стран, Всесоюзный Центр по экологии вирусов (на базе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского) 1970–1990	Образовано новое научное направление – молекулярная экология. Подготовлена исследовательская база. Создана эколого-вирусологическая школа. На основе экологического подхода разработана система циркуляции арбовирусов в разных ландшафтно-климатических поясах и проведено обследование территорий от Арктики до субтропиков Северной Евразии. Изолировано свыше 60 вирусов, из которых 27 внесены в Международный каталог арбовирусов в качестве новых для науки. Изучена их роль в патологии, разработаны диагностические методы, описаны неизвестные ранее инфекции: лихорадка карельская, Иссык-Кульская, Тамды, долины Сырдарьи и др. Показано повсеместное распространение вирусов КЭ. Разработан прогноз возникновения эпидемических вспышек в различных ландшафтно-климатических поясах, создан атлас распространения вирусов в Северной Евразии. ≥120 статей Орден Ленина (1990 г.) Государственная премия РФ (2000 г.) 6 монографий	Львов Д.К., Лебедев А.Д. <i>Экология арбовирусов</i> . М.: Медицина; 1974. Цилинский Я.Я., Львов Д.К. <i>Популяционная генетика вирусов позвоночных</i> . М.: Медицина; 1977. Жданов В.М., Львов Д.К. <i>Экология возбудителей инфекций</i> . М.: Медицина; 1984. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. <i>Арбовирусы и арбовирусные инфекции</i> . М.: Медицина; 1989. Mahy B.W., L'vov D.K. <i>Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present</i> . Victoria–Paris–Berlin–Berkshire: Harwood Academic Publishers; 1993. Львов Д.К., ред. Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территорий Российской Федерации с целью противозидемической защиты населения и войск (Методические рекомендации). М.: МЗ РФ; 1993. L'vov D.K. Ecological sounding of the USSR territory for natural foci of arboviruses. <i>Sov. Med. Rev. Ser. E: Virology Reviews</i> . 1993; (5): 1–47. L'vov D.K. Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States). In: Beran G.W., ed. <i>Handbook of Zoonoses. Section B: Viral</i> . London–Tokyo: CRC Press; Boca Raton: AMArbar; 1994: 237–60. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. <i>Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации</i> . М.: Изд-во НИЦ ТМГ МЗ РФ; 2001.

Продолжение таблицы см. на стр. 177.

№ п/п	Направление	Где, когда	Основные результаты	Основные публикации
7.	Выявление значения птиц в циркуляции вирусов и их роли в трансконтинентальном переносе вирусов и возникновении чрезвычайных эпидемических ситуаций	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), Институт эволюционной морфологии и экологии животных им. А.Н. Северцова АН СССР, повсеместно в Северной Евразии 1970–1990	Создание Всесоюзного орнитологического комитета на базе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Доказана активная роль птиц в циркуляции в природных биомах Северной Евразии вирусов семейств <i>Togaviridae</i> (вирусы Синдбис, карельской лихорадки), <i>Flaviviridae</i> (вирусы клещевого энцефалита, Западного Нила, омской геморрагической лихорадки, Сокулук, Тюлений, японского энцефалита), <i>Reoviridae</i> (вирусы Кемерово, Баку, Охотский), <i>Bunyaviridae</i> (Крымской-Конго геморрагической лихорадки, Сахалин, Парамушир, Залива Терпения, Укунием), <i>Orthomyxoviridae</i> (грипп H1N1 и др. вирусы рода <i>Alphainfluenzavirus</i> , Тюлек (род <i>Quarantavirus</i>), Баткен, Дхори (род <i>Thogotovirus</i>). Показано участие птиц в трансконтинентальном переносе вирусов. 18 статей, монография	Львов Д.К., Ильичёв В.Д. Миграция птиц и перенос возбудителей инфекции. М.: Наука; 1979. Львов Д.К. Экология вирусов. <i>Вестник Академии медицинских наук СССР</i> . 1983; (12): 71–82. Львов Д.К. Значение новых и возвращающихся инфекций для биобезопасности. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2002; 47(5): 4–7. L'vov D.K., Timopheeva A.A., Chervonski V.I. New types of arbovirus foci in the northern part of the Soviet Far East and their relationships with other regions of the Pacific. In: <i>12th Pacific Science Congress</i> . Australia, Canberra; 1971. Львов Д.К. <i>Состояние и перспективы работы Национального Комитета по изучению вирусов, экологически связанных с птицами. Итоги 6-го симпозиума по изучению вирусов, экологически связанных с птицами</i> . М.; 1972: 3–11. L'vov D.K., Gromashevsky V.L., Sidorova G.A. Complex natural focus of arboviruses on Glinjanji Island, Baku archipelago, Azerbaidzhan S.S.R. <i>Acta Virologica</i> . 1973; (17): 155–8.
8.	Изучение циркуляции вирусов в высоких широтах (Арктика, Субарктика)	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), при широком международном сотрудничестве с исследователями из США, Канады, Норвегии, Австралии, Новой Зеландии 1970–1990	Установлены уникальные по интенсивности природные очаги около 20 вирусов из семейств <i>Flaviviridae</i> , <i>Bunyaviridae</i> , <i>Reoviridae</i> , экологически связанных с клещом <i>Ixodes uriae</i> и гнездовьями морских колониальных птиц. Вирусы имеют циркумполярное распространение, как в Северном, так и в Южном полушариях. 22 статьи	Львов Д.К., Тимофеева А.А., Лебедев А.Д. Очаги арбовирусов на севере Дальнего Востока. От гипотезы к экспериментальной проверке. <i>Вестник Академии медицинских наук СССР</i> . 1971; (2): 52–64. L'vov D.K., Gromashevsky V.L., Skvortsova T.M., Berezina L.K., Gofman Y.P., Zhdanov V.M. Arboviruses of high latitudes in the USSR. In: Kurstak E., ed. <i>Arctic and Tropical Arboviruses</i> . New York–San Francisco–London: Harcourt Brace Jovanovich Publ.: Academic Press; 1979: 21–38. L'vov D.K., Timopheeva A.A., Chervonski V.I., Tsyarkin Yu.M., Sazonov A.A., Pogrebenko A.G., et al. The ecology of Sakhalin virus in north of Far East of the USSR. <i>J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.</i> 1974; 18(1): 87–95.
9.	Экология вирусов гриппа. Анализ циркуляции вирусов гриппа А в природных биомах и их роль в возникновении эндемических (пандемических) штаммов	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), территория Северной Евразии Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН 1976–2003	На территории Северной Евразии выявлены природные очаги 15 из 17 известных вирусов (<i>Orthomyxoviridae</i> , <i>Alphainfluenzavirus</i>), экологически связанные с околотовными птицами, а также вирусы родов <i>Thogotovirus</i> и <i>Quarantavirus</i> , передаваемые иксодовыми и аргасовыми клещами. 56 статей	L'vov D.K. Circulation of influenza virus in natural biocenosis. In: Kurstak E., Maramorosh K., eds. <i>Viruses and Environment</i> . New York–San Francisco–London: Academic Press; 1978: 351–80. Львов Д.К. Эволюция возбудителей новых и возвращающихся инфекций в Северной Евразии – глобальные последствия. В кн.: Львов Д.К., Урываев Л.В., ред. <i>Изучение эволюции вирусов в рамках проблемы биобезопасности и социально-значимых инфекций</i> . М.; 2001: 5–16. Львов Д.К., Ямникова С.С., Федякина И.Т. Экология и эволюция вирусов гриппа в России (1979–2002). <i>Вопросы вирусологии</i> . 2004; 49(3): 17–24. L'vov D.K. Influenza A virus – a sum of populations with a common protected gene pool. <i>Sov. Med. Rev. Ser. E: Virology Reviews</i> . 1987; (2): 15–37.
10.	Панзоотический высоковирулентный вирус гриппа А/H5N1 (летальность у домашних птиц >90%, у людей >50%)	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), территория Северной Евразии, «НПО «НАРВАК» (Москва) Ветеринарные учреждения в европейской части России, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке 2003–2014	Установлены пути заноса разных генетических клонированных вируса на территорию страны и дальнейшего их распространения вплоть до г. Москвы. Представлена молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов. Сформулированы рекомендации по противоэпидемической защите, разработана вакцина для иммунизации сельскохозяйственных птиц. 19 статей	Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А – домашние животные – человек; причины и последствия проникновения на территорию России высоковирулентного вируса гриппа А/H5N1. <i>Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии</i> . 2006; 83(3): 96–100. L'vov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.-D., Matosovich M.N., eds. <i>Avian Influenza</i> . Basel: Karger; 2008: 41–58. Львов Д.К., Алипер Т.И., Дерябин П.Г., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В., Сергеев В.А. Вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная ФЛЮ ПРОТЕКТ Н5 и способ профилактики гриппа птиц. Патент РФ № 23503350; 2009.

Продолжение таблицы см. на стр. 178.

№ п/п	Направление	Где, когда	Основные результаты	Основные публикации
11.	Комплексное изучение эпидемической вспышки лихорадки Западного Нила на юге РФ с участием клиницистов, энтомологов, зоологов, вирусологов, сотрудников лечебной сети, санитарно-эпидемиологической и ветеринарной служб и охотничьих хозяйств	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), Астраханская обл., Волгоградская обл., Республика Калмыкия, Центральный НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Москва; Вирусологический центр «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск 2000–2006	Установлены пути циркуляции вируса в разных экосистемах, определены факторы риска заражения населения в верхнем, среднем и нижнем поясах дельты Волги. Выявлена роль разных видов комаров-переносчиков и птиц – резервуаров инфекции в различных биомах. Определено значение клещей <i>Hyalomma marginatum</i> в сохранении вируса в зимнем периоде и механизмах существования стабильных природных очагов. Установлены генотипы циркулирующих вирусов. Составлены рекомендации для защиты населения, туристов, сотрудников пограничной службы. 21 статья	L'vov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L., Kovtunov A.I., Prilipov A.G., Kinney R., et al. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. <i>Arch. Virol. Suppl.</i> 2004; (18): 85–96. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. <i>Вопросы вирусологии.</i> 2000; 47(2): 4–9. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю. и др. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (<i>Flaviviridae, Flavivirus</i>) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000–2002). <i>Вопросы вирусологии.</i> 2004; 49(3): 45–51. Львов Д.К., Писарев В.Б., Петров В.А., Григорьева Н.В. <i>Лихорадка Западного Нила по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999–2002 гг.</i> Волгоград; 2004.
12.	Изучение нового пандемического вируса гриппа А/Н1N1/pdm 09 (клиника, молекулярно-генетическая характеристика, эпидемиология, рецепторные особенности)	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва), 10 опорных баз в европейской части России, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН 2009 – по н.в.	Установлены пути заноса вируса на территорию РФ, закономерности распространения, механизм развития первичной вирусной пневмонии за счёт мутаций в рецепторсвязывающем сайте 222 гемоглобулина NA1 с заменой аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) или аспарагин (N), что ведёт к замене рецепторной специфичности эпителиальных клеток респираторного тракта с $\alpha 2-3$ и проникновению вируса в альвеолы и бронхиолы. 22 статьи	Львов Д.К. Грипп и другие новые и возвращающиеся инфекции Северной Евразии: глобальные последствия. В кн.: <i>Федеральный справочник «Здравоохранение России». Том 11.</i> М.; 2010: 209–19. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин А.Г., Колобухина Л.В. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А(Н1N1) pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. <i>Вопросы вирусологии.</i> 2012; 57(1): 14–20. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Бовин Н.В., Игнатьева А.В. и др. Особенности циркуляции вирусов гриппа и ОРВИ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в отдельных регионах России. <i>Вопросы вирусологии.</i> 2020; 65(6): 335–49.
13.	Изучение методом метагеномного анализа (next generation sequencing) молекулярно-генетических характеристик вирусов, изолированных в Северной Евразии, установление их таксономического статуса	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского (Национальный Исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Минздрав РФ) 48 Центральный НИИ Минобороны РФ, Сергиев Посад, Московская обл. Территория Северной Евразии 2012–2020	Проведено изучение генетических характеристик, молекулярной эволюции и таксономии более 80 зоонозных вирусов, изолированных в результате многолетнего мониторинга в различных экосистемах Северной Евразии. Показана циркуляция вирусов по крайней мере 17 родов, 8 семейств. Данные учтены в последнем международном издании таксономии вирусов. 18 статей	Львов Д.К., Борисевич С.В., Альховский С.В., Бурцева Е.И. Актуальные подходы к анализу вирусных геномов в интересах биобезопасности. <i>Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.</i> 2019; 8(2): 96–101. https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012 L'vov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. <i>Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology.</i> London: Academic Press, Elsevier; 2015. 1–440. Львов Д.К., Альховский С.В. Отряд <i>Bunyavirales</i> . <i>Проблемы особо опасных инфекций.</i> 2018; (4): 15–9. https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-15-19
14.	Обобщение и анализ современных данных по вирусологии и вирусным инфекциям человека и животных в России и в мире в руководствах по вирусологии	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России (Москва) 2007–2013	Книги являются наиболее полным современным руководством по общей и частной вирусологии. Дан анализ места вирусов в биосфере, экологии вирусов, их структурных компонентов, стратегии генома, взаимодействия с клетками. Описаны семейства вирусов, патогенных для человека и животных. Охарактеризованы противовирусный иммунитет, химиотерапия вирусных инфекций, лабораторная диагностика и иммунопрофилактика, вирусологические методы. Приведена информация по вирусным инфекциям человека (более 150) и животных (свыше 150)	Издание двух руководств по вирусологии: Львов Д.К., ред. <i>Медицинская вирусология.</i> М.: МИА; 2008. Львов Д.К., ред. <i>Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.</i> М.: МИА; 2013.

Продолжение таблицы см. на стр. 179.

№ п/п	Направление	Где, когда	Основные результаты	Основные публикации
15.	Проблема новых и возвращающихся инфекций (emerging and reemerging infections) в рамках национальной и глобальной биобезопасности. Теоретический анализ формирования популяционного генофонда вирусов с респираторной передачей, потенциально угрожающих биобезопасности	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского (Национальный Исследовательский Центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН (Минздрав РФ) 1951 – по н.в. (ВМА им. С.М., Кирова, Институт санитарии МО СССР, Институт мед. паразитологии и тропических инфекций, Институт полиомиелита АМН СССР, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, и др.)	Новые и возвращающиеся инфекции представляют постоянную угрозу безопасности прежде, сейчас и в будущем. Все вирусные инфекции человека в прошлом были зоонозами. Проведён анализ формирования популяционного генофонда вирусов с респираторной передачей, способных к возникновению пандемий, на разных этапах эволюции биосферы. Формирование генофонда вирусов <i>Poxviridae</i> тесно связано с эволюцией грызунов с палеоцена (75–70 млн лет назад). Возможен возврат натуральной оспы. Вирусы <i>Orthomyxoviridae</i> экологически связаны с птицами с мелового периода (135–110 млн лет назад). Вероятны катастрофические пандемии, вызванные вирусами гриппа А. Коронавирусы (<i>Coronaviridae</i>) взаимодействовали в основном с рукокрыльями с третичного периода (110–85 млн лет назад). Возможен переход COVID-19 в сезонную инфекцию. Очевидно, что чрезвычайные эпидемические ситуации, значительно более серьёзные, чем COVID-19, будут возникать и в обозримом будущем. Это требует объединения усилий, желателен на международном уровне, направленных на минимизацию последствий возникающих катаклизмов. Для этого необходимо проведение постоянного мониторинга популяционных генофондов потенциально опасных вирусов, прежде всего способных к респираторной передаче. 60 статей.	Львов Д.К. Экология вирусов. <i>Вестник Академии медицинских наук СССР</i> . 1983; (12): 71–82. Львов Д.К., Зверев В.В., Гинцбург А.Л., Пальцев А.М. Натуральная оспа – дремлющий вулкан. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2008; 53(4): 4–8. Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии – история изучения новых и возвращающихся инфекций. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2012; (S1): 5–20. L'vov D.K. Century of Virology. In: Mahy B.W., L'vov D.K., eds. <i>Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present</i> . Victoria–Paris–Berlin–Berkshire: Harwood Academic Publishers; 1993. Львов Д.К. Новые и вновь возвращающиеся вирусные инфекции. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2000; 45(1): 4–7. L'vov D.K., Shchelkanov M.Y., Prilipov A.G., et al. Evolution of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia (2005–08). <i>Avian Dis.</i> 2010; 54(1 Suppl.): 483–95. https://doi.org/10.1637/8893-042509-Review.1 Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика, ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (<i>Nidovirales</i> , <i>Coronaviridae</i> , <i>Coronavirinae</i> , <i>Betacoronavirus</i> , подрод <i>Sarbecovirus</i>): уроки эпидемии SARS-CoV. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2020; 65(1): 6–16. https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15 Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавируса (<i>Betacoronavirus</i> : <i>Coronaviridae</i>) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод <i>Sarbecovirus</i>), MERS-CoV (подрод <i>Merbecovirus</i>). <i>Вопросы вирусологии</i> . 2020; 65(2): 62–70. https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70 Львов Д.К., Гулюкин М.И., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. Формирование популяционного генофонда потенциально угрожающих биобезопасности зоонозных вирусов. <i>Вопросы вирусологии</i> . 2020; 65(5): 243–58. https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-1

Адрианов А.В. – академик РАН, вице-президент РАН, Москва.

Чехонин В.П. – академик РАН, вице-президент РАН, Москва.

Кульчин Ю.Н. – академик РАН, член Президиума РАН, Москва.

Макаров А.А. – академик РАН, член Президиума РАН, Москва.

Нигматуллин Р.Н. – академик РАН, член Президиума РАН, Москва.

Онищенко Г.Г. – академик РАН, член Президиума РАН, депутат Государственной Думы, Москва.

Тутельян В.А. – академик РАН, член Президиума РАН, Москва.

Акимкин В.Г. – академик РАН, ЦНИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Москва.

Алипер Т.И. – д.б.н., проф., ООО «Ветбиохим»; Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Альховский С.В. – д.б.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Баринский И.Ф. – д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Бовин Н.Ф. – д.х.н., проф., ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.

Борисевич С.В. – член-корр. РАН, 48 НИИ МО, Сергиев Посад.

Брико Н.И. – академик РАН, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва.

Бурцева Е.И. – д.м.н., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Василевич Ф.Н. – академик РАН, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва.

Габиров А.Б. – академик РАН, ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва.

Галегов Г.А. – д.б.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Галкина И.В. – к.м.н., НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток.

Герасименко Н.Ф. – академик РАН, депутат Государственной Думы, Москва.

Гинцбург А.Л. – академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Глотов А.Г. – д.б.н., проф., Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий РАН, Краснообск.

Гребенникова Т.В. – член-корр. РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Гулюкин М.И. – академик РАН, Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН, Москва.

Гурцевич В.Э. – д.м.н., проф., Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва.

Дятлов И.А. – академик РАН, ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск.

Ершов Ф.И. – академик РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Жирнов О.П. – член-корр. РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Забережный А.Д. – член-корр. РАН, Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Московская область.

Зайцева Н.В. – академик РАН, ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровья Роспотребнадзора, Пермь.

Зверев В.В. – академик РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.М. Мечникова, Москва.

Злобин В.И. – академик РАН, Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск.

Зуев В.А. – д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Ившина И.Б. – академик РАН, Институт экологии и генетики микроорганизмов УРО РАН, Пермь.

Ильин Л.А. – академик РАН, ФМБЦ им. А. И. Бурназяна, Москва.

Карганова Г.Г. – д.б.н., проф., ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва.

Колобухина Л.В. – д.м.н., проф., Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Кузин А.А. – д.м.н., Военно-медицинская Академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург.

Кутырев В.В. – академик РАН, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов.

Леонова Г.Н. – д.м.н., проф., НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток.

Лобзин Ю.В. – академик РАН, Детский научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА, Санкт-Петербург.

Логунов Д.Ю. – член-корр. РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Локтев В.Б. – д.б.н., проф., Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирск.

Лукашев А.Н. – член-корр. РАН, Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва.

Лукьянов С.А. – академик РАН, Российский Национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова, Москва.

Макаров В.В. – д.б.н., проф., Российский университет дружбы народов, Москва.

Макаров Ю.А. – академик РАН, Российский аграрный университет, Краснодар.

Малеев В.В. – академик РАН, ЦНИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Москва.

Манапова Э.Р. – д.м.н., проф., Казанский государственный медицинский университет, Казань.

Михайлов М.И. – член-корр. РАН, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.М. Мечникова РАН, Москва.

Недоспасов С.А. – академик РАН, Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН, Москва.

Нетёсов С.В. – член-корр. РАН, Новосибирский государственный университет, Новосибирск.

Рожнов В.В. – академик РАН, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва.

Свердлов Е.Д. – академик РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Москва.

Сидоров П.И. – академик РАН, Северный государственный медицинский университет, Архангельск.

Тотолян А.А. – академик РАН, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург.

Урываев Л.В. – член-корр. РАН, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва.

Флинт М.Б. – член-корр. РАН, Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Москва.

Чумаков П.М. – член-корр. РАН, Институт молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта РАН, Москва.

Чучалин А.Г. – академик РАН, Российский Национальный исследовательский университет им. Н.И. Пирогова, Москва.

Шестопалов А.М. – д.б.н., проф., Евразийский институт зоонозных инфекций ФИЦ ФТМ СО РАН, Новосибирск.

Щелканов М.Ю. – д.б.н., проф., НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, Владивосток.

Янковский Н.К. – академик РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва.

От Юбиляра

Выражаю искреннюю благодарность всем написавшим юбилейный материал. Эта поддержка поможет мне и дальше продвигаться по тернистой тропинке между светлым прошлым и ещё более, как я надеюсь, светлым будущим. Полагаю необходимым добавить следующее.

Я благодарен родителям и погибшему в Ржевской битве старшему брату за формирование гордости за свою страну, уважения к традициям населяющих её народов, чувства долга в принимаемых решениях.

Глубокая благодарность моим научным руководителям – академикам Е.Н. Павловскому, Ш.Д. Мошковскому, М.П. Чумакову, обеспечившим фундаментальную подготовку по биологии, количественной эпидемиологии, вирусологии и научивших из невозможного делать возможное.

Благодарность уникальному коллективу преподавателей Военно-медицинской Академии им. С.М. Кирова, давшей мне путёвку в жизнь.

Благодарность сотням соратников по всему Советскому Союзу, с которыми плечом к плечу в экспедициях и лабораториях проводилась, подчас с риском для жизни и здоровья, «охота» за новыми возбудителями с последующим их изучением.

Моя благодарность государственным структурам, которые обеспечивали возможность проведения широких исследований по биологической безопасности и минимизации последствий возникающих катаклизмов в результате появления новых и возвращающихся инфекций.

Следует помнить, что рождение вирусологии как науки неразрывно связано с нашим соотечественником – Дмитрием Иосифовичем Ивановским. Он 130 лет назад показал способность вируса табачной мозаики проходить через бактериальные фильтры, воспроизводя при этом инфекцию. 100-летию этого события был посвящён организованный нами симпозиум в Санкт-Петербурге (1992 г.) с вручением специально выбитых на Государственном монетном дворе памятных медалей более 60 ведущим вирусологам, представляющим мировую вирусологию. Имя Д.И. Ивановского в 1950 г. было присвоено созданному в 1944 г. Институту вирусологии АМН СССР. Институт служил кузницей кадров отечественных – и не только – вирусологов. В его стенах проводились исследования, внесшие существенный вклад в развитие мировой вирусологии. Директор института, академик Виктор Михайлович Жданов, был инициатором принятой на 11-й Генеральной сессии ВОЗ (1958 г.) Международной программы глобальной ликвидации натуральной оспы в мире. Он стоял у истоков создания Международного союза микробиологов (бактериологов, вирусологов, микологов) и заслуженно был избран его первым председателем.

Период становления вирусологии заканчивается в конце XIX – начале XX столетия описанием пер-

вого фильтрующегося агента болезни животных – ящура, сделанного германским исследователем Ф.А. Лёффлером (F.A. Loeffler), и установлением вирусной этиологии жёлтой лихорадки американскими военными медиками под руководством В. Рида (W. Reed). И далее, вплоть до наших дней, история развития вирусологии была связана с появлением новых и возвращающихся инфекций.

Эволюция вирусов неразрывно связана с эволюцией биосферы на протяжении 3,5 млрд лет на нашей планете и, возможно, во Вселенной. Все вирусные инфекции человека имеют зоонозное происхождение. Формирование таковых вирусов, способных вызывать эпидемии и пандемии благодаря респираторному пути заражения, происходило на протяжении сотен миллионов лет в процессе взаимодействия с популяционными генофондами их основных хозяев – птиц, грызунов, летучих мышей. И лишь на протяжении последних 2–5 (гоминиды) – 5 (гоминиды) млн лет появились первые возможности взаимодействия популяционных генофондов этих (и других) вирусов с популяционным генофондом предков человека. Эти возможности резко возросли 300–40 тыс. лет назад в связи с появлением первых цивилизаций и активным одомашниванием животных, что связано с транстаксонным переходом возбудителей зоонозов и формированием зооантропонозов и антропонозов. С этого периода возникли условия для развития эпидемий (эпизоотий) и пандемий (панзоотий). Данный процесс продолжается, и на наших глазах произошли эти превращения: вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ), пандемического гриппа A/H1N1/pdm2009, SARS-CoV-2 (возбудитель COVID-19). Причём формирование популяционного генофонда вируса SARS-CoV-2 продолжается в настоящее время. И, вероятно, через несколько лет вирус повысит контагиозность и снизит вирулентность. Описание вирусного разнообразия в природных биотопах и изучение с использованием современных молекулярно-генетических методов эволюционных процессов, приводящих к транстаксонному переходу вирусов и появлению новых вирусных инфекций, являются актуальными фундаментальными задачами. Эти исследования имеют и серьёзное прикладное значение в контроле появления новых и возвращающихся инфекций и минимизации последствий их возникновения. Очевидно, что чрезвычайные эпидемические (и эпизоотические) ситуации, значительно более серьёзные, чем COVID-19, могут возникать и в обозримом будущем.

Необходимо уже сейчас, желательно на международном уровне, вести подготовку (научную, организационную, социальную) к появлению такого рода катаклизмов с учётом огромного положительного и отрицательного опыта разных стран по борьбе с COVID-19 и другими пандемиями. Хотелось бы надеяться, что в будущем не произойдёт ослабления усилий в этом направлении в результате очередной «оптимизации».

*Честь имею,
ДК.*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Маркёры вирусного гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) у импортёрванных низших обезьян Старого Света

© Догадов Д.И.¹, [Корзая Л.И.¹], Кюрегян К.К.^{2,3}, Карлсен А.А.^{2,3}, Михайлов М.И.^{2,3}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

Введение. Вирусный гепатит E – зооантропонозное заболевание, встречающиеся у людей и различных животных, в том числе у обезьян. Оно вызывается вирусом гепатита E (ВГЕ) (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*: *Orthohepevirus A*), для которого на сегодняшний день описано 8 генотипов. Среди них штаммы генотипов 1 и 2 выделены от человека, 3 и 4 – от человека и животных, а 5–8 – только от животных. Основная опасность болезни заключается в том, что для вирусов 3, 4, 7 и 8 генотипических вариантов к настоящему времени доказана зоонозная передача человеку через заражённое мясо, кровь и молоко. Таким образом, возможно вовлечение обезьян в цепь передачи встречающегося у них ВГЕ.

Целью настоящей работы явилось изучение серологических и молекулярно-генетических маркёров вирусного гепатита E у низших обезьян (мартышковые, *Cercopithecoidea*), импортёрванных в Адлерский приматологический центр из различных регионов мира (Танзания, Вьетнам, Маврикий).

Материал и методы. Образцы фекалий ($n = 224$) и сывороток крови ($n = 395$) от макак яванских (*Macaca fascicularis*) и зелёных мартышек вервет (*Chlorocebus pygerythrus*) изучены с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ).

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте (51,8%) обнаружения антител (АТ) класса G к ВГЕ среди 5 групп макак яванских, импортёрванных из Вьетнама, с преобладанием высокорезактивных сывороток (84%). Обращает на себя внимание выявление АТ класса M у этих животных (10,4%) в одной из групп с большим количеством подобных сывороток (36,8%). Особую значимость представляет факт выделения в 2 группах макак яванских вирусной РНК (11,9 и 5,7%). Все выделенные от обезьян последовательности принадлежали к 4 генотипу ВГЕ.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что обезьяны (в частности, макаки яванские) могут служить естественным резервуаром ВГЕ генотипа 4 для человека. Это требует проведения в ряде ситуаций соответствующего комплекса противозидемических мероприятий.

Ключевые слова: вирус гепатита E; обезьяны; анти-ВГЕ (IgG, IgM); РНК ВГЕ

Для цитирования: Догадов Д.И., [Корзая Л.И.], Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И. Маркёры вирусного гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) у импортёрванных низших обезьян Старого Света. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 182-188. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-34>

Для корреспонденции: Догадов Дмитрий Игоревич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Участие авторов: Догадов Д.И. – написание текста, создание иллюстраций, обзор публикаций на тему статьи, статистическая обработка результатов; [Корзая Л.И.] – разработка дизайна исследования, написание и редактирование текста, обзор публикаций на тему статьи; Кюрегян К.К. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста; Карлсен А.А. – выполнение филогенетического и филодинамического анализа; Михайлов М.И. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации.

Поступила 03.12.2020
Принята к печати 27.04.2021

ORIGINAL ARTICLE

Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) in the imported Old World monkeys

Dmitriy I. Dogadov¹, Lidia I. Korzaya¹, Karen K. Kyuregyan^{2,3}, Anastasiya A. Karlsen^{2,3}, Mikhail I. Mikhailov^{2,3}

¹FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia;

²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

³FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

Introduction. Viral hepatitis E is a zoonoanthropotic disease that occurs in humans and various animals, including monkeys. It is caused by hepatitis E virus (HEV) (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*: *Orthohepevirus A*), for which 8 genotypes have been described to date. Among them, strains of genotypes 1 and 2 have been isolated from humans, strains of genotypes 3 and 4 from humans and animals, and strains of genotypes 5–8 from animals only. The main threat of the disease is associated with the documented zoonotic transmission of HEV genotypes 3, 4, 7, and 8, to humans through infected meat, blood and milk. Thus, monkeys could be involved in the transmission of HEV.

The aim of this work was to study serological and molecular genetic markers of HEV infection in strepsirrhines (Old World monkeys, *Cercopithecoidea*), imported to the Adler Primate Center from various regions of the world (Tanzania, Vietnam, Mauritius).

Material and methods. Fecal ($n = 224$) and blood serum samples ($n = 395$) from cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and vervet monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*) were examined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results and discussion. The data obtained show the high detection rate (51.8%) of IgG antibodies to HEV among 5 groups of cynomolgus monkeys imported from Vietnam, with a predominance of highly reactive sera (84%). High detection rate of IgM antibodies in these animals (10.4%) was observed, with the large number of IgM-reactive sera in one particular group of animals (36.8%). The fact of detection of HEV RNA in two groups of cynomolgus monkeys (11.9% and 5.7%) is of particular importance. All HEV sequences of isolated from monkeys belonged to genotype 4.

Conclusion. Our data indicate that monkeys (in particular, cynomolgus monkeys) can serve as a natural reservoir of HEV genotype 4 for humans. This requires an appropriate set of anti-epidemic measures in a number of situations.

Key words: hepatitis E virus (HEV); monkey; anti-HEV (IgG, IgM); HEV RNA

For citation: Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I. Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) in the imported Old World monkeys. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 182-188 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-34>

For correspondence: Dmitriy I. Dogadov, Ph.D. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Infection Virology, FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Information about the authors:

Dogadov D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>

Korzaya L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2259-5773>

Kyuregyan K.K., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

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

Contribution: Dogadov D.I. – writing of the text, making the figures, reviewing of publications, statistical analysis of the results; Korzaya L.I. – developing the research design, writing and editing of the text, reviewing of publications; Kyuregyan K.K. – developing the research design, reviewing publications, editing of the text; Karlsen A.A. – phylogenetic and phylodynamic analysis; Mikhailov M.I. – developing the research design, reviewing publications.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

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

The authors confirm compliance with the institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the organization.

