

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 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, CrossRef, 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 соответствии
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 30.08.2021.

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.

4

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)

Глузов 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)

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)

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

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

Нетёсов 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)

Яшкуллов 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)

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, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member 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 prefix: 10.36233

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, 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 August 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

4

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)

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)

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Свитиц О.А., Пашков Е.П., Нечаев Д.Н., Зверев В.В.**
Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии
новой коронавирусной инфекции COVID-19* 241
- Салеева Д.В., Засухина Г.Д.**
Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19 252
- Ботвинкин А.Д.**
Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы* 259

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.**
Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования* 269
- Гайдай Е.А., Крышень К.Л., Джайн (Корсакова) Е.А., Демченко Д.В. Каргопольцева Д.Р., Кательникова А.Е., Гайдай Д.С., Балабаньян В.Ю.**
Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил 279
- Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Шагарова Н.В., Сыромятникова С.И., Андрус А.Ф., Ковальчук Е.А., Кириллов В.Б., Беспалов М.Л., Петров А.А., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л.**
Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) 289
- Попова А.Ю., Смирнов В.С., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Самойлова Л.В., Ляпина Л.В., Семёнова Е.В., Гурский М.А., Аксёнова Е.А., Арбузова Т.В., Тоголян А.А.**
Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Новосибирской области на фоне пандемии COVID-19 299
- Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Лопатовская К.В., Трушина Ю.Н., Яковчиц Н.В., Андаев Е.И.**
Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae, Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период 310
- НЕКРОЛОГ**
- Виктор Павлович Грачёв 322
- Игорь Феликсович Баринский 323

CONTENTS

REVIEWS

- Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Pashkov E.P., Nechaev D.N., Zverev V.V.**
Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19* 241
- Saleeva D.V., Zasukhina G.D.**
Prospects for using low-dose radiation in the complex therapy for COVID-19 252
- Botvinkin A.D.**
Bats and viruses: interdisciplinary issues* 259

ORIGINAL RESEARCHES

- Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G.**
Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing* 269
- Gaidai E.A., Kryshen' K.L., Jain (Korsakova) E.A., Demchenko D.V., Kargopol'tseva D.R., Katel'nikova A.E., Gaidai D.S., Balabanyan V.Yu.**
Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase 279
- Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Shagarova N.V., Syromyatnikova S.I., Andrus A.F., Koval'chuk E.A., Kirillov V.B., Bepalov M.L., Petrov A.A., Koval'chuk E.V., Pantyukhov V.B., Kutayev D.A., Borisevich S.V., Kuznetsov S.L.**
Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection* 289
- Popova A.Y., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Samoilo L.V., Lyalina L. V., Semenova E.V., Gursky M.A., Aksenova E.A., Arbusova T.B., Totolian A.A.**
Herd immunity to SARS-CoV-2 in the Novosibirsk Region population amid the COVID-19 pandemic. 299
- Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Lopatovskaya K.V., Trushina Yu.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I.**
Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East Siberia in modern period 310
- OBITUARY**
- Viktor P. Grachev 322
- Igor' F. Barinsky 323

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19

Пашков Е.А.^{1,2}, Корчевая Е.Р.², Файзулов Е.Б.², Свитич О.А.^{1,2}, Пашков Е.П.¹,
Нечаев Д.Н.¹, Зверев В.В.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;

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

Новая коронавирусная инфекция на сегодняшний день привела к гибели свыше 4 млн человек и представляет собой наиболее значимую проблему мирового здравоохранения. Первый зафиксированный случай COVID-19 отмечен в Китайской Народной Республике (КНР) (г. Ухань) в декабре 2019 г., а уже 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила пандемию в связи с быстрым распространением этой инфекции. Помимо поражения органов дыхания её возбудитель SARS-CoV-2 способен вызывать тяжёлые осложнения, которые могут затронуть практически все системы организма. В связи с недостаточной эффективностью терапии COVID-19 сохраняется острая необходимость в разработке эффективных специфических лекарственных средств. Среди известных подходов к созданию противовирусных препаратов весьма перспективным направлением является получение соединений, действие которых опосредовано механизмом РНК-интерференции. РНК-интерференция – регуляторный путь, при котором молекула малой интерферирующей РНК (миРНК; small interfering RNA, siRNA) подавляет экспрессию гена-мишени. Это явление позволяет быстро создать целую серию высокоэффективных противовирусных веществ при условии, что известна только последовательность матричной РНК (мРНК, mRNA) целевого вирусного белка. В настоящем обзоре рассматривается возможность клинического применения миРНК, направленных на подавление репродукции нового коронавируса SARS-CoV-2, с учётом опыта подобных исследований на моделях инфицирования SARS-CoV и MERS-CoV. Важно помнить, что эффективность использования молекул миРНК, нацеленных на вирусные гены, может снизиться из-за формирования к ним устойчивости патогена. В связи с этим особого внимания заслуживает дизайн миРНК, нацеленных на клеточные факторы, необходимые для репродукции SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *коронавирус SARS-CoV-2; РНК-интерференция; малые интерферирующие РНК; нокдаун гена*

Для цитирования: Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Пашков Е.П., Нечаев Д.Н., Зверев В.В. Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 241-251. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

Для корреспонденции: Пашков Евгений Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия; аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия. E-mail: pashkov.j@yandex.ru

Участие авторов: Пашков Е.А. – написание текста, заключение; Корчевая Е.Р. – написание текста, заключение; Файзулов Е.Б. – сбор и обработка материалов, написание текста, заключение; Свитич О.А. – резюме, общая редакция, научное редактирование; Пашков Е.П. – сбор и обработка материалов, резюме, общая редакция; Нечаев Д.Н. – сбор и обработка материалов; Зверев В.В. – резюме, общая редакция, научное редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 19.05.2021
Принята к печати 14.07.2021
Опубликована 31.08.2021

REVIEW ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19

Evgeny A. Pashkov^{1,2}, Ekaterina R. Korchevaya², Evgeny B. Faizuloev², Oxana A. Svitich^{1,2}, Evgeny P. Pashkov¹, Dmitry N. Nechaev¹, Vitaliy V. Zverev^{1,2}

¹FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

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

COVID-19 has killed more than 4 million people to date and is the most significant global health problem. The first recorded case of COVID-19 had been noted in Wuhan, China in December 2019, and already on March 11, 2020, World Health Organization declared a pandemic due to the rapid spread of this infection. In addition to the damage to the respiratory system, SARS-CoV-2 is capable of causing severe complications that can affect almost all organ systems. Due to the insufficient effectiveness of the COVID-19 therapy, there is an urgent need to develop effective specific medicines. Among the known approaches to the creation of antiviral drugs, a very promising direction is the development of drugs whose action is mediated by the mechanism of RNA interference (RNAi). A small interfering RNA (siRNA) molecule suppresses the expression of a target gene in this regulatory pathway. The phenomenon of RNAi makes it possible to quickly create a whole series of highly effective antiviral drugs, if the matrix RNA (mRNA) sequence of the target viral protein is known. This review examines the possibility of clinical application of siRNAs aimed at suppressing reproduction of the SARS-CoV-2, taking into account the experience of similar studies using SARS-CoV and MERS-CoV infection models. It is important to remember that the effectiveness of siRNA molecules targeting viral genes may decrease due to the formation of viral resistance. In this regard, the design of siRNAs targeting the cellular factors necessary for the reproduction of SARS-CoV-2 deserves special attention.

Key words: SARS-CoV-2 coronavirus; RNA interference; small interfering RNAs; gene knockdown

For citation: Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Pashkov E.P., Nechaev D.N., Zverev V.V. Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 241-251.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-61>

For correspondence: Evgeny A. Pashkov, Junior Researcher of the Molecular Immunology Laboratory, FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; Postgraduate Student of the Department of Microbiology, Virology, and Immunology, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia.

E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Information about the authors:

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

Korchevaya E.R., <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

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

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

Pashkov E.P., <https://orcid.org/0000-0002-2581-273X>

Nechaev D.N., <https://orcid.org/0000-0002-7592-3809>

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

Contribution: Pashkov E.A. – writing of the text, conclusion; Korchevaya E.R. – writing of the text, conclusion; Faizuloev E.B. – collection and processing of the materials, writing of the text, conclusion; Svitich O.A. – resume, general edition, scientific editing; Pashkov E.P. – collection and processing of the materials, resume, general edition; Nechaev D.N. – collection and processing of the materials; Zverev V.V. – resume, general edition, scientific editing.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Received 19 May 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Новая коронавирусная инфекция на сегодняшний день привела к гибели более 4 млн человек и представляет собой наиболее значимую проблему здравоохранения во всём мире [1]. Возбудитель тяжёло-

го инфекционного заболевания COVID-19 – коронавирус SARS-CoV-2, относящийся к виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae* [2]. Первый зафиксированный случай COVID-19 отмечен

в Ухане (Китайская Народная Республика (КНР)) в декабре 2019 г., а уже 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила пандемию в связи с быстрым тотальным распространением инфекции [3]. Новый коронавирус поражает в первую очередь дыхательные пути, однако его осложнения затрагивают не только респираторную, но и сердечно-сосудистую, центральную нервную и мочевыделительную системы. Известно, что SARS-CoV-2 способен вызывать такие серьёзные последствия, как острая сердечная, почечная и дыхательная недостаточность, кардиомиопатии, аритмии, септический шок, цитокиновый шторм, поэтому в особую группу риска входят страдающие сахарным диабетом, хроническими заболеваниями лёгких, почек, сердца, различными иммунодефицитами [4–11]. По данным ряда исследований, помимо стандартных классических респираторных проявлений COVID-19, существует риск развития мультисистемного воспалительного синдрома, включающего в себя нарушения работы желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы, шоковые состояния как у детей (multisystem inflammatory syndrome in children, MIS-C), так и у взрослых (multisystem inflammatory syndrome in adults, MIS-A) [12–14].

Специфическая терапия COVID-19 затруднительна, поскольку рекомендуемые для её лечения лекарственные средства либо недостаточно эффективны, либо их эффективность не доказана в полной мере. Показано, что применение препарата Лопинавир+Ритонавир (Lopinavir+Ritonavir) не приводит к значительным успехам в терапии новой коронавирусной инфекции, поскольку число принимавших его умерших пациентов было равным количеству летальных исходов у больных в контрольной группе со стандартным лечением [15]. В исследовании S. Joshi и соавт. указывается на улучшение состояния пациентов с лёгкими и среднетяжёлыми формами COVID-19 при назначении препарата Фавипиравир (Favipiravir), однако необходимы крупные рандомизированные исследования, демонстрирующие его явные клинические преимущества: сокращение продолжительности заболевания, снижение времени госпитализации и меньшая потребность в кислороде [16]. В другой работе, посвящённой влиянию лекарственного препарата Гидрохлорохин (Hydroxychloroquine) на течение новой коронавирусной инфекции, продемонстрировано, что применение этого медикамента ассоциировано с повышенным риском возникновения желудочковых аритмий и летального исхода [17]. Применение интерферонов (IFN) для контроля COVID-19 носит весьма ограниченный характер. Более того, M. Sa Ribero и соавт. показано, что препараты IFN I типа неэффективны на поздних стадиях заболевания [18]. На сегодняшний день большие надежды связаны с появлением вакцин, направленных на формирование активного иммунитета против SARS-CoV-2. Однако существует ряд проблем, ограничивающих массовую вакцинопрофилактику: отсутствие данных о длительности поствакцинального иммунитета; значительная группа лиц, вакцинация которых не представляется

возможной ввиду противопоказаний; низкий уровень доверия населения к вакцинопрофилактике; антипрививочная пропаганда (антивакцинаторство) [19–23]. Остро стоит и проблема наращивания производства вакцинных препаратов в объёмах, достаточных для иммунизации большей части населения планеты.

В связи с этим сохраняется острая необходимость в разработке эффективных специфических лекарственных средств для лечения COVID-19. Среди известных подходов в этом направлении весьма перспективно получение соединений, действие которых опосредовано механизмами РНК-интерференции [24].

В настоящее время известно несколько подобных препаратов, позиционирующихся для лечения других заболеваний вирусной этиологии и проходящих клинические испытания. Обнадёживающие результаты продемонстрировали противовирусные препараты Miravirsen (Santaris Pharma) (показания – терапия вирусного гепатита С), pHIV7-shITAR-CCR5RZ (City of Hope Medical Center) (показания – лечение ВИЧ-инфекции), ALN-RSV01 (Alnylam Pharmaceuticals) (показания – терапия инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом) [25, 26].

Цель данного обзора – оценка потенциала клинического применения малых интерферирующих РНК (миРНК; small interfering RNA, siRNA), направленных на подавление репродукции коронавируса SARS-CoV-2, с учётом опыта исследования миРНК в отношении инфекций SARS-CoV и MERS-CoV.

В настоящее время лицензированные противовирусные средства на основе миРНК отсутствуют. Однако важно отметить, что разрешение на клиническое применение получили 2 препарата для терапии редких наследственных заболеваний: Patisiran (Alnylam Pharmaceuticals) – амилоидной полинейропатии, и Givosiran (Alnylam Pharmaceuticals) – острой печёночной порфирии [27, 28]. Наличие уже одобренных препаратов с механизмом действия, основанным на РНК-интерференции, позволяет надеяться на создание аналогичных противовирусных средств.

Биологическая сущность РНК-интерференции

РНК-интерференция – регуляторный путь, при котором молекула миРНК подавляет экспрессию гена-мишени [29]. Это явление открыто в 1998 г. учёными А. Fire (Э. Файер) и С. Mello (К. Мелло) у нематоды *Caenorhabditis elegans*. Ими также были обозначены касающиеся этого биологического феномена основные положения, показывающие, что:

- при РНК-интерференции расщепляется матричная РНК (мРНК);
- двухцепочечная РНК (дцРНК), которая определяет комплементарный участок являющейся мишенью мРНК, эффективнее, чем одноцепочечная (оцРНК);
- для нокдауна генов достаточно лишь короткого фрагмента дцРНК [30].

Механизм РНК-интерференции заключается в том, что эндонуклеаза Dicer расщепляет чужеродную дцРНК на отдельные двухцепочечные фрагменты

длиной до 25 п.н., которые и представляют собой миРНК. Затем происходит связывание последних с комплексом белков RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-индуцируемый комплекс выключения гена (сайлесинга)) с последующим распознаванием и разрушением этой структурой мишени – мРНК [31].

Разработка противовирусных средств на основе РНК-интерференции

Известно, что геномные последовательности SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 имеют сходство между собой [32, 33]. Последовательности мРНК большинства их белков также схожи друг с другом на 79,6% [34]. Ранние исследования воздействия миРНК на геном SARS-CoV и MERS-CoV дали положительные результаты подавления вирусной репродукции как *in vitro*, так и *in vivo*. Исходя из того, что SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 филогенетически близки и относятся к одному роду семейства *Coronaviridae*, использование механизма РНК-интерференции в подавлении репродукции SARS-CoV-2 может быть весьма многообещающим.

Классические подходы к созданию противовирусных препаратов

Классическим методом получения противовирусных средств является дизайн миРНК, ингибирующее действие которых направлено на вирусный геном. В одной из ранних работ по определению мишеней у SARS-CoV для РНК-интерференции В. Meng и соавт. провели скрининг и идентификацию миРНК для подавления экспрессии генов вируса SARS-CoV. Авторы синтезировали гены белка оболочки *E* и РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-dependent RNA-polymerase, *RDRP*), после чего трансфицировали ими клетки NIH 3T3. По данным полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) оба этих гена экспрессировались в клетках после их трансфекции. Далее синтезированы 2 миРНК для гена *E* (*Ei1* и *Ei2*) и 4 – для гена *RDRP* (*Ri1*, -2, -3, -4), которыми, в свою очередь, были трансфицированы эти же клетки. Через 48 ч проведена количественная ПЦР для оценки подавления экспрессии исследуемых генов. Согласно результатам эксперимента миРНК *Ei1* снижала экспрессию гена *E* на 89%, а миРНК *Ei2* – на 97%. Полное подавление экспрессии *RDRP* показали миРНК *Ri1* и *Ri3*, направленные к участкам его мРНК в позициях 118–140 и 394–415 п.н. соответственно. Эффективность же миРНК *Ri2*, направленной к участку 224–245 п.н., составила 60%. При этом миРНК *Ri4* не оказала какого-либо влияния на экспрессию гена *RDRP*. Проведено 3 подобных эксперимента, в каждом из которых получены аналогичные результаты. Таким образом, определен ряд миРНК, которые эффективно блокировали экспрессию генов *E* и *RDRP*. Эти молекулы, вероятно, найдут применение в ходе дальнейших исследований цикла репродукции SARS-CoV и потенциально могут быть изучены в качестве терапевтических агентов для лечения вызываемого им заболевания [35].

Y. Wang и соавт. изучали эффективность миРНК, направленные на ген мембранного белка М вируса SARS-CoV. В качестве мишеней были выбраны 2 наиболее консервативных участка нуклеотидной последовательности мРНК М-белка (221–242 и 466–486 п.н.); синтезированы 2 миРНК *si-M1* и *si-M2*, направленных к этим участкам соответственно. Затем выполнялось слияние *M*-гена с *EGFP*-геном с дальнейшим конструированием плазмиды *pEGFP-M* и последующей трансфекцией полученной конструкцией культуры клеток HEK 293. Влияние миРНК на *M*-ген определяли посредством ПЦР-РВ с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) и оценкой экспрессии *EGFP*. При использовании *si-M1* и *si-M2* достигалось 8-кратное снижение экспрессии гена *M* вследствие его ингибирования. Более высокие дозы *si-M1* приводили к нарастанию выраженности этого эффекта в 2–3 раза по сравнению с первоначальным значением [36].

Далее, Р. Zhao и соавт. продемонстрировали эффективность сконструированных ими плазмидных векторов, несущих гены коротких шпилечных РНК (кшРНК; small hairpin RNA, shRNA), нацеленных на *N*-ген SARS-CoV, в экспериментах на мышах (*Mus musculus*). Полученные плазмидные векторы *pN-EGFP*, *pU6-shN388* и *pUC18*, несущие последовательности генов *N* и миРНК, вводились внутримышечно 6-недельным самкам мышей линии BALB/c. Животные были случайным образом распределены в 2 группы: опытную и контрольную (по 4 особи в каждой). Каждые 4 сут осуществлялась забор одной из мышей в каждой группе для получения образцов мышечной ткани с целью последующего изучения экспрессии генов *N* и *EGFP*. ПЦР-анализ показал, что ингибирующий эффект миРНК (плазида *pU6-shN388*) сохранялся даже спустя 16 сут после инъекции. Уровень экспрессии мРНК *N*-гена SARS-CoV в мышцах животных снижался до 19, 17, 21 и 23% по сравнению с контрольной плазмидой на 4, 8, 12 и 16 сут после инфицирования соответственно [37].

Эффективное ингибирующее действие миРНК в отношении вируса SARS-CoV на его штамме HKU-39849 и культуре клеток Vero описали Z. Wang и соавт. Всего синтезировано 6 плазмид, кодирующих синтез миРНК, нацеленных на разные участки вирусного генома. Культура Vero была трансфицирована плазмидами и инфицирована вирусом SARS-CoV. Наибольший эффект зарегистрирован для плазмид *pSR02* и *pSR03*, кодирующих синтез миРНК, направленных на ген РНК-полимеразы вируса. Титр вируса уменьшался в 48 раз при воздействии *pSR02* и в 96 раз – для *pSR03* по сравнению с заражёнными нетрансфицированными клетками. Кроме того, эффективно снижался синтез вирусных белков N и 3CL. Авторы полагают, что эти миРНК могут использоваться в процессе разработки специфического лекарственного препарата [38].

Успешное использование миРНК, направленных к вирусному геному, показали в эксперименте Y. Shi и соавт. Исследователи подобрали 26 последовательностей миРНК, специфичных для генов *E*, *M*, *N* SARS-CoV. МиРНК *No5*, *No6* и *No16*, направленные

к мРНК белков E, M, N соответственно, в концентрации 30 нМ снижали экспрессию этих генов в культуре Vero на 70%. По мнению учёных, клиническое применение подобранных миРНК способно обеспечить эффективную терапевтическую стратегию при SARS (severe acute respiratory syndrome, тяжёлый острый респираторный синдром) [39].

Одной из потенциальных мишеней для миРНК служит ген поверхностного (spike) S-белка, играющего важную роль в проникновении вируса SARS-CoV внутрь клетки посредством связывания с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2; angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) и слияния вирусной оболочки и клеточной мембраны [40]. В своём исследовании С. Wu и соавт. приводят данные о подавлении репродукции штамма Hong-Kong SARS-CoV с помощью ряда миРНК, направленных в том числе к мРНК S-гена вируса. Авторами выбраны 7 последовательностей миРНК, некоторые из которых были направлены к S-белку (*siSARS-S1*, *-S2*, *-S3*), некоторые – к последовательности 3'-UTR, необходимой для репликации и транскрипции вирусного РНК-генома (*siSARS-3'-UTR*); наконец, 1 миРНК была направлена к последовательности, регулирующей транскрипцию (transcription-regulating sequence, TRS) (*siSARS-TRS*). Также синтезирована миРНК *siSARS-L*, нацеленная на область лидерной последовательности каждой из 5 субгеномных мРНК (сгРНК; subgenomic RNA, sgRNA). Полученными миРНК трансфицировали культуру Vero при посевной концентрации 4×10^4 клеток в количестве 100 пМ на лунку и заражали обработанные клетки вирусом SARS-CoV при множественности инфицирования (МИ; multiplicity of infection, MOI) 0,01. Путём визуальной оценки цитопатического действия (ЦПД) установлено, что клетки, которые были трансфицированы *siSARS-S2* или *siSARS-S3*, практически никак не изменились, в то время как трансфицированные другими разновидностями *siSARS* приобрели более округлую форму и уменьшились в размерах. Методом ПЦР-РВ показано, что применение *siSARS-S2* и *siSARS-S3* подавляло синтез вирусной нуклеиновой кислоты на 85–90%; все остальные миРНК показали неудовлетворительные результаты. В данной работе продемонстрировано, что указанные структуры способны эффективно ингибировать репродукцию SARS-CoV *in vitro*. Однако для подбора оптимальных доз миРНК и других условий с целью использования данного подхода в клинической практике необходимы дальнейшие исследования [41].

Z. Qin и соавт. трансфицировали культуру клеток HEK 293T плазмидами *pEGFP-S*, содержащими фрагменты S-гена вируса SARS-CoV, для определения противовирусной активности подобранных в опытах миРНК. Последние (*S-siRNA1* и *S-siRNA2*) были проверены на отсутствие гомологии с клеточными генами во избежание явления неспецифического нокдауна, после чего этими структурами трансфицирована клеточная культура. Как минимум в 3 независимых экспериментах наблюдалось достоверное уменьше-

ние флуоресценции *pEGFP-S*, свидетельствующее о подавлении экспрессии гена S и снижении концентрации соответствующей мРНК. При ПЦР-РВ в ходе трансфекции этими миРНК уровень транскриптов указанного гена снижался в 9–10 раз [42].

Эффективность использования направленных к указанному гену миРНК подтверждается и в работе В. Li и соавт. на лабораторной модели макаков резусов (*Macaca mulatta*) с использованием штамма PUMC01 вируса SARS-CoV, культивируемого в культуре Vero. Для проведения экспериментов были отобраны 2 миРНК – *siSC2* и *siSC5*, нацеленные на геном SARS-CoV в областях, кодирующих S-белок и NSP12 (*ORF1b*). Авторы обосновали свой выбор следующими положениями: 1) данные миРНК гомологичны штаммам вируса PUMC01, TOR-2; 2) эффективность этих миРНК доказана в ранних исследованиях и возрастает при их парной трансфекции; 3) указанные структуры не гомологичны геному человека, что позволит избежать непредвиденного неспецифического нокдауна генов [43–46]. В качестве отрицательного контроля служили миРНК *siCONa* и *siCONb*, не имеющие гомологии ни с человеческим, ни вирусным геномами. Для оценки эффективности подобранных миРНК была разработана репортёрная система на основе гена светляковой люциферазы (*pCI-scLuc*), содержащая последовательности *siSC2* и *siSC5*. Котрансфекция клеток Vero *pCI-scLuc* и *siSC2/siSC5* показала, что комбинация из данных миРНК, направленных к гену S-белка, способна подавлять также биосинтез люциферазы. С целью выбора оптимального средства доставки использовали растворы трансфекционных агентов D5W [47] и Infasurf [48]. При котрансфекции клеток плазмидой *pCI-scLuc* с *siSC2/siSC5* в комплексе с препаратом D5W получены более высокий уровень экспрессии люциферазы и более сильный эффект интерференции, чем в случае доставки с Infasurf. Из общего количества ($n = 21$) лабораторных животных 20 особей (поделённые на 5 групп) инфицировали вирусом SARS-CoV в дозе 1×10^5 TCID₅₀ (доза, инфицирующая 50% клеток культуры ткани) в 1 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) посредством интраназальной инстилляцией (внутренний контроль – 1 незаражённая особь). Далее подопытным вводили комплексы *siSC2/siSC5*, комбинации *siCONa* и *siCONb* в количестве 30 мг на 3 мл D5W. У всех заражённых макаков проявились SARS-подобные симптомы, однако те из них, которые получали специфические миРНК, имели более низкую температуру тела (~38,7 °С, что близко к нормальным значениям для этого вида). Дополнительно с помощью ПЦР-РВ анализировали мазки из ротоглотки. Вирусная РНК не обнаруживалась в 75% образцов, полученных от трансфицированных специфической миРНК обезьян. Таким образом, результаты испытаний молекулы *siSC2-5* позволяют рассматривать её в качестве потенциального терапевтического средства [49].

S. Åkerström и соавт. описали ингибирование репродукции SARS-CoV препаратами миРНК, нацеленными на вирусную сгРНК, кодирующую белки 7a/7b, 3a/3b и S. Трансфекцию культуры клеток

Vero E6 плазмидами, кодирующими синтез миРНК, проводили методом электропорации. В качестве репортёрной системы использовали ген *GFP* под контролем *CMV*-промотора. Клеточные линии, трансфицированные генами миРНК, заражали вирусом SARS-CoV. Спустя 1 сут культуральную жидкость собирали и титровали на культуре Vero E6 по показателю ЦПД. Во всех 3 линиях трансфицированных клеток отмечалось подавление вирусной репродукции на ~70% по сравнению с контролем. Примечательно, что одна из подобранных миРНК (*siRNA 7*) демонстрировала при этом эффективное подавление как целевой *sgRNA 7*, так и *sgRNA 8*, обеспечивая нокдаун 4 акцессорных белков [50].