Received 3 December 2020

Accepted 27 April 2021

Введение

Вирусный гепатит (ВГ) Е – острое высококонтагиозное заболевание, широко распространённое во многих тропических и субтропических странах, где регистрируется как в виде эпидемий, так и спорадически. Особенность его заключается в том, что среди всех наиболее известных ВГ (А, В, С, D, Е, F и G) только

гепатит Е является зоонозным и вызывает высокую смертность среди беременных женщин [1–4].

Возбудитель инфекции – ВГЕ относится к семейству *Hepeviridae*, роду *Orthohepevirus*, который, в свою очередь, включает 4 вида: инфицирующих птиц (*Aves*) (*Orthohepevirus B*); грызунов (*Rodentia*), землеройкообразных (*Soricomorpha*) и плотояд-

ных (*Carnivore*) (*Orthohepevirus C*); летучих мышей (*Microchiroptera*) (*Orthohepevirus D*), а также вид *Orthohepevirus A*. Для последнего описано 8 генотипов, представители которых инфицируют человека (ВГЕ-1, -2, -3, -4 и 7) [5, 6]; обезьян (*Haplorhini*) [7], кроликов (*Oryctolagus*), мангустов (*Herpestes*) и оленей (*Cervidae*) (ВГЕ-3); свиней (*Suidae*) (ВГЕ-3 и 4); кабанов (*Sus*) (ВГЕ-3, -4, -5 и 6); яков (*Bos*) (ВГЕ-4) и верблюдов (*Camelus*) (ВГЕ-7 и 8) [5, 6, 8]. Вирион возбудителя – сферическая необолочечная частица размером ~27–34 нм. Вирусный геном представлен одноцепочечной (+)РНК длиной ~7,2 т.п.н. РНК состоит из коротких 5'- и 3'-нетранслируемых участков (*untranslated regions*, *UTRs*), образующих «шпильчатые» структуры из ~58–68 п.н. соответственно, а также 3 частично перекрывающихся открытых рамок считывания (ОРС) [6, 9, 10].

Многие виды обезьян рода макак (макак резусы (*Macaca rhesus*; *Macaca mulatta*)); яванские (*Macaca fascicularis*), индийские (*Macaca radiata*), тайванские (*Macaca cyclopis*) и японские (*Macaca fuscata*) макаки; макаки лапундеры (*Macaca nemestrina*) чувствительны к ВГЕ [11–16]. Однако несмотря на то, что у этих животных обнаружены антитела к возбудителю, к настоящему времени имеются только 2 работы, посвящённые генотипированию этого вируса у обезьян. Первая из них – публикация Н. Yamamoto с соавт., в которой представлены данные о длительной персистенции ВГЕ-инфекции у японских макак с выделением патогена. Последовательность изолированного штамма была зарегистрирована в GenBank (№ JQ026407), а её филогенетический анализ показал принадлежность к 3 генотипу ВГЕ [7]. В другой работе F. Yang с соавт. описано выделение вируса 4 генотипа от 11 макак резусов (GenBank № LC428039–49) [17]. На сегодняшний день для штаммов с генотипическими вариантами 3, 4, 7 и 8 доказана зоонозная передача человеку через заражённое мясо, кровь и молоко. Поэтому обезьяны, поступающие из-за рубежа (особенно из мест естественного обитания), несмотря на удовлетворительный соматический статус, могут представлять опасность как для окружающих животных, так и для контактирующих с ними людей.

Кроме того, импортированные обезьяны могут быть подвержены вирусным заболеваниям, распространённым среди рождённых в питомнике животных. В связи с этим определение специфических маркёров вирусных инфекций у таких особей является важным и необходимым этапом в период их содержания на карантине [14, 16].

Целью настоящей работы явилось изучение серологических и молекулярно-генетических маркёров ВГЕ у низших обезьян Старого Света (мартышковые, *Cercopithecoidea*), импортированных из различных регионов мира в Адлерский приматологический центр.

Материал и методы

Исследование проводилось на базе лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии» Минобрнауки России (НИИ МП),

а также лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». В работе использованы сыворотки крови и фекальные образцы, собранные в период 2014–2018 гг. Всего исследовано 224 фекальных образца и 305 сывороток крови макак яванских, доставленных в питомник НИИ МП из вьетнамского питомника в 2015–2018 гг. Также подвергнуто исследованию 40 сывороток крови зеленых мартышек вервет (*Chlorocebus pygerythrus*), поступивших из мест естественного обитания (Танзания) в 2014 г., и 50 аналогичных сывороток макак яванских статуса SPF (*specified pathogen free* – свободные от специфицированной патогенной флоры) из Маврикия (2016 г.). Фекальные образцы собирали на 10, а сыворотки крови – на 23 сут после прибытия животных.

Антитела (АТ) к ВГЕ (анти-ВГЕ) определяли посредством иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия). Они неоднократно испытывались в сравнительном аспекте при изучении иммуноглобулинов обезьян и признаны наиболее подходящими для выявления у них анти-ВГЕ АТ. Кроме того, результаты определения показателя оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) биоматериала макак яванских SPF свидетельствуют о том, что различие значения критической ОП (ОП_{крит}) для человека и представителей этого вида незначительно и количество положительных образцов достоверно. Данные ИФА учитывали на спектрофотометре ImmunoChem-2100 («Интермедика Сервис», США); полученные величины выражали в единицах ОП₄₅₀.

Выявление РНК ВГЕ проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС2) вируса. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров – 5'-AAU TAT GCM CAG TAC CGG GTT-G-3' (прямой) и 5'-CCC TTA TCC TGC TGA GCA TTC TC-3' (обратный); внутренняя пара – 5'-GTU ATG YTU TGC ATA CAT GGC T-3' (прямой) и 5'-AGC CGA CGA AAT YAA TTC TGT C-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР выполняли совмещённо с ОТ, условия реакции были следующими: 42 °С – 1 ч, далее 5 мин – 94 °С (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94 °С – 30 с, 45 °С – 30 с, 72 °С – 45 с, финальная элонгация 72 °С – 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР – 35 циклов: 94 °С – 30 с, 45 °С – 30 с, 72 °С – 45 с, финальная элонгация 72 °С – 7 мин. Полученные ПЦР-продукты, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в Трис-боратном электродном буфере (ТВЕ). Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 п.н.

Для подтверждения специфичности детекции РНК возбудителя и последующего филогенетического анализа выявленных его вариантов осуществляли прямое секвенирование амплифицированных фрагментов

вирусного генома. Продукт ПЦР размером 350 п.н. вырезали из геля и выделяли из агарозы при помощи набора QIA Quick Gel Extraction kit («Qiagen», Германия). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента проводили на автоматическом секвенаторе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием набора «Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («ThermoFisher Scientific», США). Выравнивание всех нуклеотидных последовательностей ВГЕ выполняли с помощью программного обеспечения MEGA v7.0.18.

Полученные в результате экспериментов данные подвергали статистической обработке по общепринятым методикам в программе Microsoft Excel 2010. Обработка включала: определение средних показателей величин; вычисление среднего квадратического отклонения; расчёт 95% доверительного интервала (ДИ); выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с при-

менением точного теста χ^2 (различия оценивали как достоверные при вероятности 95% – $p \leq 0,05$).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 135 от 25.05.2014).

Результаты

В таблице в сравнительном аспекте представлены суммарные данные, полученные при обследовании содержащихся в карантине обезьян из различных регионов (Танзания, Маврикий, Вьетнам) на наличие маркёров ВГЕ-инфекции. Всего проверено 395 сывороток крови и 224 фекальных образца.

Видно, что анти-ВГЕ класса G обнаружены у 40% животных, тогда как маркёры «свежей» (анти-

Частота обнаружения маркёров вируса гепатита E у обезьян, импортированных в питомник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»

Detection of hepatitis E virus markers in monkeys imported into the apery of the FSBRI «Research Institute of Medical Primatology»

Вид и происхождение обезьян Monkeys' species and origin	Поступление обезьян Data of monkeys' arrival	Возраст (диапазон, $M \pm m$) Age (range, $M \pm m$)	Маркёры ВГЕ HEV markers				
			Антитела IgG IgG antibodies		Антитела IgM IgM antibodies		PHK ВГЕ* HEV RNA*
			IgG*	ОП ₄₅₀ ** OD ₄₅₀ **	IgM*	ОП ₄₅₀ ** OD ₄₅₀ **	
Макаки яванские Супомолгус monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>) (Вьетнам) (Vietnam)	08.11.2015	4,1–8,8 (6,0 ± 0,1)	23/40 (57,5 ± 7,8)	1,008 ± 0,086	3/40 (7,5 ± 4,1)	0,521 ± 0,101	0/9 (0)
	05.08.2016	3,6–6,6 (4,9 ± 0,1)	0/45 (0)	н.и. n.i.	0/45 (0)	н.и. n.i.	0/10 (0)
	22.04.2017	3,6–8,3 (6,1 ± 0,2)	29/44 (65,9 ± 7,1)	1,384 ± 0,073	5/44 (11,3 ± 4,8)	0,275 ± 0,056	0/10 (0)
	11.05.2017	4,0–8,3 (5,6 ± 0,2)	25/44 (56,8 ± 7,5)	1,517 ± 0,072	19/44 (43,2 ± 7,5)	0,906 ± 0,154	2/35 (5,7 ± 3,9)
	04.08.2017	0,7–2,6 (1,7 ± 0,1)	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.	5/42 (11,9 ± 4,9)
	14.02.2018	1,7–2,5 (1,9 ± 0,1)	63/92 (68,5 ± 4,8)	1,393 ± 0,033	9/92 (9,8 ± 3,1)	0,462 ± 0,091	0/97 (0)
09.06.2018	3,2–4,9 (3,9 ± 0,1)	18/40 (45,0 ± 7,9)	1,515 ± 0,093	4/40 (10,0 ± 4,7)	0,529 ± 0,156	0/10 (0)	
Макаки яванские SPF Супомолгус monkeys SPF (<i>Macaca fascicularis</i>) (Маврикий) (Mauritius)	17.09.2016	4,8–9,6 (8,1 ± 0,2)	0/50 (0)	0	0/50 (0)	0	н.и. n.i.
Зеленые маргышки вервет Vervet monkeys (<i>Chlorocebus pygerythrus</i>) (Танзания) (Tanzania)	01.06.2014	3–5 –	0/40 (0)	0	0/40 (0)	0	н.и. n.i.
Всего Total			158/395 (40,0 ± 2,5)	1,377 ± 0,030	40/395 (10,1 ± 1,5)	0,690 ± 0,089	7/224 (3,1 ± 1,2)

Примечание. * – число позитивных/число обследованных особей (% ± m); ** – среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) ± среднее арифметическое среднеквадратичного отклонения; ВГЕ – вирус гепатита E; SPF – свободные от специфицированной патогенной флоры; н.и. – не исследованные.

Note. * number of positive/number of examined individuals (% ± m); ** mean value of optical density at 450 nm (OD₄₅₀) ± arithmetic mean of standard deviation; HEV, hepatitis E virus; SPF, specified pathogen free; n.i. not investigated.

ВГЕ IgM) и острой (РНК вируса) инфекции определялись достоверно ($p \leq 0,05$) реже (10,1 и 3,1% соответственно). Следует отметить, что индикаторы ВГЕ выявлены только среди импортированных из Вьетнама макак яванских, которые поступали в питомник отдельными партиями с 2015 по 2018 г. Всего обследовано 7 партий особей данного вида; серологические признаки ВГЕ-инфекции выявлены в 5 из 7 обследуемых групп. Анти-ВГЕ IgG обнаруживались с частотой от 45 до 68,5%, а средняя арифметическая величины реактивности положительных образцов была равной 1,377 ОП₄₅₀. Доля высокореактивных сывороток ($>1,000$ ОП₄₅₀) варьировала от 61 до 90% и в целом составила 84%.

Частота выявления анти-ВГЕ IgM была в 4 раза (10,1%) меньше ($p \leq 0,05$) и также варьировала в группах от 7,5 до 43,2%. Высокореактивные сыворотки (в количестве 36,8%) обнаружены только у 1 партии животных, поступивших 11.05.2017. В остальных группах подобные сыворотки отсутствовали.

Особого внимания заслуживает факт выделения вирусной РНК, которая детектировалась в фекальных образцах 7 (3,1%) из 224 обследованных макак яванских (рисунок). Позитивные особи присутствовали в 2 группах обезьян, привезённых 11.05.2017 и 04.08.2017. В группе макак яванских, доставленных 11.05.2017, средний возраст составил 5,6 года (4,0–8,3). Анти-ВГЕ IgG имелись у 25 (56,8%), а анти-ВГЕ IgM – у 19 (43,2%) из 44 животных. РНК ВГЕ в этой группе детектирована у 2 (5,7%) из 35 особей. Средний возраст обезьян, импортированных 04.08.2017, был равен 1,7 года (0,7–2,6), а РНК вируса выявлена у 5 (11,9%) из 42 обследованных. Отсутствие проб сывороток крови в этой группе не позволило провести исследование на наличие серологических маркёров ВГЕ-инфекции.

ВГЕ-позитивные животные не имели каких-либо клинических симптомов заболевания и имели удовлетворительный общесоматический статус. Показатели общего анализа крови также были в пределах нормы.

На рисунке в качестве примера представлена электрофореграмма с результатами выявления РНК возбудителя у 3 макак яванских с номерами 44196 (образец № 2), 44217 (образец № 8) и 44226 (образец № 10).

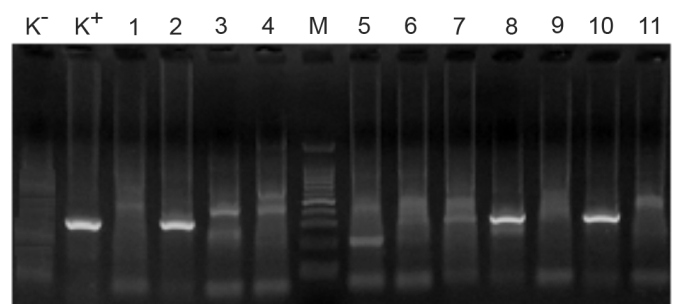
Специфичность детекции РНК ВГЕ всех 7 положительных образцов подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов ORC1 и ORC2 величиной 711 и 273 п.н. соответственно. Поиск гомологов заданной последовательности нуклеотидов BLAST (basic local alignment search tool) в базе данных NSBI (National Center for Biotechnology Information) подтвердил принадлежность данных образцов к участкам генома ВГЕ ORC1 и ORC2. Филогенетический анализ нуклеотидных фрагментов показал, что 7 последовательностей обнаруженных у обезьян ВГЕ принадлежат к 4 генотипу. Все последовательности вируса, выделенные от макак яванских, были депонированы в GenBank (№ MK604188–94 для ORC1 и № MG387126–28, MG590378–81 для ORC2).

Обсуждение

В настоящей работе нами охарактеризовано наличие серологических и молекулярно-генетических маркёров ВГЕ у обезьян, импортированных из Вьетнама. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте (51,8%) обнаружения АТ класса G к ВГЕ-инфекции среди 5 обследованных групп животных. Вместе с тем IgM-антитела выявлялись достоверно ($p \leq 0,05$) реже – у 10,1% особей. Это подтверждает литературные данные, согласно которым анти-ВГЕ обнаруживались только у представителей рода макак [7, 17], а также результаты серологического мониторинга возбудителя среди обезьян Адлерского питомника, регулярно проводимого с 1999 г.; до настоящего времени автохтонных ВГЕ-изолятов не выявлено [14, 18].

При изучении молекулярно-генетических маркёров ВГЕ-инфекции у 7 поступивших из Вьетнама макак яванских (3,1%) нами обнаружена РНК вируса, а все последовательности принадлежали к 4 генотипу. Согласно имеющейся информации это первый зарегистрированный случай инфекции, вызванной ВГЕ-4, у особей рассматриваемого вида. Кроме того, все автохтонные последовательности вируса из России принадлежат к генотипу 3; единственный обнаруженный в РФ штамм ВГЕ-4 был импортирован с территории острова Корсика (Франция) в 2012 г. [19].

Ранее нами также проведён дополнительный филодинамический анализ, в соответствии с которым средний возраст вирусных последовательностей, выделенных от макак яванских, составил 5,2 года (ДИ 3,47–10,15). Это заставляет предположить, что



Электрофореграмма с результатами выявления РНК вируса гепатита E у обезьян, импортированных из Вьетнама.

K⁻ – контрольный отрицательный образец;

K⁺ – контрольный положительный образец;

M – маркёры молекулярных масс (сверху вниз: 1500, 1000, 900, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100 пар нуклеотидов);

1–11 – исследуемые образцы.

Примечание. Положительные образцы от яванских макак: № 2 (44196), № 8 (44217) и № 10 (44226).

Electrophoregram with the results of hepatitis E virus RNA detection in monkeys imported from Vietnam.

K⁻, negative control sample;

K⁺, positive control sample;

M, molecular weight markers (from top to bottom: 1500, 1000, 900, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100 base pairs); 1–11, tested samples.

Note. Positive samples from cynomolgus monkeys: # 2 (44196), # 8 (44217), and # 10 (44226).

ВГЕ-инфекция не явилась результатом распространения от одного источника инфекции, а, вероятнее всего, стабильно циркулирует среди представителей данного вида [20, 21].

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что обезьяны (в частности, макаки яванские) могут служить естественным резервуаром ВГЕ генотипа 4. Указанный факт требует присутствия эпидемиологической настороженности и проведения в ряде ситуаций (в том числе при содержании этих животных, импортированных из естественных мест обитания, в условиях питомника) соответствующего комплекса противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

- Bradley D.W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46(2): 442–61. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072409>
- Matsuda H., Okada K., Takahashi K., Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(6): 944. <https://doi.org/10.1086/378074>
- Spina A., Lenglet A., Beversluis D., de Jong M., Vernier L., Spencer C., et al. A large outbreak of Hepatitis E virus genotype 1 infection in an urban setting in Chad likely linked to household level transmission factors, 2016–2017. *PLoS One.* 2017; 12(11): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188240>
- Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S., et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(1): 169–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-169>
- Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 537–42. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- Nan Y., Zhang Y.J. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 1419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419>
- Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., et al. Hepatitis E Virus Outbreak in Monkey Facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
- Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
- Mushahwar I.K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4): 646–58. <https://doi.org/10.1002/jmv.21116>
- Guu T.S.Y., Liub Z., Ye Q., Mata D.A., Li K., Yin C., et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(31): 12992–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106>
- Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120070>
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>
- Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Маркеры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180>
- Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of Hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with

- this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
- Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Лазарева И.Я. Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника обезьян. *Вопросы вирусологии.* 2007; 52(1): 36–40.
 - Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
 - Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркеры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии».* Сочи; 2011: 79–88.
 - Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Исаева О.В. Случай завоза вируса гепатита Е 4 генотипа в Россию. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2016; 93(3): 64–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-3-64-69>
 - Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
 - Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Исаева О.В., Карлсен А.А., Потёмкин И.А., и др. Вирусные гепатиты: прогнозы и проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2019; 9(1): 71–80. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.1.71-80>

REFERENCES

- Bradley D.W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46(2): 442–61. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072409>
- Matsuda H., Okada K., Takahashi K., Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(6): 944. <https://doi.org/10.1086/378074>
- Spina A., Lenglet A., Beversluis D., de Jong M., Vernier L., Spencer C., et al. A large outbreak of Hepatitis E virus genotype 1 infection in an urban setting in Chad likely linked to household level transmission factors, 2016–2017. *PLoS One.* 2017; 12(11): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188240>
- Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S., et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(1): 169–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-169>
- Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 537–42. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- Nan Y., Zhang Y.J. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 1419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419>
- Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., et al. Hepatitis E Virus Outbreak in Monkey Facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
- Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
- Mushahwar I.K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4): 646–58. <https://doi.org/10.1002/jmv.21116>
- Guu T.S.Y., Liub Z., Ye Q., Mata D.A., Li K., Yin C., et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(31): 12992–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106>
- Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120070>
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>

13. Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for Hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
14. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Dogadov D.I., Lapin B.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Markers of hepatitis E among the population of the Greater Sochi and in monkeys of the Adler primate center [*Markery gepatita E u naseleniya Bol'shogo Sochi i obez'yan Adlerskogo primatologicheskogo tsentra*]. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180> (in Russian)
15. Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of Hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
16. Korzaya L.I., Lapin B.A., Keburiya V.V., Lazareva I.Ya. The detection rate of hepatitis E virus antibodies in the personnel serving the macaques of the Adler apery [*Chastota vyyavleniya antitel k virusu gepatita E u obsluzhivayushchego personala i u makak Adlerskogo pitomnika obez'yan*]. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(1): 36–40. (in Russian)
17. Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
18. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharenko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd international scientific conference «Fundamental and applied aspects of Medical Primatology» [Markery virusnykh infektsiy u laboratornykh primatov. V kn.: Materialy vtoroy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoj primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. (in Russian)
19. Mikhailov M.I., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V. A case of import of genotype 4 hepatitis E virus into Russia [*Sluchay zavoza virusa gepatita E 4 genotipa v Rossiyu*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; 93(3): 64–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-3-64-69> (in Russian)
20. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
21. Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Malinnikova E.Yu., Isaeva O.V., Karlsen A.A., Potemkin I.A., et al. Viral hepatitis: Prognosis and Problems [*Virusnye gepatity: prognozy i problemy*]. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2019; 9(1): 71–80. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.1.71-80> (in Russian)



Моноклональные антитела к гемагглютинуину вируса гриппа A/H7N3 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

© Сорокин Е.В.¹, Царёва Т.Р.¹, Руднева И.А.², Тимофеев Б.И.², Ляшко А.В.², Баланова М.А.², Артёмов Е.К.², Гребенникова Т.В.², Тимофеева Т.А.²

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

²Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Введение. Варианты вируса гриппа (ВГ) А подтипа Н7, как и Н5, обладают высоким пандемическим потенциалом. Однако имеющиеся сведения об антигенной структуре гемагглютинаина (НА) Н7 значительно уступают по объёму аналогичным данным в отношении НА подтипа Н5.

Цели исследования – разработка и характеристика панели моноклональных антител (МКАТ), направленных к НА подтипа Н7 возбудителя гриппа А.

Материал и методы. Культуру вируса накапливали в 10-дневных куриных эмбрионах. Очистку и концентрацию вирусных частиц, определение концентрации белка, получение МКАТ и асцитных жидкостей, реакцию гемагглютинации (РГА) и реакцию торможения гемагглютинации (РТГА), оценку активности антител в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА), а также определение изотипов МКАТ и реакцию нейтрализации (РН) проводили стандартными способами.

Результаты. Полученные МКАТ к штамму A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) исследованы в РТГА с набором штаммов разных лет выделения, относящихся к различным эволюционным группам. Во всех случаях антитела обладали сниженной реакционной способностью по сравнению с вирусом-иммуногеном. Выявлено перекрёстное взаимодействие МКАТ 9E11 и 9G12 в РТГА с ВГ А/Н15.

Обсуждение. Возбудитель гриппа А с НА подтипа Н7 может послужить потенциальным агентом будущей пандемии. Разработка панели МКАТ к НА этого подтипа представляется актуальной задачей как для ветеринарии, так и для общественного здравоохранения.

Заключение. Полученные нами антитела могут найти применение не только для эпитопного картирования НА подтипа вируса Н7 (которое к настоящему времени недостаточно разработано) и в качестве реагентов тест-систем, но и с целью определения общих («универсальных») эпитопов в данной молекуле у разных штаммов Н7.

Ключевые слова: вирус гриппа А; гемагглютинин Н7; моноклональные антитела; филогенетические деревья

Для цитирования: Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Руднева И.А., Тимофеев Б.И., Ляшко А.В., Баланова М.А., Артёмов Е.К., Гребенникова Т.В., Тимофеева Т.А. Моноклональные антитела к гемагглютинуину вируса гриппа А/Н7N3 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 189-197. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45>

Для корреспонденции: Тимофеева Татьяна Анатольевна, заведующая лабораторией физиологии вирусов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Участие авторов: Сорокин Е.В. – получение и характеристика моноклональных антител, сбор данных, интерпретация результатов работы; Царёва Т.Р. – получение и характеристика моноклональных антител; Руднева И.А. – культивирование вируса гриппа, проведение иммунологических реакций; Тимофеев Б.И. – построение и сравнительный анализ филогенетических деревьев; Ляшко А.В. – проведение иммунологических реакций; Баланова М.А. – характеристика моноклональных антител; Артёмов Е.К. – характеристика моноклональных антител; Гребенникова Т.В. – написание текста, консультативная помощь; Тимофеева Т.А. – идея, концепция и дизайн исследования, сбор данных, интерпретация результатов работы, написание текста, утверждение окончательной версии статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Благодарности. Авторы выражают благодарность ведущему инженеру ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Е.Б. Тимофеевой за проведение сравнительного анализа филогенетических деревьев.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Поступила 01.02.2021

Принята к печати 11.05.2021

Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

Evgeniy V. Sorokin¹, Tatiana R. Tsareva¹, Irina A. Rudneva², Boris I. Timofeev², Alexander V. Lyashko², Marina A. Balanova², Evgeny K. Artemov², Tatyana V. Grebennikova², Tatiana A. Timofeeva²

¹FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;

²D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Variants of influenza virus A/H7 have the same high pandemic potential as A/H5. However, the information about the antigenic structure of H7 hemagglutinin (HA) is considerably inferior in quantitative terms to similar data for H5 HA.

The **aims** of the study were development and characterization of the monoclonal antibodies (MAbs) panel for HA subtype H7 of the influenza A virus.

Material and methods. Viruses were accumulated in 10-day-old chicken embryos. Purification and concentration of the virus, determination of protein concentration, preparation of MAbs and ascitic fluids, hemagglutination and hemagglutination inhibition (HI) tests, assessment of antibodies' activity in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as well as determination of MAbs isotypes and neutralization reaction (NR) were carried out by standard methods.

Results. The obtained MAbs to A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) strain were studied in HI test with a set of strains of different years of isolation belonging to different evolutionary groups. MAbs had a reduced reactivity compared to the immunogen-virus for all the studied strains. Cross-interaction of MAbs 9E11 and 9G12 in HI test with influenza A/H15 virus has been observed.

Discussion. Influenza A agent with H7 HA variant could serve as a potential cause of a future pandemic. Development of the MAbs panel for subtype H7 HA is an urgent task for both veterinary medicine and public health.

Conclusion. The obtained MAbs can be used not only for epitope mapping of the H7 HA molecule (currently insufficiently studied) and as reagents for diagnostic assays, but also for determining common («universal») epitopes in HA of different strains of this subtype.

Key words: *influenza A virus; H7 hemagglutinin; monoclonal antibodies; phylogenetic trees*

For citation: Sorokin E.V., Tsareva T.R., Rudneva I.A., Timofeev B.I., Lyashko A.V., Balanova M.A., Artemov E.K., Grebennikova T.V., Timofeeva T.A. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). Problems of Virology (*Voprosy Virusologii*). 2021; 66(3): 189-197 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45>

For correspondence: Tatiana A. Timofeeva, Head of the Laboratory of Virus Physiology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: timofeeva.tatyana@inbox.ru

Information about the authors:

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

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

Rudneva I.A., <https://orcid.org/0000-0001-5000-2547>

Timofeev B.I., <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Lyashko A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5714-9461>

Balanova M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4151-4123>

Artemov E.K., <https://orcid.org/0000-0002-6786-6357>

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

Timofeeva T.A., <http://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Contribution: Sorokin E.V. – obtaining and characterization of monoclonal antibodies, data collection, interpretation of research results; Tsareva T.R. – obtaining and characterization of monoclonal antibodies; Rudneva I.A. – cultivation of the influenza virus, conducting of immunological reactions; Timofeev B.I. – design and comparative analysis of phylogenetic trees; Lyashko A.V. – conducting immunological reactions; Balanova M.A. – characterization of monoclonal antibodies; Artemov E.K. – characterization of monoclonal antibodies; Grebennikova T.V. – writing of the text, consultations; Timofeeva T.A. – idea, research concept and design, data collection, interpretation of research results, writing of the text, approval of the final version of the article.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

The authors express their gratitude to the Leading Engineer of FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» E.B. Timofeeva, for conducting a comparative analysis of phylogenetic trees.

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

Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia.

Received 01 February 2021

Accepted 11 May 2021

Введение

Вирус гриппа (ВГ) с гемагглютинином (НА) подтипа Н7 впервые идентифицирован в 1955 г. по модели штамма A/chicken/Brescia/1/1902 (H7N7), ставшего причиной крупной эпизоотии в Европе в начале XX в. [1]. Спустя столетие на европейской территории произошла ещё одна вспышка, вызванная вирусом птиц H7N7, при которой были также случаи поражения людей [2, 3]. Затем с февраля 2013 г., а именно в начале сезона весенней миграции птиц, в Китайской Народной Республике (КНР) возникали спорадические эпизоды заболевания в человеческой популяции, связанные с ВГ птиц подтипа H7N9. Источником большинства подобных случаев были инфицированные домашние птицы, переносившие инфекцию бессимптомно. Массовая гибель птиц тогда не была зарегистрирована, однако выявлено несколько семейных очагов заболевания у людей, все члены семей которых могли контактировать с птицами. Под наблюдением специалистов находились около 2 тыс. человек, имевших контакты с заболевшими, в результате чего была показана ограниченная способность ВГ птиц А (H7N9) передаваться воздушно-капельным путём от человека к человеку. Повышенное сродство этого патогена к клеточным рецепторам «человеческого» типа тоже подтверждает подобную возможность [4]. Таким образом, варианты ВГ А подтипа Н7, как и «печально известного» Н5, также обладают высоким пандемическим потенциалом. Между тем сведения об антигенной структуре гемагглюнина (НА) Н7 значительно уступают по объёму аналогичным данным в отношении подтипа Н5.

Изложенные факты определяют значимость исследования эволюционной изменчивости и антигенной структуры молекулы НА подтипа Н7. Достижению этой цели может способствовать использование специфичных моноклональных антител (МКАТ). Подобные антитела успешно применяют для типирования ВГ посредством таких простых и доступных иммунологических методов, как реакция нейтрализации (РН) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА). МКАТ, полученные к НА Н7, применяются с целью эпитопного картирования этой молекулы изолята А/Н7N9, выделенного в КНР [5–7]. Они также служат ценным исследовательским инструментом в процессе антигенной характеристики новых вирусных штаммов, что при сопоставлении с данными генетического анализа позволяет выявить закономерности эволюционной изменчивости ВГ.

Целями настоящей работы явились разработка и характеристика панели МКАТ, направленных к молекуле НА подтипа Н7 возбудителя гриппа А.

Материал и методы

Получение аллантоисной жидкости, содержащей вирус гриппа. Культивирование ВГ А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), А/FPV/Rostock/34 (H7N1), А/FPV/Weybridge (H7N7), А/Anhui/1/2013 (H7N9), А/Shanghai/2/2013 (H7N9), А/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), А/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)

[8], А/avian/NJ/273874/2003 (H7N2), А/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1), А/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3) и А/duck/Australia/341/83 (H15N8) проводили в аллантоисной полости куриных эмбрионов согласно методическим рекомендациям ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» (НИИ гриппа) Минздрава России [9].

Очистка и концентрация вируса. Вирусные частицы из содержащей ВГ А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) аллантоисной жидкости осаждали ультрацентрифугированием при 50 000 g в течение 2 ч и суспендировали в малом количестве (1 мл) 10 mM Трис-ЭДТА буфера, pH 7,2 (STE). После этого выполняли очистку вируса через градиент 20–60% сахарозы ультрацентрифугированием при 100 000 g в течение 2,5 ч с последующим осаждением вирусных частиц из зоны 36–40% сахарозы на дно при 120 000 g на протяжении 1 ч. Осадок ресуспендировали в буфере STE. Полученную суспензию хранили до исследования в замороженном состоянии при –75 °С.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка оценивали с помощью набора «BCA™ Protein Assay Kit» («Pierce», США); реакцию проводили в соответствии с инструкцией производителя. Результаты учитывали при длине волны 560 нм на спектрофотометре Multiskan FC («ThermoFisher Scientific», Финляндия). Значения концентрации белка в исследуемых пробах рассчитывали по калибровочной кривой, линейный участок которой соответствовал интервалу концентраций 0,05–2,0 мг/мл по белку.