В недавнем исследовании G. Gallicano и соавт. показано, что миРНК и микроРНК (мкРНК; *microRNA*, *miRNA*) с предсказанной специфичностью по отношению к гену S-белка вируса SARS-CoV-2 блокируют его синтез в клетках HEK 293T и hP7C. Клеточные культуры трансфицировали плазмидой, экспрессирующей S-протеин. Далее клетки обрабатывали синтетическими миРНК (*siRNA1-Sense*, *siRNA2-Sense*) и мкРНК (*miRNA1-hsa-miR624-5p* и *miRNA2-hsa-miR510-3p*), направленными к мРНК данного белка. Авторы установили, что все варианты миРНК и мкРНК по отдельности или в комбинации в концентрации 200 нМ согласно данным ОТ-ПЦР уменьшают синтез белка S в 2,5–5 раз. Выяснено предположение о том, что выбранный подход может использоваться в качестве инновационной стратегии ингибирования репродукции респираторных коронавирусов [51]. Работа заслуживает отдельного внимания, поскольку предлагает использовать для подобной цели миРНК – естественные клеточные факторы интерференции РНК.

В табл. 1 суммированы сведения о вирусных генах-мишенях, подавление которых приводило к эффективному снижению репродукции вируса SARS-CoV по данным независимых исследований.

Большинство работ по исследованию противовирусной активности миРНК в отношении вируса MERS-CoV носят теоретический характер. Так, S. Nur и соавт. при помощи программы siDirect 2.0 подобрали несколько миРНК к гену *ORF1ab* с последующей отбраковкой вариантов, дающих неспецифические (off-target) эффекты [33]. В сообщении S. Sohrab и соавт. описываются направленные на тот же ген миРНК для подавления репродукции MERS-CoV в культуре Vero [52].

Вместе с тем в публикации J. Millet и G. Whittaker, исследовавших способы проникновения MERS-CoV в клетку, показано снижение восприимчивости к вызываемой данным вирусом инфекции в клеточной культуре HEK 293T после её трансфекции миРНК, подавляющей экспрессию гена фурина. В результате снижения уровня кодирующей фурина мРНК на 62,5% клетки оказались менее восприимчивы к заражению псевдовирусами MERS-CoV. Напротив, популяция клеток с повышенной экспрессией этого протеолитического фермента была более восприимчивой к инфицированию, что указывает на немаловажную роль фурина в цикле репродукции MERS-CoV [53].

Альтернативные методики получения противовирусных препаратов

Другой подход к конструированию противовирусных соединений заключается в применении специфических миРНК, направленных к мРНК клеточных генов. Известно, что АПФ является вирусным рецептором для SARS-CoV [54]. С. Lu и соавт. сконструировали ряд плазмид, кодирующих малые шпилечные РНК (мшРНК; short hairpin RNA, shRNA), направленные на мРНК гена *ACE2*. Авторы проводили трансфекцию клеток Vero E6 генами 2 мшРНК, направленными на сайты A4 и C4 мРНК гена *ACE2*. После этого клетки заражали вирусом SARS-CoV при MOI = 1; 0,1; 0,01; 0,001. В результате репликация инфекционного агента блокировалась в клетках A4

Таблица 1. Вирусные гены, нокдаун которых приводил к значительному снижению репродукции SARS-CoV-2

Table 1. Viral genes which knockdown led to a significant decrease in the reproduction of SARS-CoV-2

Название генов Gene name	Функция Function	Ссылки References
<i>E</i>	Перенос ионов через мембрану вируса Transport of ions across the virus envelope	[35, 39]
<i>RDRP</i> gene	Синтез новых молекул РНК Synthesis of new RNA molecules	[35, 38]
<i>M</i>	Стабилизация вирусной мембраны Ensuring the stability of the virus envelope	[39]
<i>N</i>	Образование нуклеокапсида Formation of the nucleocapsid	
Spike gene	Обеспечение связывания с клеточным рецептором ACE2 и проникновения вируса в клетку Ensuring binding to the cellular receptor ACE2 and penetration of the virus into the cell	[41, 49, 51]
<i>3'-UTR</i>	3'-нетранслируемая область 3'-untranslated region	[41]
<i>TRS</i>	Регуляторная последовательность транскрипции Transcriptional regulatory sequence	
<i>ORF1B</i>	Открытая рамка считывания Open reading frame	[49]

с нокдауном этого гена при низких дозах заражения ($1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-3}$), соответствующих 3 последним значениям, тогда как при $MOI = 1$ не отмечено различий в вирусной нагрузке между клетками Vero E6 (контроль) и A4 на различных сроках от момента инфицирования. Исследователи полагают, что подавление активности гена *ACE2* способно ингибировать репродукцию SARS-CoV. Однако отмечается, что целевой нокдаун *ACE2* в органах, уязвимых для этого вируса, может привести к неожиданным последствиям, связанным с нарушением работы органов дыхательной и сердечно-сосудистой систем [55–57].

Клеточные факторы, участвующие в репродукции различных коронавирусов на разных этапах жизненного цикла, изучались в работах A. de Wilde и соавт. В целях выявления факторов хозяина, имеющих отношение к репродукции SARS-CoV, авторы осуществляли скрининг на основе библиотеки мРНК, нацеленных на кином человека. Поскольку протеинкиназы выступают ключевыми регуляторами многих клеточных функций, то исследования по подавлению экспрессии их генов позволяют выявить факторы и сигнальные пути, способствующие либо препятствующие репродукции коронавируса. В результате идентифицировано 40 клеточных белков, которые оказывают позитивное влияние на процесс репродукции SARS-CoV, и 90 факторов, имеющих противовирусный эффект. Анализ сигнальных путей позволил установить группы факторов, участвующих в определенных клеточных процессах, включая запуск ре-

акций врожденного иммунного ответа и метаболизм сложных липидов. Эти реакции, по-видимому, играют роль в развитии инфекции, вызываемой указанным возбудителем. Несколько факторов были выбраны для углубленной проверки в последующих экспериментах. В клетках, обработанных мРНК к фактору *COPB2*, наблюдалось наиболее выраженное противовирусное действие, проявляющееся в уменьшении экспрессии белков SARS-CoV и снижении выхода вируса примерно в 100 раз. Нокдаун *COPB2*-родственных белков – *COPB1*, *GBF1* и ряда других – также показал их важность для репликации SARS-CoV. Подавление протеинкиназы R (protein kinase R, PKR) усиливало репликацию вируса на первичном скрининге, а эксперименты по валидации подтвердили увеличение экспрессии белка SARS-CoV и продукции вируса после истощения PKR. Кроме того, циклин-зависимая киназа 6 (*CDK6*) также представляет собой значимый для репродукции этого вируса фактор хозяина [58, 59].

В табл. 2 представлен ряд клеточных генов, играющих важную роль в жизненном цикле коронавирусов. Нокдаун этих генов приводил к снижению репродукции SARS-CoV.

Заключение

Таким образом, разработка специфических препаратов для терапии COVID-19, основанных на механизмах РНК-интерференции, представляется перспективным направлением исследований. Суще-

Таблица 2. Клеточные гены, нокдаун которых приводил к значительному снижению репродукции SARS-CoV-2
Table 2. Cellular genes which knockdown led to a significant decrease in the reproduction of SARS-CoV-2

Название гена Gene name	Функция Function	Ссылки References
<i>ACE2 (ACEH)</i>	Специфический рецептор для входа SARS-CoV-2 в клетку Receptor for the entry of SARS-CoV-2 into the cell	[55, 59]
<i>EIF2AK2</i>	Фосфорилирование фактора инициации трансляции EIF2S1 Phosphorylation of the translation initiation factor EIF2S1	[59]
<i>CDK5R2</i>	Кодирование специфического активатора киназы CDK5 Encoding of the specific activator of CDK5 kinase	[58]
<i>GBF1</i>	Участие в везикулярном переносе путём активации фактора 1 рибозилирования аденозиндифосфата Participation in vesicular transfer by activating factor 1 of adenosine diphosphate ribosylation	
<i>COPB1</i>	Кодирование одной из белковых субъединиц, связанных с транспортом к комплексу Гольджи Encoding of one of the protein subunits associated with transport in the Golgi complex	
<i>COPB2</i>	Кодирование одной из белковых субъединиц, связанных с транспортом к комплексу Гольджи Encoding of one of the protein subunits associated with transport in the Golgi complex	
<i>CDK6</i>	Каталитическая субъединица протеинкиназного комплекса, важная для прохождения фазы G1 клеточного цикла и перехода к G1/S Catalytic subunit of the protein kinase complex, which is important for the passage of the G1 phase of the cell cycle and the G1/S transition	
<i>CLK1</i>	Кодируемый белок в ядре, фосфорилирует богатые серином/аргинином белки, участвующие в процессе сингге пре-мРНК, высвобождая их в нуклеоплазму The encoded protein in the nucleus which phosphorylates the serine/arginine-rich proteins involved in pre-mRNA processing with releasing them into the nucleoplasm	
<i>ABL1</i>	Белковая тирозинкиназа, участвует во множестве клеточных процессов, включая деление, адгезию, дифференцировку и стрессовую реакцию Protein tyrosine kinase which involved in a variety of cellular processes including cell division, adhesion, differentiation, and stress response	
Furin	Протеолиз S2 субъединицы Proteolysis of the S2 subunit	[53]

ствование одобренных препаратов для лечения наследственных заболеваний с механизмом действия, основанным на рассматриваемом феномене (Patisiran и Givosiran), позволяет надеяться на создание аналогичных противовирусных препаратов, показанных для терапии COVID-19. Предполагается, что негативная регуляция вирусной репродукции на ранних этапах инфекции вирусом SARS-CoV-2 способна существенно снизить риск развития тяжёлых форм заболевания. При этом миРНК можно направлять как на мРНК вирусного происхождения, так и на участвующие в различных этапах вирусной репродукции клеточные факторы и сигнальные пути.

Вместе с тем следует учитывать, что применение миРНК, направленных к вирусным генам, способно привести к формированию резистентности вируса ввиду появления точечных замен в геноме вируса, а также неспецифически подавлять экспрессию клеточных генов и оказывать негативное влияние на клетки. Для предотвращения формирования устойчивости вирусов к препаратам миРНК вследствие мутабельности и генетического разнообразия вирусов в пределах вида и типа может быть использован принцип комбинированного воздействия на ряд независимых мишеней в транскриптом как самого вирусного агента, так и поддерживающей его репликацию клетки организма хозяина. Нерешённой проблемой является и эффективная адресная доставка миРНК *in vivo*. Эти и ряд других вопросов требуют проведения дальнейших изысканий теоретического и экспериментального характера.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/> (accessed July 29, 2021).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed July 29, 2021).
4. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system? A call for epidemiologic investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
5. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
6. Wu J., Li J., Zhu G., Zhang Y., Bi Z., Yu Y., et al. Clinical features of maintenance Hemodialysis patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 15(8): 1139–45. <https://doi.org/10.2215/cjn.04160320>
7. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with Coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–90. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
8. Perico L., Benigni A., Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? Why and to what extent? The emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron.* 2020; 144(5): 213–21. <https://doi.org/10.1159/000507305>
9. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(4): 420–2. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
10. Jordan R.E., Adab P., Cheng K.K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ.* 2020; 368: m1198. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1198>
11. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Complications. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/complications> (accessed July 29, 2021).
12. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(10): 2565–75. <https://doi.org/10.1002/ppul.24991>
13. Panigrahy N., Policarpio J., Ramanathan R. Multisystem inflammatory syndrome in children and SARS-CoV-2: A scoping review. *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 2020; 13(3): 301–16. <https://doi.org/10.3233/prm-200794>
14. García-Salido A., de Carlos Vicente J.C., Belda Hofheinz S., Balcalls Ramírez J., Slöcker Barrio M., Leóz Gordillo I., et al. Spanish Pediatric Intensive Care Society working group on SARS-CoV-2 infection. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: from COVID-19 pneumonia to multisystem inflammatory syndrome: a multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 666. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03332-4>
15. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., et al. A trial of Lopinavir–Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(19): 1787–99. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001282>
16. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., et al. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 102: 501–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.069>
17. Cavalcanti A.B., Zampieri F.G., Rosa R.G., Azevedo L.C.P., Veiga V.C., Avezum A., et al. Hydroxychloroquine with or without azithromycin in mild-to-moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(21): 2041–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019014>
18. Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020; 16(7): e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
19. Онищенко Г.Г., Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Анализ перспективных направлений создания вакцин против COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
20. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ.* 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>
21. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
22. Gallup. One in Three Americans Would Not Get COVID-19 Vaccine. Available at: <https://news.gallup.com/poll/317018/one-three-americans-not-covid-vaccine.aspx> (accessed July 29, 2021).
23. da Costa C.B.P., Martins F.J., da Cunha L.E.R., Ratcliffe N.A., Cisne de Paula R., Castro H.C. COVID-19 and Hyperimmune sera: A feasible plan B to fight against coronavirus. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220>
24. Weng Y., Xiao H., Zhang J., Liang X.J., Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.* 2019; 37(5): 801–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012>
25. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
27. Hoy S.M. Patisiran: first global approval. *Drugs.* 2018; 78(15): 1625–31. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
28. Center for drug evaluation and research. Multi-discipline review. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf (accessed July 29, 2021).
29. Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(4): 657–85. <https://doi.org/10.1128/mmmr.67.4.657-685.2003>

30. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391(6669): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>
31. Пашков Е.А., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Сергеев О.В., Зверев В.В. Перспектива создания специфических противогриппозных препаратов на основе синтетических малых интерферирующих РНК. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190>
32. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(4): 2006–11. https://doi.org/10.26355/eurrev_202002_20378
33. Nur S.M., Hasan M.A., Amin M.A., Hossain M., Sharmin T. Design of potential RNAi (miRNA and siRNA) molecules for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) gene silencing by computational method. *Interdiscip. Sci.* 2015; 7(3): 257–65. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0266-9>
34. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
35. Meng B., Lui Y.W., Meng S., Cao C., Hu Y. Identification of effective siRNA blocking the expression of SARS viral envelope E and RDRP genes. *Mol. Biotechnol.* 2006; 33(2): 141–8. <https://doi.org/10.1385/mb:33:2:141>
36. Wang Y., Cao Y.L., Yang F., Zhang Y., Wang S.H., Liu L. Small interfering RNA effectively inhibits the expression of SARS coronavirus membrane gene at two novel targeting sites. *Molecules*. 2010; 15(10): 7197–207. <https://doi.org/10.3390/molecules15107197>
37. Zhao P., Qin Z.L., Ke J.S., Lu Y., Liu M., Pan W., et al. Small interfering RNA inhibits SARS-CoV nucleocapsid gene expression in cultured cells and mouse muscles. *FEBS Lett.* 2005; 579(11): 2404–10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.080>
38. Wang Z., Ren L., Zhao X., Hung T., Meng A., Wang J., et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J. Virol.* 2004; 78(14): 7523–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7523-7527.2004>
39. Shi Y., Yang D.H., Xiong J., Jia J., Huang B., Jin Y.X. Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by synthetic small interfering RNAs. *Cell Res.* 2005; 15(3): 193–200. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290286>
40. Xiao X., Dimitrov D.S. The SARS-CoV S glycoprotein. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2428–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4257-y>
41. Wu C.J., Huang H.W., Liu C.Y., Hong C.F., Chan Y.L. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res.* 2005; 65(1): 45–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.09.005>
42. Qin Z.L., Zhao P., Zhang X.L., Yu J.G., Cao M.M., Zhao L.J., et al. Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(4): 1186–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.180>
43. Chen Z., Zhang L., Qin C., Ba L., Yi C.E., Zhang F., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J. Virol.* 2005; 79(5): 2678–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>
44. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta* with SARS coronavirus. *J. Pathol.* 2005; 206(3): 251–9. <https://doi.org/10.1002/path.1769>
45. Haasnoot P.C., Cupac D., Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(6 Pt. 1): 607–16. <https://doi.org/10.1159/000073526>
46. Zheng B.J., Guan Y., Tang Q., Du C., Xie F.Y., He M.L., et al. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir. Ther.* 2004; 9(3): 365–74.
47. Ghanayem N.S., Yee L., Nelson T., Wong S., Gordon J.B., Marcante K., et al. Stability of dopamine and epinephrine solutions up to 84 hours. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2001; 2(4): 315–7. <https://doi.org/10.1097/00130478-200110000-00005>
48. Thomas N.J., Hollenbeak C.S., Lucking S.E., Willson D.F. Cost-effectiveness of exogenous surfactant therapy in pediatric patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2005; 6(2): 160–5. <https://doi.org/10.1097/01.pcc.0000154965.08432.16>
49. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q., et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* 2005; 11(9): 944–51. <https://doi.org/10.1038/nm1280>
50. Åkerström S., Mirazimi A., Tan Y.J. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res.* 2007; 73(3): 219–27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.10.008>
51. Gallicano G.I., Casey J.L., Fu J., Mahapatra S. Molecular targeting of vulnerable RNA sequences in SARS CoV-2: identifying clinical feasibility. *Gene Ther.* 2020; 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00210-0>
52. Sohrab S.S. et al. Antiviral Activity Evaluation of siRNAs Against MERS-CoV in Vero Cell Culture. *Applied Microbiology*. London; 2020.
53. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(42): 15214–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
54. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450–4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
55. Lu C.Y., Huang H.Y., Yang T.H., Chang L.Y., Lee C.Y., Huang L.M. siRNA silencing of angiotensin-converting enzyme 2 reduced severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replications in Vero E6 cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8): 709–15. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0495-5>
56. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System? A Call for Epidemiologic Investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
57. Cheng H., Wang Y., Wang G.Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 726–30. <https://doi.org/10.1002/jmv.25785>
58. de Wilde A.H., Wannee K.F., Scholte F.E., Goeman J.J., Ten Dijke P., Snijder E.J., et al. A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8318–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.01029-15>
59. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host factors in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 1–42. https://doi.org/10.1007/82_2017_25

REFERENCES

1. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int/> (accessed July 29, 2021).
2. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
3. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (accessed July 29, 2021).
4. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is there an association between COVID-19 mortality and the renin-angiotensin system? A call for epidemiologic investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
5. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020; 395(10223): 497–506. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5)
6. Wu J., Li J., Zhu G., Zhang Y., Bi Z., Yu Y., et al. Clinical features of maintenance Hemodialysis patients with 2019 novel Coronavirus-

- infected pneumonia in Wuhan, China. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2020; 15(8): 1139–45. <https://doi.org/10.2215/cjn.04160320>
7. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with Coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–90. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
 8. Perico L., Benigni A., Remuzzi G. Should COVID-19 concern nephrologists? Why and to what extent? The emerging impasse of angiotensin blockade. *Nephron.* 2020; 144(5): 213–21. <https://doi.org/10.1159/000507305>
 9. Xu Z., Shi L., Wang Y., Zhang J., Huang L., Zhang C., et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(4): 420–2. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30076-x](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30076-x)
 10. Jordan R.E., Adab P., Cheng K.K. Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ.* 2020; 368: m1198. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1198>
 11. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Complications. Available at: <https://bestpractice.bmj.com/topics/en-gb/3000201/complications> (accessed July 29, 2021).
 12. Yasuhara J., Kuno T., Takagi H., Sumitomo N. Clinical characteristics of COVID-19 in children: A systematic review. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(10): 2565–75. <https://doi.org/10.1002/ppul.24991>
 13. Panigrahy N., Policarpio J., Ramanathan R. Multisystem inflammatory syndrome in children and SARS-CoV-2: A scoping review. *J. Pediatr. Rehabil. Med.* 2020; 13(3): 301–16. <https://doi.org/10.3233/prm-200794>
 14. Garcia-Salido A., de Carlos Vicente J.C., Belda Hofheinz S., Balcells Ramirez J., Slöcker Barrio M., Leóz Gordillo I., et al. Spanish Pediatric Intensive Care Society working group on SARS-CoV-2 infection. Severe manifestations of SARS-CoV-2 in children and adolescents: from COVID-19 pneumonia to multisystem inflammatory syndrome: a multicentre study in pediatric intensive care units in Spain. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 666. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03332-4>
 15. Cao B., Wang Y., Wen D., Liu W., Wang J., Fan G., et al. A trial of Lopinavir–Ritonavir in adults hospitalized with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(19): 1787–99. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001282>
 16. Joshi S., Parkar J., Ansari A., Vora A., Talwar D., Tiwaskar M., et al. Role of favipiravir in the treatment of COVID-19. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 102: 501–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.069>
 17. Cavalcanti A.B., Zampieri F.G., Rosa R.G., Azevedo L.C.P., Veiga V.C., Avezum A., et al. Hydroxychloroquine with or without azithromycin in mild-to-moderate Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(21): 2041–52. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2019014>
 18. Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 2020; 16(7): e1008737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008737>
 19. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development [Analiz perspektivnykh napravleniy sozdaniya vaksiny protiv COVID-19]. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227> (in Russian)
 20. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ.* 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>
 21. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
 22. Gallup. One in Three Americans Would Not Get COVID-19 Vaccine. Available at: <https://news.gallup.com/poll/317018/one-three-americans-not-covid-vaccine.aspx> (accessed July 29, 2021).
 23. da Costa C.B.P., Martins F.J., da Cunha L.E.R., Ratcliffe N.A., Cisne de Paula R., Castro H.C. COVID-19 and Hyperimmune sera: A feasible plan B to fight against coronavirus. *Int. Immunopharmacol.* 2021; 90: 107220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107220>
 24. Weng Y., Xiao H., Zhang J., Liang X.J., Huang Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.* 2019; 37(5): 801–25. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.012>
 25. Janssen H.L., Reesink H.W., Lawitz E.J., Zeuzem S., Rodriguez-Torres M., Patel K., et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368(18): 1685–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1209026>
 26. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(4): e1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
 27. Hoy S.M. Patisiran: first global approval. *Drugs.* 2018; 78(15): 1625–31. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-0983-6>
 28. Center for drug evaluation and research. Multi-discipline review. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/212194Orig1s000MultidisciplineR.pdf (accessed July 29, 2021).
 29. Agrawal N., Dasaradhi P.V., Mohammed A., Malhotra P., Bhatnagar R.K., Mukherjee S.K. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(4): 657–85. <https://doi.org/10.1128/mmr.67.4.657-685.2003>
 30. Fire A., Xu S.Q., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998; 391(6669): 806–11. <https://doi.org/10.1038/35888>
 31. Pashkov E.A., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Sergeev O.V., Zverev V.V. The potential of synthetic small interfering RNA-based antiviral drugs for influenza treatment [Perspektiva sozdaniya spetsificheskikh protivogrippoznykh preparatov na osnove sinteticheskikh malykh interferiruyushchikh RNK]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(4): 182–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-182-190> (in Russian)
 32. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A., Hemalatha K. COVID-19 (Novel Coronavirus 2019) – recent trends. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(4): 2006–11. https://doi.org/10.26355/eurev_202002_20378
 33. Nur S.M., Hasan M.A., Amin M.A., Hossain M., Sharmin T. Design of potential RNAi (miRNA and siRNA) molecules for Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) gene silencing by computational method. *Interdiscip. Sci.* 2015; 7(3): 257–65. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0266-9>
 34. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
 35. Meng B., Lui Y.W., Meng S., Cao C., Hu Y. Identification of effective siRNA blocking the expression of SARS viral envelope E and RDRP genes. *Mol. Biotechnol.* 2006; 33(2): 141–8. <https://doi.org/10.1385/mb:33:2:141>
 36. Wang Y., Cao Y.L., Yang F., Zhang Y., Wang S.H., Liu L. Small interfering RNA effectively inhibits the expression of SARS coronavirus membrane gene at two novel targeting sites. *Molecules.* 2010; 15(10): 7197–207. <https://doi.org/10.3390/molecules15107197>
 37. Zhao P., Qin Z.L., Ke J.S., Lu Y., Liu M., Pan W., et al. Small interfering RNA inhibits SARS-CoV nucleocapsid gene expression in cultured cells and mouse muscles. *FEBS Lett.* 2005; 579(11): 2404–10. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.080>
 38. Wang Z., Ren L., Zhao X., Hung T., Meng A., Wang J., et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J. Virol.* 2004; 78(14): 7523–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7523-7527.2004>
 39. Shi Y., Yang D.H., Xiong J., Jia J., Huang B., Jin Y.X. Inhibition of genes expression of SARS coronavirus by synthetic small interfering RNAs. *Cell Res.* 2005; 15(3): 193–200. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290286>
 40. Xiao X., Dimitrov D.S. The SARS-CoV S glycoprotein. *Cell Mol. Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2428–30. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4257-y>
 41. Wu C.J., Huang H.W., Liu C.Y., Hong C.F., Chan Y.L. Inhibition of SARS-CoV replication by siRNA. *Antiviral Res.* 2005; 65(1): 45–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2004.09.005>
 42. Qin Z.L., Zhao P., Zhang X.L., Yu J.G., Cao M.M., Zhao L.J., et al. Silencing of SARS-CoV spike gene by small interfering RNA in HEK 293T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 324(4): 1186–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.180>
 43. Chen Z., Zhang L., Qin C., Ba L., Yi C.E., Zhang F., et al. Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing the spike glycoprotein of severe acute respiratory syndrome coronavirus induces protective neutralizing antibodies primarily targeting the receptor binding region. *J. Virol.* 2005; 79(5): 2678–88. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.5.2678-2688.2005>
 44. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta*

- with SARS coronavirus. *J. Pathol.* 2005; 206(3): 251-9. <https://doi.org/10.1002/path.1769>
45. Haasnoot P.C., Cupac D., Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(6 Pt. 1): 607-16. <https://doi.org/10.1159/000073526>
 46. Zheng B.J., Guan Y., Tang Q., Du C., Xie F.Y., He M.L., et al. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir. Ther.* 2004; 9(3): 365-74.
 47. Ghanayem N.S., Yee L., Nelson T., Wong S., Gordon J.B., Marcante K., et al. Stability of dopamine and epinephrine solutions up to 84 hours. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2001; 2(4): 315-7. <https://doi.org/10.1097/00130478-200110000-00005>
 48. Thomas N.J., Hollenbeak C.S., Lucking S.E., Willson D.F. Cost-effectiveness of exogenous surfactant therapy in pediatric patients with acute hypoxemic respiratory failure. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2005; 6(2): 160-5. <https://doi.org/10.1097/01.pcc.0000154965.08432.16>
 49. Li B.J., Tang Q., Cheng D., Qin C., Xie F.Y., Wei Q., et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat. Med.* 2005; 11(9): 944-51. <https://doi.org/10.1038/nm1280>
 50. Åkerström S., Mirazimi A., Tan Y.J. Inhibition of SARS-CoV replication cycle by small interference RNAs silencing specific SARS proteins, 7a/7b, 3a/3b and S. *Antiviral Res.* 2007; 73(3): 219-27. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.10.008>
 51. Gallicano G.I., Casey J.L., Fu J., Mahapatra S. Molecular targeting of vulnerable RNA sequences in SARS CoV-2: identifying clinical feasibility. *Gene Ther.* 2020; 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-00210-0>
 52. Sohrab S.S. et al. Antiviral Activity Evaluation of siRNAs Against MERS-CoV in Vero Cell Culture. *Applied Microbiology*. London; 2020.
 53. Millet J.K., Whittaker G.R. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014; 111(42): 15214-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407087111>
 54. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426(6965): 450-4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
 55. Lu C.Y., Huang H.Y., Yang T.H., Chang L.Y., Lee C.Y., Huang L.M. siRNA silencing of angiotensin-converting enzyme 2 reduced severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replications in Vero E6 cells. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 27(8): 709-15. <https://doi.org/10.1007/s10096-008-0495-5>
 56. Hanff T.C., Harhay M.O., Brown T.S., Cohen J.B., Mohareb A.M. Is There an Association Between COVID-19 Mortality and the Renin-Angiotensin System? A Call for Epidemiologic Investigations. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 870-4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa329>
 57. Cheng H., Wang Y., Wang G.Q. Organ-protective effect of angiotensin-converting enzyme 2 and its effect on the prognosis of COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 726-30. <https://doi.org/10.1002/jmv.25785>
 58. de Wilde A.H., Wannee K.F., Scholte F.E., Goeman J.J., Ten Dijke P., Snijder E.J., et al. A kinome-wide small interfering RNA screen identifies proviral and antiviral host factors in severe acute respiratory syndrome coronavirus replication, including double-stranded RNA-activated protein kinase and early secretory pathway proteins. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8318-33. <https://doi.org/10.1128/jvi.01029-15>
 59. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host factors in coronavirus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 1-42. https://doi.org/10.1007/82_2017_25

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-62>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19

Салеева Д.В.¹, Засухина Г.Д.^{1,2}

¹ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России, 123098, Москва, Россия; ²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук, 117971, Москва, Россия

В настоящем обзоре изложены литературные данные относительно подходов к лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 малыми дозами радиации (МДР). Кроме того, приведены сведения о применении МДР для терапии различных заболеваний, в частности пневмонии, ряда воспалительных процессов разного происхождения, а также болезни Альцгеймера. Кратко описаны механизмы действия этого лечебного метода, связанные с активацией иммунной системы и противовоспалительным ответом за счёт влияния на процессы оксидативного стресса, что отражается в увеличении активности цитокинов (интерлейкин- (IL-) 6), изменении экспрессии ряда генов (таких как *P53* и *NF-κB* (*p65*)), содержания длинных некодирующих РНК (днРНК; long non-coding RNA, ncRNA) и микроРНК (мкРНК; microRNA, miRNA) (представлены собственные данные авторов). На основании анализа представленного материала можно предполагать, что дальнейшие клинические испытания действия МДР (50–100 мГр) в группах пациентов с COVID-19 на разных стадиях заболевания позволят выявить оптимальные условия для выработки и использования эффективной схемы лечения.

Ключевые слова: малые дозы радиации; COVID-19; ген; *P53*; *NF-κB*; длинные некодирующие РНК; микроРНК

Для цитирования: Салеева Д.В., Засухина Г.Д. Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 252-258. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-62>

Для корреспонденции: Салеева Дарья Владиславовна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и генетики радиационных эффектов, ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России, 123098, Москва, Россия. E-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

Участие авторов: Салеева Д.В. – сбор и обработка материала, написание текста; Засухина Г.Д. – сбор материала, резюме, общая редакция, научное редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена на базе ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства России при финансовой поддержке программы развития ядерной медицины АО «Наука и инновация» ГК «Росатом» и по тематике ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской Академии наук (госзадание № 0112-2019-0002).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 25.05.2021

Принята к печати 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

REVIEW ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-62>

Prospects for using low-dose radiation in the complex therapy for COVID-19

Daria V. Saleeva¹, Galina D. Zasukhina^{1,2}

¹FSBI «State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center» of Federal Medical Biological Agency of Russia, 123098, Moscow, Russia

²FSBIS Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

This review presents the literature data of new approaches for the treatment of COVID-19 with low doses of radiation (LDR). In addition, data on the use of LDR for the treatment of various disorders, in particular pneumonia, a number of inflammatory processes of various etiology, as well as Alzheimer's disease are discussed. The

mechanisms of LDR action are briefly described, associated with the activation of the immune system and anti-inflammatory response due to the effect on the processes of oxidative stress, which is reflected in an increase in the activity of cytokines (interleukin- (IL-) 6), changes in the expression of a number of genes (such as *P53* and *NF-κB* (*p65*)) and long non-coding RNAs (ncRNAs) (the authors' own data are presented). Based on the analysis of the material presented, it can be assumed that further clinical trials of the effect of MDR (5–10 cGy) on patients with COVID-19, who are at different stages of the disease, will reveal the optimal conditions for the development and use of an effective treatment regimen.

Keywords: *low-dose radiation; COVID-19; gene, P53; NF-κB, non-coding RNAs, microRNAs*

For citation: Saleeva D.V., Zasukhina G.D. Prospects for using low-dose radiation in the complex therapy for COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 252-258 (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-62>

For correspondence: Daria V. Saleeva, Junior Researcher of the Laboratory of Molecular Biology and Genetics of Radiation Effects, FSBI «State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center» of Federal Medical Biological Agency of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: dasha_saleeva@inbox.ru

Information about the authors:

Saleeva D.V., <https://orcid.org/0000-0002-5870-5594>

Zasukhina G.D., <https://orcid.org/0000-0002-9871-0902>

Contribution: Saleeva D.V. – collection and processing of the material, writing of the text; Zasukhina G.D. – collection of the material, summary, general edition, scientific editing of the article.

Funding. This study was carried out on the basis of the FSBI «State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center» of Federal Medical Biological Agency of Russia with the financial support by the Program of Nuclear Medicine Development of JSC «Science and Innovations», State Atomic Energy Corporation «Rosatom» and on the theme of the FSBIS Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences (State task No. 0112-2019-0002).

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

Received 25 May 2021
Accepted 14 July 2021
Published 31 August 2021

Введение

В последнее время малые дозы радиации (МДР), применяемые для терапии ряда патологических состояний у человека (включая онкозаболевания), стали использоваться и для лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 [1–4]. Беспороговая концепция действия ионизирующего излучения (ИИ), которая господствовала до последнего времени, предполагала линейную зависимость развития повреждений с увеличением дозы [5]. Высокие дозы радиации (ВДР) на протяжении многих десятилетий эффективно применяются для радиотерапии опухолей, вызывая разрушение и гибель злокачественных клеточных элементов [6]. Однако в ряде работ показано, что МДР вызывают при предварительном облучении устойчивость клеток, их популяций, микро- и макроорганизмов к действию не только ВДР, но и ряда высокотоксичных химических мутагенов [7]. В этом заключается так называемый эффект гормезиса, который привлек внимание исследователей в данном случае к изучению спектра и механизмов действия МДР [2, 8].

Некоторые исторические аспекты использования ионизирующего излучения для лечения патологии человека

Ещё с 1905 г. радиотерапия являлась убедительно действующим методом лечения неразрешающихся бактериальных пневмоний, основанным на ускорении метаболических и аутолитических процессов в ходе элиминации воспалительного очага [9]. Так, в 1913 г. применение этого терапевтического вмешательства снизило смертность от пневмонии на 50%.

В 1924 г. у 243 больных, которым назначалась радиотерапия, также были получены положительные результаты. Однако с открытием пенициллина в 40-х гг. XX в. стал происходить постепенный отказ от методов облучения. В 2013 г. опубликовано сообщение о лечении различных типов пневмоний МДР, при этом в 83% случаев (из 863 пациентов) продемонстрирован положительный эффект терапии [10]. Авторы подчёркивали необходимость соблюдения определённых протоколов лечения, в частности использования доз облучения в диапазоне 20–200 сГр [4, 11]. Кроме того, радиотерапия на протяжении определённого периода времени рассматривалась как один из основных методов лечения ряда заболеваний, включая болезнь Альцгеймера [12].

Известно, что в различных регионах Земли имеются районы с повышенным природным фоном радиации. Неоднократно было показано, что представители их населения реже болеют не только острыми респираторными, но и другими заболеваниями, включая злокачественные новообразования. Так, в округе Янси (провинция Гуандун, Китайская Народная Республика (КНР)) измеренная эффективная доза радиации оказалась равной 6,24 мЗв/год, тогда как её уровень в контрольном регионе составлял 1,95 мЗв/год. При этом в сыворотке крови 54 мужчин, проживавших в исследуемом регионе, при сравнении с 54 лицами мужского пола, представлявших население другой административной области (контроль), были достоверно повышены уровни интерлейкинов (IL) и степень экспрессии ряда генов, ответственных за регуляцию иммунного статуса и клеточного гомеостаза [13].

Лечение COVID-19

Приведённые сведения явились предпосылками использования МДР для пилотных исследований по лечению новой коронавирусной инфекции COVID-19 [3, 14–16]. Рядом авторов приводятся данные о положительном влиянии МДР на течение заболевания, хотя в ряде случаев совместно с облучением назначали лекарственную терапию. Одним из важнейших факторов является доза ИИ. Авторы считают, что МДР осуществляют мультицентрическое клиническое воздействие, при этом позитивный эффект оказывает их сочетание с противовоспалительными препаратами – ингибиторами цитокинов. Диапазон МДР при лечении некоторых пациентов с пневмониями находился в интервале от 0,7–0,8 до 1,0 Гр. При этом применялось либо фракционированное облучение (2–3 раза с интервалами 2–3 сут), либо облучение только лёгких, либо всего тела. Вместе с тем оценивался риск возможных негативных последствий ИИ в двух основных направлениях: во-первых, возможность отдалённого возникновения различного рода новообразований; во-вторых, вероятность спонтанной вирусной активации. Относительно влияния на процесс канцерогенеза первые исследования применения МДР показали положительные результаты без развития острой лучевой токсичности и ухудшения в т.ч. в виде цитокинового шторма [17]. В случаях же вирусной активации, например в ходе лечения инфекции, вызываемой вирусом простого герпеса (*Herpesviridae*; *Alphaherpesvirinae*; *Simplexvirus*: *Herpes simplex virus 1* (HHV-1)), использовались ВДР – 5–10 Гр [18]. По этой причине для активации латентных вирусных агентов необходимой считается доза >4 Гр, что, естественно, не может быть каким-либо образом связано с МДР.

Механизм действия МДР

Основным механизмом воздействия МДР на организм человека является активация иммунной системы, проявления функционирования которой обнаружены на различных экспериментальных моделях [15, 19–20]. Активированные CD8+ дендритические и Т-клетки атакуют и элиминируют вирус-инфицированные клеточные элементы. Продуцирующие IL-10 иммунные клетки, индуцированные лёгочными макрофагами, ослабляют контроль цитокинового шторма, вызываемого вирусной инфекцией. МДР активируют эндотелиальные клетки и уменьшают адгезию лейкоцитов, что способствует выработке противовоспалительных цитокинов. Кроме того, данный вид лучевой терапии влияет на оксидативный стресс – основной компонент действия ИИ. Элиминация свободных радикалов выступает одним из механизмов противовоспалительного ответа при применении МДР. Кроме того, наряду с процессом активации иммунных клеток многие транскрипционные факторы (P53, контролирующий клеточный гомеостаз; ядерный фактор NF-κB (p65); активированный протеин AP1) организуют противовоспалительную защиту. Для эффекта МДР характерна повышенная экспрес-

сия генов теплового шока, способствующих устойчивости клеток. Показано активирующее воздействие МДР на Т-клетки с повышением продукции интерферона (IFN-) γ и экспрессии IL-2, -4, -6 [21].

Разные исследователи неоднозначно определяют оптимальный терапевтический диапазон МДР. Это в определённой степени зависит от источника облучения, проведения исследования *in vitro* или процедуры *in vivo*, характеристик облучаемого органа, условий содержания животных (диета и др.), степени злокачественности клеток и ряда других факторов. Так, величина МДР может колебаться от 0,005 до 0,1 Гр [22–23]. Вместе с тем анализ данных о положительных эффектах МДР указывает на целесообразность применения дозы 0,05 Гр, которая по сравнению с другими (более высокими) стимулирует иммунологические реакции, не оказывая какого-либо токсического влияния. Напротив, воздействие ВДР (>1 Гр) ведёт к снижению иммунного статуса, вызывает геномную нестабильность, повреждение тканей, а также эпигенетические изменения [2, 22, 24].

Нами изучен ряд параметров, характеризующих влияние МДР (0,1 Гр) на уровни экспрессии некоторых генов и их регуляторов в нормальных лимфоцитах здоровых доноров через 1 и 4 ч после облучения (**таблица**) [25]. Определяли содержание матричной РНК (мРНК) белок-кодирующих генов, длинных некодирующих РНК (днРНК; long non-coding RNA, ncRNA) и микроРНК (мкРНК; microRNA, miRNA). Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программ Statistica 7.0. При оценке экспрессии генов определяли значения медианы (Me) и квартилей Q1; Q3. С целью установления достоверности различий применяли t-критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни (при уровне значимости $p \leq 0,05$).

Из генов, представленных в **таблице**, *PTEN* является мишенью гена *P53*. Гены *RhoA*, *cdc42*, *IRAK1*, *IAP1* и *IL6*, в свою очередь, представляют собой мишени ядерного транскрипционного фактора NF-κB. Через 1 ч после воздействия радиации (рентгеновское излучение в дозе 0,1 Гр) на лимфоциты в клетках отмечалось статистически значимое увеличение содержания мРНК гена *P53* наряду со снижением содержания мРНК генов *RhoA*, *cdc42* и *IL-6*. Таким образом, на протяжении этого временного отрезка зафиксировано увеличение транскрипции гена *P53* и снижение функциональной активности NF-κB в лимфоцитах. Спустя 4 ч все уровни мРНК белоксинтезирующих генов возвращались к показателям интактного контроля.

Как видно из **таблицы**, через 1 ч после облучения в дозе 0,1 Гр в лимфоцитах наблюдались увеличение содержания днРНК MALAT1 и GAS5, снижение экспрессии miR-27a и miR-181a, а спустя 4 ч – нормализация этих показателей. Таким образом, показано, что в течение первого часа после воздействия ИИ в лимфоцитах активируется p53-система и снижается активность NF-κB-ответа. Через 4 ч активность исследуемых показателей восстанавливается.

Содержание матричных РНК белок-кодирующих генов, длинных некодирующих РНК и микроРНК в контроле через 1 и 4 ч после воздействия рентгеновского излучения 0,1 Гр на лимфоциты человека

Content of matrix RNA of protein-coding genes, long non-coding RNA and microRNA in the control after 1 hour and 4 hours exposure of the human lymphocytes to X-ray at a dose of 0.1 Gy

Параметры Parameters	Содержание мРНК, Me (Q1; Q3) mRNA content, Me (Q1; Q3)			
	Через 1 ч In 1 h		Через 4 ч In 4 h	
	Контроль Control	0,1 Гр 0,1 Gy	Контроль Control	0,1 Гр 0,1 Gy
<i>RhoA</i>	1,00 (0,93–1,14)	0,57* (0,46–0,61)	1,02 (0,54–1,37)	1,07 (0,81–1,86)
<i>cdc42</i>	1,00 (0,81–1,23)	0,57* (0,46–0,66)	1,00 (0,59–1,39)	1,10 (0,78–2,37)
<i>PTEN</i>	1,00 (0,93–1,07)	1,07 (1,00–1,51)	1,05 (0,68–1,79)	0,90 (0,90–0,97)
<i>TP53</i>	1,00 (0,95–1,04)	1,62* (1,14–1,74)	1,01 (0,90–1,15)	1,04 (0,97–1,19)
<i>NF-κB (p65)</i>	1,00 (0,89–1,07)	1,07 (1,00–1,15)	1,00 (0,87–2,28)	1,07 (1,07–1,74)
<i>LAP1</i>	1,00 (0,84–1,15)	0,97 (0,90–1,37)	1,00 (0,93–1,20)	1,07 (1,0–1,15)
<i>IL-6</i>	1,00 (1,00–1,00)	0,71* (0,44–0,87)	1,00 (0,52–2,09)	0,87 (0,25–1,15)
<i>IRAK1</i>	1,00 (0,93–1,15)	1,00 (0,81–1,74)	1,01 (0,74–1,19)	0,76 (0,66–0,87)
ROR	1,00 (0,95–1,31)	1,52 (1,23–1,62)	1,02 (0,69–1,42)	0,81 (0,75–1,00)
MALAT1	1,00 (0,53–1,04)	1,41* (1,12–1,23)	1,00 (0,82–1,11)	0,84 (0,64–0,97)
GAS5	1,00 (0,71–1,07)	1,41* (1,23–1,62)	1,00 (0,52–1,37)	0,66 (0,47–0,81)
HOTAIR	1,00 (0,38–1,23)	2,29 (0,66–4,00)	1,10 (0,44–3,84)	1,00 (0,35–4,81)
NEAT1	1,00 (0,57–1,07)	0,81 (0,67–1,33)	1,06 (0,68–2,02)	1,70 (0,75–2,14)
miR-107	1,00 (0,95–1,04)	1,15 (0,76–1,32)	1,00 (0,3–2,64)	1,14 (0,25–8,57)
miR-181a	1,01 (0,71–1,33)	0,37* (0,35–0,57)	1,00 (0,56–1,95)	1,00 (0,81–1,23)
miR-27a	1,00 (0,71–1,07)	0,41 (0,27–1,04)	1,07 (0,68–1,46)	1,02 (0,56–1,43)

Примечание. Значения медианы в контрольной группе приняты за 1; аналогичные значения в экспериментальных группах показывают, во сколько раз уровень экспрессии гена выше или ниже относительно контроля; * – различия между интактным контролем и облучёнными клетками статистически значимы ($p < 0,05$).

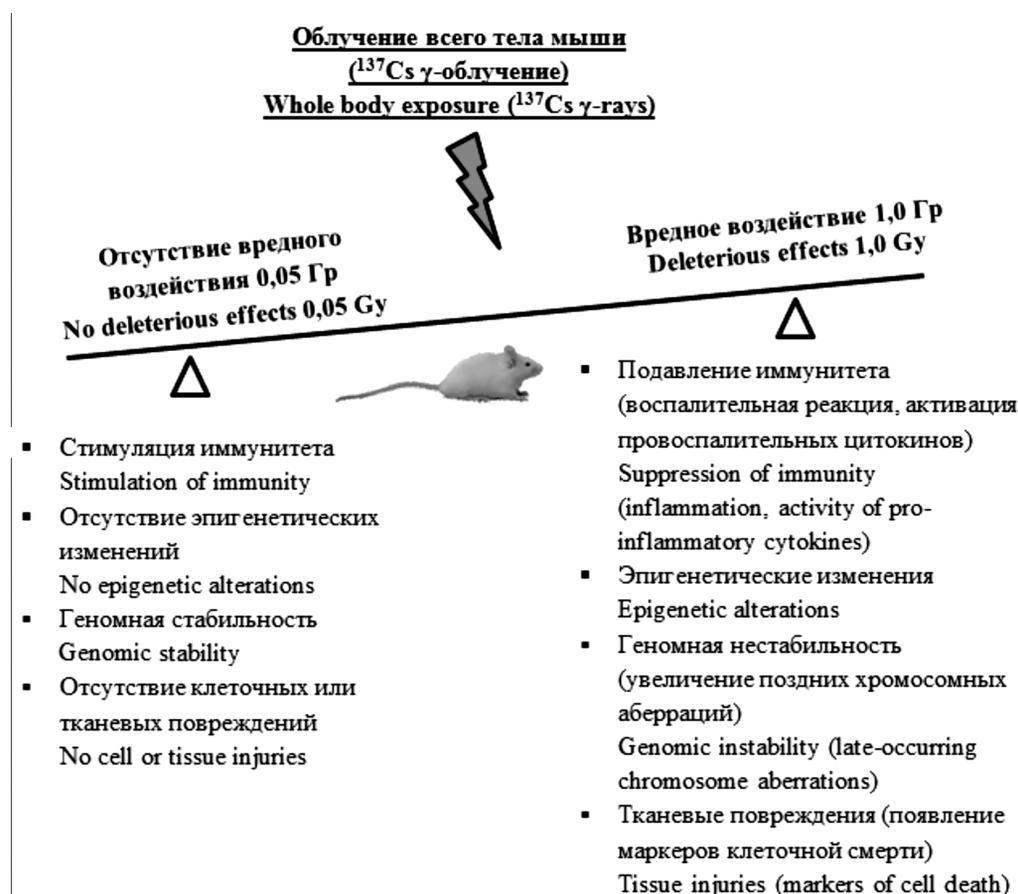
Note. The median values in the control group are taken as 1, and the similar values in the experimental groups show how many times the gene expression level is higher or lower relative to the control; *, the differences between intact control and irradiated cells are statistically significant ($p < 0.05$).

Приведённые данные демонстрируют, что уже через 1 ч после облучения в клетках создавалась определённая устойчивость, называемая адаптивным ответом (одно из проявлений радиационного гормезиса), который характеризовался резистентностью к действию ВДР. В работе В.Ф. Михайлова и соавт. опубликованы данные, где показано различие в экспрессии генов и некодирующих РНК [25].

Некоторые авторы делали акцент на микроРНК, используемые как биомаркёры прогноза заболевания или эффективности радиотерапии, влияющие на устойчивость либо чувствительность к облучению [26]. В других случаях основное внимание уделялось днРНК в качестве регуляторов генов при ответе на

воздействие ИИ [27]. Нами осуществлён комплексный структурированный анализ активности генов и их регуляторов – днРНК и микроРНК. Из полученных результатов следует, что имеет место разнонаправленный ответ со стороны этих генетических структур на действие радиации.

Таким образом, можно заключить, что совокупность литературных данных с учётом проведённых собственных исследований позволяет считать возможным использование действия МДР для лечения пациентов с COVID-19. Во-первых, облучение в дозе 0,05 Гр не даёт каких-либо отдалённых последствий, активируя иммунный ответ и другие защитные механизмы. Во-вторых, для потенциального терапев-



Различия в ответе на действие радиации в дозах 0,05 и 1 Гр на клетки мышей линии BALB/cJ (Jurkat) (адаптировано из [28]).
Differences in the response to the radiation effect at doses of 0.05 and 1 Gy on the cells of BALB/cJ (Jurkat) mice (adapted from [28]).

тического применения эффективным является облучение в дозе 0,05 Гр всего тела, а не отдельных органов, что связано с активацией различных биологических систем разных органов и тканей, неодинаковых по чувствительности к действию МДР и к ИИ в целом [21].

На рисунке из работы W. Jangiam и соавт. [28] показано значительное преимущество лучевого воздействия в дозе 0,05 Гр по сравнению 1 Гр на примере клеточной линии мышей BALB/cJ (Jurkat).

Авторы сообщают о стимуляции реакций иммунитета, в том числе активации противовоспалительных цитокинов, отсутствии эпигенетических изменений и нестабильности генома, а также повреждений клеток и тканей при облучении в дозе 0,05 Гр, тогда как в случае дозы 1 Гр наблюдаются перечисленные эффекты (ингибирование иммунологических реакций и действия провоспалительных цитокинов, геномная нестабильность, эпигенетические изменения и тканевые повреждения).

Необходимо отметить, что предобработка клеток МДР создают устойчивость не только к действию ВДР, но и к химическим мутагенам. Возможно, что состояние устойчивости формируется также по отношению к вирусным токсинам, которые разрушают клеточные или тканевые структуры.