Получение моноклональных антител. МКАТ к вирусу А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) получали по модифицированному методу, описанному ранее [10].

Получение асцитных жидкостей. Мышам линии BALB/c, предварительно праймированным пристаном (C₁₉H₄₀) (0,5 мл на особь), внутрибрюшинно вводили гибридные клетки в количестве 3–5 млн на особь. Спустя 2–3 нед асцитную жидкость отбирали из брюшной полости мышей. Исследования выполняли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ РФ N 266 от 19.06.2003).

Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации. Реакции гемагглютинации (РГА) и торможения гемагглютинации (РТГА) ставили стандартным методом в соответствии с методическими рекомендациями НИИ гриппа [9]. За титр антител принимали их наибольшее разведение, полностью подавляющее гемагглютинацию 8 ГАЕ вируса (ГАЕ – гемагглютинирующая единица).

Оценку активности полученных моноклональных антител в непрямом иммунофлуоресцентном анализе выполняли согласно описанной ранее методике [10].

Определение изотипов моноклональных антител. Изотипы МКАТ определяли в ИФА с использованием коммерческого набора «IsoStrip™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit» («Sigma», Германия) согласно инструкциям фирмы-изготовителя.

Оценку нейтрализующей активности моноклональных антител в микркультуральном иммуно-

флуоресцентном анализе также проводили по описанной ранее методике [10].

Иммуноблоттинг. Вирусные белки разделяли при помощи электрофореза в 5–20%-градиентном полиакриламидном геле (ПАГ) в восстанавливающих условиях (с добавлением β -меркаптоэтанола, C_2H_6SO) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Millipore толщиной 0,45 мкм («Sigma-Aldrich», США) посредством элюции. Инкубацию МКАТ в блокирующем растворе бычьей фетальной сыворотки (ФСБ), содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), осуществляли при температуре 37 °С в течение 2 ч, после чего обрабатывали пероксидазным конъюгатом антител к молекулам IgG мыши («Sigma»), разведённым блокирующим буфером в соотношении 1 : 1000, при 37 °С на протяжении 1 ч. Окраску белков на нитроцеллюлозной мембране проводили раствором для блоттинга, содержащим 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид (ТМБ) ($C_{16}H_{20}N_2$) с добавлением пероксида водорода (H_2O_2).

Построение филогенетических деревьев вирусов гриппа А подтипа Н7. При построении деревьев применяли 2 различные программы: FastTree v.2.1.10 [11], в основе которой заложен метод присоединения соседей (neighbor-joining, NJ) с последующим уточнением методами минимальной эволюции (замены ближайшего соседа – nearest neighbour interchange, NNI и обрезки/пересадки ветвей субдеревьев – subtree pruning and regrafting, SPR) и максимального правдоподобия (maximal likelihood estimation, MLE) на матрице замен LG [12], и алгоритм RAxML v.8.2.10 [13], использующий MLE на матрицах замен LG и FLU [14].

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (Протокол № 13/1 от 21.10.2019).

Результаты

В результате отбора положительных клонов получена панель из 7 МКАТ (7D11, 7H9, 8A3, 9B2, 9B10, 9E11 и 9G2), специфически взаимодействующих с очищенным концентратом вируса-иммуногена A/mallard/Netherlands/12/2000(H7N3). Согласно данным вестерн-блот анализа все антитела оказались направленными к большой субъединице (НА1) НА (молекулярная масса 57 кДа), что предполагает их взаимодействие с линейными эпитопами данной молекулы [15, 16]. Результаты определения класса и субкласса тяжёлых цепей в составе иммуноглобулина показали, что все МКАТ принадлежали к классу IgG, но к различным его изотипам: в частности, 7D11 к IgG3, 7H9 и 9E11 – к IgG2a, 9B2 и 9B10 – к IgG1. Полученные МКАТ взаимодействовали в ИФА с вирусом A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) в диапазоне титров 10^{-4} – 10^{-7} . Обнаружено, что антитела 7D11, 7H9

и 9B2 обладали значительной нейтрализующей активностью по отношению не только к вирусу-иммуногену, но и к высокопатогенному штамму A/Anhui/1/2013 (H7N9). Характеристика полученных МКАТ представлена в **табл. 1**.

Для типирования и антигенного анализа вирусных штаммов наиболее широкое применение находит РТГА. Установлено, что все МКАТ обладали выраженной антигемагглютинирующей активностью в отношении вируса-иммуногена A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) (**табл. 2**). По степени интенсивности взаимодействия в РТГА полученные антитела можно условно разделить на 2 группы: 1) МКАТ (8A3 и 9B10) со средней активностью (титры 1 : 640 – 1 : 1280); 2) МКАТ (7D11, 7H9, 9B2, 9E11 и 9G12) с высокой активностью (титры 1 : 10^3 – 1 : 2×10^3). Полученные антитела исследованы в данной реакции с набором штаммов ВГ подтипа Н7 разных лет выделения, относящихся к различным эволюционным группам (**табл. 2**). Во всех случаях МКАТ обладали сниженной реакционной способностью по сравнению с таковой для вируса-иммуногена. Кроме того, представлялось важным оценить реакционную способность антител с ВГ различных подтипов НА – как эволюционно близких к Н7 (Н15), так и эволюционно удалённых (Н5, Н1) (**рис. 1**) [17]. В результате выявлено перекрёстное взаимодействие 9E11 и 9G12 в РТГА с вирусом А/Н15. С возбудителями подтипов Н5N3 и Н1N1 все полученные нами МКАТ не реагировали.

Чтобы теоретически подтвердить филогенетическую удалённость исследованных штаммов ВГ А/Н7 от использованного нами для получения МКАТ вируса A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), проведено построение филогенетических деревьев с использованием базы данных GISAID EpiFlu™ для возбудителей гриппа А с НА подтипа Н7. Для построения деревьев отобрано 4491 полных и полностью определённых аминокислотных последовательностей вирусов с НА Н7, идентифицированных с 1902 по 2020 г., среди которых оказалось 1999 уникальных. Их выравнивание выполнено с помощью программы Clustal Omega [18] и признано нами приемлемым. Как и ожидалось, основные различия в длине последовательностей были обусловлены наличием варибельности в сайте нарезания – между большой (НА1) и малой (НА2) субъединицами молекулы НА.

Полученные деревья сравнивались с аналогичными данными более ранних исследований филогении Н7 [19] и между собой, как визуально, так и с использованием метрики Робинсона–Фулдса [20] при помощи пакета программ Phangorn v.2.5.5 (<https://www.rdocumentation.org/packages/phangorn>). Результаты сравнения (**табл. 3**) показывают хорошее согласие построенных различными методами деревьев Н7, что подтверждает возможность использования их для оценки дистанции между тестируемыми штаммами.

На **рис. 2** представлено построенное нами филогенетическое дерево вирусов А/Н7, из которого видно, что использованный «европейский» вирус-иммуно-

Таблица 1. Иммунохимические и биологические свойства моноклональных антител к вирусу гриппа А/Н7N3

Table 1. Immunochemical and biological properties of monoclonal antibodies to influenza A/H7N3 virus

	Моноклональные антитела Monoclonal antibodies						
	7D11	7H9	8A3	9B2	9B10	9E11	9G12
Класс и субкласс иммуноглобулина Immunoglobulin class and subclass	IgG [*] , IgG3	IgG, IgG2a	IgG, н.и. n.i.	IgG, IgG1	IgG, IgG1	IgG, IgG2a	IgG, н.и. n.i.
Иммуноблоттинг с вирусом A/mallard/ Netherlands/12/2000 (H7N3) (белок) Immunoblotting with A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) virus (protein)	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1	HA1
Активность в непрямом ИФА с вирусом A/mallard/ Netherlands/12/2000 (H7N3), титр ^{**} Activity in indirect ELISA with virus A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), titer ^{**}	5 × 10 ⁶	5 × 10 ⁵	10 ⁴	5 × 10 ⁷	10 ⁴	5 × 10 ⁶	5 × 10 ⁶
Активность в реакции нейтрализации с вирусом A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), титр ^{***} Activity in neutralization reaction with virus A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), titer ^{***}	> 2 × 10 ³	2 × 10 ³	н.и. n.i.	10 ³	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
Активность в реакции нейтрализации с вирусом A/Anhui/1/2013 (H7N9), титр ^{***} Activity in neutralization reaction with virus A/Anhui/1/2013 (H7N9), titer ^{***}	> 2 × 10 ³	2 × 10 ³	н.и. n.i.	10 ³	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.

Примечание. *приведены данные одного из 3 типичных экспериментов; **титры МКА представлены в обратных разведениях; ***нейтрализующим титром моноклональных антител считали последнее их разведение, при котором наблюдалось 2-кратное снижение оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) по сравнению с контролем репродукции вируса; н.и. – не исследовались; HA1 – большая субъединица молекулы гемагглютинаина; ИФА – иммуноферментный анализ.

Note. *data from one of three typical experiments are presented; **monoclonal antibodies titers are presented in reverse dilutions; ***the neutralizing titer of monoclonal antibodies was considered to be the last dilution in which there was a twofold decrease in optical density at a wavelength of 450 nm (OD₄₅₀) compared to the control of virus reproduction; n.i., not investigated; HA1, large subunit of hemagglutinin molecule; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

Таблица 2. Активность моноклональных антител в реакции торможения гемагглютинации с различными штаммами вируса гриппа А (титры)

Table 2. Monoclonal antibodies activity in hemagglutination inhibition test with different influenza A virus strains (titers)

Вирусные штаммы Virus strains	Моноклональные антитела* Monoclonal antibodies*						
	7D11	7H9	8A3	9B2	9B10	9E11	9G12
A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3)	1 : 20 480 ^{**}	1 : 20 480	1 : 640 – 1 : 1280	1 : 20 480	1 : 640 – 1 : 1280	1 : 10 240	1 : 10 240
A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	1 : 6400	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	1 : 400
A/FPV/Weybridge (H7N7)	1 : 200	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 100
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	1 : 10 240	1 : 10 240	н.и. n.i.	1 : 320	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
A/Shanghai/2/2013 (H7N9)	1 : 20 480	1 : 10 240	н.и. n.i.	1 : 640	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
A/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)	1 : 800	1 : 3200	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 1600	1 : 3200
A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2)	1 : 3200	< 1 : 100	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 800	1 : 3200
A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2)	1 : 12 800	1 : 6400	< 1 : 20	< 1 : 100	< 1 : 20	1 : 1600	1 : 3200
A/duck/Australia/341/83 (H15N8)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	1 : 320	1 : 2560
A/duck/Moscow/4970/2013 (H1N1)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20
A/duck/Moscow/4182/2010 (H5N3)	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20	< 1 : 20

Примечание. *приведены данные одного из 3 типичных экспериментов; **приведены обратные величины титра моноклональных антител в реакции торможения гемагглютинации; н.и. – не исследовались.

Note. *data from one of three typical experiments are presented; **the inverse values of the monoclonal antibodies titer in hemagglutination inhibition are given; n.i., not investigated.

ген A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3) достаточно далеко расположен от «корневых» ВГ А/H7 штаммов A/FPV/Rostock/34 (H7N1), A/FPV/Weybridge (H7N7), равно как и от «азиатских», сравнительно недавних изолятов A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Shanghai/2/2013 (H7N9), и ещё далее – от A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), принадлежащего «американской» ветви дерева. К сожалению, последовательность штамма A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2) в базе данных не найдена, вероятно, в связи с тем, что она не была секвенирована.

Полные версии построенных деревьев приведены в сопроводительных материалах (<https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl1>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl2>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl3>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl4>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl5>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl6>).

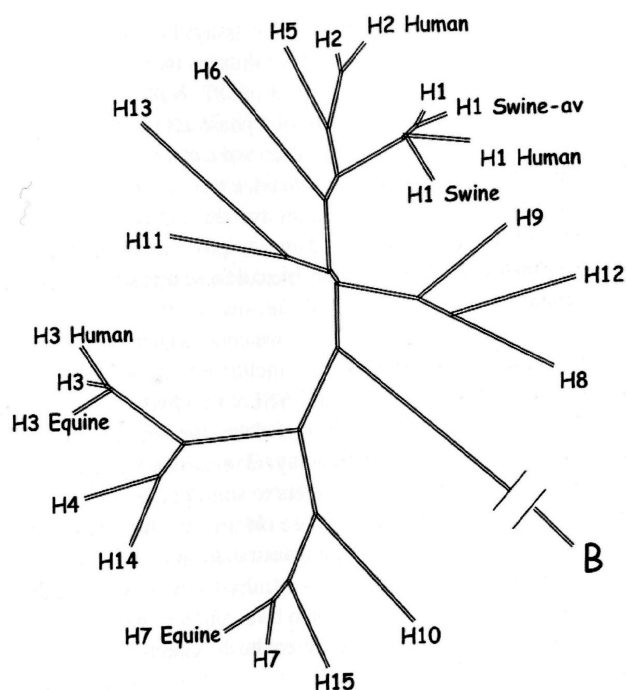


Рис. 1. Эволюционные связи между вирусами гриппа водоплавающих птиц и млекопитающих, основанные на результатах полногеномного секвенирования генов гемагглютинаина репрезентативных вирусных штаммов [17].

Fig. 1. Evolutionary relationships between waterfowl and mammalian influenza viruses based on the results of genome-wide gene sequencing of representative viral strains [17].

0507-4088-45supl2, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl3>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl4>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl5>, <https://doi.org/10.36233/0507-4088-45supl6>).

Обсуждение

Возбудитель гриппа А с гемагглютинином подтипа Н7 может стать потенциальной причиной будущей пандемии [21]. В этой связи поиск направленных против данного патогена средств, а также компонентов диагностических тест-систем [22, 23] для быстрой идентификации и типирования новых изолятов является актуальной задачей как для ветеринарии, так и для общественного здравоохранения. С этой целью в настоящем исследовании разработана панель МКАТ к молекуле НА низкопатогенного ВГ А/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3). Ранее он был выбран в качестве донора НА для создания вируса-реассортанта – вакцинного штамма [24]. В более поздней работе предложены векторные вакцины на основе этого же штамма [25]. Отметим, что A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), так же как и A/mallard/Netherlands/2/2000 (H10N7), послужил прототипом высокопатогенного природного реассортанта A/chicken/Netherlands/1/2003 (H7N7), вызвавшего эпизоотию в Европе в начале XX в. Таким образом, выбор возбудителя-иммуногена для получения МКАТ был сделан не случайно.

Полученные нами антитела к «европейскому» возбудителю A/mallard/Netherlands/12/2000 (H7N3), как оказалось, слабо реагируют в РТГА с патогенными «азиатскими» (A/Anhui/1/2013 (H7N9) и A/Shanghai/2/2013 (H7N9)) вирусами 2013 г., ещё более слабо – с «американскими» (A/chicken/NJ/294508-12/2004 (H7N2), A/avian/NJ/273874/2003 (H7N2) и A/chicken/NJ/294598-12/2004-MA (H7N2)), а также «корневыми европейскими» (A/FPV/Rostock/34 (H7N1) и A/FPV/Weybridge (H7N7)) изолятами этого подтипа. Тем не менее некоторые МКАТ (7D11, 7H9, 9E11 и 9G12) демонстрируют высокие титры в РТГА с филогенетически удалёнными вирусами. Поэтому нам представлялось важным построить более современные филогенетические деревья с целью определения удалённости друг от друга используемых штаммов, что было сделано с помощью программ, оптимизи-

Таблица 3. Взвешенная дистанция Робинсона–Фулдса между филогенетическими деревьями (в процентах)

Table 3. The Robinson–Foulds weighted distance between phylogenetic trees (at percentage)

Методы построения филогенетических деревьев (программа и матрица замен) Methods of phylogenetic trees construction (program and substitution matrix)	FastTree-LG	RAxML-FLU	RAxML-LG
FastTree-LG	0	28,9	35,0
RAxML-FLU	28,9	0	10,3
RAxML-LG	35,0	10,3	0

Примечание. За расстояние между деревьями принимается сумма $A + B$ (где A – количество разбиений первого дерева, которые не присутствуют во втором, B – аналогичное количество для второго дерева, которые не присутствуют в первом), отнесённая к общему количеству разбиений и выраженная в процентах (взвешенная дистанция Робинсона–Фулдса). В ячейках таблицы приведены различия в процентах между деревьями, построенными при помощи разных программ.

Note. The distance between the trees is taken as the sum of $A + B$ (where A is the number of partitions of the first tree that are not present in the second, B is the number of partitions of the second tree that are not present in the first) assigned to the total number of partitions and expressed in percent (Robinson–Foulds weighted distance). The table cells show the percentage differences between trees constructed using different programs.

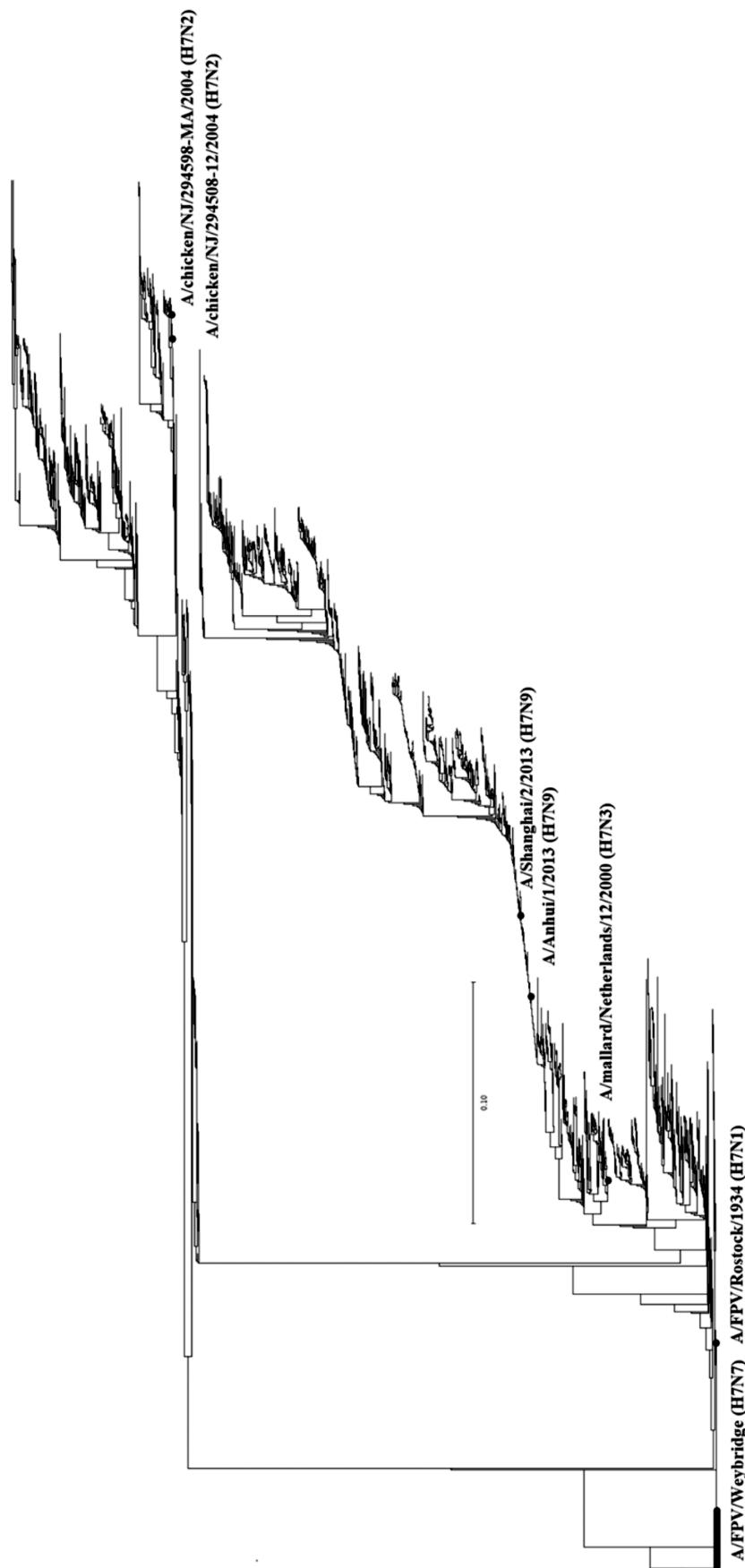


Рис. 2. Филогенетическое дерево гемагглютинаина H7, построенное программой RAxML с матрицей замен FLU.

Примечание. Шкала характеризует дату сбора штаммов (от 1902 до 2020 г.).

Fig. 2. The phylogenetic tree for H7 hemagglutinin constructed by the RAxML program with the FLU substitution matrix.

Note. The scale characterizes the date of collection of strains (from 1902 to 2020).

рованных к увеличению количества последовательностей. Результат оказался аналогичным «старым» версиям филогении [19], в которых вирусы гриппа А/Н7 подразделяются на 4 основные ветви: «австралийскую», «евразийскую», «лошадиную» и «американскую», причём последняя является наиболее удалённой от остальных. Такое распределение связано, по-видимому, с преимущественно меридианно-направленной миграцией диких птиц – переносчиков птичьего гриппа [26].

К сожалению, МКАТ 9E11 и 9G12, обнаружившие связывание в РТГА с вирусом Н15 (эволюционно близким к Н7), нельзя использовать для дифференциальной диагностики и типирования НА в иммунологических тестах. В дальнейшем планируется исследовать их реактогенную способность по отношению к более развёрнутому спектру возбудителей гриппа с различными подтипами НА.

Заключение

Достаточно высокая вируснейтрализующая активность антител 7D11, 7H9 и 9B2 предполагает возможность их перспективного применения в качестве реагентов диагностических тест-систем, профилактических и лечебных средств.

Все МКАТ панели, представленной в данной работе, в дальнейшем планируется использовать для изучения особенностей тонкой антигенной структуры молекулы Н7. Кроме того, полученные нами антитела могут найти применение не только для эпитопного картирования НА Н7 (которое к настоящему времени, к сожалению, недостаточно разработано) и в качестве реагентов тест-систем, но и для определения общих («универсальных») эпитопов в молекуле НА подтипа Н7 разных штаммов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., ред. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013.
2. Elbers A.R., Fabri T.H., de Vries T.S., de Wit J.J., Pijpers A., Koch G. The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in the Netherlands in 2003 – lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Dis.* 2004; 48(3): 691–705. <https://doi.org/10.1637/7149>
3. Kemink S.A., Fouchier R.A., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Koopmans M., Osterhaus A.D., et al. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2004; 148(44): 2190–4.
4. WHO. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal-interface/influenza-h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf (accessed May 14, 2021).
5. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarad E., Weiss C., et al. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 hemagglutinin provide protection against H7N9 challenge. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0117108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117108>
6. Thornburg N.J., Zhang H., Bangaru S., Sapparapu G., Kose N., Lampley R.M., et al. H7N9 influenza virus neutralizing antibodies that possess few somatic mutations. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1482–94. <https://doi.org/10.1172/jci85317>
7. Yao L., Chen Y., Wang X., Bi Z., Xiao Q., Lei J., et al. Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin of H7 avian influenza virus. *Avian. Pathol.* 2020; 49(1): 62–73. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1666971>
8. Седова Е.С., Верховская Л.В., Артёмов Э.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Руднева И.А., и др. Защита мышей от заражения вирусом гриппа птиц субтипа Н7 с помощью иммунизации рекомбинантным аденовирусом, кодирующим консерва-

- тивные антигены вируса гриппа А. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(1): 60–7. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67>
9. Суховецкая В.Ф., Дондурей Е.А., Дринецкий В.П., Соминина А.А., Майорова В.Г., Писарева М.М., и др. Методические рекомендации. Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация. Санкт-Петербург; 2006.
 10. Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Желтухина А.И. Моноклональные антитела к гемагглютнину вирусов гриппа В викторианской эволюционной линии. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(6): 275–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280>
 11. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3): e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
 12. Le S.Q., Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(7): 1307–20. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
 13. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
 14. Dang C.C., Le Q.S., Gascuel O., Le V.S. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-99>
 15. Куш А.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Фёдорова Н.Е., Ботиков А.Г., Федякина И.Т., и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенного на территории Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2008; 53(5): 9–14.
 16. Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А., и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, обладающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии.* 2011; 56(3): 15–20.
 17. Matrosovich M.N., Klenk H.-D., Kawaoka Y. Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. In: Kawaoka Y., ed. *Influenza Virology: Current Topics.* Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2006: 95–138.
 18. Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011; 7: 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
 19. Banks J., Speidel E.C., McCauley J.W., Alexander D.J. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2000; 145(5): 1047–58. <https://doi.org/10.1007/s007050050695>
 20. Robinson D.F., Foulds L.R. Comparison of phylogenetic trees. *Math. Biosci.* 1981; 53(1): 131–47. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(81\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90043-2)
 21. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014; 1323(1): 115–39. <https://doi.org/10.1111/nyas.12462>
 22. Chen L., Ruan F., Sun J., Chen H., Liu M., Zhou J., et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus. *J. Med. Virol.* 2019; 91(6): 1168–71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25408>
 23. Dong J., Fan J., Wang J., Zhang Q., Yang Y., Jia Y., et al. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV-H7. *Anal. Biochem.* 2019; 572: 52–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.024>
 24. Jadhao S.J., Achenbach J., Swayne D.E., Donis R., Cox N., Matsuo-ka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Vaccine.* 2008; 26(14): 742–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.036>
 25. Meseda C.A., Atukorale V., Soto J., Eichelberger M.C., Gao J., Wang W., et al. Immunogenicity and protection against influenza H7N3 in mice by modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza virus hemagglutinin or neuraminidase. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5364. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23712-9>
 26. Боголюбов А.С., Жданова О.В., Кравченко М.В. Справочник по орнитологии. Миграции птиц. М.: Экосистема; 2006.

REFERENCES

1. Lvov D.K., ed. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)

2. Elbers A.R., Fabri T.H., de Vries T.S., de Wit J.J., Pijpers A., Koch G. The highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus epidemic in the Netherlands in 2003 – lessons learned from the first five outbreaks. *Avian Dis.* 2004; 48(3): 691–705. <https://doi.org/10.1637/7149>
3. Kemink S.A., Fouchier R.A., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Koopmans M., Osterhaus A.D., et al. A fatal infection due to avian influenza-A (H7N7) virus and adjustment of the preventive measures. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 2004; 148(44): 2190–4.
4. WHO. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal-interface/influenza-h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf (accessed May 14, 2021).
5. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarad E., Weiss C., et al. Antibodies to antigenic site A of influenza H7 haemagglutinin provide protection against H7N9 challenge. *PLoS One.* 2015; 10(1): e0117108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117108>
6. Thornburg N.J., Zhang H., Bangaru S., Sapparapu G., Kose N., Lampley R.M., et al. H7N9 influenza virus neutralizing antibodies that possess few somatic mutations. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(4): 1482–94. <https://doi.org/10.1172/jci85317>
7. Yao L., Chen Y., Wang X., Bi Z., Xiao Q., Lei J., et al. Identification of antigenic epitopes in the haemagglutinin of H7 avian influenza virus. *Avian. Pathol.* 2020; 49(1): 62–73. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1666971>
8. Sedova E.S., Verkhovskaya L.V., Artemova E.A., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Rudneva I.A., et al. Protecting mice from H7 avian influenza virus by immunisation with a recombinant adenovirus encoding influenza A virus conserved antigens [Zashchita myshey ot zarazheniya virusom grippa ptits subtipa N7 s pomoshchyu immunizatsii rekombinantnyim adenovirusom, kodiruyushchim konservativnyye antigeny virusa grippa A. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie]. 2020; 20(1): 60–7. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-1-60-67> (in Russian)
9. Sukhovetskaya V.F., Dondurey E.A., Drinevskiy V.P., Somnina A.A., Mayorova V.G., Pisareva M.M., et al. Methodological recommendations. Isolation of influenza viruses in cell cultures and chicken embryos and their identification [Metodicheskie rekomendatsii. Vydelenie virusov grippa v kletochnykh kulturakh i kurinykh embrionakh i ikh identifikatsiya]. St. Petersburg; 2006. (in Russian)
10. Sorokin E.V., Tsareva T.R., Zheltukhina A.I. Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza B viruses Victoria evolutionary lineage [Monoklonal'nye antitela k gemagglutininu virusov grippa V viktori-anskoj evolyutsionnoy linii]. *Voprosy virusologii.* 2018; 63(6): 275–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-6-275-280> (in Russian)
11. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2-approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One.* 2010; 5(3): e9490. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
12. Le S.Q., Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(7): 1307–20. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn067>
13. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
14. Dang C.C., Le Q.S., Gascuel O., Le V.S. FLU, an amino acid substitution model for influenza proteins. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-99>
15. Kushch A.A., Klimova R.R., Masalova O.V., Fedorova N.E., Botikov A.G., Fedyakina I.T., et al. Monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza A(H5N1) strain isolated in the Russian Federation: development and properties [Poluchenie i svoystva monoklonal'nykh antitel k vysokopatogennomu shtammu virusa grippa ptits A(H5N1), vydelennogo na territorii Rossiyskoy Federatsii]. *Voprosy virusologii.* 2008; 53(5): 9–14. (in Russian)
16. Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl [Monoklonal'nye antitela k pandemicheskomu virusu grippa A/IIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, obladayushchie vysokoy virusneyntralizuyushchey aktivnost'yu]. *Voprosy virusologii.* 2011; 56(3): 15–2. (in Russian)
17. Matrosovich M.N., Klenk H.-D., Kawaoka Y. Receptor specificity, host-range, and pathogenicity of influenza viruses. In: Kawaoka Y., ed. *Influenza Virology: Current Topics*. Wymondham, UK: Caister Academic Press. 2006; 95–138.
18. Sievers F., Wilm A., Dineen D.G., Gibson T.J., Karplus K., Li W., et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 2011; 7: 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
19. Banks J., Speidel E.C., McCauley J.W., Alexander D.J. Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2000; 145(5): 1047–58. <https://doi.org/10.1007/s007050050695>
20. Robinson D.F., Foulds L.R. Comparison of phylogenetic trees. *Math. Biosci.* 1981; 53(1): 131–47. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(81\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0025-5564(81)90043-2)
21. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. NY Acad. Sci.* 2014; 1323(1): 115–39. <https://doi.org/10.1111/nyas.12462>
22. Chen L., Ruan F., Sun J., Chen H., Liu M., Zhou J., et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus. *J. Med Virol.* 2019; 91(6): 1168–71. <https://doi.org/10.1002/jmv.25408>
23. Dong J., Fan J., Wang J., Zhang Q., Yang Y., Jia Y., et al. Development and evaluation of a C-ELISA for rapid detection of antibody to AIV-H7. *Anal. Biochem.* 2019; 572: 52–7. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.02.024>
24. Jadhao S.J., Achenbach J., Swayne D.E., Donis R., Cox N., Matsuo-ka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Vaccine.* 2008; 26(14): 742–50. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.036>
25. Meseda C.A., Atukorale V., Soto J., Eichelberger M.C., Gao J., Wang W., et al. Immunogenicity and protection against influenza H7N3 in mice by modified vaccinia virus Ankara vectors expressing influenza virus hemagglutinin or neuraminidase. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5364. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23712-9>
26. Bogolyubov A.S., Zhdanova O.V., Kravchenko M.V. Handbook of Ornithology. Migrations of Birds [Spravochnik po ornitologii. Migratsii ptits]. Moscow: Ecosystem; 2006. (in Russian)



Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae*; *Alphainfluenzavirus*)

© Марченко В.А.¹, Барашкова С.В.², Зелинская И.А.³, Торопова Я.Г.³, Рэмзи Э.С.¹, Жилинская И.Н.¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

²СПБ ГБУЗ «Детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им. К.А. Раухфуса», 191036, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, Россия

Введение. Вирус гриппа (ВГ) А (*Orthomyxoviridae*; *Alphainfluenzavirus*) способен вызывать дисфункцию эндотелия (ДЭ), апоптоз эндотелиоцитов, а также влиять на экспрессию эндотелиальных факторов, поддерживающих сосудистый гемостаз. В то же время воздействие этого патогена на характер экспрессии ключевых факторов эндотелия до настоящего времени неизвестно.