Заключение

Одна из задач данной работы состоит в привлечении внимания специалистов к возможности использования МДР как одного из подходов для улучшения состояния больных с COVID-19. Значительный интерес к применению этого метода для лечения новой коронавирусной инфекции может стимулировать поиски эффективного использования терапевтического потенциала МДР либо в начале заболевания, либо в процессе манифестации его клинических проявлений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barsoumian H.B., Ramapriyan R., Younes A.I., Caetano M.S., Menon H., Comeaux N.I., et al. Low-dose radiation treatment enhances systemic antitumor immune responses by overcoming the inhibitory stroma. *J. Immunother. Cancer.* 2020; 8(2): e000537. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000537>
2. Михайлов В.Ф., Засухина Г.Д. Новый подход к стимуляции защитных систем организма малыми дозами радиации. *Ученые современной биологии.* 2020; 140(3): 244–52. <https://doi.org/10.31857/S0042132420030060>
3. Koosha F., Pourbagheri-Sigaroodi A., Bakhshandeh M., Bashash D. Low-dose radiotherapy (LD-RT) for COVID-19-induced pneumonia: a worth considering approach. *Int. J. Radiat. Biol.* 2021; 97(3): 302–12. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1864049>
4. Koukourakis M.I. Low-dose radiotherapy for late-stage COVID-19 pneumonia? *Dose Response.* 2020; 18(3): 1559325820951357. <https://doi.org/10.1177/1559325820951357>

5. Schofield P.N., Kondratowicz M. Evolving paradigms for the biological response to low dose ionizing radiation; the role of epigenetics. *Int. J. Radiat. Biol.* 2018; 94(8): 769–81. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1388548>
6. Guo T., Zou L., Ni J., Chu X., Zhu Z. Radiotherapy for unresectable locally advanced non-small cell lung cancer: a narrative review of the current landscape and future prospects in the era of immunotherapy. *Transl. Lung Cancer Res.* 2020; 9(5): 2097–112. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-511>
7. Vaiserman A., Cuttler J.M., Socol Y. Low-dose ionizing radiation as a hormetin: experimental observations and therapeutic perspective for age-related disorders. *Biogerontology.* 2021; 22(2): 145–64. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09908-5>
8. Ильин Л.А., Коренков И.П., Наркевич Б.Я. *Радиационная гигиена*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017.
9. Musser J.H., Edsall D.L. A study of metabolism in leukemia, under the influence of the x-ray. *Tr. A. Am. Physicians.* 1905; 20: 294–323.
10. Calabrese E.J., Dhawan G. How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: could it be useful today? *Yale J. Biol. Med.* 2013; 86(4): 555–70.
11. Kirkby C., Mackenzie M. Low dose lung radiation therapy for pneumonia: an examination of historical dose distributions. *Phys. Med. Biol.* 2020; 65(15): 155019. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab9e55>
12. Bevelacqua J.J., Mortazavi S.M.J. Alzheimer's disease: possible mechanisms behind neurohormesis induced by exposure to low doses of ionizing radiation. *J. Biomed. Phys. Eng.* 2018; 8(2): 153–6.
13. Wen C., Su S., Tang Y., Li R., Xu H., Chen H., et al. IL-2 and IL-2R gene polymorphisms and immune function in people residing in areas with high background radiation, Yangjiang, China. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020; 96(11): 1466–72. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1820607>
14. Algara M., Arenas M., Marin J., Vallverdu I., Fernandez-Letón P., Villar J., et al. Low dose anti-inflammatory radiotherapy for the treatment of pneumonia by covid-19: A proposal for a multi-centric prospective trial. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 2020; 24: 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2020.06.005>
15. Pandey B.N. Low-dose radiation therapy for coronavirus disease-2019 pneumonia: Is it time to look beyond apprehensions? *Ann. Thorac. Med.* 2020; 15(4): 199–207. https://doi.org/10.4103/atm.ATM_433_20
16. Trinitat G.H., Romero-Expósito M., Sánchez-Nieto B. Low dose radiation therapy for COVID-19: Effective dose and estimation of cancer risk. *Radiother. Oncol.* 2020; 153: 289–95. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.09.051>
17. Hess C.B., Buchwald Z.S., Stokes W., Nasti T.H., Switchenko J.M., Weinberg B.D., et al. Low-dose whole-lung radiation for COVID-19 pneumonia: Planned day 7 interim analysis of a registered clinical trial. *Cancer.* 2020; 126(23): 5109–13. <https://doi.org/10.1002/cncr.33130>
18. Mezhir J.J., Advani S.J., Smith K.D., Darga T.E., Poon A.P., Schmidt H., et al. Ionizing radiation activates late herpes simplex virus 1 promoters via the p38 pathway in tumors treated with oncolytic viruses. *Cancer Res.* 2005; 65(20): 9479–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1927>
19. Dhawan G., Kapoor R., Dhawan R., Singh R., Monga B., Giordano J., et al. Low dose radiation therapy as a potential life saving treatment for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Radiother. Oncol.* 2020; 147: 212–6. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.05.002>
20. Gao H., Zhuo D., Xinkou G., Juancong D., Yuyu Z., Wei W., et al. Effects of various radiation doses on induced T-helper cell differentiation and related cytokine secretion. *J. Radiat. Res.* 2018; 59(4): 395–403. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry011>
21. Shin E., Lee S., Kang H., Kim J., Kim K., Youn H., et al. Organ-specific effects of low dose radiation exposure: a comprehensive review. *Front. Genet.* 2020; 11: 566244. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.566244>
22. Shimura N., Kojima S. The lowest radiation dose having molecular changes in the living body. *Dose Response.* 2018; 16(2): 1559325818777326. <https://doi.org/10.1177/1559325818777326>
23. Yang G., Yu D., Li W., Zhao Y., Wen X., Liang X., et al. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget.* 2016; 7(44): 71856–72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12379>
24. Шульгина Л.В., Михайлов В.Ф., Засухина Г.Д. Длинные некодирующие РНК в радиоответе. *Радиационная биология. Радиэкология.* 2020; 60(3): 239–48. <https://doi.org/10.31857/S0869803120030133>
25. Михайлов В.Ф., Шульгина Л.В., Раева Н.Ф., Васильева И.М., Салеева Д.В., Незнанова М.В., и др. Влияние малых доз ионизирующей радиации на экспрессию генов и некодирующих РНК в нормальных и злокачественных клетках человека. *Цитология.* 2019; 61(6): 427–38. <https://doi.org/10.1134/S0041377119060051>
26. Chen Y., Cui J., Gong Y., Wei S., Wei Y., Yi L. MicroRNA: a novel implication for damage and protection against ionizing radiation. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 2021; 28(13): 15584–96. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12509-5>
27. Aryankalayil M.J., Chopra S., Levin J., Eke I., Makinde A., Das S., et al. Radiation-induced long noncoding RNAs in a mouse model after whole-body irradiation. *Radiat. Res.* 2018; 189(3): 251–63. <https://doi.org/10.1667/RR14891.1>
28. Jangiam W., Udomtanakunchai C., Reungpatthanaphong P., Tungjai M., Honikel L., Gordon C., et al. Late effects of low-dose radiation on the bone marrow, lung, and testis collected from the same exposed BALB/cJ mice. *Dose Response.* 2018; 16(4): 1559325818815031. <https://doi.org/10.1177/1559325818815031>

REFERENCES

1. Barsoumian H.B., Ramapriyan R., Younes A.I., Caetano M.S., Me-non H., Comeaux N.I. et al. Low-dose radiation treatment enhances systemic antitumor immune responses by overcoming the inhibitory stroma. *J Immunother Cancer.* 2020; 8(2): e000537. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000537>
2. Mikhailov V.F., Zasukhina G.D. A new approach the stimulation the body's defense systems with low radiation doses [Novyy podkhod k stimulyatsii zashchitnykh sistem organizma malymi dozami radiatsii]. *Uspekhi sovremennoy biologii.* 2020; 140(3): 244–52. <https://doi.org/10.31857/S0042132420030060> (in Russian)
3. Koosha F., Pourbagheri-Sigaroodi A., Bakhshandeh M., Bashash D. Low-dose radiotherapy (LD-RT) for COVID-19-induced pneumopathy: a worth considering approach. *Int. J. Radiat. Biol.* 2021; 97(3): 302–12. <https://doi.org/10.1080/09553002.2021.1864049>
4. Koukourakis M.I. Low-dose radiotherapy for late-stage COVID-19 pneumonia? *Dose Response.* 2020; 18(3): 1559325820951357. <https://doi.org/10.1177/1559325820951357>
5. Schofield P.N., Kondratowicz M. Evolving paradigms for the biological response to low dose ionizing radiation; the role of epigenetics. *Int. J. Radiat. Biol.* 2018; 94(8): 769–81. <https://doi.org/10.1080/09553002.2017.1388548>
6. Guo T., Zou L., Ni J., Chu X., Zhu Z. Radiotherapy for unresectable locally advanced non-small cell lung cancer: a narrative review of the current landscape and future prospects in the era of immunotherapy. *Transl. Lung Cancer Res.* 2020; 9(5): 2097–112. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-511>
7. Vaiserman A., Cuttler J.M., Socol Y. Low-dose ionizing radiation as a hormetin: experimental observations and therapeutic perspective for age-related disorders. *Biogerontology.* 2021; 22(2): 145–64. <https://doi.org/10.1007/s10522-020-09908-5>
8. Il'in L.A., Korenkov I.P., Narkevich B.Ya. *Radiation Hygiene [Radiatsionnaya gigiena]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (in Russian)
9. Musser J.H., Edsall D.L. A study of metabolism in leukemia, under the influence of the x-ray. *Tr. A. Am. Physicians.* 1905; 20: 294–323.
10. Calabrese E.J., Dhawan G. How radiotherapy was historically used to treat pneumonia: could it be useful today? *Yale J. Biol. Med.* 2013; 86(4): 555–70.
11. Kirkby C., Mackenzie M. Low dose lung radiation therapy for pneumonia: an examination of historical dose distributions. *Phys. Med. Biol.* 2020; 65(15): 155019. <https://doi.org/10.1088/1361-6560/ab9e55>
12. Bevelacqua J.J., Mortazavi S.M.J. Alzheimer's disease: possible mechanisms behind neurohormesis induced by exposure to low doses of ionizing radiation. *J. Biomed. Phys. Eng.* 2018; 8(2): 153–6.
13. Wen C., Su S., Tang Y., Li R., Xu H., Chen H., et al. IL-2 and IL-2R gene polymorphisms and immune function in people residing in areas with high background radiation, Yangjiang, China. *Int. J. Radiat. Biol.* 2020; 96(11): 1466–72. <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1820607>

14. Algara M., Arenas M., Marin J., Vallverdu I., Fernandez-Letón P., Villar J., et al. Low dose anti-inflammatory radiotherapy for the treatment of pneumonia by covid-19: A proposal for a multi-centric prospective trial. *Clin. Transl. Radiat. Oncol.* 2020; 24: 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.ctro.2020.06.005>
15. Pandey B.N. Low-dose radiation therapy for coronavirus disease-2019 pneumonia: Is it time to look beyond apprehensions? *Ann. Thorac. Med.* 2020; 15(4): 199–207. https://doi.org/10.4103/atm.ATM_433_20
16. Trinitat G.H., Romero-Expósito M., Sánchez-Nieto B. Low dose radiation therapy for COVID-19: Effective dose and estimation of cancer risk. *Radiother. Oncol.* 2020; 153: 289–95. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.09.051>
17. Hess C.B., Buchwald Z.S., Stokes W., Nasti T.H., Switchenko J.M., Weinberg B.D., et al. Low-dose whole-lung radiation for COVID-19 pneumonia: Planned day 7 interim analysis of a registered clinical trial. *Cancer.* 2020; 126(23): 5109–13. <https://doi.org/10.1002/cncr.33130>
18. Mezhir J.J., Advani S.J., Smith K.D., Darga T.E., Poon A.P., Schmidt H., et al. Ionizing radiation activates late herpes simplex virus 1 promoters via the p38 pathway in tumors treated with oncolytic viruses. *Cancer Res.* 2005; 65(20): 9479–84. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1927>
19. Dhawan G., Kapoor R., Dhawan R., Singh R., Monga B., Giordano J., et al. Low dose radiation therapy as a potential life saving treatment for COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Radiother. Oncol.* 2020; 147: 212–6. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2020.05.002>
20. Gao H., Zhuo D., Xinkou G., Juancong D., Yuyu Z., Wei W., et al. Effects of various radiation doses on induced T-helper cell differentiation and related cytokine secretion. *J. Radiat. Res.* 2018; 59(4): 395–403. <https://doi.org/10.1093/jrr/rry011>
21. Shin E., Lee S., Kang H., Kim J., Kim K., Youn H., et al. Organ-specific effects of low dose radiation exposure: a comprehensive review. *Front. Genet.* 2020; 11: 566244. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.566244>
22. Shimura N., Kojima S. The lowest radiation dose having molecular changes in the living body. *Dose Response.* 2018; 16(2): 1559325818777326. <https://doi.org/10.1177/1559325818777326>
23. Yang G., Yu D., Li W., Zhao Y., Wen X., Liang X., et al. Distinct biological effects of low-dose radiation on normal and cancerous human lung cells are mediated by ATM signaling. *Oncotarget.* 2016; 7(44): 71856–72. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12379>
24. Shulenina L.V., Mikhailov V.F., Zasukhina G.D. The long non-coding RNA in radiation response [Dlinnye nekodiruyushchie RNK v radiootvete]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya.* 2020; 60(3): 239–48. <https://doi.org/10.31857/S0869803120030133> (in Russian)
25. Mikhailov V.F., Shulenina L.V., Raeva N.F., Vasil'eva I.M., Saleeva D.V., Neznanova M.V., et al. The effect of low doses of ionizing radiation on the expression of genes and non-coding RNA in normal and malignant human cells [Vliyaniye malykh doz ioniziruyushchey radiatsii na ekspressiyu genov i nekodiruyushchikh RNK v normal'nykh i zlokachestvennykh kletkakh cheloveka]. *Tsitologiya.* 2019; 61(6): 427–38. <https://doi.org/10.1134/S0041377119060051> (in Russian)
26. Chen Y., Cui J., Gong Y., Wei S., Wei Y., Yi L. MicroRNA: a novel implication for damage and protection against ionizing radiation. *Environ. Sci. Poll. Res. Int.* 2021; 28(13): 15584–96. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12509-5>
27. Aryankalayil M.J., Chopra S., Levin J., Eke I., Makinde A., Das S., et al. Radiation-induced long non-coding RNAs in a mouse model after whole-body irradiation. *Radiat. Res.* 2018; 189(3): 251–63. <https://doi.org/10.1667/RR14891.1>
28. Jangiam W., Udomtanakunchai C., Reungpatthanaphong P., Tungjai M., Honikel L., Gordon C., et al. Late effects of low-dose radiation on the bone marrow, lung, and testis collected from the same exposed BALB/cJ mice. *Dose Response.* 2018; 16(4): 1559325818815031. <https://doi.org/10.1177/1559325818815031>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

© БОТВИНКИН А.Д., 2021



Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы

Ботвинкин А.Д.

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

Отношение вирусологов к рукокрылым (*Chiroptera*) изменилось в конце XX в. на фоне роста популярности концепции новых и возвращающихся (emerging) инфекций. После начала пандемии COVID-19 количество публикаций о вирусах рукокрылых резко возросло.

В обзоре рассмотрены история изучения, биологическое разнообразие этих животных и связанных с ними вирусов, медицинское и ветеринарное значение некоторых таксонов (*Lyssavirus*, *Henipavirus*, *Marburgvirus*, *Ebolavirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus*), а также проблемы охраны рукокрылых. Поиск информации проведён в электронных базах данных преимущественно за период 2000–2021 гг. Включены публикации на русском языке, недостаточно представленные в англоязычных обзорах.

Цель представляемой работы состоит в обосновании важности междисциплинарного подхода к изучению вирусных инфекций рукокрылых в условиях возросшего интереса к данной проблеме. Обзор адресован прежде всего исследователям, ранее непосредственно не занимавшимся этой областью научных знаний. С начала текущего столетия число известных видов вирусов, ассоциированных с рукокрылыми, возросло на порядок (>200). Первые ранговые места по числу находок занимают семейства *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, а наиболее высокое разнообразие вирусов установлено для рукокрылых семейств *Vespertilionidae*, *Pteropodidae*, *Molossidae*. Междисциплинарное взаимодействие положительно влияет на результативность, биологическую безопасность и практическую значимость проводимых исследований. Лучшие результаты достигнуты командами, в состав которых входили представители разных специальностей с хорошей подготовкой по смежным вопросам. Во многих работах подчёркивается необходимость соблюдения баланса интересов в сферах здравоохранения и охраны природы.

Анализ научных публикаций свидетельствует об изменении подходов к исследованиям в этой области: от сбора фактов в рамках отдельных специальностей к комплексной оценке новых знаний с экологических, эволюционных и социально-экономических позиций. Актуальность связанных с рукокрылыми вирусных инфекций определяет необходимость коррекции и межведомственной координации научной работы и эпидемиологического надзора за зоонозами в Российской Федерации.

Ключевые слова: вирусы; рукокрылые; летучие мыши; междисциплинарный подход

Для цитирования: Ботвинкин А.Д. Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 259-268. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

Для корреспонденции: Ботвинкин Александр Дмитриевич, д-р мед. наук, заведующий кафедрой эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, 664003, Иркутск, Россия. E-mail: botvinkin_ismu@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) № 20-115-50063/20.

Благодарности. Автор выражает благодарность И.В. Кузьмину (биомедицинская и консалтинговая компания Aravan LLC, Lilburn; CDC, Atlanta, GA, USA) и С.В. Крускову (ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, научно-исследовательский зоологический музей) за ценные советы и замечания при подготовке текста статьи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.06.2021
Принята к печати 01.08.2021
Опубликована 31.08.2021

REVIEW ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

Viruses and bats: interdisciplinary issues

Aleksandr D. Botvinkin

FSBEI HE «Irkutsk State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 664003, Irkutsk, Russia

The virologists' attention to bats (*Chiroptera*) changed in the late 20th century as the concept of emerging infections grew in popularity. Since the beginning of the COVID-19 pandemic, the number of publications on bat viruses has increased profoundly.

History of the problem; biodiversity of *Chiroptera* and related viruses; medical and veterinary significance of some viral genera and subgenera (*Lyssavirus*, *Henipavirus*, *Marburgvirus*, *Ebolavirus*, *Sarbecovirus*, *Merbecovirus*), as well as problems of bat protection, are addressed in a concise form. Literature search was carried out in electronic databases, mainly for the period of 2000–2021. Publications in Russian that are poorly represented in English-language reviews are also included. The purpose of the review is to substantiate the importance of an interdisciplinary approach in the context of increased interest in the study of viral infections in bats. This review was written for researchers who have not previously dealt with this problem.

Since the beginning of this century, the number of known virus species associated with bats has increased by an order of magnitude (>200). The families *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae* are in the first ranks according to the number of findings, and the highest diversity of viruses has been established for the families *Vespertilionidae*, *Pteropodidae*, *Molossidae*. Interdisciplinary cooperation positively influences the efficiency, biological safety and practical significance of the ongoing research. The best results were achieved by multidisciplinary teams with good cross-training in several specialties. Many papers emphasize the need to balance health and conservation interests.

The analysis of scientific publications indicates a change in research approaches in this area: from collecting individual facts within the framework of narrow specialties to a comprehensive assessment of new knowledge from ecological, evolutionary and socio-economic positions. Results of the research emphasize the need to maintain complex approaches addressing public health needs and environmental protection. The importance of bat-borne viral infections determines the necessity for correction and interdepartmental coordination of scientific research and surveillance of wildlife zoonoses in the Russian Federation.

Key words: *viruses; chiropterans; bats; interdisciplinary approach*

For citation: Botvinkin A.D. Viruses and bats: interdisciplinary issues. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 259-268. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

For correspondence: Aleksandr D. Botvinkin, D.Sci. (Med.), Head of Epidemiology Department, FSBEI HE «Irkutsk State Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 664003, Irkutsk, Russia. E-mail: botvinkin_ismu@mail.ru

Information about the author:

Botvinkin A.D., <http://orcid.org/0000-0002-1324-7374>

Funding. The work was carried out with funding from the Russian Foundation for Basic Researches (RFBR), project No. 20-115-50063/20.

Acknowledgement. The author gratefully acknowledges to Ivan V. Kuzmin (biomedical and consulting company Aravan LLC, Lilburn; CDC, Atlanta, GA, USA), and Sergey V. Krusko (FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University», Biology Department, Research Zoological Museum) for valuable advice and comments in preparing the text of the article.

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

Received 03 June 2021
Accepted 01 August 2021
Published 31 August 2021

Актуальность проблемы

Новые знания о вирусах, ассоциированных с рукокрылыми (*Chiroptera*), существенно изменили парадигму резервуара зоонозных инфекций. В первой половине прошлого века общеизвестным фактом было только участие летучих мышей-вампиров (*Phyllostomidae*, *Desmodus rotundus*) в распространении бешенства в тропиках Американского континента [1]. После публикации основных положений теории природной очаговости болезней [2] в разных районах мира началось изучение трансмиссивных ин-

фекций, и рукокрылые исследовались с помощью вирусологических методов параллельно с другими теплокровными [3, 4]. В это же время активно изучалось бешенство летучих мышей (ЛМ) в Соединённых Штатах Америки (США) и Канаде. В результате стали накапливаться данные о выделении от этих животных вирусов различных систематических групп, и в 1974 г. Эдвард Салкин (E. Sulkin) и Рэй Аллен (R. Allen) опубликовали первую сводку по вирусам рукокрылых [5]. В большинстве случаев новые находки расценивались как экзотические, не имеющие

практического значения. Отношение вирусологов к ЛМ изменилось в конце XX в. на фоне становления концепции возникающих (emerging) инфекций [6] и роста её популярности [7–9].

Пандемия COVID-19 резко обострила проблему. Глобальное распространение нового заболевания и сходство таких агентов, как SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus), MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome-related coronavirus) и SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) с коронавирусами ЛМ пробудило исследовательский интерес у специалистов, ранее не занимавшихся вирусными болезнями рукокрылых. В итоге резко возросло количество публикаций разного качества по этой тематике. К настоящему времени вирусам, связанным с этими животными, посвящены руководства, монографии [3, 8–10], >3 тыс. оригинальных и обзорных статей, включая серию недавних русскоязычных обзоров [4, 11–18].

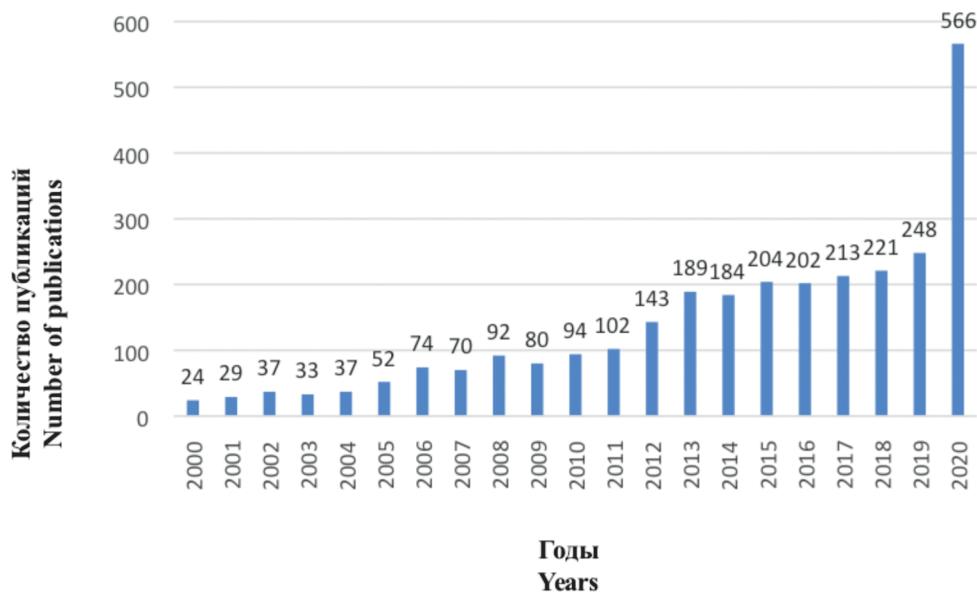
Цель настоящей работы – обоснование необходимости междисциплинарного подхода к изучению вирусных инфекций рукокрылых в условиях возросшего интереса к проблеме. Потребность в координации исследований определяется спецификой объектов и методов полевой работы с представителями данной таксономической группы, что необходимо для достижения консенсуса в случае противоречий между интересами вирусологов и специалистов в области охраны природы. Однако это не менее важно и с точки зрения результативности, биобезопасности и практической значимости проводимых работ. Вследствие ограниченности знаний исследователей о рукокрылых неизбежно возникают ошибки в названиях видов и таксонов различных рангов, а также в оценках эпидемиологического значения этих животных [19, 20].

Опубликованные в Российской Федерации данные по вирусам рукокрылых немногочисленны, в основном это обзорные публикации. В настоящее время ожидаются рост числа новых проектов в рассматриваемом направлении и приток молодых научных кадров, знакомых лишь с одной стороной проблемы. Данный обзор адресован прежде всего этой категории исследователей.

В методологическом отношении проведён поиск информации в базах данных Web of Science, Scopus, PubMed, Google Scholar, eLIBRARY по ключевым словам: «вирусы и летучие мыши («viruses and bats»), «возникающие болезни и летучие мыши» («emerging diseases and bats»), «биология летучих мышей» («bat biology»), охрана летучих мышей («bat conservation») за 2000–2021 гг. В дальнейшем поиск продолжен как по спискам цитируемых источников, так и другими традиционными способами с отбором публикаций, подтверждающих значимость междисциплинарного подхода. В обзор включены отечественные работы, недостаточно представленные в англоязычных изданиях.

Вирусологические исследования

С начала XXI в. количество работ по вирусам рукокрылых быстро увеличивалось. Выделяются 2 временных отрезка, когда число публикаций за год возрастало более чем в 2 раза: 2004–2007 гг. и 2020–2021 гг. (рисунк). В эти периоды отчётливо прослеживается связь с эпидемиями коронавирусных инфекций, вызываемых MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, и попытками установить их происхождение. В начале текущего столетия в сводке С. Calisher и соавт. содержались сведения всего о 66 видах вирусов, выделенных от 74 видов рукокрылых [5]; при сравнении же с более



Количество публикаций по вирусам рукокрылых на протяжении 2000–2020 гг. (по данным PubMed; ключевые слова «viruses and bats»; дата доступа 26.07.2021).

Number of publications on *Chiroptera* viruses during 2000–2020 (according to PubMed; keywords «viruses and bats»; accessed 07/26/2021).

поздними публикациями отмечается бурный прогресс [7, 8, 12]. В недавно вышедшей в свет монографии обозначено свыше 200 видов вирусов 27 семейств [10]. Опубликован каталог вирусов, обнаруженных у рукокрылых к 2020 г., где зафиксировано 260 видов – представителей 19 отрядов, 28 семейств, 61 рода, не считая большого количества неклассифицированных вирусных агентов [22]. Очевидно, что точный подсчёт в подобных случаях невозможен из-за быстрого обновления массива данных и применения разных подходов к оценке биоразнообразия. Далеко не всегда вирусы удавалось выделить и точно идентифицировать; некоторые находки представлены лишь фрагментами генома [3, 10, 21]. Виром рукокрылых изучался с помощью метагеномного секвенирования с неоднозначной оценкой результатов [23]. Тем не менее удалось составить общее представление о связи тех или иных систематических групп вирусов и рукокрылых. Первые ранговые места по числу находок у этих животных занимают вирусные семейства *Rhabdoviridae*, *Coronaviridae*, *Paramyxoviridae*, а наибольшее разнообразие вирусов установлено для семейств *Vespertilionidae*, *Pteropodidae*, *Molossidae* [21]. Современная систематика вирусов представлена на сайте Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) [24].

Биология рукокрылых

Рукокрылые позднее других теплокровных, например грызунов (*Rodentia*) и птиц (*Aves*), стали объектом пристального внимания вирусологов. Это один из наиболее многочисленных отрядов класса млекопитающих (*Mammalia*), который включает в себя более 20% всех известных на планете видов этого таксона. По числу видов и географии распространения рукокрылые уступают лишь грызунам. Число описанных видов рукокрылых постоянно увеличивается и к настоящему времени превышает 1,4 тыс. [25, 26]. На территории РФ отмечены 57 видов 4 семейств: *Vespertilionidae*, *Rhinolophidae*, *Miniopteridae*, *Molossidae*. Представители первого из них наиболее многочисленны и широко распространены в природных и антропогенных ландшафтах (за исключением Крайнего Севера и высокогорий); ЛМ остальных семейств встречаются только вблизи южных границ России [27].