Цель исследования – выявить изменения экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (NO) (eNOS) и ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1, или serpin E1) в инфицированных ВГ А эндотелиоцитах. **Задачи работы:** изучение экспрессии указанных факторов в клетках эндотелия, инфицированных вирусом A(H1N1)pdm09; установление наличия гомологичных фрагментов в белках исследуемого патогена и эндотелиальных факторах.

Материал и методы. В экспериментах использовали клеточную линию эндотелия человека EA.hy926, которую инфицировали ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09. Детекцию уровня экспрессии эндотелиальных факторов в динамике (6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч) выполняли иммуноцитохимическим методом (ИЦХ) с помощью антител (АТ) к eNOS и PAI-1. Для количественной оценки полученного сигнала использовали программу Nis-Elements F3.2 («Nikon», Япония). Поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и молекул eNOS и PAI-1 осуществляли путём компьютерного сравнения в них фрагментов длиной 12 а.о.

Результаты и обсуждение. Экспрессия eNOS в инфицированных клетках уменьшалась от 7,9% через 6 ч до 3,3% спустя 72 ч (контроль принят за 100%). Уровень экспрессии PAI-1 на протяжении исследования значительно варьировал: через 6 ч его показатель снижался до 49,6%, через 18 ч – возрастал до 116,3% с последующим резким падением до 18,9% спустя 24 ч. Через 48 ч и 72 ч выраженность экспрессии составляла 23,5 и 35% соответственно. В ряде белков исследуемого вируса обнаружены последовательности, гомологичные фрагментам eNOS и PAI-1.

Заключение. В ходе эксперимента с инфицированием клеток эндотелия ВГ А установлено, что вирус вызывает выраженное снижение экспрессии eNOS и модулирует экспрессию PAI-1. Описанное явление может быть использовано при дальнейшей разработке направлений патогенетической терапии сосудистых осложнений инфекции, вызываемой данным возбудителем.

Ключевые слова: клеточная линия эндотелия человека EA.hy926; вирус гриппа A(H1N1)pdm09; эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS); ингибитор активатора плазминогена (PAI-1); иммуноцитохимия

Для цитирования: Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Рэмзи Э.С., Жилинская И.Н. Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 198-210. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48>

Для корреспонденции: Марченко Владимир Александрович, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории системной вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: vmarcenco@mail.ru

Участие авторов: Марченко В.А. – культивирование вируса гриппа, культивирование и инфицирование клеточной культуры, статистическая обработка результатов, подбор литературных данных; Барашкова С.В. – проведение морфометрических и иммуноцитохимических исследований; Зелинская И.А. – фиксация материала для последующего иммуноцитохимического исследования; Торопова Я.Г. – поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и белков eNOS и PAI-1; Рэмзи Э.С. – перевод англоязычных материалов; Жилинская И.Н. – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансировании в соответствии с Государственным заданием Министерства здравоохранения Российской Федерации «Роль вирусов гриппа в развитии дисфункции эндотелия кровеносных сосудов» (регистрационный номер 121042900092-6 от 29.04.2021).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.02.2021
Принята к печати 11.05.2021

ORIGINAL ARTICLE

Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection

Vladimir A. Marchenko¹, Svetlana V. Barashkova², Irina A. Zelinskaya³, Yana G. Toropova³, Edward S. Ramsay¹, Irina N. Zhilinskaya¹

¹FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;

²SPB SBIH «K.A. Rauhfus Children's Municipal Multi-Specialty Clinical Center of High Medical Technologies», 191036, St. Petersburg, Russia;

³FSBI «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of Russia, 197341, St. Petersburg, Russia

Introduction. Influenza A virus infection can lead to endothelial dysfunction (ED), including apoptosis of endothelial cells and modulation of endothelial factor activities. Affected biochemical factors may include those playing important roles in vascular homeostasis. However, the effect of this pathogen on the expression pattern of key endothelial factors is still unknown.

The **aim** of this work was to study the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1, serpin E1) in the EA.hy926 endothelial cells. Research objectives: to assess expression of eNOS and PAI-1 in endothelial cells infected with influenza virus A(H1N1)pdm09, and to identify homologous fragments in structure of viral proteins and endothelial factors.

Material and methods. Cells were infected with influenza virus A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 and analyzed in dynamics in 6, 12, 18, 24, 48, and 72 hrs post infection (hpi). Detection of endothelial factors expression levels was performed by immunocytochemical method (ICC) using antibodies for eNOS and PAI-1 while quantitative assessment of expression levels was carried out by program Nis-Elements F3.2 («Nikon», Japan). The search for homologous sequences between viral proteins and eNOS and PAI-1 was performed by computer comparison. Sequences were analyzed as fragments 12 amino acid residues (aar) in length.

Results and discussion. eNOS expression in infected cells had decreased to 7.9% by 6 hpi (control was taken as 100%) to 3.3% at 72 hpi. PAI-1 expression varied significantly over the course of the experiment: by 6 hpi it had decreased to 49.6%, and to 43.2% by 12 hpi. Later PAI-1 levels were: 116.3% (18 hpi); 18.9% (24 hpi); 23.5% (48 hpi), and 35% (72 hpi).

Conclusion. These results indicate that influenza A infection of endothelial cells causes a significant decrease in eNOS expression, while modulating PAI-1 one. The described phenomenon can be used in the further development of directions of pathogenetic therapy of vascular complications of infection caused by this pathogen.

Key words: EA.hy926 human endothelial cell line; influenza virus A(H1N1)pdm09; endothelial nitric oxide synthase (eNOS); plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); immunocytochemistry

For citation: Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Ramsay E.S., Zhilinskaya I.N. Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 198-210 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48>

For correspondence: Vladimir A. Marchenko, Graduate Student, Research Assistant of Laboratory of Systemic Virology, FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia. E-mail: vmarcenco@mail.ru

Information about the authors:

Marchenko V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>

Barashkova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-4510>

Zelinskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>

Toropova Ya.G., <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>

Ramsay E.S., <https://orcid.org/0000-0001-7086-5825>

Zhilinskaya I.N., <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

Contribution: Marchenko V.A. – cultivation of influenza virus, cultivation and infection of cell culture, statistical data analysis, literature search; Barashkova S.V. – morphometric assay, and immunocytochemical assay; Zelinskaya I.A. – tissue preparation for immunocytochemical assay; Toropova Ya.G. – searching for homologous fragments in the structure of viral proteins and eNOS and PAI-1; Ramsay E.S. – English translations; Zhilinskaya I.N. – writing of the text of the article.

Acknowledgments. The work was carried out with funding within the framework of State Assignment of Ministry of Health of the Russian Federation «The role of influenza viruses in the development of blood vessel endothelial dysfunction» (registry entry No. 121042900092-6 dated 04.29.2021).

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

Received 05 February 2021

Accepted 11 May 2021

Введение

В настоящее время установленной является способность вируса гриппа (ВГ) помимо избирательно-го воздействия на эпителий респираторного тракта

поражать кровеносные сосуды и вызывать дисфункцию эндотелия (ДЭ). Это подтверждается соответствующей клинической картиной в виде носовых кровотечений, геморрагий в коже и слизистых обо-

лочках, микрогематурии, развития острого респираторного дистресс-синдрома и диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (ДВС-синдрома) [1, 2]. При гриппе повышается также риск возникновения глубокого тромбоза вен и лёгочной эмболии [3], острого коронарного синдрома [4, 5], ишемической болезни сердца [6], инфаркта миокарда [7–9] и других заболеваний кардиоваскулярной системы [10–14]. Кроме того, эпидемиологические наблюдения показали, что с окончанием эпидемии гриппа регистрируется существенная избыточная (дополнительная) смертность в группах риска у больных с хронической сердечно-сосудистой и лёгочной патологией – 870 на 100 тыс. переболевших (ВОЗ, 2008).

Однако механизмы развития при гриппозной инфекции ДЭ до сих пор неизвестны. Возникновение данного состояния связывают с нарушением таких процессов, как активация агрегации тромбоцитов, свёртывание крови, изменение проницаемости сосудистой стенки, сокращение и расслабление гладкой мускулатуры сосудов, пролиферация клеток сосудистого русла и воспалительная реакция. Все они регулируются целым рядом факторов, синтезируемых клетками эндотелия. Среди этих веществ одними из важнейших являются эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS), ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1, или serpin E1), тканевой активатор плазминогена (tPA) и др.

Целью исследования явилось изучение характера экспрессии 2 эндотелиальных факторов – eNOS и PAI-1 при экспериментальной гриппозной инфекции в клетках эндотелия линии EA.hy926. Выбор этих соединений определён тем, что eNOS отвечает за продукцию оксида азота (NO), который имеет исключительно важное значение в поддержании гомеостаза на уровне эндотелия [15–18]. Уменьшение продукции NO, вызванное снижением экспрессии eNOS, рассматривается как следствие воспалительных процессов в кровеносных сосудах, атеросклероза, фиброза и нарушения тонуса стенки сосудов. PAI-1, являясь сериновой протеазой, синтезируемой преимущественно эндотелиальными клетками, в нормальных физиологических условиях контролирует активность урокиназного (uPA) и тканевого активаторов плазминогена, плазмина, матриксных металлопротеиназ (ММР), тем самым поддерживая тканевой гомеостаз [19]. Кроме того, он играет ключевую роль в патогенезе тромботических состояний, таких как глубокий венозный тромбоз и инфаркт миокарда [16]. Следует отметить, что исследования по изучению уровня экспрессии эндотелиальных факторов (eNOS и PAI-1) в эндотелиоцитах, инфицированных вирусом гриппа, ранее не проводились.

Материал и методы

Клеточная линия. В экспериментах использовали перевиваемую клеточную линию эндотелия человека EA.hy926, любезно предоставленную д-ром Корой-Джин Эджел (Dr. Cora Jean Edgell) из отдела патологии Университета Северной Каролины (США).

Данный материал представляет собой гибридную линию, полученную при слиянии клеток венозного эндотелия пупочного канатика человека (HUVEC) и клеток карциномы лёгкого человека (A549). Клетки культивировали в среде DMEM с глутамином («Биолот», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) («Биолот»). Для предотвращения бактериальной контаминации применяли антибиотики: стрептомицин и пенициллин («Биолот»). Исследования проводили с 3-дневной культурой эндотелиальных клеток EA.hy926, что соответствовало суточному монослою. Подсчёт клеточных элементов выполняли с помощью гемоцитометра открытого типа (камера Горяева). Посевная концентрация составляла $7,2\text{--}7,8 \times 10^4$ кл/мл.

Вирус. Использован ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, вызывавший вирусные геморрагические пневмонии в период эпидемии гриппа 2015–2016 гг. Вирус трижды пассировали на куриных эмбрионах, а затем определяли инфекционную активность (ИА) по ранее описанной методике [20]. Для исследуемого возбудителя значение ИА составляло 8–9 lg ЭИД₅₀/мл (ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза).

Инфекционная активность вируса гриппа. Определение ИА патогена в инфицированных клетках EA.hy926 осуществляли посредством детекции NP-антигена ВГ методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя к данному антигену конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела (АТ), полученные из отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

С указанной целью суспензию клеток со стандартной посевной концентрацией разливали в 96-луночные планшеты («Nunc», Дания). Далее следовала инкубация в поддерживающей среде (DMEM) до образования клеточного монослоя. Через 1 сут клетки инфицировали 10-кратными разведениями вируса в данной среде, для чего в каждую лунку вносили по 150 мкл вирусосодержащей жидкости. Контакт патогена с клетками поддерживали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С. Для обеспечения многоциклового репродукции ВГ в вирусосодержащую жидкость добавляли обработанный ТРСК (тозилфенилаланинхлорометилкетон) трипсин в концентрации 2 мкг/мл («Sigma», США). После инкубирования клеточные элементы отмывали от вируса и добавляли к ним по 100 мкл поддерживающей среды с трипсином. Через 5 сут поддерживающую среду удаляли и клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 20 мин при температуре –20 °С. Затем лунки троекратно отмывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,2–7,4). Далее в них добавляли 200 мкл 5% раствора обезжиренного молока («BioRad», США) и инкубировали в термостате при 37 °С на протяжении 1 ч. На следующем этапе из всех лунок сливали раствор обезжиренного молока и добавляли по 100 мкл конъюгата (соотношение АТ 1 : 1000). Инкубацию проводили 45 мин при температуре 37 °С. После удаления конъюгата лунки

трижды промывали ФСБ с твином 20. С помощью субстратной смеси проявляли пероксидазную реакцию, для чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата. Реакцию останавливали путём внесения 2 Н серной кислоты (H_2SO_4), после чего измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля служили неинфицированные клетки EA.hy926.

Для определения гемагглютинирующей активности (ГА) вируса использовали реакцию гемагглютинации (РГА) с 0,5% взвесью куриных эритроцитов. С этой целью на 5 сут после инфицирования клеток отбирали по 50 мкл супернатанта и титровали в физиологическом растворе с добавлением 50 мкл указанной взвеси.

Определение экспрессии эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1. Экспрессию эндотелиальных факторов определяли иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом после инфицирования клеток ВГ согласно описанной методике [21]. Для этого в стерильные чашки Петри («Биолот») помещали предметные стёкла с поли-L-лизиновым адгезивным покрытием («ThermoFisher Scientific», США). На каждое стекло наносили 1 мл клеточной взвеси с заранее определённой необходимой посевной концентрацией; затем проводили инкубацию клеток в течение 1 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °С. После этого в чашки Петри добавляли поддерживающую среду DMEM с антибиотиками. Через 1 сут клетки отмывали и инфицировали вирусосодержащей жидкостью. Контакт клеточных элементов с вирусом поддерживали в CO_2 -инкубаторе при 37 °С на протяжении 1 ч в питательной среде DMEM, содержащей антибиотик и трипсин (2 мкг/мл), без FBS. Множественность инфекции (МИ) (multiplicity of infection, m.o.i.) для ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 при заражении эндотелиоцитов была постоянной и составляла 0,01 ТЦД₅₀/мл (ТЦД – тканевая цитопатическая доза).

При проведении фиксации использовали раствор 4% параформальдегида; экспозиция составляла 10 мин. Далее стёкла с клетками в течение 5 мин погружали в ФСБ, а затем промывали в дистиллированной воде. Инкубацию клеток с АТ к eNOS и PAI-1 («Abscam», Великобритания) в разведениях 1 : 1000 и 1 : 500 соответственно выполняли на протяжении 1 ч при комнатной температуре (22–24 °С) во влажной камере. Детекцию уровня экспрессии эндотелиальных факторов осуществляли при помощи системы визуализации фирмы Novolink («Novocastra», США), включающей в себя реакцию с ДАВ-хромогеном (диаминобензидин). Интактные и инфицированные клетки велись и фиксировались параллельно.

С целью количественной оценки уровня экспрессии факторов эндотелия проводили морфометрические исследования, в ходе которых выполняли микрофотографирование препаратов, окрашенных иммуноцитохимически к соответствующим антигенам, на микроскопе Nikon Eclipse E20 («Nikon», Япония)

с цифровой камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nis-Elements F3.2 («Nikon»). Были выбраны постоянные параметры: разрешение Fast (Focus) – 1280 × 960 пикселей; захват Quality (Capture) – 2560 × 1920 пикселей; экспозиция (Exposure) 15 мс (объектив ×40); усиление (Gain) 2,80×; улучшенное контрастирование (Contrast Enhanced); дополнительно (Advanced) – Hematoxylin [23].

Для каждого эндотелиального фактора эмпирически подбирали порог регистрации сигнала в RGB-модели (модель цветопередачи, где любой цвет кодируется с помощью 3 основных: красного (red), зелёного (green) и синего (blue)) с использованием синего фильтра. Предварительно выполняли калибровку объектива Nikon E Plan 40x/0,65 WD 0,65 с использованием объект-микрометра 1 мм/100 («Nikon»). Фотосъёмку клеток производили на 5 произвольно выбранных полях зрения при увеличении ×40. Поля зрения с артифициальными изменениями и дефектами окрашивания при фотосъёмке исключали. Морфометрическую обработку полученных снимков осуществляли в программе Nis-Elements BR 4.40 («Nikon») при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме, с постоянными значениями величины порога [22].

В качестве 3 основных определяемых параметров были выбраны:

- 1) площадь заполнения – площадь с сигналом в поле зрения;
- 2) суммарная плотность – сумма отдельных величин ОП каждого пикселя в поле зрения; ОП высчитывается по формуле:

$$ОП = -\lg \frac{\text{значение интенсивности пикселя} + 0,5}{\text{максимальное значение интенсивности}} \quad (1);$$

- 3) суммарная интенсивность – сумма интенсивности всех пикселей изучаемого объекта в поле зрения; интенсивность определяется в диапазоне регистрации сигнала между минимальными и максимальными значениями для каждого исследуемого фактора (диапазон регистрации для eNOS составлял 78–185, для PAI-1 – 92–191).

Мимикрия эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1 в белках исследуемого вируса группа. Источником первичных последовательностей белков исследуемого ВГ (как структурных, так и неструктурных), молекул eNOS и PAI-1 служили общедоступные в сети Интернет базы полногеномных данных (соответственно www.ncbi.nlm.nih.gov и www.nextprot.org). Поиск гомологичных последовательностей в белковых структурах вируса и эндотелиальных факторов осуществляли путём компьютерного сравнения в них фрагментов длиной 12 а.о., принимая родственными те из них, которые проявляли идентичность по ≥ 8 позициям.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с применением параметрического теста Стьюдента или дисперсионного анализа (ANOVA) в программном обеспечении MS Office Excel 2016 и GraphPad Prism 8. Различия счи-

тали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. В процессе представления полученных результатов использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

Результаты

Инфекционная активность вируса гриппа А.

На рис. 1 представлены результаты детекции NP-антигена ВГ А в супернатанте клеток через 5 сут после инфицирования исследуемым возбудителем. Как видно из рисунка, минимальная концентрация этого антигена регистрируется в разведении 3,5 lg (по сравнению с клеточным контролем), что указывает на ИА вируса, равную 3–3,5 lg ТЦД₅₀/мл. При этом ГА патогена в супернатанте спустя 5 сут после его внесения составляла 1 : 64.

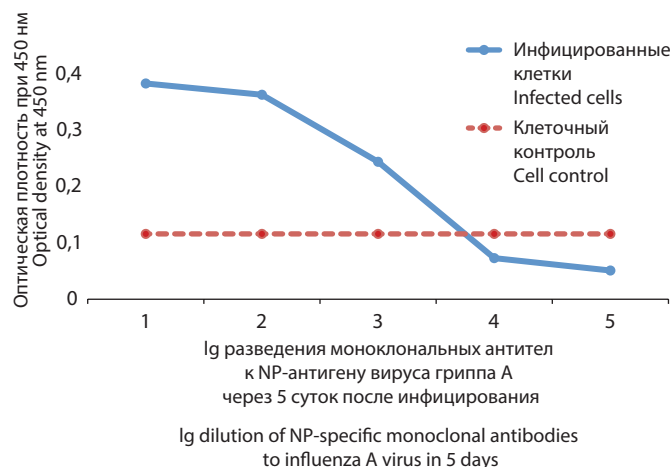


Рис. 1. Детекция NP-антигена вируса гриппа А в супернатанте клеток EA.hy926 с помощью моноклональных антител иммуноферментным методом.

Fig. 1. Detection of influenza A virus NP antigen in supernatant of infected EA.hy926 cells using type-specific monoclonal antibodies by ELISA.

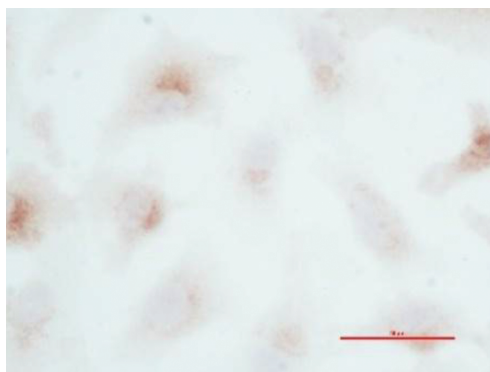


Рис. 3. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 6 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение ×40).

Fig. 3. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 6 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm; magnification ×40).

Определение экспрессии эндотелиальных факторов. Экспрессию эндотелиальных факторов – eNOS и PAI-1 изучали в клетках, инфицированных ВГ, в динамике – через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Уровни экспрессии этих веществ на протяжении всего исследования значительно изменялись по сравнению с таковыми в интактных эндотелиоцитах.

1) **Определение экспрессии eNOS.** На рис. 2 представлена экспрессия eNOS в неинфицированных клетках (контроль); на рис. 3–8 – результаты определения экспрессии этого же фактора в инфицированных вирусом эндотелиоцитах через временные промежутки 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Как можно видеть, степень экспрессии eNOS в поражённых ВГ клетках эндотелия резко снижена по сравнению с контрольным материалом.

С целью установления количественного значения выраженности экспрессии eNOS в инфицированных эндотелиоцитах определяли 3 основных параметра

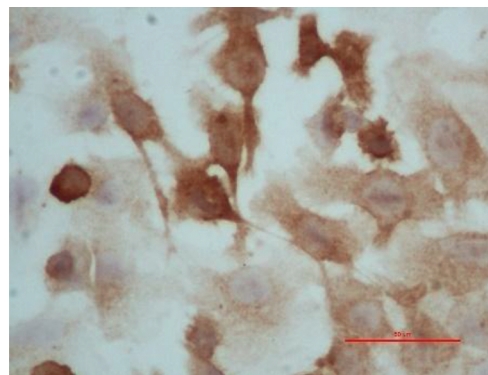


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в неинфицированных клетках эндотелия EA.hy926 (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение ×40).

Fig. 2. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in uninfected EA.hy926 endothelial cells (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm; magnification ×40).

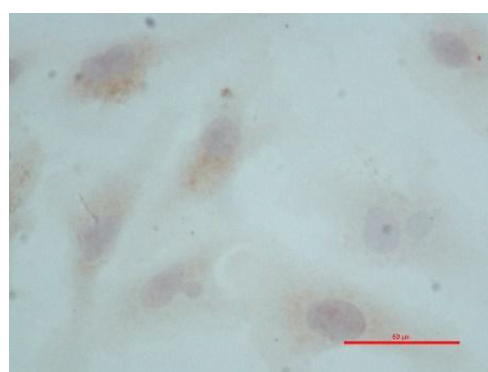


Рис. 4. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 12 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение ×40).

Fig. 4. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 12 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm; magnification ×40).

сигнала: площадь заполнения, суммарная плотность и суммарная интенсивность (см. раздел «Материал и методы») через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч (табл. 1).

Как видно из таблицы, характер изменений сигнала по 3 параметрам в интервале 6–72 ч совпадает. На ос-

новании этого для оценки выраженности экспрессии eNOS в процессе инфицирования клеток эндотелия ВГ выбран показатель суммарной интенсивности. Динамика изменения экспрессии eNOS по этому параметру представлена на рис. 9.

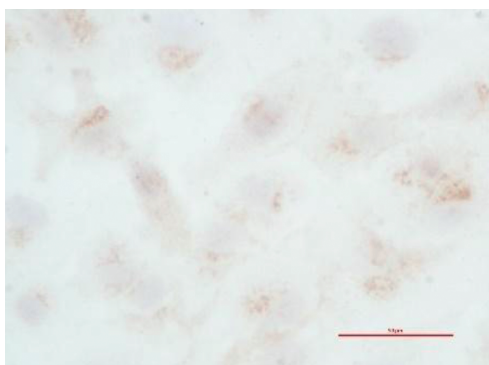


Рис. 5. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 18 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 5. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 18 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

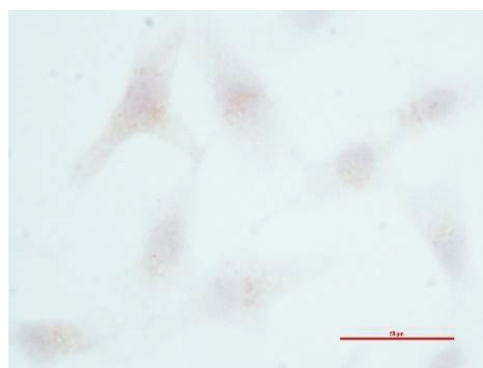


Рис. 6. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 24 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 6. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 24 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

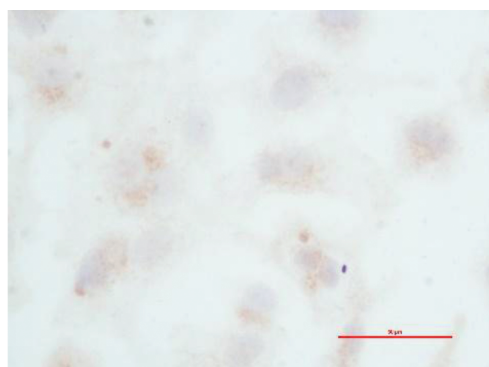


Рис. 7. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 48 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 7. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 48 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

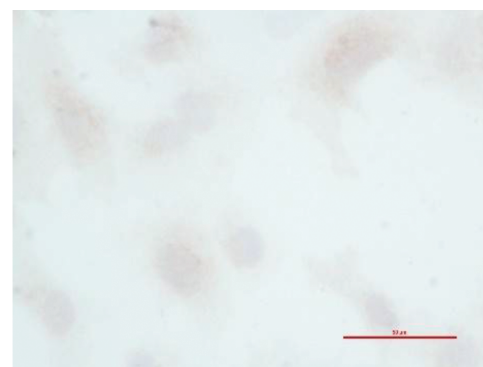


Рис. 8. Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 72 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 8. Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 72 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

Таблица 1. Определение уровня экспрессии eNOS в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия EA.hy926 ($n = 15$)

Table 1. Determination of eNOS expression level in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus ($n = 15$)

Параметры сигнала, относительные значения ($M \pm m$, %) Signal parameter, relative values ($M \pm m$, %)	Время после инфицирования клеток (ч) [†] Time post infection (hrs) [†]					
	6	12	18	24	48	72
Площадь заполнения Total area	6,5 \pm 1,7*	11,2 \pm 2,6*	4,1 \pm 1,3*	2,4 \pm 0,5*	2,4 \pm 0,6*	2,5 \pm 0,3
Суммарная плотность Sum density	3,9 \pm 1,1*	8,8 \pm 2,4*	2,6 \pm 0,7*	1,8 \pm 0,5*	1,4 \pm 0,4*	1,6 \pm 0,2
Суммарная интенсивность Sum intensity	7,9 \pm 2,1*	12,1 \pm 2,8*	5,4 \pm 1,5*	2,9 \pm 0,6*	3,1 \pm 0,7*	3,3 \pm 0,4

Примечание. [†] – за 100% приняты параметры сигнала в неинфицированных клетках; * – $p < 0,05$.

Note. [†] – signal parameters from uninfected cells designated as 100%; * – $p < 0.05$.

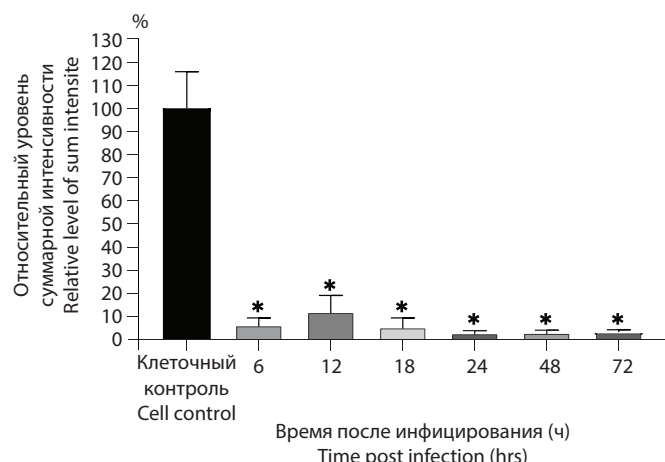


Рис. 9. Динамика изменения экспрессии eNOS в культуре клеток эндотелия EA.hy926 при их инфицировании клетками вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 ($n = 15$).

Примечание. * – $p < 0,05$.

Fig. 9. Dynamics of eNOS expression in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 over time ($n = 15$).

Note. * – $p < 0.05$.

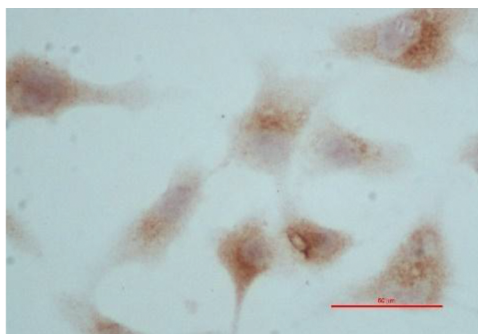


Рис. 11. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 6 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 11. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 6 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

Так, экспрессия eNOS в инфицированных клетках снижалась до 7,9% уже через 6 ч (контроль принят за 100%). Через 12 ч уровень экспрессии этого фактора уменьшался до 12,1%, через 18 ч – до 5,4%, достигая спустя 24 ч своего минимума – 2,9%. Через 48 ч значение экспрессии eNOS составляло 3,1%, а спустя 72 ч – 3,3%. Таким образом, вирус гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 вызывал снижение экспрессии eNOS в клетках эндотелия человека ($v \geq 8$ раз) на протяжении всего периода исследования.

2) *Определение экспрессии PAI-1.* Экспрессия PAI-1 в неинфицированных клетках (контроль) представлена на рис. 10. На рис. 11–16 показан характер экспрессии PAI-1 в инфицированных ВГ эндотелиоцитах через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч.

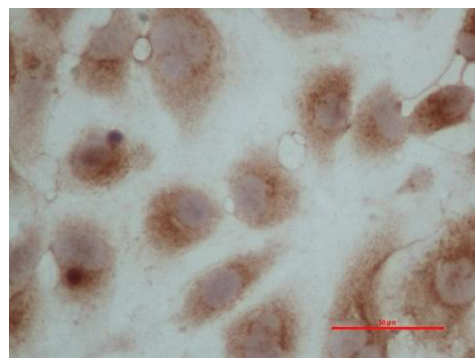


Рис. 10. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в неинфицированных клетках эндотелия EA.hy926 (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 10. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in uninfected EA.hy926 endothelial cells (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

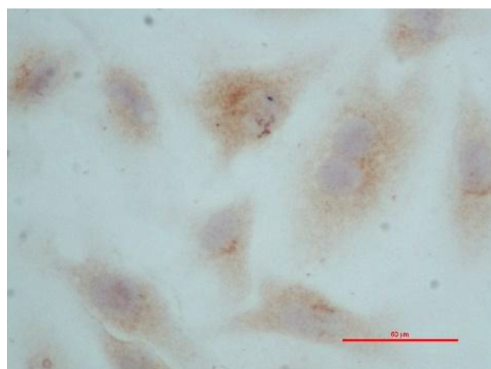


Рис. 12. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 12 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 12. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 12 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

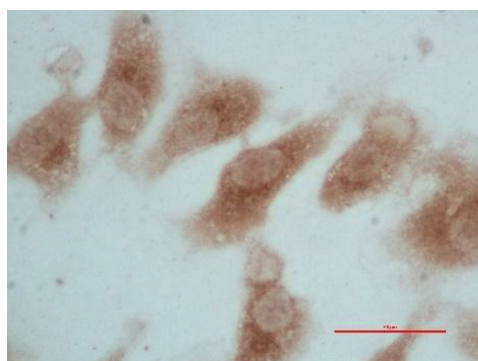


Рис. 13. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 18 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 13. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 18 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

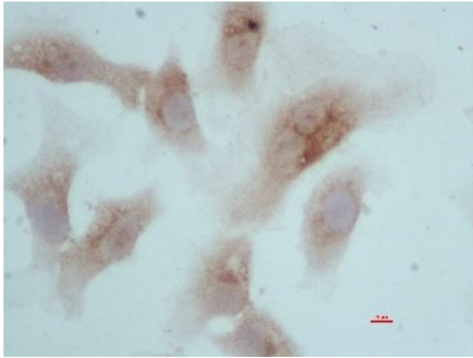


Рис. 14. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 24 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 14. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 24 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

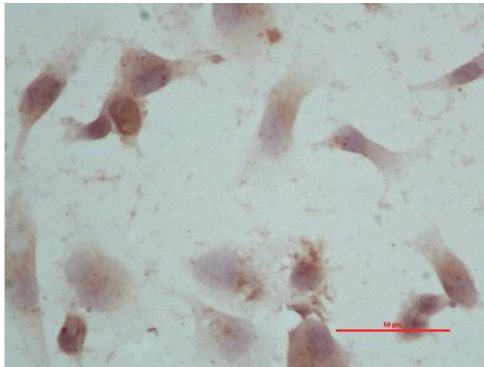


Рис. 16. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 72 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 16. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 72 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

Данные по основным параметрам сигнала в ходе оценки экспрессии PAI-1 приведены в **табл. 2**.