Систематика и таксономия рукокрылых в последние десятилетия претерпели значительные изменения, отчасти в связи с широким использованием молекулярно-генетических методов. В недалёком прошлом этих животных подразделяли на 2 больших подотряда – *Megachiroptera* (крыланы) и *Microchiroptera* (летучие мыши). В настоящее время выделяют подотряд *Yinpterochiroptera* (или *Pteropodiformes*), в который включены хорошо обособленные группы: *Pteropodoidea* (крылановые) и *Rhinolophoidea* (подковоносоподобные). Остальные семейства относят к подотряду *Yangochiroptera* [3, 26]. Кроме этого, изменились трактовки многих видов ЛМ и номенклатура

отечественной фауны. Важно отметить, что прежние видовые и надвидовые (для таксонов разного ранга) наименования рукокрылых продолжают встречаться в работах, посвящённых ассоциированным с ними вирусам, что может приводить к ошибочной интерпретации результатов. В связи с этим следует придерживаться названий, которые приводятся в сводках, публикуемых Международным союзом по охране природы (International Union for Conservation of Nature, IUCN) после 2015 г. [28]. Актуальные научные и тривиальные названия ЛМ, а также библиография по рукокрылым фауны России представлены на веб-сайте [27].

Лейтмотивом многих публикаций выступает определение особенностей ЛМ в качестве хозяев вирусов. Действительно уникальной для млекопитающих является способность этих животных к активному (машущему) полёту. С ней связывают особенности метаболизма, функционирования иммунной системы, а также патогенеза и эпидемиологии вирусных инфекций [3, 8–10, 29, 30]. С этой же точки зрения заслуживают внимания миллионные скопления некоторых видов рукокрылых в ограниченном пространстве, теснота контактов особей разного возраста в выводковых колониях, равно как и длительное зимнее оцепенение, относительно высокая продолжительность жизни и низкие темпы размножения. Спецификой отличаются и методы полевой работы с рукокрылыми, при этом особенно следует отметить трудности с оценкой их численности [3, 25, 26].

Медицина и ветеринария

Рукокрылые служат резервуаром вирусов, представляющих высокую эпидемическую опасность, что служит основным стимулом для расширения исследований. Летальность при бешенстве и других лиссавирусных энцефалитах составляет практически 100% [3, 31], а частота фатального исхода инфекций, вызванных филловирусами (*Filoviridae*), достигает 50–90% [8, 11, 12]. Вспышки заболеваний, вызванных вирусами Хендра (*Hendra henipavirus*) и Нипа (*Nipah henipavirus*), сопровождаются гибелью сельскохозяйственных животных и поражением людей с высокой летальностью [9, 13, 32]. Этот показатель при коронавирусных инфекциях, вызываемых MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, не так высок, но из-за пандемического распространения COVID-19 к середине 2021 г. от неё умерли >4 млн человек [33].

Медицинское и ветеринарное значение рукокрылых неоднозначно: они могут служить непосредственным источником sporadicческих заболеваний человека и домашних животных, но иногда от них берут начало вспышки и эпидемии, в дальнейшем распространении которых рукокрылые уже не участвуют. Как правило, инфекционные болезни людей после контактов с этими животными регистрируются редко [8, 10]. Для большинства обнаруженных у них вирусов роль в патологии человека и животных-компаньонов не установлена. Многие из этих агентов близкородственны, но не идентичны возбудителям вирусных

инфекций, циркулирующих в человеческой популяции [3, 7, 8, 10]. География эпидемиологических проявлений своеобразна, однако в целом проблема более актуальна для стран тропического и субтропического климатических поясов, где частота контактов населения с рукокрылыми значительно выше. Рассмотрим это на примере 4 таксонов вирусов (*Lyssavirus*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Coronaviridae*), представители которых имеют наибольшее эпидемиологическое значение.

Лиссавирусы (*Rhabdoviridae*, *Lyssavirus*). С этой группы в первой половине прошлого века началось изучение вирусов рукокрылых [1, 3, 5]. Наиболее известный представитель рода – вирус бешенства (*Rabies lyssavirus*) распространён среди ЛМ только на Американском континенте, где практически ежегодно регистрируются вспышки паралитического бешенства среди скота после укусов летучими мышами-вампирами и спорадические заболевания человека после контактов не только с этими животными, но и с насекомоядными ЛМ. Идентифицировано несколько хорошо различимых генетических вариантов вируса бешенства, ассоциированных с разными видами рукокрылых в Северной и Южной Америке, но другие виды лиссавирусов в Новом Свете не найдены [31, 34]. На других континентах – как в умеренных широтах, так и в тропиках – к настоящему времени известно 17 видов лиссавирусов, но нет достоверных данных о выделении вируса бешенства. Эта особенность географического распространения представителей данного таксона пока не получила удовлетворительного объяснения [34]. Первые находки «вирусов группы бешенства» в Африке в середине прошлого столетия сначала обозначались как «rabies-like» (подобные вирусам бешенства) и «rabies-related» (связанные с вирусами бешенства). Заболевания людей описаны не для всех из них и регистрируются крайне редко [3, 10, 31]. Например, в Евразии (в т.ч. в России) описано всего 8 подобных случаев, при этом 2 из заболевших занимались изучением ЛМ [35]. В Украине, России и Китайской Народной Республике (КНР) сообщалось о находках вируса бешенства у ЛМ, но они либо не подтвердились при генотипировании [36], либо основывались на обнаружении коротких фрагментов генома [37, 38]. Варианты рассматриваемого вируса, адаптированные к насекомоядным ЛМ в Америке, как и лиссавирусы рукокрылых Старого Света, периодически выделяются от собак (*Canis lupus familiaris*), кошек (*Felis catus*), сельскохозяйственных и диких животных без дальнейшего распространения инфекции среди них [54]. Тем не менее полностью исключить возможность преодоления межвидового барьера невозможно. Имеются веские основания считать, что лиссавирусы рукокрылых послужили предковыми формами для вируса бешенства, многочисленные варианты которого сегодня распространены среди хищных млекопитающих (*Carnivora*) всего мира, ежегодно служат причиной десятков тысяч летальных случаев заболевания у людей и наносят огромный ущерб животноводству [3, 7, 31].

Парамиксовирусы (*Paramyxoviridae*). Наиболее известны вирусы Хендра, Нипах и Менангле (*Menangle rubulavirus*), впервые выделенные во время вспышек среди лошадей (*Equus*) и свиней (*Sus*), которые сопровождались заболеваниями людей. Последние заражались при уходе за животными; описаны также случаи передачи вируса от человека к человеку [3, 7–9, 13]. Указанные вирусы и антитела к ним чаще всего обнаруживали у крыланов разных видов в Австралии и Азии [32]. Список известных парамиксовирусов рукокрылых постоянно пополняется, и параллельно расширяется география их находок [10, 21, 22]. Вспышки, обусловленные вирусом Нипах, практически ежегодно выявляются в Индии, Бангладеш, Малайзии, Сингапуре, нанося значительный экономический ущерб [39, 40]. Продолжают регистрироваться эпизоды заболеваний хендравиральной этиологии в Австралии [41]. На основании генетического сходства парамиксовирусов рукокрылых с вирусами кори, чумы плотоядных и другими патогенами человека и животных-компаньонов высказывались предположения об эволюционной связи этих агентов [32, 39].

Филовирусы (*Filoviridae*). С каждым годом увеличивается количество фактов, подтверждающих участие рукокрылых в резервации вирусов этого семейства. Представители 2 родов – *Marburgvirus* и *Ebolavirus* считаются возбудителями наиболее опасных для человека инфекций [5, 7, 11, 12, 18] и постоянно находятся в фокусе внимания специалистов по биобезопасности [15]. Вирус Марбург (*Marburg marburgvirus*) неоднократно выделяли от крыланов в Африке [11, 12, 42]. Имеются трудности с выделением эболавирусов от рукокрылых, но вирусная РНК обнаружена в биоматериале от нескольких видов крыланов и других представителей данного таксона в Африке и Азии. Описаны многочисленные серологические подтверждения ассоциации марбург- и эболавирусов с этими животными [14, 15, 42]. Современными зоогеографическими исследованиями установлено совпадение ареалов крыланов с территориями Западной и Центральной Африки, где регистрируются эпизоды заболевания, вызванные эболавирусом Заир (*Zair ebolavirus*) [43]. Именно при изучении рукокрылых получена большая часть новых сведений о разнообразии и географическом распространении филовирусов за пределами Африканского континента [14, 18]. Недавно новый представитель семейства – вирус Лловиу (*Lloviu cuevavirus*) обнаружен у ЛМ на территории Европы [44]. В циркуляцию филовирусов систематически вовлекаются приматы (*Primates*) и другие дикие животные, контакты с которыми также могут быть причиной заражения человека [7, 12, 15]. В дальнейшем из-за высокой контагиозности вирусов уже без участия рукокрылых развиваются вспышки и эпидемии с вовлечением десятков, а иногда тысяч людей [11, 12, 15]. Ветеринарное значение филовирусов подтверждается также выделением эболавируса Рестон (*Reston ebolavirus*, RESTV) от свиней [9, 13].

Коронавирусы (Coronaviridae). Переломным моментом в изучении коронавирусов рукокрылых стало сообщение о находке в органах китайского подковоноса (*Rhinolophus sinicus*) на юге КНР коронавируса, генетически наиболее близкого к вирусу тяжёлого острого респираторного синдрома (severe acute respiratory syndrome), – SARS-CoV [45]. Это было результатом работы мультидисциплинарной команды, организованной Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для поиска резервуара агента, вызвавшего эпидемию SARS в 2002–2003 гг. После 2005 г. в ходе исследований, развёрнутых в разных районах мира, новые данные по этой проблеме стремительно накапливались. Были установлены значительное биоразнообразие, широкий круг хозяев и глобальный характер распространения вирусов этого семейства [10, 46].

С рукокрылыми связаны коронавирусы 2 родов – *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus*, в состав которых входят возбудители, способные вызывать давно известные респираторные инфекции у человека [16, 17]. Вместе с вирусами, выделенными от рукокрылых, SARS-CoV и SARS-CoV-2 объединены в подрод *Sarbecovirus*. Из них наиболее близки в генетическом отношении (но не идентичны) обоим указанным патогенам вирусы, выделенные от различных видов подковоносов (*Rhinolophidae*), широко распространённых в Азии, а также в Европе и Африке [16, 17, 45]. Возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome) – MERS-CoV отнесён к подроду *Merbecovirus*, в состав которого включены коронавирусы, выделенные от нескольких видов широко распространённых ЛМ 2 семейств: *Vespertilionidae* и *Nycteridae* [7, 16, 46]. Сарбеко- и мербековирусы рукокрылых считаются предковыми формами, от которых происходят возбудители коронавирусных инфекций, получивших эпидемическое распространение в начале XXI в. [16, 17, 46, 47], однако нет общего мнения относительно непосредственного механизма этого процесса. Для коронавирусной инфекции с преимущественно аспирационной передачей и широкой распространённостью субклинических форм болезни трудно получить строгие доказательства относительно нулевого пациента и источника его заражения. Активно дискутируются различные варианты и схемы, предполагающие непосредственное заражение от рукокрылых, участие других животных (пальмовых цвет (*Nandinia binotata*), одногорбых верблюдов (*Camelus dromedarius*), панголинов (*Pholidota*) и других), а также возможное изменение вируса в лабораторных условиях [16, 47–49].

Даже краткое изложение сведений об избранных группах вирусов демонстрирует необходимость и значимость мультидисциплинарного подхода к их изучению и представляет собой теоретический вклад в развитие представлений о связи болезней диких животных с инфекционной патологией человека. К настоящему времени стало ясно, что возможны различные варианты эпидемиологических проявлений вирусных инфекций, резервуаром которых служат рукокрылые:

1. Человек является биологическим тупиком для вирусного агента, и в естественных условиях его дальнейшего распространения не происходит (в частности, для лиссавирусов). Это типичная ситуация для многих зоонозов.

2. Человек заражается от ЛМ непосредственно или при участии животных других видов, после чего формируются цепочки последовательных передач вируса от человека к человеку с постепенным затуханием эпидемического процесса (например, в случае с фило- и хенипавирусами).

3. Вирус преодолевает межвидовой барьер и приобретает способность неопределённо долго циркулировать среди людей (предположительно SARS-CoV-2). Такой процесс может закончиться формированием нового антропоноза.

Подобные схемы рассматриваются в монографиях [3, 8, 10] и нескольких обзорных работах в контексте происхождения инфекционных болезней человека и животных-компаньонов от зоонозов диких животных [16, 46, 50]. Пандемия COVID-19 стала первым событием планетарного масштаба после того, как у человечества появились адекватные технические возможности для анализа подобной эпидемиологической ситуации. Принципиально важным остаётся вопрос о механизмах преодоления межвидового барьера. Процесс передачи (выброса) вируса из популяции основного хозяина к другим видам животных и человеку («spillover», англ., букв. – перетекание, переливание) интенсивно изучается на молекулярно-генетическом уровне [8, 10, 18], однако не менее важное значение имеет установление экологических связей и закономерностей [3, 7, 10].

Эпидемиологический надзор и мониторинг

Накопление знаний о вирусных инфекциях рукокрылых во многом зависит от организации исследований и качества систем надзора. В США и Канаде мониторинг бешенства ЛМ на протяжении десятилетий (с середины прошлого века) проводится лабораториями учреждений здравоохранения при содействии населения, которое хорошо информировано об опасности этой инфекции. В результате в Северной Америке бешенство среди рукокрылых выявляется чаще, чем у других видов животных, и ежегодно подтверждается >1 тыс. его случаев [51]. В Европе аналогичная система стала применяться значительно позже, и в последние годы в сводках ВОЗ сообщается о десятках (иногда сотнях) случаев лиссавирусной инфекции ЛМ [52]. В настоящее время европейская система надзора за вирусными болезнями рукокрылых совершенствуется [52].

В Российской Федерации лабораторная диагностика бешенства проводится силами ветеринарных лабораторий, и случаи лиссавирусного поражения выявляются очень редко [9, 13]. Штатные работники учреждений санитарно-эпидемиологической службы не имеют опыта полевой работы с ЛМ, поскольку предшествующие зоолого-паразитологические исследования были ориентированы главным обра-

зом на мониторинг зоонозов, связанных с грызунами и кровососущими членистоногими (*Arthropoda*) [54]. В большинстве стран, включая РФ, наиболее результативны целенаправленные научные изыскания с участием специалистов, имеющих опыт работы с рукокрылыми [3, 36, 45].

Эффективность различных систем надзора определяется также особенностями конкретных инфекционных процессов. Лиссавирусные инфекции сопровождаются характерными симптомами и гибелью заболевших рукокрылых, поэтому пассивный мониторинг в этих ситуациях достаточно эффективен. Однако большинство других вирусных болезней у рукокрылых протекает субклинически, поэтому имеется необходимость в выборочном отлове и обследовании особей. К активному мониторингу прибегают при проведении серологических исследований. На сегодняшний день разработаны рекомендации по обследованию рукокрылых (в т.ч. с помощью неинвазивных протоколов [3]), а также по их отлову [3, 25, 26].

Экология и охрана природы

Рукокрылым принадлежит важная роль в биосфере [25, 55]. В ряде государств ЛМ и их убежища строго охраняются, и в данном направлении успешно работают ассоциации специалистов по рукокрылым [56, 57]. После начала пандемии COVID-19 активность специалистов в области охраны этих видов резко возросла. Помимо рассмотренных причин допускалась возможность заражения новым коронавирусом ЛМ в Европе и Америке от больных людей («spillback», *англ.*, буквально – обратное, или возвратное заражение). Для профилактики такой передачи зоологам рекомендовалось использовать средства индивидуальной защиты (СИЗ) и ограничить полевые работы с рукокрылыми [56–58]. Российская Федерация не входит в число участников Конвенции по сохранению мигрирующих видов диких животных (Боннская конвенция; Convention on Migratory Species, CMS) [56], в связи с чем ограничения при проведении полевых и экспериментальных исследований в этих ситуациях не такие жесткие, как в большинстве европейских стран. Рукокрылые представлены в региональных Красных книгах многих субъектов РФ [26, 27], и за ущерб, наносимый редким видам, предусмотрена ответственность¹. При полевой и экспериментальной работе с рукокрылыми действуют общепринятые этические нормы и требования биобезопасности [58].

Одна из основных причин сокращения биологического разнообразия и численности рукокрылых – антропогенная трансформация естественной среды обитания [25, 55]. На втором месте в списке угроз существованию этих животных стоят новые зоонозные инфекции [55]. Вирусные болезни редко приводят к гибели ЛМ [8, 10], но на фоне эпидемий научные

вирусологические проекты хорошо финансируются, и рукокрылых в больших количествах отлавливают для исследований. Часть особей при этом уничтожается, но даже прижизненный сбор биоматериала сопровождается ростом смертности среди ЛМ, особенно в критические периоды жизненного цикла (размножение, зимняя спячка и др.) [3, 55]. Распространение информации об опасных болезнях, связанных с ЛМ, формирует негативное отношение к этим животным, провоцирует уничтожение их убежищ и колоний [56–58].

В настоящее время преследование ЛМ как потенциальных переносчиков зоонозов считается бесполезным и даже контрпродуктивным [3, 6, 7]. В ограниченных масштабах истребительные мероприятия реализуются только в отношении летучих мышей-вампиров [1]. Основные же усилия должны быть направлены на ограничение контактов людей с ЛМ, использование средств индивидуальной защиты и специфической профилактики при профессиональных и случайных контактах, а также на экологическое и гигиеническое просвещение населения [26, 35, 56–58]. Подчеркивается, что вырубка лесов, нерациональные системы сельскохозяйственного производства и природопользования, торговля дикими животными (в т.ч. дичью) не только угрожают существованию некоторых видов рукокрылых, но и могут способствовать распространению новых зоонозных инфекций [3, 8, 55]. Одним из путей решения междисциплинарных проблем служит концепция «One Health» (*англ.*, буквально – единое здоровье), направленная на выработку взвешенного подхода к борьбе с зоонозами диких животных [60].

Заключение

В начале нового столетия рукокрылые, как резервуар вирусов, оказались в фокусе интересов специалистов самого различного профиля. Обзор научных публикаций свидетельствует о постепенном изменении подходов к исследованиям в этой области: от сбора фактов и их сенсационной подачи к осмыслению новых знаний с экологических, эволюционных и социально-экономических позиций. Наилучшие результаты были достигнуты командами, в состав которых входили представители разных специальностей с хорошей подготовкой по смежным вопросам. Итоги исследований свидетельствуют о необходимости соблюдения баланса интересов в сферах здравоохранения и охраны природы. В Российской Федерации ввиду возросшей актуальности тематики по вирусным инфекциям ЛМ в настоящее время требуется межведомственная координация (возможно, на государственном уровне) научных исследований и надзорных мероприятий для контроля над зоонозными инфекциями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baer G.M., ed. *The Natural History of Rabies*. New York, San Francisco, London: Academic press; 1975.
2. Павловский Е.Н. Основы учения о природной очаговости трансмиссивных болезней человека. *Журнал общей биологии*. 1946; (7): 3–33.

¹«Кодекс Российской Федерации об административных правонарушениях» от 30.12.2001 N 195-ФЗ (редакция от 01.07.2021). Статья 8.35. Уничтожение редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных или растений.

3. Newman S.H., Field H.E., de Long C.E., Epstein J.N., eds. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Investigating the Role of Bats in Emerging Zoonoses. Balancing Ecology, Conservation and Public Health Interest. Manual No 12*. Rome: FAO Animal Production and Health; 2011.
4. Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В. Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 112–22. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41>
5. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
6. Lederberg J., Shope R.E., Oaks S.C., eds. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Washington: National Academies Press; 1992.
7. Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>
8. Wang L.-F., Cowled C., eds. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118818824>
9. Макаров В.В., Лозовой Д.А. *Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрыльями*. Владимир; 2016.
10. Corrales-Aguilar E., Schwemmler M., eds. *Bats and Viruses: Current Research and Future Trends*. Caister: Academic Press; 2020.
11. Поршаков А.М., Кононова Ю.В., Локтев В.Б., Воиро М.И. Рукокрылые как возможный резервуар опасных для человека вирусов на территории Гвинеи Республики. Часть 1. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (3): 32–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-3-32-39>
12. Поршаков А.М., Кононова Ю.В., Локтев В.Б., Воиро М.И. Рукокрылые как возможный резервуар опасных для человека вирусов на территории Гвинеи Республики. Часть 2. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (4): 20–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-20-26>
13. Макаров В.В., Барсуков О.Ю. Эмерджентные зоонозы, ассоциированные с рукокрыльями. *Пест-менеджмент*. 2019; (2): 18–2. <https://doi.org/10.25732/PM.2019.110.2.003>
14. Поршаков А.М., Кононова Ю.В., Лыонг Т.М. Филовирусы Юго-Восточной Азии, Китая и Европы (обзор литературы). *Журнал инфектологии*. 2019; 11(2): 5–13. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-5-13>
15. Сизикова Т.Е., Боярская Н.В., Ковальчук А.В., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Новые представители семейства *Filoviridae*: распространение, природные резервуары, потенциальная эпидемическая опасность. *Вестник войск РХБ защиты*. 2019; 3(4): 329–36. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-4-329-336>
16. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод *Sarbecovirus*), MERS-CoV (подрод *Merbecovirus*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70>
17. Шестопалов А.М., Кононова Ю.В., Гаджиев А.А., Гуляева М.А., Маранди М.В., Алексеев А.Ю., и др. Биоразнообразие и эпидемический потенциал коронавирусов (*Nidovirales: Coronaviridae*) рукокрылых. *Юг России: экология, развитие*. 2020; 15(2): 17–34. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-2-17-34>
18. Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Вирус Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): фатальные адаптационные мутации. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 7–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-23>
19. Puechmaillie S.J., Ar Gouilh M., Dechmann D., Fenton B., Geiselman C., Medellin R., et al. Misconceptions and misinformation about bats and viruses. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 105: 606–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.097>
20. Егоров А.Ю., Романова Ю.Р. Влияние глобального распределения летучих мышей на смертность у пациентов с COVID-19. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2020; 7(1): 34–41. <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2020-7-1-34-41>
21. Chen L., Liu B., Yang J., Jin Q. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database*. 2014; 2014: bau021. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>
22. Щелканов М.Ю., Дунаева М.Н., Москвина Т.В., Воронова А.Н., Кононова Ю.В., Воробьева В.В., и др. Каталог вирусов рукокрылых (2020). *Юг России: экология, развитие*. 2020; 15(3): 6–30. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-3-6-30>
23. Hermida Lorenzo R.J., Cadar D., Koundouno F.R., Juste J., Bialonski A., Baum H., et al. Metagenomic snapshots of viral components in Guinean bats. *Microorganisms*. 2021; 9(3): 599. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030599>
24. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <https://talk.ictvonline.org> (accessed 24 July 2021).
25. Wilson D.E., Mittermeier R.A. *Handbook of the Mammals of the World. Volume 9: Bats*. Barcelona: Lynx Ediciones. 2019. Available at: <https://www.lynxeds.com/product/handbook-of-the-mammals-of-the-world-volume-9/> (accessed 24 July 2021).
26. Тиунов М.П., Крускоп С.В., Орлова М.В. *Рукокрылые Дальнего Востока России и их эктопаразиты*. М.: Перо; 2021.
27. Российская рабочая группа по рукокрылым. Available at: <https://zmmu.msu.ru/bats/rbgrhp/rbgr.htm> (accessed 20 July 2021).
28. IUCN: International Union for Conservation of Nature. Available at: <https://www.iucn.org> (accessed 24 July 2021).
29. Luis A.D., Hayman D.T.S., O'Shea T.J., Cryan P.M., Gilbert A.T., Pulliam J.R.C., et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc. Biol. Sci.* 2013; 280: 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
30. Gorbunova V., Seluanov A., Kennedy B.K. The world goes bats: living longer and tolerating viruses. *Cell Metabolism*. 2020; 32(1): 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
31. Rupprecht C., Kuzmin I., Meslin F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research*. 2017; 6: 184. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>
32. Epstein J.H., Anthony S.J., Islam A., Kilpatrick A.M., Ali Khan S., Balkey M.D., et al. Nipah virus dynamics in bats and implications for spillover to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(46): 29190–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000429117>
33. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int> (accessed 17 July 2021).
34. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses*. 2014; 6(8): 2974–90. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
35. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрыльями (обзор литературы). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86. Available at: <https://zmmu.msu.ru/bats/biblio/rabies.pdf> (accessed 17 July 2021).
36. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006; 125: 273–82.
37. Терновой В.А., Зайковская А.В., Томиленко А.А., Аксёнов В.И., Чаусов Е.В., Шестопалов А.М. Лиссавирусы у летучих мышей, обитающих на юге Западной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(1): 31–4.
38. Lu Z.L., Wang W., Yin W.L., Tang H.B., Pan Y., Liang X., et al. Lyssavirus surveillance in bats of southern China's Guangxi Province. *Virus Genes*. 2013; (2): 293–301. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0854-2>
39. Drexler J.F., Corman V.M., Muller M.A., Maganga G.D., Vallo P., Binger T., et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* 2012; 3: 796. <https://doi.org/10.1038/ncomms1796>
40. Sharma V., Kaushik S., Kumar R., Yadav J.P., Kaushik S. Emerging trends of Nipah virus: A review. *Rev. Med. Virol.* 2019; (1): e2010. <https://doi.org/10.1002/rmv.2010>
41. Williamson K.M., Wheeler S., Kerr J., Bennett J., Freeman P., Kohlhaagen J., et al. BatOneHealth field team. Hendra in the Hunter Valley. *One Health*. 2020; 10: 100162. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100162>
42. Kuzmin I.V., Niezgoda M., Franka R., Agwanda B., Markotter W., Breiman R.F., et al. Marburg virus in fruit bat, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(2): 352–4. <https://doi.org/10.3201/eid1602.091269>
43. Koch L.K., Cunze S., Kochmann J., Klimpel S. Bats as putative *Zaire ebolavirus* reservoir hosts and their habitat suitability in Africa. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 14268. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71226-0>
44. Negredo A., Palacios G., Vázquez-Morón S., González F., Dopazo H., Molero F., et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): e1002304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>

45. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science*. 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
 46. Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 71: 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.meeid.2019.03.001>
 47. Leitner T., Kumar S. Where did SARS-CoV-2 come from? *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(9): 2463–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa162>
 48. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* 2020; 92(4): 433–40. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>
 49. Olival K.J., Cryan P.M., Amman B.R., Baric R.S., Blehert D.S., Brook C.E., et al. Possibility for reverse zoonotic transmission of SARS-CoV-2 to free-ranging wildlife: A case study of bats. *PLoS Pathog.* 2020; 16(9): e1008758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008758>
 50. Wolfe N.D., Dunavan C.P., Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature*. 2007; 447(7142): 279–83. <https://doi.org/10.1038/nature05775>
 51. Patyk K., Turmelle A., Blanton J.D., Rupprecht C.E. Trends in national surveillance data for bat rabies in the United States: 2001–2009. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 2012; 12(8): 666–73. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0839>
 52. Schatz J., Fooks A.R., McElhinney L., Horton D., Echevarria J., Vázquez-Moron S., et al. Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 22–34. <https://doi.org/10.1111/zph.12002>
 53. Phelps K.L., Hamel L., Alhmoud N., Ali S., Bilgin R., Sidamonidze K., et al. Bat research networks and viral surveillance: gaps and opportunities in Western Asia. *Viruses*. 2019; 11(3): 240. <https://doi.org/10.3390/v11030240>
 54. Транквилевский Д.В., Жуков В.И., Царенко В.А. Вероятность заражения населения возбудителями, ассоциированными с рукокрылыми, в Российской Федерации. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018; (3): 32–7. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-300-3-32-37>
 55. Voigt C.C., Kingston T., eds. *Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world*. Cham: Springer; 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_1
 56. Bat Conservation International. Available at: <https://www.batcon.org> (accessed 24 July 2021).
 57. UNEP/EUROBATS. Agreement on the conservation of populations of European bats. Available at: <https://www.eurobats.org/> (accessed 24 July 2021).
 58. Melber M., Gloza-Rausch F., Voigt C.C. Statement on handling of bats in times of Covid-19 regarding the IUCN Bat Specialists Groups recommendations of field activities for the protection of bats. Available at: https://bvflfedermaus.de/wp-content/uploads/2020/04/BVF_Statement_on_Handling_of_Bats_in_times_of_Covid_19.pdf (accessed 24 July 2021).
 59. Германчук В.Г., Семакова А.П., Шавина Н.Ю. Этические принципы при обращении с лабораторными животными в эксперименте с патогенными биологическими агентами I–II групп. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (4): 33–8. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-33-38>
 60. Cunningham A.A., Daszak P., Wood J.L.N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017; 372(1725): 20160167. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>
- REFERENCES**
1. Baer G.M., ed. *The Natural History of Rabies*. New York, San Francisco, London: Academic press; 1975.
 2. Pavlovsky E.N. Fundamentals of the doctrine of the natural focus of vector-borne human [Osnovy ucheniya o prirodnoy ochagovosti transmissivnykh bolezney cheloveka]. *Zhurnal obshchey biologii*. 1946; (7): 3–33. (in Russian)
 3. Newman S.H., Field H.E., de Long C.E., Epstein J.N., eds. *Food and Agriculture Organization of the United Nations. Investigating the Role of Bats in Emerging Zoonoses. Balancing Ecology, Conservation and Public Health Interest. Manual No 12*. Rome: FAO Animal Production and Health; 2011.
 4. Lenshin S.V., Romashin A.V., Vyshemirsky O.I., Lvov D.K., Alkhovskiy S.V. Bats of the subtropical climate zone of the Krasnodar Territory of Russia as a possible reservoir of zoonotic viral infections [Letuchie myshi subtropicheskoy zony Krasnodarskogo kraya kak vozmozhnyy rezervuar zoonoznykh virusnykh infektsiy]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 112–22. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41> (in Russian)
 5. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
 6. Lederberg J., Shope R.E., Oaks S.C., eds. *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Washington: National Academies Press; 1992.
 7. Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>
 8. Wang L.-F., Cowled C., eds. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2015. <https://doi.org/10.1002/9781118818824>
 9. Makarov V.V., Lozovoy D.A. *New Especially Dangerous Infections Associated with Bats [Novye osobo opasnye infektsii, assotsirovannyye s rukokrylymi]*. Vladimir; 2016. (in Russian)
 10. Corrales-Aguilar E., Schwemmler M., eds. *Bats and Viruses: Current Research and Future Trends*. Caister: Academic Press; 2020.
 11. Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Loktev V.B., Boiro M.I. *Chiroptera as a potential reservoir of dangerous for humans viruses in the territory of the Republic of Guinea. Part 1 [Rukokrylye kak vozmozhnyy rezervuar opasnykh dlya cheloveka virusov na territorii Gvineyskoy Respubliki. Chast' 1]. Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (3): 32–9. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-3-32-39> (in Russian)
 12. Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Loktev V.B., Boiro M.I. *Chiroptera as a potential reservoir of dangerous for humans viruses in the territory of the Republic of Guinea. Part 2 [Rukokrylye kak vozmozhnyy rezervuar opasnykh dlya cheloveka virusov na territorii Gvineyskoy Respubliki. Chast' 2]. Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (4): 20–6. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-20-26> (in Russian)
 13. Makarov V.V., Barsukov O.Yu. Emerging zoonoses associated with Chiroptera [Emerzhentnye zoonozy, assotsirovannyye s rukokrylymi]. *Pest-menedzhment*. 2019; (2): 18–2. <https://doi.org/10.25732/PM.2019.110.2.003> (in Russian)
 14. Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Lyong T.M. Filoviruses of Southeast Asia, China and Europe (the literature review) [Filovirusy Yugo-Vostochnoy Azii, Kitaya i Evropy (obzor literatury)]. *Zhurnal infektologii*. 2019; 11(2): 5–13. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-2-5-13> (in Russian)
 15. Sizikova T.E., Boyarskaya N.V., Kovalchuk A.V., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The new members of Filoviridae family: distribution, natural reservoirs, potential epidemic danger [Novye predstaviteli semeystva Filoviridae: rasprostraneniye, prirodnye rezervuary, potentsial'naya epidemicheskaya opasnost']. *Vestnik voysk RKHB zashchity*. 2019; 3(4): 329–36. <https://doi.org/10.35825/2587-5728-2019-3-4-329-336> (in Russian)
 16. Lvov D.K., Alkhovskiy S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus) [Istoki pandemii COVID-19: ekologiya i genetika koronavirusov (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (podrod Sarbecovirus), MERS-CoV (podrod Merbecovirus)]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(2): 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70> (in Russian)
 17. Shestopalov A.M., Kononova Yu.V., Gadzhiev A.A., Gulyaeva M.A., Marandi M.V., Alekseev A.Yu., et al. Biodiversity and epidemic potential of Chiroptera coronaviruses (Nidovirales: Coronaviridae) [Bioraznoobrazie i epidemicheskiiy potentsial koronavirusov (Nidovirales: Coronaviridae) rukokrylykh]. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie*. 2020; 15(2): 17–34. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-2-17-34> (in Russian)
 18. Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Ebola virus (Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus): fatal adaptation mutations [Virus Ebola (Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus): fatal'nye adaptatsionnyye mutatsii]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 7–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-23> (in Russian)
 19. Puechmaillie S.J., Ar Gouilh M., Dechmann D., Fenton B., Geiselman C., Medellín R., et al. Misconceptions and misinformation

- about bats and viruses. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 105: 606–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.097>
20. Egorov A.Yu., Romanova Yu.R. The impact of the global distribution of bats on mortality in COVID-19 patients [Vliyaniye global'nogo raspredeleniya letuchikh myshey na smertnost' u patsientov s COVID-19]. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2020; 7(1): 34–41. <https://doi.org/10.18527/2500-2236-2020-7-1-34-41> (in Russian)
 21. Chen L., Liu B., Yang J., Jin Q. DBatVir: the database of bat-associated viruses. *Database.* 2014; 2014: bau021. <https://doi.org/10.1093/database/bau021>
 22. Shchelkanov M.Yu., Dunaeva M.N., Moskvina T.V., Voronova A.N., Kononova Yu.V., Vorob'eva V.V., et al. Catalogue of Chiropteran viruses (2020) [Katalog virusov rukokrylykh (2020)]. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie.* 2020; 15(3): 6–30. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2020-3-6-30> (in Russian)
 23. Hermida Lorenzo R.J., Cadar D., Koundouno F.R., Juste J., Bialonski A., Baum H., et al. Metagenomic snapshots of viral components in Guinean bats. *Microorganisms.* 2021; 9(3): 599. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030599>
 24. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: <https://talk.ictvonline.org> (accessed 24 July 2021).
 25. Wilson D.E., Mittermeier R.A. *Handbook of the Mammals of the World. Volume 9: Bats.* Barcelona: Lynx Ediciones. 2019. Available at: <https://www.lynxeds.com/product/handbook-of-the-mammals-of-the-world-volume-9/> (accessed 24 July 2021).
 26. Tiunov M.P., Kruskop S.V., Orlova M.V. *Bats of Russian Far East and their ectoparasites [Rukokrylye Dal'nego Vostoka Rossii i ikh ektoparazity]*. Moscow: Pero; 2021. (in Russian)
 27. Russian Working Group on Bats [Rossiyskaya rabochaya gruppya po rukokrylym]. Available at: <https://zmmu.msu.ru/bats/rbgrhp/rbrg.htm> (accessed 20 July 2021). (in Russian)
 28. IUCN: International Union for Conservation of Nature. Available at: <https://www.iucn.org> (accessed 24 July 2021).
 29. Luis A.D., Hayman D.T.S., O'Shea T.J., Cryan P.M., Gilbert A.T., Pulliam J.R.C., et al. A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc. Biol. Sci.* 2013; 280: 20122753. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
 30. Gorbunova V., Seluanov A., Kennedy B.K. The world goes bats: living longer and tolerating viruses. *Cell Metabolism.* 2020; 32(1): 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
 31. Rupprecht C., Kuzmin I., Meslin F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Research.* 2017; 6: 184. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>
 32. Epstein J.H., Anthony S.J., Islam A., Kilpatrick A.M., Ali Khan S., Balkey M.D., et al. Nipah virus dynamics in bats and implications for spillover to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(46): 29190–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000429117>
 33. WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int> (Accessed 17 July 2021).
 34. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses.* 2014; 6(8): 2974–90. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
 35. Botvinkin A.D. Fatal human cases of rabies in Eurasia after contacts with *Chiroptera* (the literature review) [Smertel'nye sluchai zabolevaniya lyudey beshenstvom v Evrazii posle kontaktov s rukokrylymi (obzor literatury)]. *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86. Available at: <https://zmmu.msu.ru/bats/biblio/rabies.pdf> (accessed 17 July 2021). (in Russian)
 36. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 125: 273–82.
 37. Ternovoy V.A., Zaykovskaya A.V., Tomilenko A.A., Aksenov V.I., Chausov E.V., Shestopalov A.M. Lyssavirus in bats residing in the south of West Siberia [Lissavirusy u letuchikh myshey, obitayushchikh na yuge Zapadnoy Sibiri]. *Voprosy virusologii.* 2005; 50(1): 31–4. (in Russian)
 38. Lu Z.L., Wang W., Yin W.L., Tang H.B., Pan Y., Liang X., et al. Lyssavirus surveillance in bats of southern China's Guangxi Province. *Virus Genes.* 2013; (2): 293–301. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0854-2>
 39. Drexler J.F., Corman V.M., Muller M.A., Maganga G.D., Vallo P., Binger T., et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat. Commun.* 2012; 3: 796. <https://doi.org/10.1038/ncomms1796>
 40. Sharma V., Kaushik S., Kumar R., Yadav J.P., Kaushik S. Emerging trends of Nipah virus: A review. *Rev. Med. Virol.* 2019; (1): e2010. <https://doi.org/10.1002/rmv.2010>
 41. Williamson K.M., Wheeler S., Kerr J., Bennett J., Freeman P., Kohlhagen J., et al. BatOneHealth field team. Hendra in the Hunter Valley. *One Health.* 2020; 10: 100162. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100162>
 42. Kuzmin I.V., Niezgoda M., Franka R., Agwanda B., Markotter W., Breiman R.F., et al. Marburg virus in fruit bat, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(2): 352–4. <https://doi.org/10.3201/eid1602.091269>
 43. Koch L.K., Cunze S., Kochmann J., Klimpel S. Bats as putative Zaire ebolavirus reservoir hosts and their habitat suitability in Africa. *Sci. Rep.* 2020; 10(1): 14268. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71226-0>
 44. Negrodo A., Palacios G., Vázquez-Morón S., González F., Dopazo H., Moleró F., et al. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): e1002304. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>
 45. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
 46. Luk H.K.H., Li X., Fung J., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 71: 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.03.001>
 47. Leitner T., Kumar S. Where did SARS-CoV-2 come from? *Mol. Biol. Evol.* 2020; 37(9): 2463–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa1162>
 48. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* 2020; 92(4): 433–40. <https://doi.org/10.1002/jmv.25682>
 49. Olival K.J., Cryan P.M., Amman B.R., Baric R.S., Blehert D.S., Brook C.E., et al. Possibility for reverse zoonotic transmission of SARS-CoV-2 to free-ranging wildlife: A case study of bats. *PLoS Pathog.* 2020; 16(9): e1008758. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008758>
 50. Wolfe N.D., Dunavan C.P., Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature.* 2007; 447(7142): 279–83. <https://doi.org/10.1038/nature05775>
 51. Patyk K., Turmelle A., Blanton J.D., Rupprecht C.E. Trends in national surveillance data for bat rabies in the United States: 2001–2009. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 2012; 12(8): 666–73. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0839>
 52. Schatz J., Fooks A.R., McElhinney L., Horton D., Echevarria J., Vázquez-Morón S., et al. Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses Public Health.* 2013; 60(1): 22–34. <https://doi.org/10.1111/zph.12002>
 53. Phelps K.L., Hamel L., Alhmodou N., Ali S., Bilgin R., Sidamonidze K., et al. Bat research networks and viral surveillance: gaps and opportunities in Western Asia. *Viruses.* 2019; 11(3): 240. <https://doi.org/10.3390/v11030240>
 54. Trankvilevskiy D.V., Zhukov V.I., Tsarenko V.A. The probability of infection of the population by pathogens associated with *Chiroptera* in the Russian Federation [Veroyatnost' zarazheniya naseleniya vzbuditelyami, assotsirovannymi s rukokrylymi, v Rossiyskoy Federatsii]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2018; (3): 32–7. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-300-3-32-37> (in Russian)
 55. Voigt C.C., Kingston T., eds. *Bats in the Anthropocene: conservation of bats in a changing world.* Cham: Springer; 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25220-9_1
 56. Bat Conservation International. Available at: <https://www.batcon.org> (accessed 24 July 2021).
 57. UNEP/EUROBATS. Agreement on the conservation of populations of European bats. Available at: <https://www.eurobats.org/> (Accessed 24 July 2021).
 58. Melber M., Gloza-Rausch F., Voigt C.C. Statement on handling of bats in times of Covid-19 regarding the IUCN Bat Specialists Groups recommendations of field activities for the protection of bats. Available at: https://bvffledermaus.de/wp-content/uploads/2020/04/BVF_Statement_on_Handling_of_Bats_in_times_of_Covid_19.pdf (Accessed 24 July 2021).
 59. Germanchuk V.G., Semakova A.P., Shavina N.Yu. Ethical Principles for Handling Laboratory Animals in an Experiment with Pathogenic Biological Agents of the I–II Groups [Eticheskije printsipy pri obrabotke s laboratornymi zhivotnymi v eksperimente s patogennymi biologicheskimi agentami I–II gruppy]. *Problemy osobopasnykh infektsiy.* 2018; (4): 33–8. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-33-38> (in Russian)
 60. Cunningham A.A., Daszak P., Wood J.L.N. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017; 372(1725): 20160167. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования

Борисова Н.И.^{1*}, Котов И.А.^{1,2*}, Колесников А.А.¹, Каптелова В.В.¹, Сперанская А.С.¹,
Кондрашева Л.Ю.¹, Тиванова Е.В.¹, Хафизов К.Ф.¹, Акимкин В.Г.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 «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141700, Долгопрудный, Россия

Введение. С начала пандемического распространения инфекции COVID-19, вызываемой коронавирусом SARS-CoV-2, международное научное сообщество регулярно фиксирует появление мутаций этого патогена, потенциально способных повысить его контагиозность и/или вирулентность. В частности, с конца 2020 г. в мире обнаружено несколько вызывающих озабоченность вариантов, включая альфа (B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1) и дельта (B.1.617.2). Однако существующие механизмы поиска мутаций и выявления штаммов не всегда бывают достаточно эффективными, поскольку лишь небольшая доля получаемых от пациентов образцов возбудителя может быть исследована на наличие генетических изменений, например методом полногеномного секвенирования из-за его высокой стоимости.

Материал и методы. В исследовании применён способ таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения (next generation sequencing, NGS) наиболее значимых регионов гена, кодирующего S-гликопротеин (шиповидный, spike) вируса SARS-CoV-2, для чего разработана соответствующая праймерная панель. В среднем на платформе Illumina на 1 образец приходилось около 50 тыс. парноконцевых прочтений длиной ≥ 150 п.н. С помощью описанной методики нами исследованы 579 случайных образцов, полученных у проживающих в Московском регионе пациентов с новой коронавирусной инфекцией с февраля по июнь 2021 г.

Результаты. В работе продемонстрирована динамика представленности в Российской Федерации ряда штаммов нового коронавируса и нескольких его мутаций на протяжении февраля–июня 2021 г. Установлено, что штамм дельта появился на территории Москвы и Московской области в мае текущего года, а в июне стал доминирующим, частично вытеснив другие разновидности вируса.

Обсуждение. Полученные данные представляют возможность определять принадлежность образцов к упомянутым и некоторым другим штаммам, а описанный подход может быть использован для стандартизации процедуры поиска новых и существующих разновидностей SARS-CoV-2. Методика делает возможным изучение большого количества образцов в короткие сроки, позволяя получать более детальное представление об эпидемиологической ситуации в регионе.

Ключевые слова: *коронавирус; коронавирусная инфекция; SARS-CoV-2; секвенирование нового поколения; геном; штаммы*

Для цитирования: Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 269-278. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

Для корреспонденции: Хафизов Камилль Фаридович, канд. биол. наук, руководитель научной группы разработки новых методов диагностики на основе технологий секвенирования следующего поколения отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия. E-mail: kkhafizov@gmail.com

*Первые авторы статьи

Участие авторов: Борисова Н.И. – написание текста, выполнение экспериментов; Котов И.А. – написание текста, подготовка иллюстраций, биоинформатический анализ; Колесников А.А. – выполнение экспериментов; Каптелова В.В. – выполнение экспериментов; Сперанская А.С. – выполнение экспериментов; Кондрашева Л.Ю. – организация сбора биологического материала, постановка полимеразной цепной реакции; Тиванова Е.В. – организация сбора биологического материала; Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстраций, биоинформатический анализ, общая редакция статьи; Акимкин В.Г. – написание резюме, научное редактирование и общая редакция статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. 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 ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.)

Поступила 1.07.2021

Принята к печати 14.08.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing

Nadezhda I. Borisova^{1*}, Ivan A. Kotov^{1,2*}, Anton A. Kolesnikov¹, Valeria V. Kaptelova¹, Anna S. Speranskaya¹, Larisa Yu. Kondrasheva¹, Elena V. Tivanova¹, Kamil F. Khafizov¹, Vasily G. Akimkin¹

¹FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia

²FSAEI HE «Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)», 141700, Dolgoprudny, Russia

Introduction. Since the outbreak of the COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 novel coronavirus, the international community has been concerned about the emergence of mutations altering some biological properties of the pathogen like increasing its infectivity or virulence. Particularly, since the end of 2020, several variants of concern have been identified around the world, including Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), and Delta (B.1.617.2). However, the existing mechanism of detecting important mutations are not always effective enough, since only a relatively small part of all pathogen samples can be examined by whole genome sequencing due to its high cost.

Material and methods. In this study, we have designed special primer panel and used it for targeted high-throughput sequencing of several significant S-gene (spike) regions of SARS-CoV-2. The Illumina platform averaged approximately 50,000 paired-end reads with a length of ≥ 150 bp per sample. This method was used to examine 579 random samples obtained from COVID-19 patients in Moscow and the Moscow region from February to June 2021.

Results. This study demonstrated the dynamics of distribution of several SARS-CoV-2 strains and its some single mutations. It was found that the Delta strain appeared in the region in May 2021, and became prevalent in June, partially displacing other strains.

Discussion. The obtained results provide an opportunity to assign the viral samples to one of the strains, including the previously mentioned in time- and cost-effective manner. The approach can be used for standardization of the procedure of searching for mutations in individual regions of the SARS-CoV-2 genome. It allows to get a more detailed data about the epidemiological situation in a region.

Key words: coronavirus; coronavirus infection, SARS-CoV-2; next generation sequencing; COVID-19; genome; strains

For citation: Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 269–278. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>

For correspondence: Kamil F. Khafizov, Ph.D. (Biol.), Head of the Scientific Group for the Development of New Diagnostic Methods, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia. E-mail: kkhafizov@gmail.com

* Shared first co-authorship

Information about the authors:

Borisova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-9672-0648>
Kotov I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2416-5689>
Kolesnikov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-3480-953X>
Kaptelova V.V., <http://orcid.org/0000-0003-0952-0830>
Speranskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0001-6326-1249>
Kondrasheva L.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>
Tivanova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1286-2612>
Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>
Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Borisova N.I. – writing of the text, performing experiments; Kotov I.A. – writing of the text, preparing of the illustrations, bioinformatics analysis; Kolesnikov A.A. – performing experiments; Kaptelova V.V. – performing experiments; Speranskaya A.S. – performing experiments; Kondrasheva L.Yu. – organization of collection of biological material, polymerase chain reaction analysis; Tivanova E.V. – organization of the biological material collection; Khafizov K.F. – writing of the text, collection and processing of the materials, preparation of the illustrations, bioinformatics analysis, general edition of the article; Akimkin V.G. – writing of the resume, scientific editing, general edition of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Ethics approval. 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 (Rospotrebnadzor) (Protocol No. 111 dated December 22, 2020).

Received: 1 July 2021
Accepted: 14 August 2021
Published: 31 August 2021

Введение

С момента первого выявления в декабре 2019 г. в Ухане (Китайская Народная республика (КНР)) [1] новый коронавирус SARS-CoV-2 распространился по всему миру и стал причиной >4 млн смертей [2]. За время, прошедшее с начала пандемии, выработан ряд эффективных терапевтических и профилактических мер борьбы с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. Сюда относится применение иммунологических препаратов, например моноклональных антител (АТ) [3, 4] и вакцин [5–8], в качестве антигена для которых, как правило, выступает шиповидный (spike) S-белок вируса.

В конце 2020 г. международное научное сообщество описало несколько вызывающих настороженность вариантов SARS-CoV-2, которые требуют особого внимания. Это прежде всего альфа (ранее имевший название «британский», В.1.1.7), бета («южноафриканский», В.1.351), гамма («бразильский», Р.1) и дельта («индийский», В.1.617.2). Указанные разновидности вируса заинтересовали исследователей после того, как в ряде географических регионов планеты стали появляться сообщения об учащении случаев передачи данных инфекционных агентов от человека к человеку, а впоследствии новые варианты патогена были обнаружены во многих странах. Например, вариант альфа быстро распространился на юго-востоке Великобритании, где вызвал большое количество эпизодов заболевания, и вскоре после этого был выявлен в США (Центры по контролю и профилактике заболеваний, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) [9], сделавшись доминирующим на территории этой страны к апрелю 2021 г. Аналогичным образом варианты из Южно-Африканской Республики (ЮАР) и Бразилии обусловили вспышки COVID-19 в этих государствах. Перечисленные разновидности SARS-CoV-2 также вызывают озабоченность, поскольку содержат

в S-белке мутацию E484K, которая, вероятно, снижает эффективность некоторых терапевтических моноклональных АТ, затрудняет нейтрализацию вируса *in vitro* и может привести к его потенциальному уходу от иммунной защиты, сформировавшейся после ранее перенесённой инфекции или вакцинации [8, 10–14].

Кроме того, 3 варианта (альфа, бета и гамма) имеют на уровне ключевого участка S-белка (рецептор-связывающего домена, receptor binding domain (RBD)) мутацию N501Y, ассоциированную с повышенной аффинностью к рецептору ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Это, в свою очередь, может способствовать повышенной трансмиссивности возбудителя [15, 16]. Ранее специалистами ФБУН Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ) был разработан набор реагентов для быстрого выявления данной мутации в геноме вируса с помощью метода петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [17], что позволило резко сократить число образцов, передаваемых на полногеномное секвенирование с целью выявления и мониторинга содержащих мутацию N501Y новых штаммов. Однако дальнейшее появление подобных штаммов, в том числе характеризующихся другими мутациями в гене S-белка, показало, что геномные замены в местах посадки праймеров для LAMP могут снижать эффективность указанной методики. В дополнение к этому по мере обнаружения и изучения вариантов SARS-CoV-2 возрастает перечень мутационных изменений, вызывающих интерес и подлежащих отслеживанию. Например, в мае 2021 г. в РФ обнаружен штамм дельта, ранее ставший причиной высокой заболеваемости в Индии, причём его распространённость на территории нашей страны с этого времени стремительно росла. Более того, в России также выявлены локальные штаммы,

в том числе сибирский (B.1.1.397+) и северо-западный (B.1.1.370.1), несущие мутации в гене S-белка [18, 19]. На данный момент изучение представленности циркулирующих в Российской Федерации штаммов продолжается [20]. В силу приведённых причин учёным требуются более эффективные и универсальные инструменты для определения целого ряда важных мутаций в рамках одного цикла лабораторного исследования. И хотя полногеномное секвенирование вируса – безусловно, наиболее детальный способ генетического анализа [21], с экономической точки зрения при современном уровне развития методов секвенирования такой подход не всегда оптимален. Его применение затруднительно в условиях постоянного роста числа случаев COVID-19, включая возможные повторные эпизоды заболевания. К тому же определение полной генетической последовательности может оказаться нерациональным в плане оперативного эпидемиологического надзора с учётом того, что наиболее значимые изменения происходят в небольшой части вирусного генома.

В настоящей статье мы описываем идентификацию изолятов, относящихся к различным вариантам SARS-CoV-2 (включая штаммы альфа, бета и дельта), с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения. Для этого нами разработана праймерная панель, позволяющая быстро и эффективно проводить целевую амплификацию геномных фрагментов, избегая этапа лигирования адаптеров при подготовке образцов к секвенированию благодаря модификации олигонуклеотидов на стадии синтеза. Амплифицируемые участки включают наиболее значимые с эпидемиологической точки зрения мутации, соответствующие аминокислотным заменам K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y, A570D, P681H и другим, а также делеции HV69–70 и Y144 (рис. 1). Это даёт возможность не только кардинально снизить стоимость пробоподготовки, но и на порядки сократить объём генерируемых данных, вследствие чего становится доступным изучение большого количества образцов

вируса за короткий промежуток времени. Последнее особенно важно в случаях, когда требуется срочно установить представленность различных штаммов на рассматриваемой территории. С помощью новой праймерной панели нами исследованы 579 случайных образцов вируса, отобранных в феврале–июне 2021 г. в Москве и Московской области, а также показано изменение частот отдельных мутаций и штаммов в этом регионе.