Как видно из таблицы, максимальные значения параметров сигналов в инфицированных ВГ эндотелиальных клетках зарегистрированы через 18 ч после внесения возбудителя, а минимальные – спустя 24 ч.

Аналогично определению экспрессии eNOS количественную оценку выраженности этого свойства для PAI-1 проводили по параметру суммарной интенсивности сигнала. Так, её значение в этом случае снижалось на протяжении первых 12 ч: через 6 ч экспрессия PAI-1 уменьшалась до 49,6% (контроль принят за 100%), а спустя 12 ч составляла уже 43,2%, после чего наблюдалось резкое повышение выраженности экспрессии уже через 18 ч после инфицирования клеток (116,7%). Наиболее значительное снижение зарегистрировано через 24 ч после внесения вируса – 18,9%. Указанные изменения сохранялись спустя 48 и 72 ч (23,5 и 35% соответственно) (**рис. 17**).

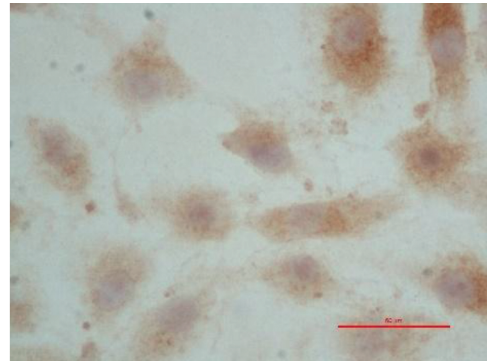


Рис. 15. Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 48 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение $\times 40$).

Fig. 15. Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 48 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50 μm ; magnification $\times 40$).

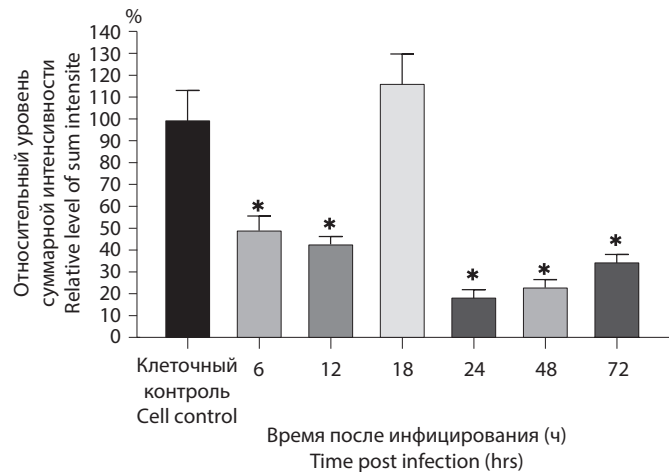


Рис. 17. Уровень экспрессии PAI-1 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 при их инфицировании вирусом А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 ($n = 15$).

Примечание. * – $p < 0,05$.

Fig. 17. Dynamics of eNOS expression in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 ($n = 15$).

Note. * – $p < 0.05$.

Таким образом, в эндотелиоцитах, инфицированных ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, экспрессия PAI-1 в значительной степени варьировала на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем клеток. Уровень её снижался в ≥ 2 раза в первые 12 ч после инфицирования клеток. Спустя 18 ч наблюдалось повышение степени экспрессии в 1,16 раза, после чего на всех последующих сроках исследования вновь определялось уменьшение данного показателя в 3–5 раз относительно контроля.

Мимикрия эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1 в белках исследуемого вируса гриппа. Результаты поиска гомологичных аминокислотных последовательностей в белках исследуемых вирусов и системы гемостаза человека показали, что в структуре

Таблица 2. Определение уровня экспрессии PAI-1 в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия EA.hy926 (n = 15)
Table 2. Determination of PAI-1 expression level in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus (n = 15)

Параметры сигнала, относительные значения ($M \pm m$, %) Signal parameter, relative values ($M \pm m$, %)	Время после инфицирования (ч) [†] Time post infection (hrs) [†]					
	6	12	18	24	48	72
Площадь заполнения Total area	39,2 ± 3,2*	36,7 ± 5,5*	117,0 ± 9,7	17,2 ± 3,3*	21,1 ± 4,7*	33,3 ± 5,6*
Суммарная плотность Sum density	25,4 ± 2,4*	25,3 ± 4,1*	107,7 ± 8,9	13,8 ± 2,8*	18,4 ± 4,2*	30,4 ± 5,4*
Суммарная интенсивность Sum intensity	49,6 ± 5,7*	43,2 ± 4,9*	116,7 ± 8,5	18,9 ± 4,2*	23,5 ± 5,0*	35,0 ± 5,8*

Примечание: [†] – за 100% приняты параметры сигнала в неинфицированных клетках; * – $p < 0,05$.

Note: [†] – signal parameters from uninfected cells designated as 100%; * – $p < 0.05$.

Таблица 3. Детерминация гомологичных фрагментов в структуре белков вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 и эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1

Table 3. Fragment homology between the influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus and the eNOS, PAI-1 endothelial factors

Белки вируса гриппа Influenza virus proteins	Эндотелиальные факторы Endothelial factors	
	eNOS	PAI-1
PA	–	–
PB2	K R K R D S S I L T D S Q (736–747)* : : : : R R K R K E S S N T D S A (627–638)**	K D E Q S I A E A I I V (389–400)* : : : : K D E I S T T D A I F V (111–122)**
PB1	–	–
HA	E K N V T V T H S V N L (38–49)* : : E I N V A V L H S Y Q L (401–412)**	L L V L L E N E R T L D Y (442–453)* : : G L E L L E S E I T Y D K (278–289)**
NA	–	–
NP	–	–
M1	K E V S L S Y S T G A L (113–124)* : K E S S N T D S A G A L (631–642)**	K E V S L S Y S T G A L (113–124)* : : K E V P L S A L T N I L (266–277)**
M2	–	–
NS1	–	–
NEP (NS2)	Q L L L E V E Q E I R A (104–115)* : : Q R L Q E V E A E V A A (148–159)**	–

Примечание:

- | – идентичные аминокислоты;
- : – изофункциональные аминокислоты;
- * – аминокислотная последовательность белка вируса гриппа (порядковые номера аминокислотных остатков);
- ** – аминокислотная последовательность эндотелиального фактора (порядковые номера аминокислотных остатков).

Note:

- | – identical amino acids;
- : – isofunctional amino acids;
- * – amino acid sequence of an influenza virus protein fragment (ordinal numbers of amino acid residues);
- ** – amino acid sequence of a host immune system protein fragment (ordinal numbers of amino acid residues).

ряда вирусных белковых структур имеется множество последовательностей, мимикрирующих таковые эндотелиальных факторов (табл. 3).

В частности, фрагменты аминокислотной последовательности, гомологичные eNOS, обнаружены в белках PB2, HA, M1 и NEP (NS2) исследуемого ВГ. В этих же структурах, за исключением последней, обнаружены также фрагменты последовательности аминокислот, гомологичные PAI-1. Гомология данных участков, мимикрирующих эндотелиальные факторы, характеризуется высокой степенью сходства: из 12 сравниваемых аминокислотных остатков в каждом случае 7 гомологичны и по 2–4 – изофункциона-

нальны, т.е. гомологичность сравниваемых фрагментов превышает 80%.

Обсуждение

ВГ поражает верхний отдел респираторного тракта, приводя обычно к самолимитирующей болезни с умеренными симптомами со стороны дыхательной системы. При тяжёлых формах гриппозной инфекции возбудитель может не только инфицировать клетки респираторных путей, но и вызывать острое поражение лёгких с развитием повышенной проницаемости лёгочных капилляров, а также сосудистый коллапс. Ухудшение клинического состояния пациентов свя-

зывают с ДЭ, ведущей к отёку лёгких, гипоксемии и дыхательной недостаточности [23, 24].

Согласно современным представлениям ВГ А может способствовать возникновению ДЭ различными путями: 1) за счёт реорганизации цитоскелета, приводящей к продукции и последующему утолщению стресс-фибрилл. Эти нарушения обуславливают изменение морфологии клеток и повышают их проницаемость; 2) посредством синтеза микроРНК, индуцирующих сигнальные пути с вовлечением PKC (протеинкиназы C), Rho/ROCK, Ras/Raf/MEK/ERK, а также комплекса кальций–кальцимодулин (Ca^{2+} /CaM), что дополнительно увеличивает проницаемость клеток, вызывая их дисфункцию; 3) запуском механизма цитокинового шторма, при котором наблюдается чрезмерная продукция и секреция фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α). Резкое повышение содержания последнего ведёт к Rho-киназа-индуцированному образованию стресс-фибрилл и усиливает фосфорилирование лёгких цепей миозина, вследствие чего происходит блеббинг («вскипание мембран»); клетка приобретает округлую форму и подвергается апоптозу [25–27]. Наблюдаемая при цитокиновом шторме избыточная продукция ФНО- α , интерлейкинов 6 и 1 β приводит также к повышению активности трипсина в эндотелиоцитах, что вызывает деградацию одного из белков плотных контактов (ZO-1, zonula occludens-1) и повышение проницаемости сосудистой стенки за счёт протеазного рецептора 2 (PAR-2) [28]. Совокупность указанных изменений, в свою очередь, обуславливает разрушение плотных межклеточных контактов и дальнейший рост сосудистой проницаемости; 4) модулированием экспрессии эндотелиальных факторов, таких как eNOS [23], tPA [29], PAI-1.

Изменение степени экспрессии ряда факторов, синтезируемых клетками эндотелия, вносит существенный вклад в формирование ДЭ, приводя к возникновению сердечно-сосудистой патологии [24]; при этом непосредственная роль гриппозной инфекции в данном процессе остаётся до конца не выясненной. В настоящем исследовании изучена экспрессия 2 эндотелиальных факторов: eNOS и PAI-1. Экспрессия этих молекул определялась при инфицировании клеток эндотелия EA.hy926 исследуемым ВГ через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Оказалось, что экспрессия eNOS в инфицированных вирусом эндотелиоцитах была резко снижена на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с клеточным контролем. Выраженность её уменьшалась до 7,9% уже через 6 ч (контроль принят за 100%). Через 12 ч уровень суммарной экспрессии снижался до 12,1%, через 18 ч до 5,4% и спустя 24 ч достигал своего минимума – 2,9%. Через 48 ч степень экспрессии eNOS была равной 3,1%, а спустя 72 ч – 3,3%.

Экспрессия PAI-1 в инфицированных ВГ клетках эндотелия значительно варьировала. Так, через 6 ч показатель её интенсивности PAI-1 уменьшился до 49,6% (контроль – 100%), а спустя 12 ч составлял 43,2%, после чего наблюдалось резкое повышение экспрессии уже через 18 ч после внесения возбудителя – 116,7%.

Наиболее выраженное снижение зарегистрировано через 24 ч после инфицирования (18,9%). Указанные изменения сохранялись спустя 48 и 72 ч: 23,5 и 35% соответственно.

Известно, что существенное уменьшение экспрессии eNOS в эндотелиоцитах ведёт к снижению синтеза NO и нарушению процессов регуляции релаксации и констрикции сосудистой стенки, что является одним из ведущих звеньев в патогенезе ДЭ кровеносных сосудов [15, 30]. Один из механизмов снижения продукции NO – разобщение eNOS с субстратом, в качестве которого выступает L-аргинин. Это приводит к тому, что молекулы данного фактора, продолжая получать электроны от восстановленного никотин/амиддинуклеотид-фосфата (NADPH), поставляют их другому субстрату – молекулярному кислороду (O_2), в результате чего образуются высокоактивные формы кислорода (в частности, супероксиданион ($\text{O}_2^{\cdot-}$)) [31, 32]. Свободные радикалы в дальнейшем могут вызывать окислительный стресс и усиливать проявления ДЭ. В то же время снижение биодоступности NO, вырабатываемого eNOS, может компенсироваться за счёт индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Экспрессия данной изоформы NO-синтазы связана с провоспалительными цитокинами и увеличивается с активацией транскрипционного фактора NF- κ B. Несмотря на данный адаптивный механизм, концентрация NO становится избыточной и возрастает с нано- до микромолярной. Избыток NO взаимодействует с $\text{O}_2^{\cdot-}$, в результате чего образуется пероксинитрит (ONOO^-). В свою очередь, высокое содержание последнего коррелирует с гибелью эндотелиальных клеток посредством апоптоза [33–35] или некроза. NO-индуцируемое перекисное окисление липидов в данном случае может служить причиной серьёзного повреждения сосудистой стенки, ещё больше усугубляя ДЭ [36].

PAI-1 является основным ингибитором активаторов плазминогена: тканевого (tPA) и урокиназного (uPA) [37], а также участвует в регуляции фибринолитической системы. Первым двум веществам отводится важная роль в регуляции гемостаза при гриппе. Так, полученные в ходе исследования данные о модуляции экспрессии PAI-1 в целом коррелируют с имеющимися сведениями относительно изменения экспрессии tPA в инфицированных возбудителем гриппа эндотелиоцитах человека EA.hy926: экспрессия PAI-1 через 12 ч снижалась, а tPA – возрастала и наоборот, спустя 18 ч экспрессия tPA уменьшалась, а PAI-1 – повышалась [29]. Столь выраженные изменения степени экспрессии PAI-1 и tPA в клетках эндотелия подтверждают способность ВГ A(H1N1)pdm09 вызывать ДВС-синдром. Именно сочетанное взаимодействие эндотелиальных факторов PAI-1 и tPA (снижение концентрации одного с повышением содержания другого и наоборот) служит одним из ведущих патофизиологических механизмов развития этого синдрома, наблюдаемого при сепсисе и тяжёлых вирусных инфекциях [38].

Таким образом, инфицирование ВГ клеток эндотелия приводит к нарушению экспрессии эндоте-

лиальных факторов и, следовательно, к поражению кровеносных сосудов. Одним из путей воздействия патогена на эндотелиоциты может быть молекулярная мимикрия вирусных белков и аминокислотных фрагментов молекул PAI-1 и eNOS. Сравнительный компьютерный анализ первичной последовательности PAI-1 и eNOS со структурами ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 позволил выявить в ряде его белков (PB2, HA, M1, NP (NS2)) фрагменты с высокой степенью гомологии. Можно предположить, что мимикрия вирусом факторов эндотелия может играть важную роль в дисрегуляции функций последнего, вызывая широкий спектр нарушений, связанных с проницаемостью клеточных мембран, развитием цитокинового шторма [28], изменениями процессов вазодилатации и вазоконстрикции. Гомологичные фрагменты могут высвобождаться из белковых структур вируса путём протеолиза клеточными протеазами либо вирусными же белками, обладающими подобной активностью.

Другой потенциальный механизм нарушения регуляции вирусными гомологичными фрагментами функций эндотелия может проявляться в индукции иммунного ответа к гомологичным фрагментам вирусных белков, в частности выработкой специфических АТ, способных также распознавать и, соответственно, блокировать содержащие их белковые структуры макроорганизма. Подтверждением возможности такого варианта патогенеза аутоиммунных реакций служат результаты вакцинации в период пандемии гриппа 2009–2010 гг. Проведение прививок вакциной Pandemrix («GlaxoSmithKline», Великобритания) имело следствием резкий рост частоты нарколепсии у детей и подростков в разных странах. Сопоставление характеристик разных вакцинных препаратов показало возможную связь возникновения этого заболевания с высоким содержанием в вакцине Pandemrix нуклеопротеина ВГ и образованием к нему АТ, перекрёстно реагировавших с рецептором гипокретина-2 (орексина-2). Оказалось, что рецептор гипокретина-2 имеет в своей внеклеточной петле мотив, присутствующий в составе вирусного нуклеопротеина [39].

Заключение

Таким образом, полученные данные указывают на способность ВГ А(H1N1)pdm09 влиять на экспрессию ряда факторов эндотелия – eNOS и PAI-1, тем самым способствуя формированию ДЭ, что является чрезвычайно важным условием развития сердечно-сосудистой патологии. Описанный феномен может быть использован при дальнейшей разработке патогенетической терапии сосудистых осложнений инфекции, вызываемой данным возбудителем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95–100. <https://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
2. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pe-*

- diatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541–4. <https://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
3. Smeeth L., Cook C., Thomas S., Hall A.J., Hubbard R., Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006; 367(9516): 1075–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68474-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68474-2)
4. Corrales-Medina V.F., Madjid M., Musher D.M. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10(2): 83–92. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70331-7)
5. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(3): 572–9. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00152-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00152-2)
6. Ludwig A., Lucero-Obusan C., Schirmer P., Winston C., Holodny M. Acute cardiac injury events ≤ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2015; 15: 109. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0095-0>
7. Kwong J.C., Schwartz K.L., Campitelli M.A., Chung H., Crowcroft N.S., Karnauchow T., et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(4): 345–53. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1702090>
8. Barnes M., Heywood A.E., Mahimbo A., Rahman B., Newall A.T., Macintyre C.R. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case-control studies. *Heart.* 2015; 101(21): 1738–47. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307691>
9. Warren-Gash C., Smeeth L., Hayward A.C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9(10): 601–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70233-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70233-6)
10. Fagnoul D., Pasquier P., Bodson L., Ortiz J.A., Vincent J.L., De Backer D. Myocardial dysfunction during H1N1 influenza infection. *J. Crit. Care.* 2013; 28(4): 321–7. <https://doi.org/10.1016/j.jccr.2013.01.010>
11. Tseng G.S., Hsieh C.Y., Hsu C.T., Lin J.C., Chan J.S. Myopericarditis and exertional rhabdomyolysis following an influenza A (H3N2) infection. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-283>
12. Lobo M.L., Taguchi A., Gaspar H.A., Ferranti J.F., de Carvalho W.B., Delgado A.F. Fulminant myocarditis associated with the H1N1 influenza virus: case report and literature review. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2014; 26(3): 321–6. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20140046>
13. Lubrano V., Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc. Res.* 2016; 105: 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.006>
14. Kwok C.S., Aslam S., Kontopantelis E., Myint P.K., Zaman M.J., Buchan I., et al. Influenza, influenza-like symptoms and their association with cardiovascular risks: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69(9): 928–37. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12646>
15. Gliozzi M., Scicchitano M., Bosco F., Musolino V., Carresi C., Scarano F., et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(13): 3294. <https://doi.org/10.3390/ijms20133294>
16. Sessa W.C. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* 2004; 117(Pt. 12): 2427–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.01165>
17. Naseem K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects. Med.* 2005; 26(1-2): 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>
18. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(11): 4651–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>
19. Ghosh A.K., Vaughan D.E. PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(2): 493–507. <https://doi.org/10.1002/jcp.22783>
20. Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>
21. Burry R.W. Immunocytochemistry: a Practical Guide for Biomedical Research. New York: Springer; 2010.
22. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>

23. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 2015; 22(14): 1230–42. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6158>
24. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
25. Petrache I., Birukov K., Zaiman A.L., Crow M.T., Deng H., Wadgaonkar R., et al. Caspase dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved om TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J.* 2003; 17(3): 407–16. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0672com>
26. Petrache I., Crow M.T., Neuss M., Garcia J.G. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306(1): 244–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00945-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00945-8)
27. Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* 1999; 73(3): 2222–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2222-2231.1999>
28. Wang S., Le T.Q., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., et al. Influenza virus-cytokine-protase cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(7): 991–1001. <https://doi.org/10.1086/656044>
29. Азарёнок А.А., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Харченко Е.П., Козлова Н.М., Жилинская И.Н. Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А и его поверхностных белков. *Тромбоз, гемостаз, реология.* 2014; (1): 3–8.
30. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart. J.* 2012; 33(7): 829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
31. Lubrano V., Balzan S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free Radic. Res.* 2014; 48(8): 841–8. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.929122>
32. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 152786. <https://doi.org/10.1155/2013/152786>
33. Pritchard K.A. Jr., Ackerman A.W., Gross E.R., Stepp D.W., Shi Y., Fontana J.T., et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(21): 17621–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.c100084200>
34. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharm. Rev.* 1991; 43(2): 109–42.
35. Ahmad R., Rasheed Z., Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2009; 31(3): 388–96. <https://doi.org/10.1080/08923970802709197>
36. Natarajan M., Konopinski R., Krishnan M., Roman L., Bera A., Hongying Z., et al. Inhibitor-κB kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; 308(8): 673–83. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00367.2014>
37. Yasar Yildiz S., Kuru P., Toksoy Oner E., Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal.* 2014; 2014: 858293. <https://doi.org/10.1155/2014/858293>
38. Gando S., Levi M., Toh C. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016; 2: 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
39. Hallberg P., Smedje H., Eriksson N., Kohnke H., Daniilidou M., Öhman I., et al. Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival. *EBioMedicine.* 2019; 40: 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.041>
3. Smeeth L., Cook C., Thomas S., Hall A.J., Hubbard R., Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006; 367(9516): 1075–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68474-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68474-2)
4. Corrales-Medina V.F., Madjid M., Musher D.M. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10(2): 83–92. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70331-7)
5. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(3): 572–9. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00152-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00152-2)
6. Ludwig A., Lucero-Obusan C., Schirmer P., Winston C., Holodniy M. Acute cardiac injury events ≤30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2015; 15: 109. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0095-0>
7. Kwong J.C., Schwartz K.L., Campitelli M.A., Chung H., Crowcroft N.S., Karnauchow T., et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(4): 345–53. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1702090>
8. Barnes M., Heywood A.E., Mahimbo A., Rahman B., Newall A.T., Macintyre C.R. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case-control studies. *Heart.* 2015; 101(21): 1738–47. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307691>
9. Warren-Gash C., Smeeth L., Hayward A.C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9(10): 601–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70233-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70233-6)
10. Fagnoul D., Pasquier P., Bodson L., Ortiz J.A., Vincent J.L., De Backer D. Myocardial dysfunction during H1N1 influenza infection. *J. Crit. Care.* 2013; 28(4): 321–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.01.010>
11. Tseng G.S., Hsieh C.Y., Hsu C.T., Lin J.C., Chan J.S. Myopericarditis and exertional rhabdomyolysis following an influenza A (H3N2) infection. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-283>
12. Lobo M.L., Taguchi A., Gaspar H.A., Ferranti J.F., de Carvalho W.B., Delgado A.F. Fulminant myocarditis associated with the H1N1 influenza virus: case report and literature review. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2014; 26(3): 321–6. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20140046>
13. Lubrano V., Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc. Res.* 2016; 105: 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.006>
14. Kwok C.S., Aslam S., Kontopantelis E., Myint P.K., Zaman M.J., Buchan I., et al. Influenza, influenza-like symptoms and their association with cardiovascular risks: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69(9): 928–37. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12646>
15. Gliozzi M., Scicchitano M., Bosco F., Musolino V., Carresi C., Scarano F., et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(13): 3294. <https://doi.org/10.3390/ijms20133294>
16. Sessa W.C. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* 2004; 117(Pt. 12): 2427–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.01165>
17. Naseem K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects. Med.* 2005; 26(1-2): 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>
18. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(11): 4651–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>
19. Ghosh A.K., Vaughan D.E. PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(2): 493–507. <https://doi.org/10.1002/jcp.22783>
20. Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats [Modelirovaniye grippoznoy infektsii u polovozrelykh krys stoka Wistar]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166> (in Russian)
21. Burry R.W. Immunocytochemistry: a Practical Guide for Biomedical Research. New York: Springer; 2010.
22. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
23. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid. Re-*

REFERENCES

1. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95–100. <https://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
2. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541–4. <https://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>

- dox Signal.* 2015; 22(14): 1230–42. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6158>
24. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
 25. Petrache I., Birukov K., Zaiman A.L., Crow M.T., Deng H., Wadgaonkar R., et al. Caspase dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J.* 2003; 17(3): 407–16. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0672com>
 26. Petrache I., Crow M.T., Neuss M., Garcia J.G. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306(1): 244–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00945-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00945-8)
 27. Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* 1999; 73(3): 2222–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2222-2231.1999>
 28. Wang S., Le T.Q., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(7): 991–1001. <https://doi.org/10.1086/656044>
 29. Azarenok A.A., Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Kharchenko E.P., Kozlova N.M., Zhilinskaya I.N. Modification in activity of tissue plasminogen activator of endothelial cells in response to influenza virus A and its surface proteins [Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А и его поверхностных белков]. *Tromboz, gemostaz, reologiya.* 2014; (1): 3–8. (in Russian)
 30. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart. J.* 2012; 33(7): 829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
 31. Lubrano V., Balzan S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free Radic. Res.* 2014; 48(8): 841–8. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.929122>
 32. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 152786. <https://doi.org/10.1155/2013/152786>
 33. Pritchard K.A. Jr., Ackerman A.W., Gross E.R., Stepp D.W., Shi Y., Fontana J.T., et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(21): 17621–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.c100084200>
 34. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharm. Rev.* 1991; 43(2): 109–42.
 35. Ahmad R., Rasheed Z., Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2009; 31(3): 388–96. <https://doi.org/10.1080/08923970802709197>
 36. Natarajan M., Konopinski R., Krishnan M., Roman L., Bera A., Hongying Z., et al. Inhibitor-κB kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; 308(8): 673–83. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00367.2014>
 37. Yasar Yildiz S., Kuru P., Toksoy Oner E., Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal.* 2014; 2014: 858293. <https://doi.org/10.1155/2014/858293>
 38. Gando S., Levi M., Toh C. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016; 2: 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
 39. Hallberg P., Smedje H., Eriksson N., Kohnke H., Daniilidou M., Öhman I., et al. Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival. *EBioMedicine.* 2019; 40: 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.041>



Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток

© Мазлум А.¹, Иголкин А.С.¹, Зиняков Н.Г.¹, ван Шалквик А.², Власова Н.Н.¹

¹ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), 600901, Владимирская обл., Владимир, мкр. Юрьевец, Россия;

²Ветеринарный институт Ондерстепорта, 100 Олд Саутпен Род, Ондерстепорт 0110, Южно-Африканская Республика

Введение. Возбудитель африканской чумы свиней (*Suidae*) (АЧС) – крупный (175–215 нм) двухцепочечный ДНК-вирус, относящийся к семейству *Asfarviridae*. К настоящему времени секвенирован и подробно проанализирован только геном штамма BA71V, адаптированного к клеточной культуре Vero.

Целью данной работы явился сравнительный анализ полногеномного сиквенса исходного изолята вируса АЧС Odintsovo 02/14 и 2 штаммов, полученных на уровне 30 и 50 пассажей и адаптированных к росту в клеточной культуре CV-1.

Материал и методы. В работе использованы различные варианты вируса АЧС: исходный изолят Odintsovo 02/14 и 2 штамма адаптированного вируса: ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50. Библиотеку последовательностей конструировали с использованием набора «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina», США).

Результаты. Длина геномов штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 составила 186 529 и 186 525 п.н. соответственно. Всего между исходным и адаптированными вариантами обнаружены 78 однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNP); кроме того, установлено наличие крупноразмерной делеции величиной 2947 п.н. в правом (3'-концевом) вариабельном регионе у обоих адаптированных штаммов.

Обсуждение. Возбудитель АЧС как ДНК-содержащий вирус может не иметь высокого мутационного статуса. Однако в данном исследовании повторно установлено, что адаптация этого инфекционного агента к росту в перевиваемой культуре клеток (КК) приводит к появлению крупноразмерной делеции в 3'-вариабельной области генома.

Заключение. В связи с недостаточной изученностью данной проблемы необходимо проведение дополнительных исследований, что позволит подтвердить имеющиеся данные относительно влияния каждой из описанных мутаций на характер размножения вируса и степень его вирулентности.

Ключевые слова: вирус африканской чумы свиней; полногеномное секвенирование; адаптированные вирусы; перевиваемая культура клеток

Для цитирования: Мазлум А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалквик А., Власова Н.Н. Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 211-216. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50>

Для корреспонденции: Мазлум Али, канд. биол. наук, ведущий ветеринар, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), 600901, Владимирская обл., Владимир, мкр. Юрьевец, Россия. E-mail: ali.mazloun6@gmail.com

Участие авторов: Мазлум А. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Иголкин А.С. – написание текста, редактирование статьи; Зиняков Н.Г. – проведение лабораторных исследований; ван Шалквик А. – сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Власова Н.Н. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста, редактирование статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.02.2021

Принята к печати 11.05.2021

Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture

Ali Mazloum¹, Alexey S. Igolkin¹, Nikolay G. Zinyakov¹, A. van Schalkwyk², Natalia N. Vlasova²

¹FSBI «Federal Centre for Animal Health» («ARRIAH»), 600901, Vladimir region, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia;

²Onderstepoort Veterinary Institute, 100 Old Soutpan road, Onderstepoort 0110, South Africa

Introduction. African swine fever virus (ASFV) is a large, double-stranded DNA virus in the *Asfarviridae* family. It is the causative agent of African swine fever (ASF). Only the genome of BA71V strain, adapted to Vero cell culture, was fully analyzed.

The aim of this study was analyzing the complete genome sequence of two strains of adapted to the growth in CV-1 cell culture (CC) ASFV obtained after 30 and 50 passages, in comparison to the parental virus.

Material and methods. ASFV isolate Odintsovo 02/14 (parental), ASFV adapted variants ASFV/ARRIAH/CV-1/30 and ASFV/ARRIAH/CV-1/50 were all used to extract genomic DNA (gDNA). Sequencing library was constructed using the «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina», USA).

Results. Genomes of ASFV/ARRIAH/CV-1/30 and ASFV/ARRIAH/CV-1/50 consisted of 186 529 bp and 186 525 bp, respectively. Total 78 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified between the parental Odintsovo 02/14 and the two high passaged strains, as well as a 2947 bp large-size deletion in the 3' variable region of adapted viruses was detected.

Discussion. ASFV as a DNA-containing virus may not have a very high level of mutation, but this is the second study showing that adaptation to growth in continuous CC leads to large deletions in the genome of the virus.

Conclusion. Mutations in the protein-coding regions of the genome can be synonymous and non-synonymous, i.e. leading to amino acid substitution. Additional research is needed to understand the influence of the mutations described in the adaptation process on the reproduction of the virus and its virulence.

Keywords: African swine fever virus; complete genome sequencing; adapted viruses; continuous cell culture

For citation: Mazloum Ali, Igolkin A.S., Zinyakov N.G., van Schalkwyk A., Vlasova N.N. Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 211-216. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-50>

For correspondence: Mazloum Ali, Ph.D. (Biol.), Leading Veterinarian, FSBI «Federal Center for Animal Health» («ARRIAH»), 600901, Vladimir region, Vladimir, Yuryevets microdistrict, Russia. E-mail: ali.mazloum6@gmail.com

Information about the authors:

Mazloum Ali, <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Zinyakov N.G., <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

van Schalkwyk A., <https://orcid.org/0000-0003-4761-8767>

Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

Contribution: Mazloum A. – research concept and design, performing of the laboratory research, collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text; Zinyakov N.G. – performing of the laboratory research; Igolkin A.S. – writing of the text, editing of the article; van Schalkwyk A. – collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text; Vlasova N.N. – performing of the laboratory research, collection and processing of the material, statistical processing, writing of the text, editing of the article.

Acknowledgement. The study has no sponsorship.

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

Received: 16 February 2021

Accepted: 11 May 2021

Введение

Возбудителем африканской чумы свиней (*Suidae*) (АЧС) является крупный (175–215 нм) содержащий двухцепочечную ДНК вирус, относящийся к семейству *Asfarviridae*. Вызываемая им инфекция представляет собой высококонтагиозное заболевание с выраженным геморрагическим синдромом и высоким уровнем смертности у домашних свиней (*Sus scrofa domestica*) и диких кабанов (*Sus scrofa*).