Материал и методы

В исследовании использован биологический материал, полученный при взятии назофарингеальных мазков, от пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции. У этих лиц наличие SARS-CoV-2 было подтверждено методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ) с применением набора реагентов АмплиСенс Cov-Bat-FL («АмплиСенс», Россия). Исследование проводилось при информированном согласии пациентов; протокол исследования одобрен Этическим комитетом ЦНИИЭ (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.). Образцы помещали в транспортную среду (ЦНИИЭ, Россия). Выделение РНК из клинического материала производили при помощи комплекта реагентов РИБО-преп («АмплиСенс»); обратную транскрипцию осуществляли с использованием набора РЕВЕРТА-L («АмплиСенс»). Отбирали только те клинические образцы, в которых пороговое число циклов (cycle threshold, Ct) при постановке ПЦР не превышало 20.

В ходе амплификации на приборе T100 Thermal Cycler («BioRad», США) использовали ПЦР-смесь-2 blue («АмплиСенс»), содержащую *Taq*-полимеразу. Далее осуществляли очистку ПЦР-продукта от реакционной смеси посредством реагентов AMPureXP beads («Beckman Coulter», США). Температурный профиль амплификации был следующим: 1) денатурация при 95 °C в течение 30 с; 2) 38 циклов амплификации: 95 °C – 30 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 60 с; 3) финальная элонгация при 72 °C на протяжении 3 мин.

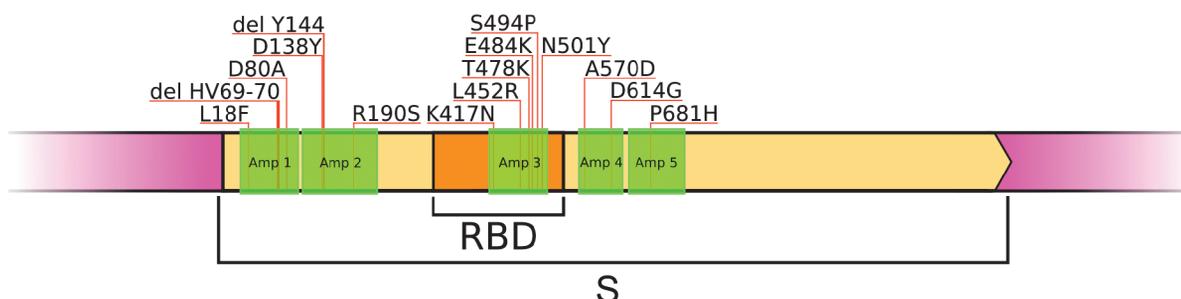


Рис. 1. Локализация ампликонов, получаемых с помощью разработанной панели праймеров, относительно генома SARS-CoV-2.

Примечание. Указан ряд аминокислотных замен и делеций, покрываемых панелью.

Amp 1–5 – ампликоны; S – S-белок; RBD – рецептор-связывающий домен.

Fig. 1. Localization of the amplicons obtained using the primer panel relative to the SARS-CoV-2 virus genome.

Note. Several amino acid substitutions and deletions covered by the panel are indicated.

Amp 1–5, amplicons; S, S-protein; RBD, receptor binding domain.

Индексацию выполняли с использованием ПЦР-смеси-2 blue и EvaGreen («Biotium», США) в качестве красителя на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System («ThermoFisher Scientific», США). Для этого применяли индекс-праймеры, совместимые с набором реагентов Nextera XT Index Kit v2 (а именно N7xx – 26 возможных вариантов и S5xx – 18 вариантов; подробнее см. «Illumina Adapter Sequences», Document # 1000000002694 v16, April 2021, <https://support-docs.illumina.com/SHARE/AdapterSeq/illumina-adapter-sequences.pdf>). Такое двойное индексирование повышает точность идентификации образцов и позволяет одновременно исследовать большее их количество. Температурный профиль индексации: 1) 98 °C – 30 с; 2) 15 циклов: 98 °C – 10 с, 65 °C – 1 мин 15 с. В дальнейшем образцы повторно очищали от реакционной смеси. Измерение концентрации ДНК проводили на флуориметре Qubit 4.0 («ThermoFisher Scientific»). Образцы собирали в пул эквивалентно концентрациям, после чего осуществляли анализ качества пула при помощи биоанализатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», США). Денатурацию и расчёт загрузочной концентрации в прибор проводили согласно инструкциям производителя.

Секвенирование выполняли на платформах Illumina MiSeq («Illumina», США) с использованием реагентов MiSeq Reagent Kit v2 (PE 150 + 150 либо PE 250 + 250 циклов) или MiSeq Reagent Kit v3 (PE 300 + 300 циклов), а также на Illumina HiSeq с применением набора v2 Rapid SBS (PE 250 + 250 циклов). На 1 образец приходилось ~50 тыс. прочтений, что эквивалентно ~0,3% информации, полученной при использовании в процессе секвенирования набора MiSeq Reagent Kit v2 (PE 150 + 150), или ~0,1% – для набора MiSeq Reagent Kit v3 (PE 300 + 300 циклов). Выбранный подход делает возможным исследование без чрезмерных финансовых затрат значительного количества образцов, при этом средняя величина покрытия для большинства из них составляет ≥ 2000 .

Панель праймеров для таргетной амплификации фрагментов гена S-белка подбирали вручную с учётом имеющейся информации об известных эпидемиологически значимых мутациях, а также сведений о консервативных областях генома. Температуры плавления олигонуклеотидов и определение степеней взаимодействий между ними определяли посредством инструмента Multiple Primer Analyzer («ThermoFisher Scientific»). С помощью программы BLASTn [22] оценивали специфичность каждой полученной последовательности ко всем известным организмам (в первую очередь человека, генетический материал которого был представлен в пробе в наибольшем количестве), что позволяло исключить неспецифическое взаимодействие праймера с участками ДНК человека и других организмов. Всего создано 5 олигонуклеотидных пар, содержащих также дополнительные адаптерные последовательности, которые необходимы для сокращения времени и стоимости пробоподготовки. Синтез произведён в ООО «НПФ Синтол» (Россия).

Структура праймеров приведена в **таблице**. Длины ампликонов подбирали таким образом, чтобы обеспечивать полное покрытие целевых участков при их высокопроизводительном секвенировании на платформах Illumina MiSeq с наборами реагентов MiSeq v2 (300 циклов), v2 (500 циклов) и v3 (600 циклов), а также Illumina HiSeq с использованием комплекта v2 Rapid SBS (500 циклов).

Для анализа данных секвенирования получаемые прочтения выравнивали на референсный геном коронавируса SARS-CoV-2 в программном обеспечении BWA [23]. Программу BBTools [24] применяли с целью тримминга адаптерных последовательностей в прочтениях. В качестве минимального допустимого покрытия принимали значение 5. Поиск генетических вариантов осуществляли с применением пакета программ GATK [25]. Последовательности, полученные в настоящем исследовании, были загружены в базу данных нуклеотидных последовательностей вируса SARS-CoV-2 и его мутаций VGARus (<https://genome.criie.ru/>).

В целях визуализации молекулы S-белка и создания рисунков применяли программный продукт VMD [26]. Использовали структурную модель S-белка (идентификационный код в банке данных Protein Data Bank (PDB) ID: 7CAB), полученную с помощью криоэлектронной микроскопии [27].

Результаты

Временной промежуток, в течение которого проводилось исследование в Московском регионе, совпал с периодом, когда во всём мире, включая Россию, началось активное распространение вызывающих настороженность штаммов SARS-CoV-2, что могло стать одной из причин новых волн заболеваемости в ряде стран.

Если в изолятах, полученных в феврале 2021 г., найдена лишь весьма небольшая (~2%) доля штамма альфа, то в марте его представленность возросла до ~20%, что вполне согласуется с данными о повышенной контагиозности этого штамма [28]. Однако в дальнейшем широкого распространения его не зарегистрировано, и эта величина постепенно снижалась, упав в середине июня практически до нуля. С наибольшей вероятностью это вызвано появлением в мае этого же года в РФ штамма дельта, ранее, возможно, ставшего причиной повышенных показателей заболеваемости и смертности среди населения Индии. К середине июня 2021 г. представленность данного штамма также резко выросла на территории Москвы (до 70%) и по данным, не вошедшим в представляемое исследование, с этого времени продолжает увеличиваться вплоть до >90%. Кроме того, в конце июня текущего года отмечены случаи заболевания штаммом дельта-плюс с дополнительной заменой K417N [29], встречавшейся ранее в штамме бета и находящейся также в одном из участков генома SARS-CoV-2, амплифицируемых при помощи разработанной праймерной панели (**рис. 2**).

Примечательно, что значительного распространения варианта бета на территории Москвы зарегистрирова-

но не было, хотя в апреле 2021 г. его доля быстро увеличилась до 13%, что вызвало определённую обеспокоенность среди населения. Это имело в своей основе сведения о том, что указанный штамм нового коронавируса частично избегает нейтрализующего действия АТ, выработавшихся вследствие как перенесённой ранее коронавирусной инфекции, так и вакцинации [30].

Помимо этого, следует отметить штамм В.1.1.523, представленность которого существенно выросла к маю 2021 г. Наличие у него мутации E484K указывало, что он (как и штамм бета) может быть более устойчив к воздействию АТ. Кроме того, этот вариант имеет изменения в S-белке – S494P и делецию 3 аминокислот. Впрочем, его доля тоже резко упала в июне этого же года, когда превалирующим стал вариант дельта. При этом нами не обнаружено случаев заболеваний, вызванных штаммом гамма (бразильский).

На **рис. 2** показана также динамика представленности вариантов вируса, имеющих мутации N501Y или E484K, но не отнесённых к какому-либо из указанных штаммов в силу отсутствия других необходимых для этого изменений в геноме.

Диаграммы на **рис. 3** показывают изменение частот распространённости отдельных мутаций, которые были показаны ранее как изменяющие свойства вируса и приводящие к повышенной трансмиссивности либо избеганию защитного действия АТ. Так, в феврале 2021 г. почти 15% всех изолятов содержали мутацию E484K, хотя на тот момент несущий эту замену штамм бета ещё не был обнаружен на территории России. Этот феномен

свидетельствует о том, что хотя подобное изменение в геноме может предоставлять патогену определённые преимущества, однако без других важных мутаций, значимые комбинации которых часто не ясны, оно не всегда ведёт к широкому распространению возбудителя. Последующие же месяцы отмечены ростом частоты нескольких мутаций, в том числе E484K, N501Y, S494P. В апреле 2021 г. за счёт появления в РФ штамма бета зарегистрировано повышение частоты мутации K417N, которая имеется также в варианте дельта-плюс, впервые обнаруженном на территории Российской Федерации лишь в конце июня этого же года. Наконец, мутации L452R и T478K, принадлежащие штамму дельта, появились в мае 2021 г. и сейчас присутствуют в подавляющем большинстве геномов SARS-CoV-2.

Представленные данные показывают, что применение небольшой праймерной панели для амплификации фрагментов генома нового коронавируса и последующего таргетного секвенирования позволяет выявлять практически все известные значимые изменения в гене S-белка коронавируса и идентифицировать штаммы возбудителя, делая возможным отслеживание их частоты (представленности) в определённые промежутки времени. В то же время необходимо подчеркнуть, что далеко не всегда отдельные мутации приводят к возникновению более контагиозного и эпидемиологически опасного варианта вируса и лишь сочетания мутационных изменений способны придавать новые свойства патогену, иногда обуславливая его широкое распространение.

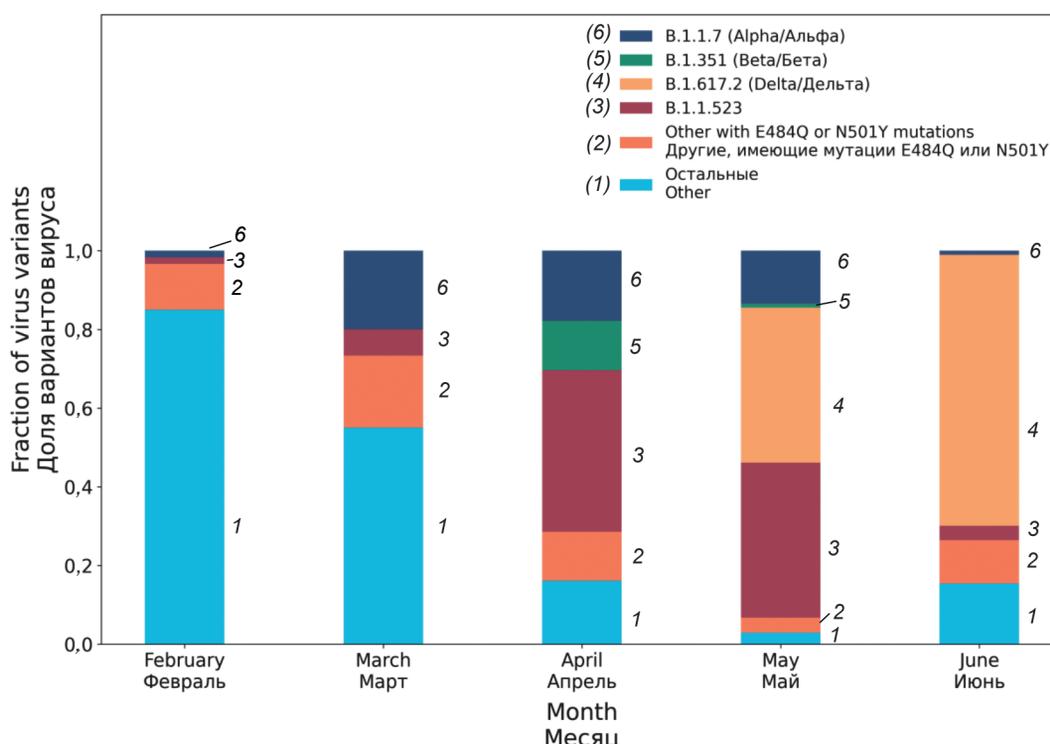


Рис. 2. Представленность различных вариантов вируса SARS-CoV-2 с февраля по июнь 2021 г. на территории Москвы и Московской области.

Fig. 2. Representation of various variants of SARS-CoV-2 from February to June 2021 in Moscow and the Moscow Region.

Обсуждение

В этой методологической работе мы описали возможность выявления ряда штаммов SARS-CoV-2, включая варианты альфа (британский, B.1.1.7), бета (южноафриканский, B.1.351), гамма (бразильский, P.1), дельта (индийский, B.1.617.2), с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования нового (следующего) поколения. Для этих целей нами разработана праймерная панель (таблица), позволяющая эффективно проводить целевую амплификацию геномных фрагментов нового коронавируса. Амплифицируемые участки включают большое число известных важных мутаций, изменяющих свойства

вируса, что позволяет кардинально снизить расходы на секвенирование и исследовать большее количество образцов. Последнее вполне оправдано, если необходимо именно выявление значимых изменений в гене S-белка для определения принадлежности изолятов вируса к различным штаммам. Чтобы продемонстрировать использование праймерной панели на практике, мы провели также исследование 579 случайных образцов SARS-CoV-2, отобранных на протяжении февраля–июня 2021 г. у пациентов Москвы и Московской области. Представляется важным, что большинство важных изменений в гене S-белка локализованы в ряде небольших его фрагментов, кодирующих в ос-

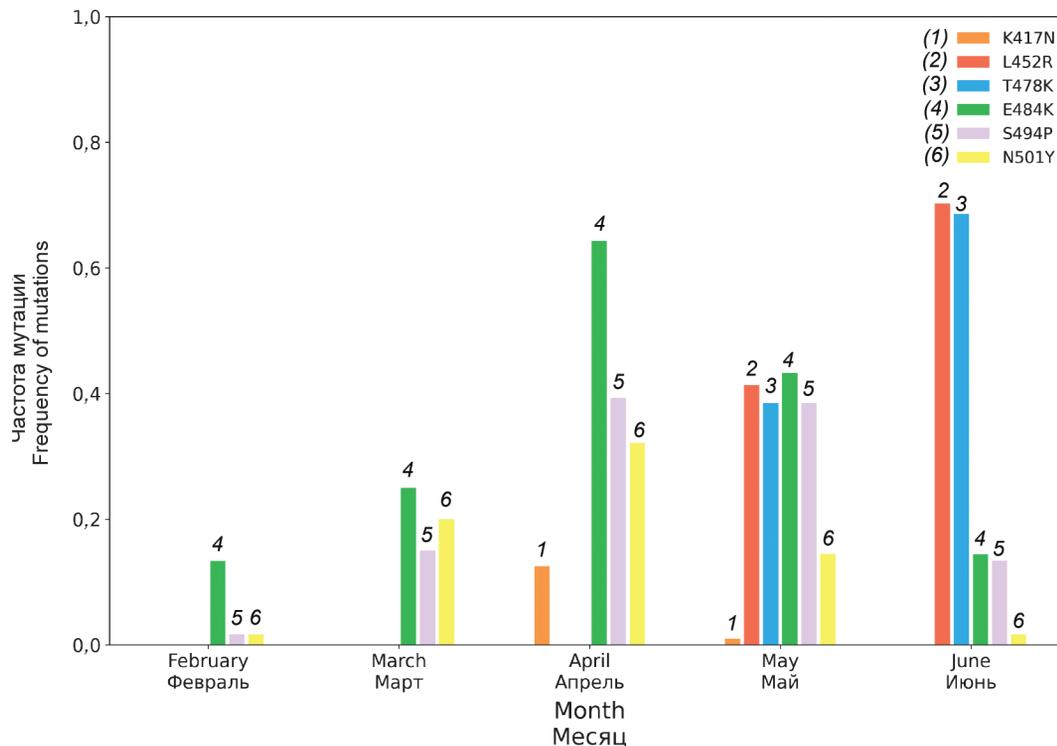


Рис. 3. Частота отдельных мутаций вируса SARS-CoV-2 в разные месяцы 2021 г. на территории Москвы и Московской области.
 Fig. 3. Frequency of individual SARS-CoV-2 mutations in different months of 2021 in Moscow and the Moscow Region.

Последовательности олигонуклеотидов в праймерной панели Sequences of oligonucleotides in the primer panel

Идентификатор олигонуклеотида Oligonucleotide ID	Последовательность олигонуклеотида Oligonucleotide sequence
F1	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-TGT TTT TCT TGT TTT ATT GCC ACT AGT CTC-3'
R1	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-TC TTA TGT TAG ACT TCT CAG TGG AAG CA-3'
F2	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-GCT GGA TTT TTG GTA CTA CTT TAG ATT CG-3'
R2	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-AA TCT ACC AAT GGT TCT AAA GCC GAA AAA C-3'
F3	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-GCT CCA GGG CAA ACT GGA AA-3'
R3	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CT GTA TGG TTG GTA ACC AAC ACC AT-3'
F4	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-CCA ACA ATT TGG CAG AGA CAT TG-3'
R4	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CGC CAA GTA GGA GTA AGT TGA TCT G-3'
F5	5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-AAA CAC GTG CAG GCT GTT TAA TAG G-3'
R5	5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G-CT ACT GAT GTC TTG GTC ATA GAC ACT GG-3'

Примечание. Специфические фрагменты отделены от адаптеров символом «-».

Note. Specific fragments are separated from adapters with a «-» symbol.

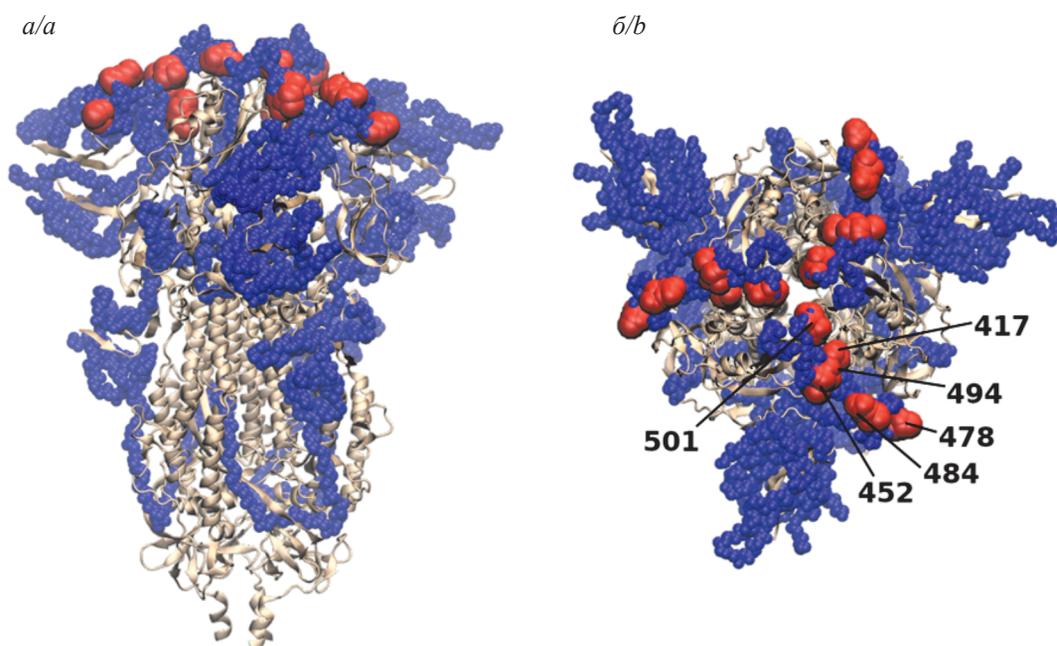


Рис. 4. Структурная модель S-белка, полученная с использованием криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 7CAB). *а)* – вид сбоку, *б)* – вид сверху.

Примечание. Числами от 417 до 501 обозначены аминокислотные остатки в соответствующих позициях. Регионы, вошедшие в праймерную панель, подсвечены синим цветом и показаны в виде небольших сфер. Значимые мутации (K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y) показаны красным цветом как сферы большего диаметра и указаны на рисунке (*б*).

Fig. 4. Structural model of S-protein obtained using cryo-electron microscopy (PDB ID: 7CAB). View from the side (*a*) and from above (*b*).

Note. The numbers from 417 to 501 indicate the amino acid residues in the corresponding positions. The regions included in the primer panel are highlighted in blue and shown as small spheres. Significant mutations (K417T, L452R, T478K, E484K, S494P, N501Y) are shown in red as larger spheres and are indicated in figure (*b*).

новном расположенные на поверхности аминокислоты (**рис. 4**). Настоящая работа дополнительно иллюстрирует необходимость активизации популяционных, геномных и эпидемиологических исследований по выявлению, отслеживанию распространения и мониторингу новых вариантов вирусных патогенов.

Мы показали быстрое изменение доли различных генетических вариантов возбудителя COVID-19 в указанный период, включая появление и активное распространение на территории Москвы и Московской области на протяжении мая–июня 2021 г. штамма дельта, потенциально частично ответственного за новую волну заболевания в Москве летом текущего года. Тем не менее пренебрежение со стороны населения мерами социального дистанцирования, индивидуальной защиты и низкий уровень вакцинации также играют важнейшую роль в распространении инфекции. Таким образом, проделанная работа дополнительно иллюстрирует необходимость активизации популяционных, геномных и эпидемиологических исследований по выявлению, отслеживанию распространения и мониторингу как новых вариантов SARS-CoV-2, так и других вирусных агентов, характеризующихся повышенной изменчивостью.

Хотя нельзя исключить, что новые значимые геномные варианты затронут другие важные фрагменты генетического материала вируса, использование панели с небольшим количеством праймеров обеспечивает

кардинальное сокращение затрат на выявление циркулирующих в настоящее время штаммов, а простой дизайн позволяет быстро изменять структуру олигонуклеотидов с учётом постоянно появляющейся новой информации о геномах. Следует отдельно отметить, что таргетное секвенирование не может полностью заменить полногеномное, позволяющее выявлять все изменения в геноме и проводить детальный филогенетический анализ. Для подробного биоинформатического анализа специалисты могут обратиться к недавно созданной базе данных геномов коронавируса VGARus, в которой на конец июня 2021 г. уже содержалось ~15 тыс. последовательностей, включая ~8 тыс. полных геномов, которые получены секвенированием собранных в различных регионах РФ изолятов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. COVID-19 data in motion. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu> (accessed July 24, 2021).
3. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 229–37. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2029849>
4. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoire R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035002>

5. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
6. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>
7. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00191-4)
8. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., и др. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II). *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11(2): 283–96. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>
9. About Variants of the Virus that Causes COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/Transmission/variant.html> (accessed July 26, 2021).
10. Wang W.B., Liang Y., Jin Y.Q., Zhang J., Su J.G., Li Q.M. E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: binding free energy calculation studies. *bioRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431566>
11. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., St. Denis K., Nitido A.D., Garcia Z.H., Hauser B.M., et al. Circulating SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *medRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.21251704>
12. Liu H., Wei P., Zhang Q., Chen Z., Aviszus K., Downing W., et al. 501Y.V2 and 501Y.V3 variants of SARS-CoV-2 lose binding to bamlanivimab *in vitro*. *MAbs.* 2021; 13(1): 1919285. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1919285>
13. Yuan M., Huang D., Lee C.D., Wu N.C., Jackson A.M., Zhu X., et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science.* 2021; eabh1139. <https://doi.org/10.1126/science.abh1139>
14. Ikegame S., Siddiquey M.N.A., Hung C.-T., Haas G., Brambilla L., Oguntuyo K.Y., et al. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. *medRxiv.* 2021.03.31.21254660. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254660>
15. Gard N., Buzko O., Spilman P., Niazi K., Rabizadeh S., Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant *bioRxiv.* 2021.01.13.426558. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>
16. Tian F., Tong B., Sun L., Shi S., Zheng B., Wang Z., et al. Mutation N501Y in RBD of spike protein strengthens the interaction between COVID-19 and its receptor ACE2. *bioRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431117>
17. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
18. Gladkikh A., Dolgova A., Dedkov V., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Popova A., et al. Characterization of a novel SARS-CoV-2 genetic variant with distinct spike protein mutations. *Viruses.* 2021; 13(6): 1029. <https://doi.org/10.3390/v13061029>
19. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabitava E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia. *medRxiv.* 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.05.25.21257695>
20. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
21. Long S.W., Olsen R.J., Christensen P.A., Subedi S., Olson R., Davis J.J., et al. Sequence Analysis of 20,453 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genomes from the Houston Metropolitan Area Identifies the Emergence and Widespread Distribution of Multiple Isolates of All Major Variants of Concern. *Am. J. Pathol.* 2021; 191(6): 983–92. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.03.004>
22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25(14): 1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
24. Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
25. Poplin R., Ruano-Rubio V., DePristo M.A., Fennell T.J., Carneiro M.O., Van der Auwera G.A., et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv.* 2018; 2011178. doi: <https://doi.org/10.1101/2011178>
26. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996; 14(1): 33–8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
27. Lv Z., Deng Y.Q., Ye Q., Cao L., Sun C.Y., Fan C., et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science.* 2020; 369(6510): 1505–9. <https://doi.org/10.1126/science.abc5881>
28. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science.* 2021; 372(6538): eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
29. Expert comment on the ‘Delta plus’ variant (B.1.617.2 with the addition of K417N mutation). Available at: <https://www.sciencemediacentre.org/expert-comment-on-the-delta-plus-variant-b-1-617-2-with-the-addition-of-k417n-mutation/> (accessed July 26, 2021).
30. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 22 June 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-june-2021> (accessed July 24, 2021).