Для изучения основ патогенности и иммуногенности вируса АЧС необходимо проведение сравнительного анализа биологических свойств возбудителя и структуры его генов. Патоген обладает способно-

стью к размножению в первичных культурах клеток (КК) свиней: лейкоцитов, альвеолярных макрофагов и т.д. Однако эти культуры трудно стандартизировать, поскольку их характеристики варьируют в зависимости от особенностей используемого животного. Это значительно затрудняет получение генетически однородного образца вируса, пригодного для анализа. Для решения этой проблемы различные изоляты вируса АЧС были адаптированы к росту в перевиваемой КК, в частности Georgia 2007/1 и BA71 – в культуре Vero. В результате такого адаптационного процесса получены штаммы ASFV-G/V и BA71V [1, 2], постепенно утратившие вирулентные свойства. Необходи-

мо отметить, что полногеномное секвенирование было проведено только для вируса BA71V [2].

Поскольку в ходе адаптации к росту в перевиваемых КК вирулентность возбудителя снизилась [3], целью данной работы являлся сравнительный анализ полногеномного сиквенса 2 штаммов вируса АЧС, полученных на уровне 30 и 50 пассажей в культуре клеток CV-1, с генетическим материалом исходного изолята.

Материал и методы

Первичную и перевиваемую культуры клеток CV-1 выращивали в питательной среде Игла с добавлением 20% бычьей фетальной сыворотки (FBS) в соответствии с методическими рекомендациями [4].

С целью выделения геномной ДНК (гДНК) использовали различные варианты вируса АЧС: исходный изолят Odintsovo 02/14 и 2 штамма адаптированного вируса ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50. Генетический материал выделяли фенол-хлороформным методом, а осадок гДНК элюировали в воде, не содержащей нуклеаз [5]. Библиотеку последовательностей секвенирования конструировали с использованием набора «Nextera XT DNA library preparation kit» («Illumina»). Секвенирование нового поколения (next-generation sequencing, NGS) проводили с применением набора реагентов «MiSeq reagent kit v2» на настольном секвенаторе MiSeq («Illumina», США). Анализ результатов осуществляли в программном обеспечении CLC Genomics Workbench v9.5.2 («Qiagen», Aarhus, Дания; www.clcbio.com); открытые рамки считывания (ОРС) были предсказаны и вычислены при помощи программы GATU.

Полученные последовательности генома анализировали и сравнивали со структурой гДНК штамма FR682468.1_ASFV/Georgia 2007/1. Полные последовательности были депонированы в GenBank с номерами доступа MW528217 и MW528218.

Для построения выравнивания и обнаружения точечных мутаций в виде однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms, SNPs) использовали программу CLC Genomics Workbench v9.5.2.

Результаты

В ФГБУ ВНИИЗЖ были детально изучены биологические и генетические характеристики изолята вируса АЧС ASFV Odintsovo 02/14 [6], поэтому данную его разновидность использовали для адаптации к росту в перевиваемой культуре фибробластоподобных псевдодиплоидных клеток африканской зелёной мартовки (*Cercopithecus aethiops*) (CV-1).

В ходе проведённых экспериментов получены штаммы вируса АЧС, которые обладали способностью к репродукции в непермиссивной КК CV-1. Определены биологические свойства и полноразмерная последовательность геномов этих штаммов, полученных на уровне 30 и 50 пассажей и адаптированных к клеточной культуре (ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 соответственно). Иссле-

дования выявили существенное снижение вирулентности изолята ASFV/ARRIAH/CV-1/30 (~<20 %), однако его геном в постадаптационный период не был удовлетворительно охарактеризован [3].

В процессе опытов удалось установить характер влияния адаптации возбудителя АЧС к росту в перевиваемой КК на структуру его генома, а также выявить мутации, возникшие в результате адаптационного процесса. Установлено, что длина ДНК у штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50 составила 186 529 и 186 525 п.н. соответственно. Между исходным и адаптированными вариантами обнаружены различия, проявившиеся в наличии у последних 78 однонуклеотидных полиморфизмов, а также значительной делеции (2947 п.н.) в 3'-концевом варибельном регионе между 181 980–184 929 п.н. Аналогичная делеция ранее описана в геноме штамма BA71V – другого адаптированного к росту в культуре Vero варианта вируса [2].

Наблюдаемые различия в размере последовательности полных геномов анализируемых штаммов ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/CV-1/50, составили лишь 4 п.н., тогда как у Georgia 2007/1 (189 344 п.н.) и Odintsovo 02/14 (189 122 п.н.) они составляли 222 п.н. Разность длины геномов исходного изолята и его адаптированных вариантов превышала 2590 п.н. (2,9 kb), что указывает на наличие крупноразмерной делеции в генетических последовательностях обоих штаммов вируса.

Из 78 SNPs между родительским штаммом Odintsovo 02/14 и двумя адаптированными штаммами 13 располагаются внутри межгенных областей, а 5 удалить также связаны с повторяющимися нуклеотидами гомополимера. Находящиеся внутри ОРС 8 SNP охарактеризованы как синонимичные, а 52 – как несинонимичные. Данные обо всех 60 синонимичных и несинонимичных SNP приведены в **табл. 1**.

Как видно из таблицы, большинство ($n = 36$) несинонимичных SNP являются консервативными заменами аминокислотных остатков, тогда как 14 олигонуклеотидных полиморфизмов привели к появлению в определённой последовательности белка незаряженной или иной заряженной аминокислоты.

Из несинонимичных олигонуклеотидных полиморфизмов 2 вызвали образование в гене стоп-кодона, что, в свою очередь, не позволяет осуществить полноценный белковый синтез либо полностью блокирует построение предсказанного белка (**табл. 2**). Результаты анализа влияния нуклеотидных замен с появлением стоп-кодона или с проявлением неконсервативного замена аминокислот в различных белковых последовательностях вируса АЧС приведены в **табл. 2**; в ней также указаны белки, отсутствующие из-за делеции 2,9 kb в составе генома.

Представленные результаты наглядно демонстрируют, что большинство замен аминокислотных остатков происходило в геноме адаптированных вариантов ASFV/ARRIAH/CV-1/50 и/или ASFV/ARRIAH/CV-1/30, за исключением мутаций, которые были уникальными для генома изолята Odintsovo 02/14 (в таблице выделены серым цветом).

Таблица 1. Гены различных штаммов вируса африканской чумы свиней, кодирующие белки с синонимичными и несинонимичными однонуклеотидными полиморфизмами

Table 1. Genes of different strains of the African swine fever virus encoding proteins with synonymous and non-synonymous single nucleotide polymorphisms

Ген, кодирующий белок Protein encoding gene	Штамм вируса Virus strain				Предсказанные аминокислотные замены в белке* Predicted amino acid substitutions in the protein*
	Georgia 2007/1	Odintsovo 02/14	ASFV/ARRIAH/CV-1/30	ASFV/ARRIAH/CV-1/50	
<i>ASFV_G_ACD_00270</i>	R	R	R	K	R16K
<i>ASFV_G_ACD_00270</i>	R	R	R	K	R20K
<i>MGF-360-11L</i>	F	F	F	F	F120F
<i>MGF-360-14L</i>	L	L	L	F	L118F
<i>A104R</i>	T	T	T	I	T22I
<i>MGF-360-15R</i>	R	R	R	K	R60K
<i>A859L</i>	S	S	S	F	S244F
<i>A859L</i>	Y	Y	Y	F	Y614F
<i>A859L</i>	F	F	F	F	F684F
<i>F317L</i>	S	S	S	F	S206F
<i>F77R</i>	Q	Q	Q	Q	Q65Q
<i>F1055L</i>	I	I	I	F	I596F
<i>ASFV_G_ACD_00760</i>	L	L	L	I	L24I
<i>K205R</i>	S	S	S	S	S192S
<i>EP1242L</i>	Y	Y	Y	F	Y817F
<i>EP1242L</i>	S	S	S	F	S998F
<i>EP1242L</i>	L	L	L	F	L1145F
<i>EP84R</i>	L	L	L	F	L37F
<i>EP153R</i>	L	L	L	F	L10F
<i>EP364R</i>	C	C	C	G	C158G
<i>M1249L</i>	P	P	L	P	P1055L
<i>M1249L</i>	P	P	S	P	P1093S
<i>M1249L</i>	P	P	L	P	P1248L
<i>C257L</i>	L	L	L	F	L176F
<i>C962R</i>	T	T	T	N	T643N
<i>C962R</i>	L	L	L	L	L645L
<i>B962L</i>	L	L	L	F	L228F
<i>B318L</i>	I	I	I	F	I170F
<i>B318L</i>	L	L	L	F	L294F
<i>B354L</i>	I	I	I	I	I101I
<i>B125R</i>	D	D	D	E	D27E
<i>G1340L</i>	D	D	D	E	D979E
<i>0174L</i>	S	S	S	F	S75F
<i>0174L</i>	S	S	S	F	S121F
<i>NP1450L</i>	L	L	L	F	L446F
<i>NP419L</i>	N	N	N	S	N414S
<i>H359L</i>	A	A	A	T	A225T
<i>H359L</i>	I	I	I	F	I247F
<i>E301R</i>	D	D	D	E	D162E
<i>E199L</i>	F	S	F	F	F133S
<i>I267L</i>	S	S	S	F	S65F
<i>ASFV_G_ACD_01990</i>	F	F	F	F	F48F
<i>DP60R</i>	F	F	F	F	F27F
<i>DP60R</i>	V	V	V	F	V28F

Примечание. Аминокислота, предсказанная для каждого штамма, а также её положение указаны в столбце «Предсказанные аминокислотные замены в белке»; там же указаны позиции, затронутые в штаммах ASFV/ARRIAH/CV-1/30 либо Odintsovo 02/14. Синонимичные полиморфизмы выделены светло-серым цветом; изменения нуклеотидов, приведшие к аминокислотным заменам, отмечено тёмно-серым цветом; * – первая буква представляет аминокислоту у исходного гена (цифры указывают на позицию в аминокислотной последовательности белка), вторая буква представляет аминокислоту после мутации.

Note. The amino acid predicted for each strain and its position are listed in the column «Predicted amino acid substitutions in the protein»; the positions affected in ASFV/ARRIAH/CV-1/30 or Odintsovo 02/14 strains are also listed there. Synonymous polymorphisms are highlighted in light gray; nucleotide changes that led to amino acid substitutions are marked in dark gray; * – the first letter represents the amino acid of the wild type gene (the numbers indicate the position in the amino acid sequence of the protein), and the second letter represents the amino acid after the mutation.

Таблица 2. Список предсказанных аминокислотных замен с изменениями заряда или образованием стоп-кодона

Table 2. List of predicted amino acid substitutions with either charge changes or generation of stop-codon

Ген, кодирующий белок Protein encoding gene	Штамм вируса Virus strain				Предсказанные аминокислотные замены в белке* Predicted amino acid substitutions in the protein*
	Georgia 2007/1	Odintsovo 02/14	ASFV/ARRIAH/CV-1/30	ASFV/ARRIAH/CV-1/50	
<i>MGF_110_1L</i>	W	W	W	Стоп-кодон Stop-codon	Стоп-кодон в позиции 197 Stop-codon at position 197
<i>MGF_360_8L</i>	E	E	E	K	E70K
<i>MGF-505-7R</i>	D	D	D	N	D204N
<i>MGF_505_6R</i>	E	E	E	K	E378K
<i>MGF_505_6R</i>	E	E	E	K	E475K
<i>F334L</i>	M	M	M	K	M145K
<i>F1055L</i>	D	D	D	N	D576N
<i>F1055L</i>	E	E	E	K	E575K
<i>EP1242L</i>	D	D	D	N	D700N
<i>C717R</i>	D	D	D	N	D313N
<i>B318L</i>	Q	Q	Q	K	Q277K
<i>B354L</i>	E	E	E	Стоп-кодон Stop-codon	Стоп-кодон в позиции 218 Stop-codon at position 218
<i>NP419L</i>	D	D	D	N	D322N
<i>E199L</i>	G	E	G	G	G127E
<i>E24R</i>	D	D	D	N	D86N
<i>DP96R</i>	D	G	D	D	D64G
<i>I7L</i>	+	+	Делеция 2947 п.н. (979 аминокислот) Deletion of 2947 bp (979 amino acids)	Делеция 2947 п.н. (979 аминокислот) Deletion of 2947 bp (979 amino acids)	Отсутствие белка No protein
<i>I8L</i>	+	+			
<i>ASFV_G_ACD_001870</i>	+	+			
<i>I9L</i>	+	+			
<i>I10L</i>	+	+			
<i>I11L</i>	+	+			
<i>MGF_360-18R</i>	+	+			

Примечание. Мутации, уникальные для генома штамма Odintsovo 02/14, обозначены серым цветом; * – первая буква представляет аминокислоту у исходного гена (цифры указывают на позицию в аминокислотной последовательности белка), вторая буква представляет аминокислоту после мутации.

Note. Mutations unique to the genome of the Odintsovo 02/14 isolate are marked in gray; * – the first letter represents the amino acid of the wild type gene (the numbers indicate the position in the amino acid sequence of the protein), and the second letter represents the amino acid after the mutation.

Обсуждение

При определённых условиях возбудитель АЧС как ДНК-содержащий вирус может не иметь высокой изменчивости генома, однако, поскольку на настоящий момент эффективная вакцинопрофилактика при АЧС не разработана, значительное место в изучении данного вируса занимают исследования основ его патогенности и иммуногенности. При этом основным инструментом служит выявление взаимосвязи проявления тех или иных биологических свойств патогена и особенностей структуры его генома.

Поскольку ранее установлено, что адаптация возбудителя АЧС к росту в перевиваемой культуре клеток приводит к значительным изменениям в генетическом материале и снижению вирулентности [3, 7], наиболее информативным подходом в изучении механизмов патогенности вируса АЧС следует признать анализ происходящих при его адаптации изменений в геноме. Указанные предпосылки обуславливают необходимость получения варианта вируса, адаптированного к росту в перевиваемой КК.

В представленной работе наглядно продемонстрировано, что адаптация патогена к росту в перевиваемой культуре CV-1 ведёт к появлению крупноразмерной делеции в 3'-вариабельной области. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей исходного штамма и адаптированных вариантов позволил также выявить 78 олигонуклеотидных полиморфизмов, которые влияли на предсказанную аминокислотную последовательность кодируемого белка или не оказывали подобного влияния. Лишь 2 олигонуклеотидные замены (в генах *MGF_110_1L* и *B354L*) имели результатом образование стоп-кодонов, что даёт основание исключить возможность полноценного синтеза кодируемых ими белков при инфицировании объектов вирусом штамма ASFV/ARRIAH/CV-1/50.

Заключение

Таким образом, наряду с обнаружением значительного количества SNP у 2 адаптированных вариантов вируса АЧС наиболее значимой модификацией в геномах ASFV/ARRIAH/CV-1/30 и ASFV/ARRIAH/

CV-1/50 была крупноразмерная делеция в 2947 п.н. в правой (3'-вариабельной) области обоих штаммов в участке между 181 975–184 920 п.н. Подобная делеция также описана в геноме другого штамма – BA71V, также адаптированного к росту в перевиваемой КК, где были затронуты те же 7 предсказанных белков (см. табл. 2). Однако ввиду недостаточной на сегодняшний день изученности этого вопроса и малого количества публикаций по теме требуются дополнительные исследования для подтверждения характера влияния каждого из описанных изменений на репликацию вируса, его иммуногенность и степень проявления вирулентных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.03250-14>
2. Rodriguez J.M., Moreno L.T., Alejo A., Lacasta A., Rodriguez F., Salas M.L. Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
3. Мазлум А., Зиняков Н.Г., Першин А.С., Шевченко И.В., Жуков И.Ю., Федосеева Д.Н., и др. Анализ изменений генетической структуры и биологических свойств вируса африканской чумы свиней при адаптации к перевиваемой культуре клеток. *Ветеринария сегодня.* 2018; (4): 21–5. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-21-25>
4. Мазлум А., Шарипова Д.В., Гаврилова В.Л. Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней. Владимир; 2019.
5. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Enquist L.W. Preparation of viral DNA from nucleocapsids. *J. Vis. Exp.* 2011; (54): 3151. <https://doi.org/10.3791/3151>
6. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Puzankova O.S., Zhukov I.Y., Pershina A.S., et al. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis. *Int. J. Env. Agricult. Res.* 2017; 3(10): 26–37. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15>
7. Tabares E., Olivares I., Santurde G., Garcia M.J., Martin E., Carnero M.E. African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97(3): 333–46. <https://doi.org/10.1007/bf01314431>

REFERENCES

1. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., et al. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2324–32. <https://doi.org/10.1128/jvi.03250-14>
2. Rodriguez J.M., Moreno L.T., Alejo A., Lacasta A., Rodriguez F., Salas M.L. Genome sequence of african swine fever virus BA71, the virulent parental strain of the nonpathogenic and tissue-culture adapted BA71V. *PLoS One.* 2015; 10(11): e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
3. Mazloun A., Zinyakov N.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Zhukov I.Y., Fedoseeva D.N., et al. Analysis of changes in African swine fever virus genetic structure and biological properties during adaptation to continuous cell culture [Анализ изменений генетической структуры и биологических свойств вируса африканской чумы свиней при адаптации к перевиваемой культуре клеток]. *Veterinariya segodnya.* 2018; (4): 21–5. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-4-27-21-25> (in Russian)
4. Mazloun A., Sharipova D.V., Gavrilova V.L. Guidelines for the isolation and titration of African swine fever virus in porcine spleen cell culture [Metodicheskiye rekomendatsii po vydeleniyu i titrovaniyu virusa afrikanskoy chумы свиней v kul'ture kletok selezenki свиней]. Владимир; 2019. (in Russian)
5. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Enquist L.W. Preparation of viral DNA from nucleocapsids. *J. Vis. Exp.* 2011; (54): 3151. <https://doi.org/10.3791/3151>
6. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A.A., Puzankova O.S., Zhukov I.Y., Pershina A.S., et al. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis. *Int. J. Env. Agricult. Res.* 2017; 3(10): 26–37. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15>
7. Tabares E., Olivares I., Santurde G., Garcia M.J., Martin E., Carnero M.E. African swine fever virus DNA: deletions and additions during adaptation to growth in monkey kidney cells. *Arch. Virol.* 1987; 97(3): 333–46. <https://doi.org/10.1007/bf01314431>



Распространённость вируса папилломы человека (*Papillomaviridae; Human papillomavirus*) высокого канцерогенного риска по результатам скрининга 3 анатомических локусов у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу

© Попова А.А.¹, Домонова Э.А.¹, Покровская А.В.^{1,2}, Шипулина О.Ю.¹, Покровский В.В.¹

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия

Введение. Вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) является этиологическим агентом рака шейки матки, а также оказывает влияние на развитие рака ануса, влагалища, полового члена, вульвы и ротоглотки. В связи с этим дальнейшее изучение биологических свойств этого агента и частоты его встречаемости в различных популяциях представляет собой актуальную задачу.

Цель исследования: установить распространённость ВПЧ ВКР при скрининге 3 анатомических локусов у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению (мужчины, практикующие секс с мужчинами (МСМ); гетеросексуальные мужчины (ГМ)), а также по ВИЧ-статусу (негативный/позитивный).

Материал и методы. Обследованы 256 лиц мужского пола, проживающих в Московском регионе, с различными сексуальным поведением и ВИЧ-статусом. Всем выполнено тестирование, направленное на обнаружение ВПЧ 14 генотипов (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). С целью детекции ДНК ВПЧ ВКР в соскобах из уретры, ануса и мазках из ротоглотки применялся метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Во всех случаях определялось абсолютное значение CD4+ лимфоцитов в периферической крови методом проточной цитометрии. У обследуемых с ВИЧ-позитивным статусом дополнительно проводилось определение РНК ВИЧ в крови посредством ПЦР-РВ.

Результаты. Распространённость инфекции, вызываемой ВПЧ ВКР, среди обследуемых составила 54,7%. Наибольшая частота выявления ВПЧ ВКР по 3 исследованным локусам зафиксирована в группе ВИЧ-позитивных МСМ (82,2%), а наименьшая – у гетеросексуалов с ВИЧ-отрицательным статусом (20,3%). При этом ВПЧ ВКР в соскобе из уретры чаще обнаруживался у ВИЧ-позитивных ГМ (24,0%); в соскобе из ануса и мазке из ротоглотки – в группе ВИЧ-положительных МСМ (79,5 и 13,7% соответственно). Показатель распространённости вируса различных генотипов значительно варьировал в зависимости от анатомического локуса, ВИЧ-статуса и сексуального поведения.

Обсуждение. Впервые получены данные по распространённости ВПЧ ВКР у мужчин с различным сексуальным поведением и ВИЧ-статусом в Московском регионе.

Заключение. Проведение в мужской популяции скрининга на ВПЧ ВКР, основанного на выявлении 14 генотипов вируса в 3 анатомических локусах (уретра, ротоглотка, анус) методом ПЦР-РВ, позволит получить информацию, необходимую для совершенствования системы эпидемиологического мониторинга и рационального планирования профилактических мероприятий среди лиц мужского пола, имеющих любой из факторов риска персистенции папилломавирусной инфекции (наличие ВИЧ-инфекции и/или отношение к группе МСМ).

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; вирус папилломы человека высокого канцерогенного риска; мужчины, практикующие секс с мужчинами; гетеросексуальные мужчины, распространённость

Для цитирования: Попова А.А., Домонова Э.А., Покровская А.В., Шипулина О.Ю., Покровский В.В. Распространённость вируса папилломы человека (*Papillomaviridae; Human papillomavirus*) высокого канцерогенного риска по результатам скрининга 3 анатомических локусов у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 217-226. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-53>

Для корреспонденции: Попова Анна Анатольевна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник специализированного научно-исследовательского отдела эпидемиологии и профилактики СПИД (СНИОЭП СПИД), ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия. E-mail: asya-med@mail.ru

Участие авторов: Попова А.А. – разработка концепции и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, статистическая обработка, написание текста; Домонова Э.А. – сбор и обработка материалов, написание и редактирование текста; Покровская А.В. – сбор и обработка материалов; Шипулина О.Ю. – сбор и обработка материалов, редактирование текста; Покровский В.В. – утверждение окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) (Протокол № 78 от 02.11.2017).

Поступила 19.03.2021
Принята к печати 11.05.2021

ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of human papillomavirus (*Papillomaviridae*; *Human papillomavirus*) of high carcinogenic risk based on the results of screening of three anatomical loci in men stratified by sexual behavior and HIV status

Anna A. Popova¹, Elvira A. Domonova¹, Anastasia V. Pokrovskaya^{1,2}, Olga Yu. Shipulina¹, Vadim V. Pokrovsky¹

¹FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia;

²FSAEI HE «People's Friendship University of Russia», 117198, Moscow, Russia

Introduction. Human papillomavirus (HPV) of high carcinogenic risk (HCR), in addition to being the etiological agent of cervical cancer, also contribute to development of cancer of the anus, vagina, penis, vulva and oropharyngeal cancer. In this connection, further study of the biological properties of this agent and its prevalence in different populations is an urgent task.

The **aim** of the study was to examine the prevalence of HCR HPV in three anatomical loci in men stratified by HIV (human immunodeficiency virus) infection status (negative, HIV+/positive/HIV-) as well as by sexual behavior: men who have sex with men (MSM), heterosexual men (HM).

Material and methods. The study included 256 men from Moscow and Moscow region: 73 MSM/HIV+, 66 MSM/HIV-, 58 HM/HIV+, and 59 HM/HIV-. All men were tested for 14 HCR genotypes of HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68). Smears were taken from three anatomical loci: urethra, anus, oropharynx. Testing was performed using real-time polymerase chain reaction assay (PCR-RT).

Results. The highest prevalence of HCR HPV detection, regardless of the locus, was recorded for MSM/HIV+ (82.2%), and the lowest for HM/HIV- (20.3%). The highest detection of HCR HPV in scrapings of epithelial cells from anus was recorded for MSM/HIV+ (79.5%). The highest incidence of this pathogen in oropharynx also was registered for MSM/HIV+ (13.7%). The highest incidence of HCR HPV in scrapings of epithelial cells from urethra was recorded for HM/HIV+ (24%). The prevalence of HCR HPV among men was found to differ markedly depending on the anatomical locus, HIV status and sexual behavior.

Discussion. For the first time, there were obtained data on the prevalence of HCR HPV in men with different patterns of sexual behavior and HIV status in the Moscow region.

Conclusion. Screening for HCR HPV in male population based on the identification of 14 genotypes of the virus in three anatomical loci (urethra, oropharynx, anus) by PCR-RT will provide the information necessary to improve the system of epidemiological monitoring and proper planning of preventive measures among men with any risk factors for HPV persistence (presence of HIV infection and/or belonging to the MSM group). HPV screening algorithm development is required for men considering their HIV status and sexual behavior. We recommend testing for 14 HCR HPV genotypes in three loci (urethra, anus, oropharynx).

Keywords: HIV infection; human papillomavirus; men who have sex with men; heterosexual men, prevalence

For citation: Popova A.A., Domonova E.A., Pokrovskaya A.V., Shipulina O.Yu., Pokrovsky V.V. Prevalence of human papillomavirus (*Papillomaviridae*; *Human papillomavirus*) of high carcinogenic risk according to the results of screening of three anatomical loci in men stratified by sexual behavior and HIV status. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 217-226 (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-53>

For correspondence: Anna A. Popova, Ph.D. (Med.), Senior Researcher of the Department of Specialized Research Laboratory for AIDS Epidemiology and Prevention, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia. E-mail: asya-med@mail.ru

Information about the authors:

Popova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9484-5917>

Domonova E.A., <http://orcid.org/0000-0001-8262-3938>

Pokrovskaya A.V., <http://orcid.org/0000-0002-2677-0404>

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

Pokrovsky V.V., <https://orcid.org/0000-0002-9514-7288>

Contribution: Popova A.A. – concept and design of research, collection and processing of materials, statistical processing, writing of the text; Domonova E.A. – collection and processing of materials, writing and editing of the text; Pokrovskaya A.V. – collection and processing of materials; Shipulina O.Yu. – collection and processing of materials, editing of the text; Pokrovsky V.V. – approval of the final version of the article.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

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

The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор) (Protocol No. 78 dated 02 November 2017).

Received: 19 March 2021
Accepted: 11 May 2021

Введение

К настоящему времени показано, что вирус папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР) является этиологическим агентом в 100% случаев рака шейки матки, 88% рака ануса, 70% – влагалища, 50% – полового члена, 43% – вульвы и 26% рака ротоглотки [1]. Обсуждается также участие ВПЧ ВКР в возникновении рака предстательной железы [2, 3].

Частота выявления патогена в анальной области выше, чем в генитальной и оральной [4–6]. При этом распространённость поражения анальной локализации различается в зависимости от этнических групп, географических зон, сексуального поведения и ВИЧ-статуса. В настоящее время большинство исследований направлены на изучение распространённости ВПЧ ВКР в группе мужчин, практикующих секс с мужчинами (МСМ), а также среди ВИЧ-положительных лиц мужского пола [1, 4–7]. Так, согласно результатам метаанализа, представленного в 2016 г., частота встречаемости ВПЧ-инфекции на основании данных исследования оральной локализации в группе ВИЧ-негативных и ВИЧ-позитивных МСМ (МСМ/ВИЧ– и МСМ/ВИЧ+) составила 17,1 и 28,9% соответственно [8].

Согласно имеющимся сведениям в целом распространённость ВПЧ генитальной локализации среди мужчин значительно выше, чем у женщин, и составляет по разным данным от 25 до 40% [1, 9]. При этом частота поражения по анатомическим участкам у мужчин неодинакова: максимальная отмечается в стволе полового члена, минимальная – в уретре [10, 11].

Важно отметить, что ВПЧ-инфекция анальной локализации может вызывать более серьёзные последствия у ВИЧ-позитивных мужчин, чем у ВИЧ-негативных. Кроме того, продемонстрировано, что положительный ВИЧ-статус увеличивает риск персистенции ВПЧ ВКР, тем самым ухудшая прогноз и способствуя развитию онкологического процесса [4].

Имеющиеся статистические данные по состоянию оказания онкологической помощи населению в РФ не позволяют провести стратификацию пациентов по ВИЧ-статусу и характеру сексуального поведения [12]. Также в России не проводится регистрация случаев ВПЧ-инфекции, что не даёт возможности достоверно отследить количество пациентов из групп риска и разработать алгоритм оказания им специализированной помощи, а также спланировать проведение профилактических мероприятий. В связи с этим необходимо дополнительное изучение распространённости инфекции, вызываемой ВПЧ ВКР, по 3 важнейшим анатомическим локусам (уретра, ротоглотка, анус) среди мужского населения Российской Федерации с учётом сексуального поведения и ВИЧ-статуса, что и явилось целью представляемого исследования.

Материал и методы

Работа проводилась в период с февраля 2018 г. по декабрь 2019 г. на базе ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В исследовании приняли участие 256 мужчин в возрасте от 18 до 65 лет, проживающих в Москве и Московской области. Критериями включения служили: мужской пол от рождения, возраст старше 18 лет, подписанное информированное согласие на участие в исследовании. Критерием исключения являлось отсутствие возможности понять содержание информированного согласия.

Для стратификации по характеру сексуального поведения (гетеросексуальные мужчины (ГМ), практикующие секс исключительно с женщинами – гетеросексуалы; мужчины, относящиеся к группе МСМ) всем пациентам были предложены анкеты, после заполнения которых проводилось интервьюирование. Отнесение к МСМ осуществлялось, если в устной беседе либо в анкете участник причислял себя к этой группе. Стратификация по ВИЧ-статусу выполнялась на основании медицинской документации, содержащей положительные результаты проведения реакции иммуноблоттинга (для ВИЧ-позитивных) или данных, полученных при определении специфических антител к антигенам ВИЧ (для лиц, не знающих свой статус).

Всем отобранным для участия (ВИЧ-негативным и ВИЧ-позитивным) проводилось определение абсолютного содержания CD4+ лимфоцитов в периферической крови. ВИЧ-инфицированным лицам дополнительно выполнялось определение РНК ВИЧ в крови.

От каждого обследуемого для последующего тестирования с применением полимеразной цепной реакции с детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени (ПЦР-РВ) получали биологический материал из 3 анатомических локусов: уретры, ротоглотки и ануса. Взятие соскоба со слизистой оболочки уретры (далее – соскоб из уретры) осуществляли с помощью стерильного одноразового урогенитального зонда типа А («Jiangsu Suyun Medical Materials Co.», КНР), мазка со слизистой оболочки ротоглотки (далее – мазок из ротоглотки) – стерильного одноразового зонда («DELTA LAB», Испания). Также у всех мужчин выполняли взятие соскоба эпителиальных клеток со слизистой оболочки ануса (далее – соскоб из ануса) в транспортную среду для жидкостной цитологии BD SurePath™ («BD Diagnostics», США) при помощи урогенитального зонда типа F («Changzhou Chuangjia Medical Appliance Co.», КНР).

Биологический материал соскобов/мазков помещали в отдельные одноразовые полипропиленовые пробирки, содержащие транспортную среду с муколитиком (ТСМ) (РУ № ФСР 2009/05514, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Во всех образцах определяли наличие ДНК ВПЧ ВКР методом ПЦР-РВ. В ходе ВПЧ-тестирования осуществляли выявление ВПЧ ВКР следующих генотипов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68.

Экстракцию ДНК из биологических образцов проводили с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® ДНК-сорб-Д» (РУ № РЗН 315/3503, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), «АмплиСенс® ДНК-сорб-АМ» (РУ № ФСР 2007/00183, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Выявление и типирование ДНК ВПЧ ВКР выполняли с использованием комплекса реагентов: «АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-титр-14-FL» (РУ

№ РЗН 2017/5387, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) и «АмплиСенс® ВПЧ ВКР генотип-титр-FL» (РУ № РЗН 2017/6533, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора).

Постановку реакции ПЦР-РВ и анализ результатов амплификации осуществляли на приборах с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени «ДТ-96» и «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-технология», Россия) в соответствии с инструкциями производителя.

В рамках работы не выполнялись цитологический анализ и визуальное исследование (осмотр) слизистых оболочек ротоглотки, уретры и ануса.

Статистическую обработку проводили в программах Microsoft Excel 2013 и SPSS 16 (допустимая ошибка E = 5%). Использовали показатели описательной статистики: среднее значение, медиана (median), стандартное отклонение, минимум (min), максимум (max),

Таблица 1. Характеристика субъектов исследования (n = 256)
Table 1. Characteristics of study subjects (n = 256)

Характеристика Characteristic	MCM MSM (n = 139; 54,3%)	Гетеросексуалы Heterosexual males (n = 117; 45,7%)	Всего Total (n = 256; 100%)
Возраст (медиана, IQR) Age (median, IQR)	32 (39–28)	38 (42–35)	35 (40–30)
<30 (n, %)	57 (41,0)	13 (11,1)	70 (27,3)
≥31 (n, %)	82 (59,0)	104 (88,9)	186 (72,7)
Образование (n, %) Educational status (n, %)			
Школьное School education	4 (2,9)	16 (13,7)	20 (7,8)
Среднее специальное Vocational education	22 (15,8)	39 (33,3)	61 (23,8)
Высшее Higher education	113 (81,3)	62 (53,0)	175 (68,4)
Количество половых партнёров за год (n, %) Number of sexual partners per year (n, %)			
0	1 (0,7)	13 (11,1)	14 (5,5)
1–5	65 (46,8)	95 (81,2)	160 (62,5)
6–10	29 (20,9)	3 (2,6)	32 (12,5)
>10	44 (31,6)	6 (5,1)	50 (19,5)
ВИЧ-статус (n, %) HIV status (n, %)			
Позитивные (ВИЧ+) Positive (HIV+)	73 (52,5)	58 (49,6)	131 (51,2)
Негативные (ВИЧ–) Negative (HIV–)	66 (47,5)	59 (50,4)	125 (48,8)
CD4+ лимфоциты, кл/мкл (медиана, IQR) CD4+ lymphocytes, cells/μl (median, IQR)	689 (831–540)	740 (970–503)	703,5 (887–503)
<250 (n, %)	8 (5,8)	2 (1,7)	10 (3,9)
250–349 (n, %)	7 (5,0)	9 (7,7)	16 (6,3)
350–500 (n, %)	18 (12,9)	18 (15,4)	36 (14,0)
>500 (n, %)	106 (76,3)	88 (75,1)	194 (75,8)

Примечание. MCM – мужчины, практикующие секс с мужчинами; IQR – интерквартильный размах.

Note. MSM, men who have sex with men; IQR, interquartile range.

интерквартильный размах (IQR = Q3–Q1). С целью сравнения количественного показателя применяли *t*-критерий Стьюдента; при анализе различий между группами по качественным признакам – критерий χ^2 . Различия между группами считали статистически значимыми при уровне достоверности 95% ($p < 0,05$).

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Протокол №78 от 02.11.2017).

Результаты

Подробная характеристика обследуемых представлена в **табл. 1**. Среди участников преобладали лица молодого возраста – $35,5 \pm 7,4$ года (min 18, max 65, median 35, IQR = 40,0–30,0), где 27,3% (70/256) приходилось на мужчин моложе 30 лет. При этом в группе MSM (54,3% от всех обследованных) доля не достигших 30-летнего возраста составила 41,0% (57/139), в то время как среди гетеросексуалов (45,7%) – только 11,1% (13/117).

Из **табл. 1** видно, что большая часть включённых в исследование мужчин имела высшее образование (68,4%). По анализируемым группам подобная тенденция сохранялась, однако в группе MSM лица с высшим образованием преобладали – 81,3% (113/139), а в группе гетеросексуалов они составили лишь 53% (62/117).

Анализ данных, характеризующих сексуальное поведение, показал, что среднее количество половых партнёров за последний год у обследованных в группе MSM составило 12,2, в то время как среди гетеросексуальных мужчин этот показатель был в 5,1 раза ниже – 2,4. В целом в исследовании преобладали лица, имевшие за последний год от 1 до 5 половых партнёров (62,5%, 160/256). В группе гетеросексуалов эта тенденция не только сохранялась, но и была преобладающей – 81,2% (95/117). В то же время основную часть представителей MSM составили имевшие за последний год 1–5 и более 10 половых партнёров (46,8 и 31,6% соответственно).

В целом в исследовании приняли участие 51,2% ВИЧ-инфицированных мужчин (131/256), при этом в группе MSM они составили большую часть обследованных – 52,2% (73/139), в то время как среди гетеросексуалов – 49,6% (58/117). Анализ исследуемых субъектов по ВИЧ-статусу и сексуальному поведению позволил выделить 4 группы: MSM/ВИЧ+ (ВИЧ-инфицированные MSM) – 73 человека, MSM/ВИЧ– (ВИЧ-негативные MSM) – 66 человек, ГМ/ВИЧ+ (ВИЧ-позитивные гетеросексуальные мужчины, практикующие секс исключительно с женщинами) – 58 и ГМ/ВИЧ– (ВИЧ-отрицательные гетеросексуальные мужчины, практикующие секс исключительно с женщинами) – 59 человек.

Следует отметить, что 82,2% (60/73) пациентов группы MSM/ВИЧ+ получали антиретровирусную терапию (АРТ), при этом у 90,0% из них (54/60) концентрация РНК ВИЧ была ниже определяемого уровня. Среди ГМ/ВИЧ+ на АРТ находились 82,8% (49/58)

человек. При этом РНК ВИЧ выше уровня детекции в этой группе на фоне АРТ зарегистрирована лишь у 1 (1,7%) участника, что было связано с недавним началом последней.

В результате проведения ВПЧ-тестирования ДНК ВПЧ ВКР выявлена у 54,7% мужчин (140/256), среди которых преобладали лица молодого возраста – $34,4 \pm 7,4$ года (median 33,5, min 18, max 58, IQR = 39,8–29,0). Наиболее часто присутствие ДНК ВПЧ ВКР вне зависимости от исследуемого локуса регистрировалось у MSM/ВИЧ+ (82,2% случаев) (60/73), в то время как в группе ГМ/ВИЧ– обнаруживалась реже всего – в 20,3% случаев (12/59) (**рис. 1**).

Анализ распределения по возрасту мужчин с положительными и отрицательными результатами ВПЧ-теста не выявил статистически значимых различий (*t*-критерий Стьюдента = 1,972, $f = 254$, $\alpha = 0,05$).

При анализе величин абсолютных значений количества CD4+ лимфоцитов установлено, что среди участников в основном преобладали лица с уровнем $728,6 \pm 327,7$ кл/мкл (min 93, max 2112, median 703,5, IQR = 887,0–503,0). Содержание CD4+ лимфоцитов у мужчин с положительным ВПЧ-тестом составило $668,36 \pm 298$ кл/мкл (min 93, max 1674, median 669, IQR = 832,0–456,3), с отрицательным – $798,97 \pm 347,6$ кл/мкл (min 273, max 2112, median 752, IQR = 958,3–573,3). Распределение по данному показателю всех тестируемых на наличие ВПЧ мужчин также не выявило достоверных различий (*t*-критерий Стьюдента = 1,972, $f = 254$, $\alpha = 0,05$). Однако при более детальном изучении выявлено, что у мужчин с негативным ВПЧ-тестом уровни CD4+ лимфоцитов <250 кл/мкл не зарегистрированы, а в группе с положительным результатом подобные показатели отмечены в 7,4% случаев ($\chi^2 = 8,898$; $p = 0,003$). В то же время у имеющих отрицательный результат ВПЧ-тестирования достоверно чаще регистрировался уровень CD4+ лимфоцитов >500 кл/мкл по сравнению с ВПЧ-позитивными (83 и 69,6% соответственно) ($\chi^2 = 6,303$; $p = 0,013$).

Частота выявления ДНК ВПЧ ВКР в различных анатомических локусах значительно варьировала в зависимости от сексуального поведения и ВИЧ-статуса обследуемых (**табл. 2**).

Наиболее часто ВПЧ-тест оказывался положительным в соскобе из ануса (42,6%) по сравнению с мазком из ротоглотки и соскобом из уретры (7 и 15,6% соответственно). С наибольшей частотой ДНК ВПЧ ВКР обнаруживали в соскобе из ануса в группе MSM/ВИЧ+ (79,5%). Отличительной чертой ВПЧ-инфекции в этих случаях явилась высокая распространённость сочетанного инфицирования несколькими генотипами возбудителя. Так, в 65,5% случаев ВПЧ-тест идентифицировал в данной локализации от 2 до 9 генотипов ВПЧ ВКР.

Случаи множественного (более чем в 1 анатомическом локусе) выявления генетического материала ВПЧ ВКР представлены в **табл. 3**. При этом он детектирован одновременно в анусе и других локусах в 9,7% случаев. У MSM/ВИЧ+ наличие ДНК ВПЧ ВКР регистрировали одновременно в анусе и других локу-

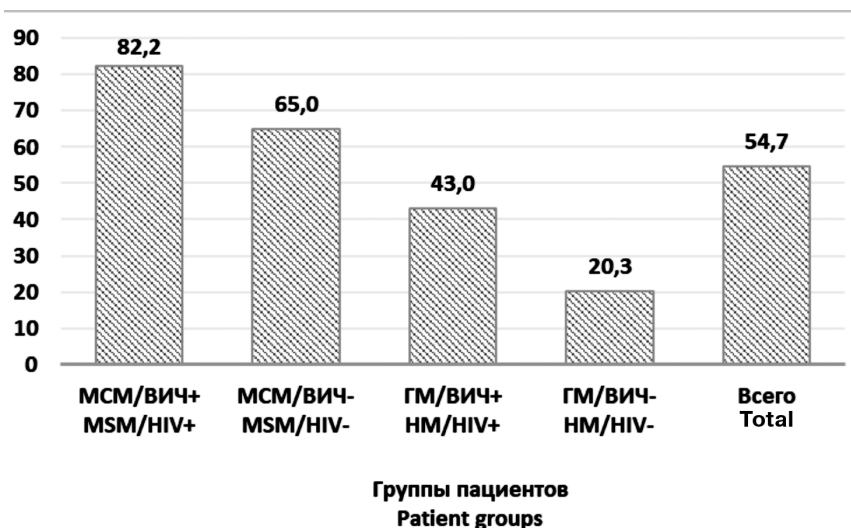


Рис. 1. Частота выявления ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу (в %).

Примечание. МСМ – мужчины, практикующие секс с мужчинами; ГМ – гетеросексуальные мужчины; НIV+ – ВИЧ-положительные; НIV- – ВИЧ-негативные.

Fig. 1. The frequency of detection of high carcinogenic risk human papillomavirus DNA in men stratified by sexual behavior and HIV status (at percentage).

Note. MSM, men who have sex with men; HM, heterosexual men; HIV+, HIV-positive; HIV-, HIV-negative.

Таблица 2. Частота выявления ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в различных анатомических локусах у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу ($n = 256$)

Table 2. The frequency of detection of high carcinogenic risk human papillomavirus DNA at various anatomical loci in men stratified by sexual behavior and HIV status ($n = 256$)

Группы пациентов Patient groups	Анатомические локусы Anatomical loci		
	Уретра Urethra (n, %)	Ротоглотка Oropharynx (n, %)	Анус Anus (n, %)
МСМ/ВИЧ+ МСМ/НIV+ ($n = 73$)	10 (13,7)	10 (13,7)	58 (79,5)
МСМ/ВИЧ- МСМ/НIV- ($n = 66$)	6 (9,0)	4 (6,1)	36 (54,5)
ГМ/ВИЧ+ НМ/НIV+ ($n = 58$)	14 (24,0)	3 (5,2)	13 (22,4)
ГМ/ВИЧ- НМ/НIV- ($n = 59$)	10 (16,9)	1 (1,7)	2 (3,4)

Примечание. МСМ – мужчины, практикующие секс с мужчинами; ГМ – гетеросексуальные мужчины; НIV+ – ВИЧ-положительные; НIV- – ВИЧ-негативные.

Note. MSM, men who have sex with men; HM, heterosexual men; HIV+, HIV-positive; HIV-, HIV-negative.

сах в 9,4% случаев, а изолированно в анусе – в 60,3%. Среди МСМ/ВИЧ- у 6% участников присутствие ДНК ВПЧ ВКР установлено одновременно с анусом в другом анатомическом локусе; для ГМ/ВИЧ+ и ГМ/ВИЧ- указанная величина составила 8,6 и 1,7%.

В соскобе из уретры ДНК ВПЧ ВКР чаще обнаруживали в группе ГМ/ВИЧ+ (24,0%). У МСМ/ВИЧ+ данная величина была равной 13,7%, при этом 30,0% (3/10) мужчин этой группы имели сексуальные контакты также и с женщинами (т.е. фактически являлись бисексуалами), что имеет важное эпидемиологическое значение. В образцах из ануса и ротоглотки ДНК ВПЧ ВКР чаще детектировался среди МСМ/ВИЧ+: 79,5 и 13,7% соответственно.

Встречаемость генотипов ВПЧ ВКР сильно варьировала в зависимости от исследуемого анатомического локуса (табл. 4).

Из таблицы видно, что у обследованных обнаруживались все 14 генотипов вируса. Наиболее часто обнаруживался 16 генотип – 29,0% (40/138), причём в уретре и ротоглотке его встречаемость преобладает (27,5 и 38,8% соответственно), а в анусе он разделяет первенство с генотипом 68.

Наряду с этим распространённость генотипов ВПЧ ВКР заметно различалась в зависимости от сексуального поведения и ВИЧ-статуса участников. Так, в группе МСМ/ВИЧ+ 16 генотип регистрировался чаще (32,8%), а среди МСМ/ВИЧ- он оказался вторым по частоте выявления – 13,9%. В группе ГМ/ВИЧ+ данный генотип разделит первенство по распространённости с 18 и 51 (по 23%).

Обращает на себя внимание тот факт, что частота выявления ВПЧ ВКР 18 генотипа в уретре и ротоглотке составила лишь 5,0 и 5,6% соответственно, в то время как в анусе этот показатель достигал 20,2%.

Обсуждение

ВПЧ ВКР приводит к развитию онкологического процесса в различных органах (шейка матки, анус,

Таблица 3. Одновременное выявление ДНК вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска в различных анатомических локусах у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу (n = 256)**Table 3. Simultaneous detection of high carcinogenic risk human papillomavirus DNA at various anatomical loci in men stratified by sexual behavior and HIV status (n = 256)**

Анатомические локусы Anatomical loci	Группы пациентов Patient groups				Всего Total (n = 256)
	МСМ/ВИЧ+ MSM/HIV+ (n = 73)	МСМ/ВИЧ- MSM/HIV- (n = 66)	ГМ/ВИЧ+ HM/HIV+ (n = 58)	ГМ/ВИЧ- HM/HIV- (n = 59)	
Анус (изолированно) Anus (solely) (n, %)	44 (60,3)	33 (50,0)	9 (15,5)	1 (1,7)	87 (33,98)
Анус + ротоглотка + уретра Anus + oropharynx + urethra (n, %)	4 (5,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (1,7)
Анус + ротоглотка Anus + oropharynx (n, %)	5 (1,95)	1 (1,5)	1 (1,7)	1 (1,7)	8 (3,1)
Анус + уретра Anus + urethra (n, %)	5(1,95)	3 (4,5)	4 (6,9)	0 (0)	12 (4,9)
Уретра (изолированно) Urethra (solely) (n, %)	1 (1,4)	3 (4,5)	9 (15,5)	10 (16,9)	23 (8,98)
Ротоглотка (изолированно) Oropharynx (solely)	1 (1,4)	3 (4,5)	1 (1,7)	0 (0)	5 (1,95)
Уретра + ротоглотка Urethra + oropharynx (n, %)	0 (0)	0 (0)	1 (1,7)	0 (0)	1 (0,4)

Примечание. МСМ – мужчины, практикующие секс с мужчинами; ГМ – гетеросексуальные мужчины; HIV+ – ВИЧ-позитивные; HIV- – ВИЧ-негативные.

Note. MSM, men who have sex with men; HM, heterosexual men; HIV+, HIV-positive; HIV-, HIV-negative.

Таблица 4. Частота выявления генотипов вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска среди ВПЧ-позитивных образцов в зависимости от анатомического локуса**Table 4. Frequency of detection of high carcinogenic risk human papillomavirus genotypes among HPV-positive samples depending on the anatomical locus**

Генотип вируса Virus genotype	Анатомические локусы Anatomical loci			
	Уретра Urethra (n = 40)	Анус Anus (n = 109)	Ротоглотка Oropharynx (n = 18)	Всего Total (n = 138)
Число случаев выявления Number of cases of detection (n, %)				
16	11 (27,5)	28 (25,7)	7 (38,8)	40 (29,0)
18	2 (5,0)	22 (20,2)	1 (5,6)	23 (16,6)
31	2 (5,0)	17 (15,6)	0 (0)	19 (13,8)
33	3 (7,5)	12 (11,0)	1 (5,6)	14 (10,1)
35	2 (5,0)	15 (13,8)	4 (22,2)	19 (13,8)
39	2 (5,0)	13 (11,9)	1 (5,6)	16 (11,2)
45	6 (15,0)	17 (15,6)	3 (16,7)	24 (17,4)
51	3 (7,5)	18 (16,5)	2 (11,1)	19 (13,8)
52	4 (10,0)	17 (15,6)	1 (5,6)	19 (13,8)
56	4 (10,0)	17 (15,6)	1 (5,6)	19 (13,8)
58	3 (7,5)	12 (11,0)	0 (0)	15 (10,9)
59	2 (5,0)	16 (14,5)	2 (11,1)	18 (13,0)
66	0 (0)	12 (11,0)	0 (0)	12 (8,7)
68	2 (5,0)	28 (25,7)	1 (5,6)	30 (21,7)

влагалище, половой член, вульва и ротоглотка), что обуславливает необходимость учитывать пути передачи возбудителя папилломавирусной инфекции при разработке диагностических алгоритмов и соответствующих мер профилактики, в том числе в рамках эпидемиологического мониторинга.

При изучении частоты выявления данного агента выбор 3 анатомических локусов (уретра, анус, ротоглотка) у мужчин обусловлен тем, что он передаётся половым путём, в то время как половые контакты у современных представителей мужской популяции характеризуются разнообразием в зависимости от особенностей сексуального поведения (анальный, вагинальный, оральный секс).

Результаты представленного исследования являются уникальными, так как подобного рода изысканий, направленных на изучение частоты обнаружения ВПЧ ВКР одновременно в различных анатомических локусах у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу, в России ранее не проводилось.

Данные о частоте детекции ДНК ВПЧ ВКР в группах МСМ с позитивным и негативным ВИЧ-статусом, полученные в ходе работы, согласуются с результатами зарубежных исследователей. Так, наибольшая частота выявления ВПЧ ВКР в соскобе из ануса зафиксирована у МСМ/ВИЧ+ (79,5%), в то время как в группе МСМ/ВИЧ- данный показатель оказывался намного ниже, хотя и превышал 50% (54,5%) [1, 4, 13, 14]. При этом в 65,5% случаях в соскобе из ануса выявля-

но сочетание нескольких генотипов вируса, что требует оптимизации диагностических подходов, а именно выявления не менее 14 генотипов ВПЧ ВКР при скрининге. Высокий процент микст-инфекций ВПЧ ВКР у МСМ (как ВИЧ-позитивных, так и ВИЧ-негативных) обусловлен частой сменой половых партнёров и практикой незащищённых сексуальных контактов [4, 16, 17]. Вероятно, имеет место недостаточность информирования представителей данной группы о путях передачи возбудителя, характере влияния на состояние здоровья и мерах профилактики вызываемой им инфекции, несмотря на преобладание среди МСМ лиц с высшим образованием (81,3%).

Согласно данным, представленным ранее, у гетеросексуальных мужчин без уточнения ВИЧ-статуса встречаемость ВПЧ ВКР в соскобе из ануса составляет 12% [14]. Однако анализ результатов частоты обнаружения этого вируса в указанном биоматериале среди гетеросексуалов демонстрирует значение ВИЧ-статуса (ГМ/ВИЧ+ – 22,4%, ГМ/ВИЧ– – 3,4%), что подтверждает негативное воздействие ВИЧ-инфекции [4, 15].

Наивысший показатель выявления ВПЧ ВКР в соскобе из уретры зафиксирован в группе ГМ/ВИЧ+ (24%), что можно объяснить частым обнаружением вируса в соскобе из цервикального канала женщин. Имеются сведения о большем риске персистенции ВПЧ ВКР среди этих мужчин [18]. Учитывая данные российских исследователей относительно возможной связи ВПЧ ВКР с развитием рака предстательной железы [2], требуется проведение дальнейших исследований по изучению встречаемости этого патогена у ВИЧ-инфицированных лиц мужского пола в различных участках урогенитального тракта (соскоб/отделяемое эпителиальных клеток головки полового члена и слизистой оболочки мочеиспускательного канала, секрет простаты) в целях планирования мероприятий по профилактике онкопатологии папилломавирусной этиологии, возникающей в данной локализации.

Наибольшая частота детекции ВПЧ ВКР в мазке из ротоглотки зафиксирована у ВИЧ-позитивных МСМ (13,7%). Показатель обнаружения возбудителя для данной локализации значительно меньше, чем для ануса и уретры, что объясняется зарубежными исследователями главным образом ошибками преаналитического этапа (курение, приём пищи перед сдачей биологического материала) [8, 17].

Полученные данные о том, что у мужчин с отрицательным ВПЧ-тестом не зарегистрирован уровень CD4+-лимфоцитов менее 250 кл/мкл и достоверно чаще зарегистрирован уровень CD4+-лимфоцитов более 500 кл/мкл, чем в группе ВПЧ-позитивных, подтверждают, что пациенты с ВИЧ-инфекцией являются группой риска по развитию онкологической патологии, обусловленной ВПЧ ВКР. Поэтому при низком уровне CD4+ лимфоцитов пациенты с ВИЧ-инфекцией требуют повышенной диагностической настороженности: назначения (если ранее не проводилась) и/или контроля эффективности уже назначенной АРТ, а также выполнения дополнительного обследования

с целью диагностики и профилактики предраковых состояний папилломавирусной этиологии.

Учитывая, что анализ распределения по возрасту мужчин с положительными и отрицательными результатами тестирования на ВПЧ ВКР не выявил статистически значимых различий, необходимо рекомендовать скрининг в виде ВПЧ-теста всем лицам мужского пола, имеющим любой фактор риска (наличие ВИЧ-инфекции и/или отношение к группе МСМ) вне зависимости от возраста.

Присутствие всех 14 генотипов ВПЧ ВКР (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) в изучаемых анатомических локусах по результатам исследования позволяет рекомендовать использовать наборы реагентов, способные выявить спектр генотипов ВПЧ ВКР, соответствующий данному или превышающий его, для тестирования мужчин с неизвестными ВИЧ-статусом и сексуальным поведением.

Представляет значительный научный и практический интерес дальнейшее изучение влияния уровня вирусной нагрузки и преобладающего генотипа ВПЧ ВКР на риск развития предраковых поражений в 3 важнейших анатомических локусах (уретра, анус, ротоглотка) у мужчин с различными сексуальным поведением и ВИЧ-статусом, что является весьма важной информацией как с эпидемиологической, так и с клинической точки зрения. Для разработки алгоритма скрининга ВПЧ-ассоциированных предраковых заболеваний в мужской популяции необходимо дополнить исследования с включением помимо ВПЧ-тестирования цитологического метода, визуальной оценки, а также наблюдения в динамике.

Заключение

Основываясь на итогах работы, можно сделать следующие выводы:

1. Распространённость ВПЧ ВКР по результатам скрининга 3 важнейших анатомических локусов у мужчин составляет 54,7% и значительно варьирует в зависимости от сексуального поведения и ВИЧ-статуса обследуемых, достигая минимального значения у гетеросексуальных мужчин с ВИЧ-негативным статусом (20,3%) и максимума – у ВИЧ-положительных МСМ (82,2%).

2. Наибольшая частота выявления ВПЧ ВКР в соскобе из ануса и мазке из ротоглотки установлена среди ВИЧ-позитивных МСМ (79,5 и 13,7% соответственно), в соскобе из уретры – у гетеросексуальных мужчин с ВИЧ-положительным статусом (24,0%).

3. Проведение скрининга мужской популяции на ВПЧ ВКР, основанного на ВПЧ-тестировании с выявлением 14 генотипов вируса в указанных анатомических локусах, позволит получить информацию, необходимую для совершенствования системы эпидемиологического мониторинга.

4. Необходимо применение дополнительных диагностических методик для определения частоты обследования на ВПЧ ВКР в мужской популяции.

5. Для снижения развития предраковых заболеваний папилломавирусной этиологии необходимо осуществление просветительских мероприятий

с информацией о путях передачи и профилактики ВПЧ-инфекции среди мужчин, имеющих 1 или более факторриска еперсистенции (наличие ВИЧ-инфекции и/или отношение к группе MSM).

ЛИТЕРАТУРА

- Giuliano A.R., Nyitray A.G., Kreimer A.R., Pierce Campbell C.M., Goodman M.T., Sudenga S.L., et al. EUROGIN 2014 Roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int. J. Cancer*. 2015; 136(12): 2752–60. <https://doi.org/10.1002/ijc.29082>
- Волгарева Г.М. Рак предстательной железы: возможная роль папилломавирусов в его возникновении. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2015; 70(1): 95–100. <https://doi.org/10.15690/vramn.v70i1.1237>
- Glenn W.K., Ngan C.C., Amos T.G., Edwards R.J., Swift J., Lutze-Mann L., et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect. Agent Cancer*. 2017; 12: 46. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0157-2>
- Lin C.C., Hsieh M.C., Hung H.C., Tsao S.M., Chen S.C., Yang H.J., et al. Human papillomavirus prevalence and behavioral risk factors among HIV-infected and HIV-uninfected men who have sex with men in Taiwan. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(45): e13201. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013201>
- Qian H.Z., Hu Y., Carlucci J.G., Yin L., Li X., Giuliano A.R., et al. Human Immunodeficiency Virus Status Differentially Associated With Genital and Anal Human Papillomavirus Infection Among Chinese Men Who Have Sex With Men: A Cross-Sectional Survey. *Sex. Transm. Dis.* 2017; 44(11): 656–62. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000672>
- Stein M., Gorbach P., Gratz B., Braxton J., Kerndt P.R., Crosby R.A., et al. Concordance between anal and oral human papillomavirus infections among young men who have sex with men. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(12): 1832–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix232>
- Glick S.N., Feng Q., Popov V., Koutsky L.A., Golden M.R. High rates of incident and prevalent anal human papillomavirus infection among young men who have sex with men. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(3): 369–76. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit441>
- King E.M., Oomeer S., Gilson R., Copas A., Beddows S., Soldan K., et al. Oral human papillomavirus infection in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0157976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157976>
- Han J.J., Beltran T.H., Song J.W., Klaric J., Choi Y.S. Prevalence of genital human papillomavirus infection and human papillomavirus vaccination rates among US adult men: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2013–2014. *JAMA Oncol.* 2017; 3(6): 810–6. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6192>
- Giuliano A.R., Nielson C.M., Flores R., Dunne E.F., Abrahamsen M., Papenfuss M.R., et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(8): 1146–52. <https://doi.org/10.1086/521629>
- Barzon L., Militello V., Pagni S., Franchin E., Dal Bello F., Mengoli C., et al. Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males. *J. Med. Virol.* 2010; 82(8): 1424–30. <https://doi.org/10.1002/jmv.21733>
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. Москва; 2019.
- Ucciferri C., Tamburro M., Falasca K., Sammarco M.L., Ripabelli G., Vecchiet J. Prevalence of anal, oral, penile and urethral Human Papillomavirus in HIV infected and HIV uninfected men who have sex with men. *J. Med. Virol.* 2018; 90(2): 358–66. <https://doi.org/10.1002/jmv.24943>
- Nyitray A.G., Carvalho da Silva R.J., Baggio M.L., Lu B., Smith D., Abrahamsen M., et al. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(1): 49–57. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq021>
- Попова А.А., Домонова Э.А., Покровская А.В., Климова Н.А., Шипулина О.Ю., Покровский В.В. Распространённость вируса

папилломы человека высокого канцерогенного риска по результатам анального скрининга мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2020; 10(3): 33–8. <https://doi.org/10.18565/epidem.2020.10.3.33-8>

- Geskus R.B., González C., Torres M., Del Romero J., Viciano P., Masiá M., et al. Incidence and clearance of anal high-risk human papillomavirus in HIV-positive men who have sex with men: estimates and risk factors. *AIDS*. 2016; 30(1): 37–44. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000874>
- Parisi S.G., Basso M., Scaggiante R., Andreis S., Mengoli C., Cruciani M., et al. Oral and anal high-risk human papilloma virus infection in HIV-positive men who have sex with men over a 24-month longitudinal study: complexity and vaccine implications. *BMC Public Health*. 2019; 19(1): 645. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7004-x>
- Grabowski M.K., Gray R.H., Serwadda D., Kigozi G., Gravitt P.E., Nalugoda F., et al. High-risk human papillomavirus viral load and persistence among heterosexual HIV-negative and HIV-positive men. *Sex. Transm. Infect.* 2014; 90(4): 337–43. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051230>

REFERENCES

- Giuliano A.R., Nyitray A.G., Kreimer A.R., Pierce Campbell C.M., Goodman M.T., Sudenga S.L., et al. EUROGIN 2014 Roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int. J. Cancer*. 2015; 136(12): 2752–60. <https://doi.org/10.1002/ijc.29082>
- Volgareva G.M. Prostate cancer: papillomaviruses as a possible cause [*Rak predstatel'noy zhelezy: vozmozhnaya rol' papillomavirusov v ego vozniknovenii*]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2015; 70(1): 95–100. <https://doi.org/10.15690/vramn.v70i1.1237> (in Russian)
- Glenn W.K., Ngan C.C., Amos T.G., Edwards R.J., Swift J., Lutze-Mann L., et al. High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. *Infect. Agent Cancer*. 2017; 12: 46. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0157-2>
- Lin C.C., Hsieh M.C., Hung H.C., Tsao S.M., Chen S.C., Yang H.J., et al. Human papillomavirus prevalence and behavioral risk factors among HIV-infected and HIV-uninfected men who have sex with men in Taiwan. *Medicine (Baltimore)*. 2018; 97(45): e13201. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000013201>
- Qian H.Z., Hu Y., Carlucci J.G., Yin L., Li X., Giuliano A.R., et al. Human Immunodeficiency Virus Status Differentially Associated With Genital and Anal Human Papillomavirus Infection Among Chinese Men Who Have Sex With Men: A Cross-Sectional Survey. *Sex. Transm. Dis.* 2017; 44(11): 656–62. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000672>
- Stein M., Gorbach P., Gratz B., Braxton J., Kerndt P.R., Crosby R.A., et al. Concordance between anal and oral human papillomavirus infections among young men who have sex with men. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(12): 1832–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix232>
- Glick S.N., Feng Q., Popov V., Koutsky L.A., Golden M.R. High rates of incident and prevalent anal human papillomavirus infection among young men who have sex with men. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(3): 369–76. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit441>
- King E.M., Oomeer S., Gilson R., Copas A., Beddows S., Soldan K., et al. Oral human papillomavirus infection in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0157976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157976>
- Han J.J., Beltran T.H., Song J.W., Klaric J., Choi Y.S. Prevalence of genital human papillomavirus infection and human papillomavirus vaccination rates among US adult men: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2013–2014. *JAMA Oncol.* 2017; 3(6): 810–6. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6192>
- Giuliano A.R., Nielson C.M., Flores R., Dunne E.F., Abrahamsen M., Papenfuss M.R., et al. The optimal anatomic sites for sampling heterosexual men for human papillomavirus (HPV) detection: the HPV detection in men study. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(8): 1146–52. <https://doi.org/10.1086/521629>
- Barzon L., Militello V., Pagni S., Franchin E., Dal Bello F., Mengoli C., et al. Distribution of human papillomavirus types in the anogen-

- ital tract of females and males. *J. Med. Virol.* 2010; 82(8): 1424–30. <https://doi.org/10.1002/jmv.21733>
12. Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V., eds. State of cancer care for the population of Russia in 2018 [*Sostoyaniye onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2018 godu*]. Moscow; 2019. (in Russian)
 13. Ucciferri C., Tamburro M., Falasca K., Sammarco M.L., Ripabelli G., Vecchiet J. Prevalence of anal, oral, penile and urethral Human Papillomavirus in HIV infected and HIV uninfected men who have sex with men. *J. Med. Virol.* 2018; 90(2): 358–66. <https://doi.org/10.1002/jmv.24943>
 14. Nyitray A.G., Carvalho da Silva R.J., Baggio M.L., Lu B., Smith D., Abrahamsen M., et al. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: the HPV in men (HIM) study. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(1): 49–57. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq021>
 15. Popova A.A., Domonova E.A., Pokrovskaya A.V., Klimova N.A., Shipulina O.Yu., Pokrovsky V.V. Prevalence of high-risk human papillomavirus according to the results of anal screening in men stratified by their sexual behavior and HIV status [*Rasprostraneniye virusa papillomy cheloveka vysokogo kantserogenного riska po rezul'tatam anal'nogo skrininga muzhchin, stratifitsirovannykh po seksual'nomu povedeniyu i VICH-statusu*]. *Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2020; 10(3): 33–8. <https://doi.org/10.18565/epidem.2020.10.3.33-8> (in Russian)
 16. Geskus R.B., González C., Torres M., Del Romero J., Viciano P., Masiá M., et al. Incidence and clearance of anal high-risk human papillomavirus in HIV-positive men who have sex with men: estimates and risk factors. *AIDS.* 2016; 30(1): 37–44. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000874>
 17. Parisi S.G., Basso M., Scaggiante R., Andreis S., Mengoli C., Cruciani M., et al. Oral and anal high-risk human papilloma virus infection in HIV-positive men who have sex with men over a 24-month longitudinal study: complexity and vaccine implications. *BMC Public Health.* 2019; 19(1): 645. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7004-x>
 18. Grabowski M.K., Gray R.H., Serwadda D., Kigozi G., Gravitt P.E., Nalugoda F., et al. High-risk human papillomavirus viral load and persistence among heterosexual HIV-negative and HIV-positive men. *Sex. Transm. Infect.* 2014; 90(4): 337–43. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051230>



Экспрессия интегринов $\beta 1$, $\alpha 4$ и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 в присутствии дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса (ДНК-Na-Fe) клетками MT-4, трансформированными T-лимфотропным вирусом человека 1 типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*)

© Калнина Л.Б.¹, Селимова Л.М.¹, Каплина Э.Н.², Носик Д.Н.¹

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

²ЗАО ФП «Техномедсервис», 105318, Москва, Россия

Введение. Важная роль интегринов (ИГ) в возникновении и развитии онкологических процессов делает данные структуры удобными мишенями для разработки иммуномодулирующих терапевтических препаратов, оказывающих воздействие непосредственно на эти молекулы. Среди последних выделяются ИГ $\beta 1$, $\alpha 4$ и рецептор клеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Иммуномодуляторы способны посредством неспецифических механизмов изменять активность ИГ, что, однако, в ряде случаев может служить причиной снижения защитных функций иммунной системы и ухудшения состояния здоровья человека. **Цель** исследования – установление влияния на выраженность клеточной экспрессии и характер метаболизма ИГ препарата дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс – ДНК-Na-Fe, используемого в Российской Федерации в качестве иммуномодулирующего средства, детали действия которого тем не менее изучены недостаточно.

Материал и методы. В работе использовали 2 варианта неопластической клеточной линии CD4+ T-лимфоцитов, трансформированных T-лимфотропным вирусом человека 1 типа (ТЛВЧ-1; human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1) семейства *Retroviridae*, – MT-4 (MT-4/1 и MT-4/2). Указанные варианты характеризовались различной выраженностью экспрессии белковых маркёров активации CD28 и CD38. После культивирования клеточной культуры в присутствии 500 мкг/мл ДНК-Na-Fe изучали уровни экспрессии ИГ $\beta 1$ (CD29), $\alpha 4$ (CD49d) и ICAM-1 (CD54) методом проточной цитометрии.

Результаты. Практически все клетки обеих линий имели мембранные белки CD29+ (90,4% \pm 4,5), CD54+ (97,9% \pm 1,4), а также незначительное количество CD49d+ (1,9% \pm 1,0). В присутствии препарата различий в экспрессии исследуемых белков на клеточной поверхности не наблюдалось.

Обсуждение. Степень экспрессии ИГ $\beta 1$, $\alpha 4$ и ICAM-1 может служить одной из фенотипических характеристик клеток MT-4. Полученные данные имеют существенное значение, так как особенности трансформации CD4+ T-лимфоцитов и их метаболизма при инфицировании ТЛВЧ-1 до настоящего времени недостаточно изучены.

Заключение. Результаты настоящей работы могут быть полезны как при установлении патогенеза заболеваний, вызываемых ТЛВЧ-1, некоторых видов злокачественных новообразований, так и для поиска новых специфически действующих фармакологических веществ, в т.ч. молекулярно-нацеленных (таргетных). Представляется, что итоги исследования помогут расширить существующие представления о маркёрах клеточной линии MT-4.

Ключевые слова: T-лимфотропный вирус человека 1 типа; дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс; клетки MT-4; интегрины $\beta 1$, $\alpha 4$; рецептор клеточной адгезии ICAM-1

Для цитирования: Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. Экспрессия интегринов $\beta 1$, $\alpha 4$ и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 в присутствии дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса (ДНК-Na-Fe) клетками MT-4, трансформированными T-лимфотропным вирусом человека 1 типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 227-232. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-57>

Для корреспонденции: Селимова Людмила Мидатовна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: selim@mail.ru

Участие авторов: все авторы внесли равный вклад в подготовку публикации.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс предоставлен ООО «Фар-мПак» ЗАО ФП «Техномедсервис», Россия.

Поступила 20.04.2021

Принята в печать 11.05.2021

Expression of integrins $\beta 1$, $\alpha 4$ and cell adhesion molecule ICAM-1 in the presence of sodium deoxyribonucleate with ferrum complex (DNA-Na-Fe) by MT-4 cells transformed by human T-lymphotropic virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*)

Lyudmila B. Kalnina¹, Lyudmila M. Selimova¹, Ellie N. Kaplina², Dmitry N. Nosik¹

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;
²CJSC PC «Technomedservice», 105318, Moscow, Russia

Introduction. The important role of integrins (IG) in the initiation and development of cancer processes makes these structures convenient targets for the development of immunomodulatory therapeutic drugs that have an effect directly on these molecules. Among the latter, IG $\beta 1$, $\alpha 4$ and cell adhesion receptor ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) are of particular interest. Immunomodulators are capable of changing the IG activity through non-specific mechanisms, which, however, in some cases can cause a decrease in the protective functions of the immune system and health deterioration.

The **aim** of the study was to determine the effect on the levels of cellular expression and the nature of IG metabolism of the drug sodium deoxyribonucleate with ferrum complex, DNA-Na-Fe, which is having been used in the Russian Federation as an immunomodulatory agent, but whose action has not been studied in details so far.

Material and methods. We used 2 variants of the neoplastic CD4+ T-lymphocyte cell line transformed with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) of the *Retroviridae* family, MT-4 (MT-4/1 and MT-4/2). The indicated variants were characterized by different levels of expression of the protein activation markers CD28 and CD38. After cell culture in the presence of 500 $\mu\text{g/ml}$ DNA-Na-Fe, the expression levels of IG $\beta 1$ (CD29), $\alpha 4$ (CD49d), and ICAM-1 (CD54) were studied by flow cytometry.

Results. The cells of the both lines contained many membrane proteins CD29+ (90.4% \pm 4.5) and CD54+ (97.9% \pm 1.4), while small percentage of cells contained protein CD49d+ (1.9% \pm 1.0). No changes in the expression of the studied proteins were observed in the presence of the drug.

Discussion. The levels of IG $\beta 1$, $\alpha 4$ and ICAM-1 expression may serve as one of the phenotypic characteristics of MT-4 cells. The obtained data are of great importance because the peculiarities of CD4+ T-lymphocytes transformation and their metabolism during HTLV-1 infection have not been sufficiently studied so far.

Conclusion. The results of this work may be helpful in determining the pathogenesis of HTLV-1-induced diseases, some types of malignancies, and in searching for new specific pharmacological agents, including molecularly targeted ones. The results of the study will help to expand the existing knowledge on the markers of MT-4 cell line.

Keywords: *intercellular adhesion molecule 1; sodium deoxyribonucleate with ferrum complex; MT-4 cells; integrins $\beta 1$, $\alpha 4$; human T-lymphotropic virus type 1*

For citation: Kalnina L.B., Selimova L.M., Kaplina E.N., Nosik D.N. Expression of integrins $\beta 1$, $\alpha 4$ and cell adhesion molecule ICAM-1 in the presence of sodium deoxyribonucleate with ferrum complex (DNA-Na-Fe) by MT-4 cells transformed by human T-lymphotropic virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 227-232 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-57>

For correspondence: Lyudmila M. Selimova, D.Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: Iselim@mail.ru

Information about the authors:

Kalnina L.B., <http://orcid.org/0000-0002-2702-8578>
Selimova L.M., <http://orcid.org/0000-0003-3709-770X>
Kaplina E.N., <http://orcid.org/0000-0001-8540-5856>
Nosik D.N., <http://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Contribution: all authors contributed equally to the publication.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. Sodium deoxyribonucleate with ferrum complex was provided by CJSC PE «Technomedservice», Russian Federation.

Received 20 April 2021

Accepted 11 May 2021

Введение

Интегрины (ИГ) – это семейство трансмембранных белков, которые имеются во всех животных клетках. На цитоплазматической мембране они присутствуют в виде гетеродимеров, состоящих из α - и β -субъединиц.

Данные белки являются рецепторами, принимающими участие в адгезии клеток к компонентам экстрацеллюлярного матрикса и различным другим клеткам, обеспечивая координацию механизмов межклеточного взаимодействия. В настоящее время у человека извест-

но 18 α - и 8 β -субъединиц, которые образуют 25 α , β -гетеродимеров. Это полифункциональные молекулы, служащие важными регуляторами всех происходящих в клетках организма физиологических процессов (в том числе миграции клеток) в координации с факторами роста и цитокинами [1]. При этом α -цепи обеспечивают специфичность при узнавании различных лигандов, тогда как β -цепи выполняют функцию передачи сигналов. Обе данные структуры участвуют в прикреплении к лиганду. Слаженность системы регуляции при соблюдении условий, обеспечивающих правильный обмен сигналами, является залогом нормального функционирования как отдельных клеток, так и всего организма в целом. При различных нарушениях функции ИГ изменённая активность иммунных клеток может приводить к развитию патологических процессов и появлению малигнизированных клеточных элементов различной природы. Последние приобретают способность к неконтролируемому росту (что способствует возникновению различных видов опухолей), а также к миграции в различные органы с образованием метастазов [2, 3].

ИГ, взаимодействуя с внеклеточным матриксом и управляя множеством внутриклеточных сигналов, способны защищать раковые клетки от цитотоксических воздействий различными путями [4]. Существует мнение, что некоторые ИГ и онкогены совместно функционируют при инициации опухоли, её формировании и дальнейшем прогрессировании. В свою очередь, существуют препараты, способные ингибировать развитие неоплазий, и прежде всего следует отметить антагонисты данных молекул (антиинтегрины), показывающие эффективность в блокировке роста опухолей в преклинических и клинических исследованиях. Важная роль в возникновении и прогрессии всех видов злокачественных новообразований делает ИГ удобными мишенями для поиска соединений, которые можно использовать для подавления онкогенеза [5]. Наибольшее значение придаётся ИГ $\beta 1$, $\alpha 4$ и рецептору клеточной адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). Однако следует учитывать, что участие этих структур во многих биологических процессах является причиной того, что понижение их активности фармакологическими методами не всегда даёт хорошие результаты и даже может приводить к развитию различных побочных эффектов.

Для лечения новообразований в последние десятилетия особое значение приобретает иммуномодулирующая терапия. Использование препаратов, обладающих подобного рода активностью, является важным направлением в разработке эффективных схем воздействия на состояние хронической активации иммунной системы при различных заболеваниях. В настоящее время ведётся интенсивный поиск веществ, которые можно применять в комплексной терапии в качестве дополнительных компонентов, снижающих активацию иммунных клеток, но при этом не препятствующих организации адекватного иммунного ответа и не усиливающих патологический процесс. Среди таких соединений активное внимание уделяется препаратам нуклеиновых кислот – олигонуклеотидам, как

природным, так и синтетическим [6], служащим адъювантами при применении вакцин против различных инфекционных и онкологических заболеваний. Важным достоинством лекарственных средств на основе олигонуклеотидов является то, что они не вызывают выраженной токсичности, хорошо переносятся пациентами и при этом адекватно регулируют клеточный иммунный ответ. В этом ряду видное место занимают дезоксирибонуклеат натрия и дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс (ДНК-Na-Fe), получаемые из молок осетровых рыб (*Acipenseridae*). ДНК-Na-Fe по химическому составу является натриевой солью дуспиральной дезоксирибонуклеиновой кислоты природного происхождения, модифицированной ионами трёхвалентного железа (Fe^{3+}). Он относится к фармакологической группе противовирусных препаратов с иммуномодулирующими свойствами, и его эффективность продемонстрирована в отношении различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов [7].

Ранее нами показано, что ДНК-Na-Fe снижает уровень активации неопластической клеточной линии МТ-4 [8]. Эти клетки представлены CD4+ Т-лимфоцитами [9], трансформированными дельтатретовирусом – Т-лимфотропным вирусом человека 1 типа (ТЛВЧ-1; human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1). Данный патологический агент вызывает у взрослых людей Т-клеточный лейкоз и Т-клеточную лимфому, которые принадлежат к злокачественным новообразованиям лимфоидной и кроветворной систем. Оба заболевания малочувствительны к химиотерапии, ввиду чего с целью поиска эффективных методов их лечения активно изучаются особенности патогенеза инфицирования ТЛВЧ-1 и роль ИГ в развитии данного процесса. Т-лимфоциты взаимодействуют с экстрацеллюлярным матриксом при участии ИГ и их рецепторов, что оказывает влияние на миграцию, пролиферацию и транспорт этих клеток из крови в места локализации воспаления и лимфоидные органы. Роль указанных взаимодействий в прогрессировании заболеваний, вызываемых ретровирусами, при инфицировании Т-клеток остаётся не до конца изученной [10].

Препарат ДНК-Na-Fe используется в медицинской практике в Российской Федерации, но точный механизм его действия также изучен недостаточно. Поэтому представлялось важным охарактеризовать его влияние на метаболизм ИГ, поскольку известно, что вещества, обладающие иммуномодулирующими свойствами, могут посредством неспецифических механизмов нарушать формирование адекватного иммунного ответа с последующим ухудшением состояния здоровья человека. В связи с этим нами предпринята попытка установить характер воздействия данного соединения на экспрессию ИГ $\beta 1$, $\alpha 4$ и рецептора клеточной адгезии ICAM-1 в модельной системе *in vitro* с использованием неопластической CD4+ Т-клеточной линии МТ-4.

Материал и методы

Культивирование клеточной культуры осуществляли в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмб-

риона коровы (FBS), 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% оксида углерода (CO₂) при температуре 37 °С. Клетки пересеивали каждые 3–4 сут; плотность при пересеве составляла 2,5 × 10⁵ кл/мл. Во время посева в культуральную жидкость вносили ДНК-Na-Fe до конечной концентрации 500 мкг/мл на 24 или 72 ч (дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс, фармакологическая группа – иммуномодулирующие и противовирусные средства, ООО «Фарм-Пак» ЗАО ФП «Техномедсервис», Россия).

Для анализа наружных фенотипических маркеров клетки окрашивали следующими моноклональными антителами: CD4 (PE или PC5), CD28 (PC5), CD38 (PC5), CD29 (PE), CD49d (PE), CD54 (PE), HLA-DR (PE) («Beckman Coulter», США). Суспензию клеток предварительно отмывали 3 раза в 0,01 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) (pH 7,2) путём центрифугирования при 800 об/мин в течение 6 мин и суспендировали в том же растворе при концентрации 2 × 10⁶ кл/мл. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL («Beckman Coulter»). Полученные гистограммы обрабатывали в программном обеспечении KALUZA Software Version 1.2 («Beckman Coulter»).

Статистический анализ данных выполняли с использованием программы BioStat, v.5 («AnalystSoft», США). Уровень значимости (α) был равен 0,05.

Результаты

В процессе работы использовали 2 клеточные линии МТ-4 (МТ-4/1 и МТ-4/2) с различным потенциалом активации по таким поверхностным маркерам, как CD28 и CD38. Исследование иммунных клеток на наличие этих маркеров используется в клинической практике с целью оценки характера течения инфекционных процессов в организме и компетентности иммунной системы [11, 12]. Наши эксперименты показали, что линии отличаются по уровню репликации вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1. Результаты изучения экспрессии указанных белков представлены в **табл. 1** (данные 3 независимых опытов). Как можно видеть, через 24 ч после посева количество наружных белков в обеих линиях различалось незначительно, а через 72 ч наблюдалось усиление экспрессии CD28+ в 3,2 раза и CD38+ – в 15,5 раза в линии МТ-4/2 по сравнению с МТ-4/1. Следует отметить, что тенденция к увеличению степени экспрессии этих

компонентов в МТ-4/2 по сравнению с линией МТ-4/1 сохранялась спустя 24 ч. Аналогичные показатели основного маркера активации HLA-DR+ в клеточных линиях были высокими и в процессе культивирования практически не изменялись.

В следующей серии опытов изучено влияние ДНК-Na-Fe на присутствие наружных белков CD29, CD49d и CD54 на цитоплазматической мембране 2 вариантов клеток. Результаты представлены в **табл. 2** (данные 3 независимых опытов). Из таблицы видно, что во всех линиях обнаруживалась значительная доля клеток, содержащих белки CD29+ и CD54+, и очень незначительное их количество имело CD49d+. Показатели не изменялись в присутствии вещества и не зависели от уровня клеточной активации по определяемым маркерам.

Обсуждение

Полученные результаты указывают на то, что ДНК-Na-Fe не влияет на уровень экспрессии белков CD29 (β1), CD49d (α4) и CD54 (ICAM-1) клетками неопластической линии МТ-4. При этом определяемые показатели не изменяются при усилении активации клеток по таким маркерам, как белки CD28 и CD38. В связи с этим можно предположить, что применение данного препарата у инфицированных ТЛВЧ-1 не должно оказывать существенного воздействия на метаболические процессы, в которых участвуют изученные молекулы. Нельзя исключить также, что использование ДНК-Na-Fe не должно влиять на экспрессию охарактеризованных белков системы ИГ других клеток организма, фенотипически сходных с клетками МТ-4. Следует отметить, что при инфекции, вызванной ТЛВЧ-1, инфицированные CD4+ Т-лимфоциты могут иметь различный фенотип и существенно различаться по степени экспрессии отдельных белков, а также ИГ, что, в свою очередь, обусловлено патогенетическими особенностями этого вируса [13, 14]. В связи с этим обнаруженный нами уровень экспрессии CD29+ (90,4% ± 4,5), CD49d+ (1,9% ± 1,0) и CD54+ (97,9% ± 1,4), можно рассматривать как одну из фенотипических характеристик клеточной линии МТ-4.

Заключение

Представленные данные о выраженности экспрессии ИГ β1, α4 и ICAM-1 клетками неопластической линии МТ-4 расширяют имеющиеся сведе-

Таблица 1. Экспрессия маркеров активации клетками МТ-4

Table 1. Expression of activation markers by МТ-4 cells

Маркеры (%) Markers (%)	Клетки МТ-4/1 МТ-4/1 cells		Клетки МТ-4/2 МТ-4/2 cells	
	24 ч 24 hrs	72 ч 72 hrs	24 ч 24 hrs	72 ч 72 hrs
CD4+/CD28+	0,16 ± 0,2	5,5 ± 0,3	1,67 ± 0,2	17,6 ± 0,4
CD4+/CD38+	0,13 ± 0,3	2,2 ± 0,4	2,11 ± 0,1	34,3 ± 0,3
CD4+/HLA-DR+	83,7 ± 4,0	98,8 ± 0,1	94,8 ± 0,2	99,3 ± 0,1

Таблица 2. Экспрессия белков CD29, CD49d и CD54 клетками MT-4

Table 2. Expression of CD29, CD49d and CD54 proteins by MT-4 cells

Маркёры (%) Markers (%)	Клетки MT-4/1 MT-4/1 cells		Клетки MT-4/2 MT-4/2 cells	
	24 ч 24 hrs	72 ч 72 hrs	24 ч 24 hrs	72 ч 72 hrs
CD4+/CD29- (контроль) CD4+/CD29- (control)	9,0 ± 0,59	2,7 ± 0,6	6,8 ± 0,53	1,8 ± 0,79
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	8,2 ± 0,7	7,6 ± 0,9	6,6 ± 0,3	3,3 ± 0,2
CD4+/CD29+ (контроль) CD4+/CD29+ (control)	86,7 ± 1,2	95,9 ± 0,8	84,6 ± 2,0	96,7 ± 1,1
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	87,4 ± 1,0	89,9 ± 3,0	82,2 ± 3,0	94,3 ± 0,8
CD4+/CD49d- (контроль) CD4+/CD49d- (control)	92,1 ± 1,5	98,0 ± 0,1	93,4 ± 0,7	96,2 ± 0,3
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	93,8 ± 0,5	96,2 ± 0,3	93,7 ± 0,1	96,1 ± 0,9
CD4+/CD49d+ (контроль) CD4+/CD49d+ (control)	2,6 ± 0,2	0,55 ± 0,1	1,3 ± 0,4	1,6 ± 1,1
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	2,51 ± 0,2	0,9 ± 0,5	1,1 ± 0,3	2,54 ± 0,9
CD4+/CD54- (контроль) CD4+/CD54- (control)	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,25 ± 0,3	0,1 ± 0,2
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	0,47 ± 0,2	0,36 ± 0,2	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,02
CD4+/CD54+ (контроль) CD4+/CD54+ (control)	98,2 ± 0,2	99,4 ± 0,03	94,9 ± 1	98,6 ± 0,9
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	97,3 ± 0,4	97,8 ± 0,5	95,3 ± 0,2	97,7 ± 0,15

ния о поверхностных маркёрах этих клеток и могут быть полезны как при изучении патогенеза заболеваний, вызываемых ТЛВЧ-1, так и для поиска новых терапевтических (в т.ч. молекулярно-нацеленных – таргетных) препаратов. Степень экспрессии изученных белков представляется важной для определения фенотипических и метаболических особенностей CD4+ Т-лимфоцитов, трансформированных этим вирусом.

ЛИТЕРАТУРА

- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1): 269–80. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Rehman A., Costin N.A. Integrins and cell metabolism: an intimate relationship impacting cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(1): 189. <https://doi.org/10.3390/ijms18010189>
- Desgrosellier J.S., Cheresh D.A. Integrins in cancer: biological implication and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10(1): 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
- Cooper J., Filippo G., Giancotti F.G. Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell.* 2019; 35(3): 347–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.007>
- Mitroulis I., Alexaki V.A., Kourtzelis I., Ziogas A., Hajishengallis G., Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* 2015; 147: 123–35. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.008>
- Беседнова Н.Н., Макаренкова И.Д., Федянина Л.Н., Авдеева Ж.И., Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А., и др. Дезоксирибонуклеиновая кислота про- и эукариот в профилактике и терапии инфекционных болезней. *Антибиотики и химиотерапия.* 2018; 63(5-6): 52–67.
- Носик Д.Н., Носик Н.Н., Каплина Э.Н., Калнина Л.Б., Киселёва И.А., Кондрашина Н.Г., и др. Активность препарата «Ферровир» в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов. *Вопросы вирусологии.* 2002; 47(3): 21–3.
- Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. Влияние ферровируса на экспрессию поверхностных маркёров активации клетками неопластической линии MT-4. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(6): 355–9. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359>
- Manns A., Hisada M., La Grenada L. Human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Lancet.* 1999; 353(9168): 1951–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09460-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09460-4)
- Nakamura T., Satoh K., Nakamura H., Fukushima N., Nishiura Y., Furuya T., et al. Role of integrin signaling activation on the development of human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: its relationship to HTLV-1-infected CD4(+) T cell transmigration activity into the tissues. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2018; 34(4): 331–6. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0261>
- Glaria E., Villedor A.F. Roles of CD38 in the immune response to infection. *Cells.* 2020; 9(1): 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
- Riley J.L., June C.H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood.* 2005; 105(1): 13–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1596>
- Janahú L.T.A., Da Costa C.A., Vallinoto A.C.R., Santana B.B., Ribeiro-Lima J., Santos-Oliveira J.R., et al. CD49d is upregulated in circulating T lymphocytes from HTLV-1-infected patients. *Neuroimmunomodulation.* 2020; 27(2): 113–22. <https://doi.org/10.1159/000507086>
- Tanaka Y., Fukudome K., Hayashi M., Takagi S., Yoshie O. Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cell-leukemia cell lines. *Int. J. Cancer.* 1995; 60(4): 554–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600421>

REFERENCES

1. Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010; 339(1): 269–80. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
2. Rehman A., Costin N.A. Integrins and cell metabolism: an intimate relationship impacting cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(1): 189. <https://doi.org/10.3390/ijms18010189>
3. Desgrosellier J.S., Cheresch D.A. Integrins in cancer: biological implication and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10(1): 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrc2748>
4. Cooper J., Filippo G., Giancotti F.G. Integrin signaling in cancer: mechanotransduction, stemness, epithelial plasticity, and therapeutic resistance. *Cancer Cell.* 2019; 35(3): 347–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.01.007>
5. Mitroulis I., Alexaki V.A., Kourtzelis I., Ziogas A., Hajishengallis G., Chavakis T. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* 2015; 147: 123–35. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.008>
6. Besednova N.N., Makarenkova I.D., Fedyanina L.N., Avdeeva Zh.I., Kryzhanovskiy S.P., Kuznetsova T.A., et al. Prokaryotic and eukaryotic DNA in prevention and treatment of infection diseases [Dezoksiribonukleinovaya kislota pro- i eukariot v profilaktike i terapii infektsionnykh bolezney]. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2018; 63(5-6): 52–67. (in Russian)
7. Nosik D.N., Nosik N.N., Kaplina E.N., Kalnina L.B., Kiseleva I.A., Kondrashina N.G., et al. Activity of «Ferrovir» preparation towards RNA and DNA viruses [Aktivnost' preparata «Ferrovir» v otnoshenii RNK- i DNK-soderzhashchikh virusov]. *Voprosy virusologii.* 2002; 47(3): 21–3. (in Russian)
8. Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N., Nosik D.N. The effect of ferrovir on to expression of surface markers of activation by cells neoplastic line MT-4 [Vliyaniye ferrovira na ekspressiyu poverkhnostnykh markerov aktivatsii kletkami neoplasticheskoy linii MT-4]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2017; 62(6): 355–9. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359> (in Russian)
9. Manns A., Hisada M., La Grenada L. Human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Lancet.* 1999; 353(9168): 1951–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09460-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09460-4)
10. Nakamura T., Satoh K., Nakamura H., Fukushima N., Nishiura Y., Furuya T., et al. Role of integrin signaling activation on the development of human T cell leukemia virus-1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: its relationship to HTLV-1-infected CD4(+) T cell transmigrating activity into the tissues. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2018; 34(4): 331–6. <https://doi.org/10.1089/aid.2017.0261>
11. Glaría E., Valledor A.F. Roles of CD38 in the immune response to infection. *Cells.* 2020; 9(1): 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
12. Riley J.L., June C.H. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood.* 2005; 105(1): 13–21. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1596>
13. Janahú L.T.A., Da Costa C.A., Vallinoto A.C.R., Santana B.B., Ribeiro-Lima J., Santos-Oliveira J.R., et al. CD49d is upregulated in circulating T lymphocytes from HTLV-1-infected patients. *Neuroimmunomodulation.* 2020; 27(2): 113–22. <https://doi.org/10.1159/000507086>
14. Tanaka Y., Fukudome K., Hayashi M., Takagi S., Yoshie O. Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult T-cell-leukemia cell lines. *Int. J. Cancer.* 1995; 60(4): 554–61. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600421>

НЕКРОЛОГ



Ханс-Дитер Кленк **(25 июня 1938 г. – 1 июня 2021 г.)**



На 84-м году жизни скончался выдающийся немецкий учёный-вирусолог, педагог и организатор науки Ханс-Дитер Кленк (Hans-Dieter Klenk).

Х.-Д. Кленк родился в семье известного биохимика Эрнста Кленка (Ernst Klenk). С 1958 по 1964 г. юноша изучал медицину и биохимию в Тюбингене (ФРГ), Вене (Австрия) и Кёльне (ФРГ), получив итоговую оценку *summa cum laude* – «с наивысшим отличием». На протяжении нескольких лет (1967–1970 гг.) молодой учёный работал приглашённым исследователем в лаборатории проф. Пурнелла У. Чоппина (Purnell W. Choprin) в Рокфеллеровском университете (Нью-Йорк, США). По возвращении на родину Ханс-Дитер Кленк был назначен в 1973 г. профессором С3 (экстраординарным) в Университете им. Ю. Либиха в Гиссене (ФРГ), а спустя 12 лет принял приглашение на должность профессора С4 (ординарного – наивысшего ранга) кафедры вирусологии Марбургского университета им. Филлиппа (ФРГ). Одновременно Х.-Д. Кленк возглавил университетский институт вирусологии, оставаясь его директором до 2007 г.

Ханс-Дитер Кленк оказал решающее влияние на формирование университетской вирусологической школы, утвердив её международную ориентацию и обеспечив ей мировую известность. Под руководством профессора Кленка несколько поколений молодых учёных получили возможность реализовать свои научные интересы и впоследствии занять руководящие – научные и организаторские – должности как в ФРГ, так и за её пределами.

С именем Х.-Д. Кленка тесно связаны весьма успешные и плодотворные исследования вирусов гриппа, в частности роли поверхностных белков гемагглютинина и нейраминидазы в патогенезе этой инфекции, а также открытие феномена протеолитической активации вирусов. В круг его научных интересов входили и проблемы, касающиеся возбудителей других зоонозных заболеваний, которые угрожают общественному здоровью. Работы учёного и его коллег легли в основу создания вакцин и противовирусных препаратов против вирусов Эбола, Марбурга и других эпидемиологически значимых патогенов. Профессор Кленк – один из основателей самостоятельного исследовательского направления по изучению новых, или эмерджентных вирусов (emerging viruses), активно развивающегося и в настоящее время.

В качестве президента Ханс-Дитер Кленк с 1999 по 2005 г. возглавлял Немецкое общество вирусологии, с момента основания сотрудничал в Фонде фон Беринга–Рентгена в Гиссене

и Марбурге (ФРГ) на посту вице-президента. Он координировал деятельность многочисленных научных консорциумов, включая Центр исследований Немецкого исследовательского фонда (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG); являлся председателем ряда консультативных советов исследовательских институтов (Георг-Шпейер-Хаус – Georg-Spreyer-Haus, Фонд англо-германского научного обмена Фельдберга, Институт медицинской микробиологии Фуданьского университета (Шанхай, КНР)). Х.-Д. Кленк состоял членом многих национальных и международных научных организаций (Немецкое общество гигиены и микробиологии, Американское общество по микробиологии, Американское общество вирусологии и других).

Ханс-Дитер Кленк удостоился множества почётных наград, среди которых – золотая медаль Роберта Коха, медаль Эрнста Юнга в области медицины и премия Эмиля фон Беринга. Он также был награждён Федеральным орденом «За заслуги перед Федеративной Республикой Германия» 1 степени (офицерский Крест заслуг) (2018 г.).

Личность Кленка отличали удивительные проницательность и точность. Он пользовался особым рода авторитетом – естественным, присущим ему, как казалось, от природы. Его уход стал двойной потерей: мы скорбим по замечательному учёному, который до последних дней оставался прекрасным советчиком, и по нашему другу, последовательному и великодушному человеку, обращённому в будущее.

Профессор Ханс-Дитер Кленк был убеждённым сторонником развития сотрудничества между учёными ФРГ и России. Он выступал координатором российско-германского форума «Кох–Мечников» (2008–2010 гг.), организация которого проходила под личным патронажем Президента РФ В.В. Путина и Федерального канцлера Германии А. Меркель. На протяжении многих лет Х.-Д. Кленк входил в состав Редакционного совета российского журнала «Вопросы вирусологии», а также других профильных медицинских изданий.

Светлая память об учёном и человеке Х.-Д. Кленке будет жить в наших сердцах, а его научные идеи продолжатся в работах вирусологов по всему миру.

Львов Д.К., академик РАН
Жирнов О.П., член-корреспондент РАН