REFERENCES

1. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
2. COVID-19 data in motion. Available at: <https://coronavirus.jhu.edu> (accessed July 24, 2021).
3. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., et al. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 229–37. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2029849>
4. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoore R., et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(3): 238–51. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035002>
5. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
6. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2034577>
7. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet.* 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00191-4)
8. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Dаниленко Е.Д., Нечаева Е.А., et al. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (phase I–II) [*Prostoe slepoe plasebo-kontroliruemoe randomizirovannoe issledovanie bezopasnosti, reaktogenosti i immunogenosti vaksiny «EpiVak-Korona» dlya profilaktiki COVID-19 na dobrovol'tsakh v vozraste 18–60 let (faza I–II)*]. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(2): 283–96. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699> (in Russian)
9. About Variants of the Virus that Causes COVID-19. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/Transmission/variant.html> (accessed July 26, 2021).

10. Wang W.B., Liang Y., Jin Y.Q., Zhang J., Su J.G., Li Q.M. E484K mutation in SARS-CoV-2 RBD enhances binding affinity with hACE2 but reduces interactions with neutralizing antibodies and nanobodies: binding free energy calculation studies. *bioRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431566>
11. Garcia-Beltran W.F., Lam E.C., St. Denis K., Nitido A.D., Garcia Z.H., Hauser B.M., et al. Circulating SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity. *medRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.21251704>
12. Liu H., Wei P., Zhang Q., Chen Z., Aviszus K., Downing W., et al. 501Y.V2 and 501Y.V3 variants of SARS-CoV-2 lose binding to bamlanivimab *in vitro*. *MAbs*. 2021; 13(1): 1919285. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1919285>
13. Yuan M., Huang D., Lee C.D., Wu N.C., Jackson A.M., Zhu X., et al. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants. *Science*. 2021; eabh1139. <https://doi.org/10.1126/science.abh1139>
14. Ikegame S., Siddiquey M.N.A., Hung C.-T., Haas G., Brambilla L., Oguntuyo K.Y., et al. Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants. *medRxiv*. 2021.03.31.21254660. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.03.31.21254660>
15. Gard N., Buzko O., Spilman P., Niazi K., Rabizadeh S., Soon-Shiong P. Molecular dynamic simulation reveals E484K mutation enhances spike RBD-ACE2 affinity and the combination of E484K, K417N and N501Y mutations (501Y.V2 variant) induces conformational change greater than N501Y mutant alone, potentially resulting in an escape mutant *bioRxiv*. 2021.01.13.426558. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426558>
16. Tian F., Tong B., Sun L., Shi S., Zheng B., Wang Z., et al. Mutation N501Y in RBD of spike protein strengthens the interaction between COVID-19 and its receptor ACE2. *bioRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431117>
17. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification [*Ekspress-diagnostics novoy koronavirusnoy infektsii s pomoshch'yu reaktsii petlevoy izotermicheskoy amplifikatsii*]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42> (in Russian)
18. Gladkikh A., Dolgova A., Dedkov V., Sbarzaglia V., Kanaeva O., Popova A., et al. Characterization of a novel SARS-CoV-2 genetic variant with distinct spike protein mutations. *Viruses*. 2021; 13(6): 1029. <https://doi.org/10.3390/v13061029>
19. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabeieva E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia. *medRxiv*. 2021; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.05.25.21257695>
20. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
21. Long S.W., Olsen R.J., Christensen P.A., Subedi S., Olson R., Davis J.J., et al. Sequence Analysis of 20,453 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Genomes from the Houston Metropolitan Area Identifies the Emergence and Widespread Distribution of Multiple Isolates of All Major Variants of Concern. *Am. J. Pathol*. 2021; 191(6): 983–92. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.03.004>
22. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990; 215(3): 403–10. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2)
23. Li H., Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14): 1754–60. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
24. Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLoS One*. 2017; 12(10): e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
25. Poplin R., Ruano-Rubio V., DePristo M.A., Fennell T.J., Carneiro M.O., Van der Auwera G.A., et al. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv*. 2018; 201178. doi: <https://doi.org/10.1101/201178>
26. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*. 1996; 14(1): 33–8, 27–8. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
27. Lv Z., Deng Y.Q., Ye Q., Cao L., Sun C.Y., Fan C., et al. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody. *Science*. 2020; 369(6510): 1505–9. <https://doi.org/10.1126/science.abc5881>
28. Davies N.G., Abbott S., Barnard R.C., Jarvis C.I., Kucharski A.J., Munday J.D., et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Science*. 2021; 372(6538): eabg3055. <https://doi.org/10.1126/science.abg3055>
29. Expert comment on the 'Delta plus' variant (B.1.617.2 with the addition of K417N mutation). Available at: <https://www.sciencemediacentre.org/expert-comment-on-the-delta-plus-variant-b-1-617-2-with-the-addition-of-k417n-mutation/> (accessed July 26, 2021).
30. Weekly epidemiological update on COVID-19 – 22 June 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---22-june-2021> (accessed July 24, 2021).

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил

Гайдай Е.А.¹, Крышень К.Л.¹, Джайн (Корсакова) Е.А.³, Демченко Д.В.², Каргопольцева Д.Р.¹, Кательникова А.Е.¹, Гайдай Д.С.¹, Балабаньян В.Ю.³

¹АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия;

²ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, Москва, Россия

Введение. В настоящее время комбинированная антиретровирусная терапия (АРТ) является основным компонентом лечения пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). Вместе с тем высокий мутационный потенциал возбудителя и частота проявления побочных эффектов существующих препаратов диктуют необходимость разработки и доклинического изучения новых более эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС).

Цель исследования – комплексная оценка специфических видов токсичности нового нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (ревертазы, РНК-зависимой ДНК-полимеразы) (ННИОТ) вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил, производного бензофенона.

Материал и методы. В работе изучены репродуктивная токсичность, эмбрио-, иммунотоксичность, а также генотоксические (в тестах учёта микроядер в эритроцитах крови и ДНК-комет) и аллергизирующие свойства указанной субстанции (в тестах реакций общей анафилаксии (РОА), активной кожной анафилаксии (АКА) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)). Соединение протестировано на 3 видах животных в 2 дозах: предполагаемой терапевтической (1 ТД) и её 10-кратном эквиваленте (10 ТД). С учётом метаболических коэффициентов для крыс (*Rattus*) дозы составили 9 и 90 мг/кг, для мышей (*Mus musculus*) 21 и 210 мг/кг, для морских свинок (*Cavia porcellus*) – 8 и 80 мг/кг соответственно.

Результаты и обсуждение. По итогам исследований установлен благоприятный профиль безопасности тестируемого объекта. Не выявлено его негативного влияния на иммунную систему, репродуктивную функцию, организм беременных животных и плод; препарат в эксперименте не обладал генотоксическими и аллергизирующими свойствами.

Заключение. Полученные данные позволяют рассматривать исследуемую субстанцию в качестве перспективного терапевтического кандидата для лечения инфекции, вызываемой ВИЧ-1.

Ключевые слова: ВИЧ-1; бензофенон; доклинические исследования; иммунотоксичность; репродуктивная токсичность; эмбриотоксичность; генотоксичность; аллергия; крысы; мыши; морские свинки

Для цитирования: Гайдай Е.А., Крышень К.Л., Джайн (Корсакова) Е.А., Демченко Д.В., Каргопольцева Д.Р., Кательникова А.Е., Гайдай Д.С., Балабаньян В.Ю. Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 279-288. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

Для корреспонденции: Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук, руководитель отдела токсикологии и микробиологии, АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 188663, Ленинградская область, пос. Кузьмолловский, Россия. E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru

Участие авторов: Гайдай Е.А. – проведение экспериментов, сбор данных, подготовка текста; Крышень К.Л. – планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание текста; Джайн (Корсакова) Е.А. – анализ данных, подбор и анализ литературы, написание текста; Демченко Д.В. – анализ данных, обсуждение результатов; Каргопольцева Д.Р. – анализ данных, обсуждение результатов; Кательникова А.Е. – анализ данных, обсуждение результатов; Гайдай Д.С. – анализ данных, обсуждение результатов; Балабаньян В.Ю. – разработка концепции и дизайна исследований, обсуждение результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования России (Государственный контракт № 14.N08.11.0154 от 02 июня 2017 г.; уникальный идентификатор контракта RF-N0817X0148).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. 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 30.03.2021

Принята к печати 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase

Elena A. Gaidai¹, Kirill L. Kryshen¹, Ekaterina A. Jain (Korsakova)³, Dmitry V. Demchenko², Dilara R. Kargopol'tseva¹, Anastasiya E. Katel'nikova¹, Dmitry S. Gaidai¹, Vadim Yu. Balabanyan³

¹«RMC HOME OF PHARMACY» JSC, 188663, Leningrad Region, Kuz'molovsky vill., Russia;

²CJSC «St. Petersburg Institute of Pharmacy», 188663, Leningrad Region, Kuz'molovsky vill., Russia;

³FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University», 119991, Moscow, Russia

Introduction. Combination antiretroviral therapy is currently the main component of treatment for human immunodeficiency virus (HIV) infected patients. At the same time, the high mutational potential of the virus and the frequency of side effects of existing drugs dictate the need for the development and preclinical study of new, more effective and safer compounds.

The **aim** of the study is to evaluate the specific types of toxicity of a new non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RNA-dependent DNA revertase) (NNRTI) based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, a benzophenone derivative.

Material and methods. The study investigated reproductive toxicity, embryotoxicity, immunotoxicity, genotoxic (in micronucleus test in and comet assay) and allergenic properties of the test item compound. It was tested on three species of animals in two doses: the estimated therapeutic dose (1 TD) and its tenfold equivalent (10 TD). Taking into account the metabolic coefficients, the doses for rats (*Rattus*) were 9 and 90 mg/kg, for mice (*Mus musculus*), 21 and 210 mg/kg, and for guinea pigs (*Cavia porcellus*), 8 and 80 mg/kg, respectively.

Results and discussion. According to the obtained results, a favorable safety profile of the tested compound was established. Negative effects on the immune system, reproductive function, the body of pregnant animals and the fetus were not observed, as well as the compound did not have genotoxic and allergenic properties.

Conclusion. These data allows to consider the studied compound as a promising therapeutic candidate for the treatment of HIV-1 infection.

Key words: HIV-1; benzophenone; preclinical studies; immunotoxicity; reproductive toxicity; embryotoxicity; genotoxicity; allergy; rats; mice; guinea pigs

For citation: Gaidai E.A., Kryshen' K.L., Jain (Korsakova) E.A., Demchenko D.V., Kargopol'tseva D.R., Katel'nikova A.E., Gaidai D.S., Balabanyan V.Yu. Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae; Orthoretrovirinae; Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 279-288 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-59>

For correspondence: Kryshen' K.L., Ph.D. (Biol.), Head of the Toxicology and Microbiology Department, «RMC HOME OF PHARMACY» JSC, 188663, Russia, Leningrad Region, Kuz'molovsky vill., Russia.
E-mail: kryshen.kl@doclinika.ru

Information about the authors:

Gaidai E.A., <http://orcid.org/0000-0002-5295-6384>

Kryshen' K.L., <http://orcid.org/0000-0003-1451-7716>

Jain (Korsakova) E.A., <http://orcid.org/0000-0003-0283-8598>

Demchenko D.V., <http://orcid.org/0000-0003-3856-3936>

Kargopol'tseva D.R., <http://orcid.org/0000-0002-9944-5223>

Katel'nikova A.E., <http://orcid.org/0000-0003-3203-9869>

Gaidai D.S., <http://orcid.org/0000-0002-8773-5717>

Balabanyan V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

Contribution: Gaidai E.A. – conducting of the experiments, data collecting, preparing of the text, Kryshen' K.L. – planning and conducting of the experiments, data analysis, writing of the text; Jain (Korsakova) E.A. – data analysis, literature analysis, writing of the text; Demchenko D.V. – data analysis, discussion of the results; Kargopol'tseva D.R. – data analysis, discussion of the results; Katel'nikova A.E. – data analysis, discussion of the results; Gaidai D.S. – data analysis, discussion of the results; Balabanyan V.Yu. – working out the research concept and design, discussion of the results.

Funding. The work was carried out with a financial support from the Ministry of Education and Science of Russia (State contract No. 14.N08.11.0154 dated June 02, 2017; unique contract identifier RF-N0817X0148).

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

Ethics approval. 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 organization.

Received 30 March 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (*Retroviridae*; *Orthoretrovirinae*; *Lentivirus*; *Human immunodeficiency virus* (HIV)) является этиологическим фактором одного из наиболее широко распространённых и опасных для жизни человека состояний – синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД). По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в конце 2019 г. в мире насчитывалось ~50 млн ВИЧ-инфицированных (людей, живущих с ВИЧ), из которых ~29 млн получали антиретровирусную терапию (АРТ). Число ВИЧ-позитивных лиц, проживающих в Российской Федерации, в 2020 г. приблизилось к 1,5 млн (1 452 942 согласно официальной статистике Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) [1].

В настоящее время АРТ включает комбинированное применение следующих групп препаратов: ингибиторы протеазы и интегразы ВИЧ-1; ингибиторы фузии (слияния); ингибиторы хемокиновых рецепторов; ингибиторы обратной транскриптазы (ОТ). При этом ОТ представляет собой одну из наиболее важных мишеней фармакотерапевтического воздействия на вирус, а среди лекарственных средств (ЛС), ингибирующих действие данного фермента, преобладают ненуклеозидные ингибиторы ОТ (ННИОТ). Этот класс препаратов отличается высокой противовирусной активностью и относительно хорошей переносимостью [2]. Тем не менее значительный мутационный потенциал ВИЧ-1 и появление резистентных штаммов вируса диктуют необходимость дальнейшего поиска и создания ННИОТ различной химической структуры для применения в широкой клинической практике.

Работы, проведённые на кафедре фармацевтической и токсикологической химии в НИИ фармакологии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» (ВолгГМУ) Минздрава России в сотрудничестве с учёными Института моле-

кулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Федерального агентства организаций науки (ФАНО) России, исследователями из Соединённых Штатов Америки (США) и Западной Европы (фармацевтическая компания ImQuest BioSciences Inc., США; Rega Institute for Medical Research, Бельгия) имели результатом открытие нового класса ННИОТ, проявляющих антиретровирусную активность *in vitro* в наномолярном диапазоне концентраций. По химической классификации соединения относятся к N-алкилзамещённым производным пиримидиновых и пуриновых оснований, содержащим терминальные ненасыщенные и ароматические фрагменты [3]. Сравнительное исследование цитотоксичности и противовирусной активности позволило выделить производные бензофенона, имеющие в составе двухъядерный ароматический фрагмент на конце ациклической цепи в N1-замещённых урацилах, в качестве наиболее перспективных терапевтических кандидатов [4]. Среди молекул из группы пиримидиновых производных бензофенона было отобрано соединение-лидер – 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил.

Цель исследования – комплексная оценка специфических видов токсичности лекарственного препарата на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил для лечения инфекции, вызываемой ВИЧ-1.

Материал и методы

В ходе работы проведено экспериментальное исследование по изучению репродуктивной токсичности, эмбрио- и иммунотоксичности, генотоксических и аллергизирующих свойств ЛС на основе пиримидинового производного бензофенона – субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил (**рис. 1**). Эксперименты проведены на лабораторных животных вивария АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» с соблюдением положений Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях [5]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответ-

ствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Все исследования рассмотрены локальной биоэтической комиссией организации и одобрены для проведения. Протоколы исследований также одобрены данной комиссией (изучение иммунотоксичности: протокол № 1.3/18 от 17.01.2018; изучение репродуктивной токсичности (генеративная): протокол № 4.5/18 от 22.01.2018; изучение эмбриотоксичности: протокол № 1.16/18 от 14.03.2018; изучение аллергизирующих свойств: протокол № 1.13/18 от 02.03.2018; изучение генотоксичности: протоколы № 4.3/18 от 17.01.2018 (тест учёта микроядер), № 3.3/18 от 17.01.2018 (ДНК-комет-тест)). Использовали крыс-альбиносов (*Rattus*) (90 самцов и 290 самок в рамках изучения репродуктивной токсичности, эмбриотоксического и канцерогенного действия); мышей-альбиносов (*Mus musculus*) (95 самцов, 80 самок) с целью изучения генотоксических свойств и реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), дающей представление о характере аллергизирующего действия; мышей линии BALB/c для определения иммунотоксичности – 90 самцов и 90 самок, а также морских свинок (*Cavia porcellus*) в количестве 68 самцов и 48 самок для оценки аллергизирующих свойств в тестах реакций общей анафилаксии (РОА) и активной кожной анафилаксии (АКА). Контрольным веществом служило плацебо тестируемого агента. ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил протестировано в 2 дозах: предполагаемой терапевтической (1 ТД) и её 10-кратном эквиваленте (10 ТД). С учётом метаболических коэффициентов для крыс дозы составили 9 и 90 мг/кг, для мышей 21 и 210 мг/кг, для морских свинок – 8 и 80 мг/кг соответственно.

Все тесты проведены в соответствии со стандартными методиками [6–10]. Исследуемый препарат вводили внутривентриально с помощью атравматичного зонда. Подобный способ введения был выбран как аналог перорального, планируемого в клинической практике. Продолжительность и схема введения различались в зависимости от типа исследования и были регламентированы нормативными документами [6–10].

В ходе изучения репродуктивной токсичности группы животных были сформированы таким образом, чтобы тестируемое вещество получали только самцы или только самки. После периода введения особей, получавших препарат, скрещивали с интактными самками или самцами соответственно. Была сформирована также группа плацебо, где животных скрещивали между собой. Оценивали общее клиническое состояние животных, динамику массы тела, летальность, эффективность оплодотворения (путём определения индексов плодовитости, беременности, а также оплодотворяющей способности самцов). У самцов изучали спермограмму (концентрацию, процентное соотношение живых, мёртвых и незрелых сперматозоидов; соотношение подвижных и неподвижных клеток). У самок оценивали протекание беременности (по приросту массы тела), ориентировочно-исследовательскую активность и эмоциональный статус, а также пренатальное развитие плодов (посредством расчёта

пред- и постимплантационной смертности) и постнатальное развитие потомства: общее физическое состояние в соответствии с возрастом; степень физического развития; скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов; формирование эмоционально-двигательного поведения и способности к тонкой координации движений. Кроме того, выполняли гистологический анализ органов репродуктивной системы самцов (семенников и придатков) и самок (матки и яичников).

Оценка эмбриотоксичности включала в себя изучение общего клинического состояния животных, протекания беременности на фоне терапии тестируемым препаратом или плацебо, пре- и постнатального развития потомства (по аналогии с репродуктивной токсичностью). Осуществляли также гистологическое исследование плодов (степень развития скелета и внутренних органов) и репродуктивных органов самок.

Генотоксические свойства изучали в тестах учёта микроядер в эритроцитах крови и ДНК-комет. Первый из них заключается в оценке количества микроядер в полихроматофильных (ПХЭ) и нормохроматофильных эритроцитах (НХЭ) периферической крови мышей после курсового введения исследуемого вещества. В данный эксперимент была включена дополнительная контрольная группа, в которой особям вводили однократно внутривентриально соединение, индуцирующее образование эритроцитов с микроядрами, – циклофосфамид в дозе 50 мг/кг.

В основе ДНК-комет-теста лежит регистрация подвижности в постоянном электрическом поле молекул и/или фрагментов ДНК клеток, заключённых в агарозный гель. При этом молекулы нуклеиновой кислоты мигрируют к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы. Длина и содержание в нём ДНК зависят от количества одно- и двунитевых разрывов её молекул, а также щёлочнолабильных сайтов. Методика позволяет оценивать повреждения генетического материала на уровне от-

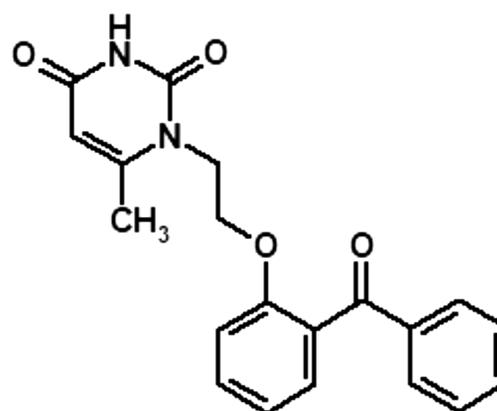


Рис. 1. Структурная формула 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацила.

Fig. 1. Structural formula of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil.

дельных клеточных элементов; она обладает высокой чувствительностью, требует минимального количества экспериментального материала и применима ко всем типам клеток, содержащих ДНК. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали её процентное содержание в хвосте кометы [10]. В рамках данного исследования изучали клетки костного мозга, печени, почек, селезенки и головного мозга самцов и самок крыс. Веществом позитивного контроля, индуцирующим повреждение нуклеиновой кислоты, служил супермутаген этилметансульфонат (ЭМС) в дозе 200 мг/кг.

Аллергизирующие свойства анализируемого соединения изучали в 3 тестах. Для оценки реакции немедленного типа были выбраны тесты РОА и АКА на самцах и самках морских свинок; оценку реакции замедленного типа проводили в тесте определения ГЗТ на аутбредных самцах и самках мышей. Данные пробы входят в перечень методов выявления сенсибилизации, технически просты и хорошо воспроизводимы. Сенсибилизацию животных выполняли тестируемым веществом и плацебо при 3-кратном внутрижелудочном способе введения в тестах РОА и АКА. В качестве разрешающей дозы использовали раствор субстанции ЛС в концентрации 0,1 мг/мл в растворе 100% диметилсульфоксида (ДМСО) + 60% полиэтиленгликоля ПЭГ-400. Разрешающую инъекцию проводили путём внутрисердечного введения в РОА. Оценку результатов осуществляли посредством вычисления анафилактического индекса Вейгля [11], отражающего интенсивность реакции в группе. В тесте АКА на стадии разрешения внутрикожно в 3 точки вводили раствор субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокс)этил]-6-метилурацил. Для контроля реактивности в область другого участка кожи аналогичным образом производили инъекцию растворителя субстанции исследуемого препарата. Через 20 мин после этого животным всех групп вводили по 0,5 мл 1% раствора синего Эванса внутрисердечно для распределения красителя через системный кровоток по органам и тканям и окрашивания мест разрешающей инъекции.

Спустя 30 мин после введения раствора синего Эванса животных эвтаназировали, вскрывали и определяли диаметр синего пятна на внутренней стороне кожи в области введения препарата. Реакцию считали положительной, если указанная величина превышала 6 мм.

Постановка реакции ГЗТ предполагала однократное внутрижелудочное введение тестируемого соединения и плацебо с выявлением сенсибилизации через 5 сут путём инъекции субстанции анализируемого вещества в разрешающей концентрации под плантарный апоневроз тазовой конечности. Через 24 ч после введения животных эвтаназировали, тазовые конечности отсекали по уровню тарзотибиального сустава, взвешивали и определяли индекс реакции, характеризующий величину отёка, по которой можно сделать заключение об интенсивности развития ГЗТ [6].

Исследование иммунотоксического действия осуществляли также в 3 тестах. Влияние на гуморальный

иммунный ответ определяли по анализу титра антител (АТ) в ответ на инъекцию суспензии эритроцитов барана (ЭБ). Данную суспензию вводили внутривентриально для иммунизации, через 7 сут после этого проводили оценку титра АТ в сыворотке крови.

Анализ клеточного иммунного ответа оценивали в реакции ГЗТ к гаптену динитрохлорбензолу (ДНХБ). Экспериментальных животных иммунизировали 2% раствором этого вещества подкожно в межлопаточную область. Затем через 5 сут иммунизированным мышам под апоневроз задней конечности вводили 0,1% раствор ДНХБ. Спустя 1 сут после разрешающей инъекции животных эвтаназировали, тазовые конечности отсекали по тарзотибиальному суставу и далее определяли индекс реакции по разнице массы исследуемой и контрольной (интактной) конечностей.

Оценку неспецифического звена иммунитета выполняли по поглощению перитонеальными макрофагами мышей частиц латекса, меченных флуоресцентным красителем FITC (fluorescein isothiocyanate) («ThermoFisher Scientific», США). Для выделения макрофагов мышам однократно внутривентриально вводили 3% тиогликолевую среду; через 3 сут проводили забор перитонеального экссудата. Расчёт индекса фагоцитарной активности осуществляли по поглощению макрофагами латексных частиц диаметром 1 мкм, конъюгированных с FITC.

В соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г. всех животных эвтаназировали помещением в CO₂-камеру в условиях постепенного заполнения её диоксидом углерода. Данный вид эвтаназии сопровождается минимальной степенью болевых ощущений, страдания и выраженности дистресса.

Результаты обрабатывали статистически в программном обеспечении Statistica 10.0 (StatSoft, США). Для оценки показателей применяли параметрические и непараметрические методы анализа в зависимости от типа распределения данных. Определяли среднее значение (M), статистическую ошибку среднего значения (m), медиану (Me), межквартильный интервал ($Q1$; $Q3$). С целью обработки результатов с признаками нормального распределения использовали однофакторный дисперсионный анализ (analysis of variance, ANOVA), а также дисперсионный анализ с повторными измерениями и последующим межгрупповым сравнением при помощи теста Тьюки. Для показателей, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Краскела–Уоллиса с дальнейшим межгрупповым сравнением средних рангов. Различия определяли как достоверные при уровне значимости (p), равном 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов по изучению репродуктивной токсичности (влияние на генеративную функцию) показано, что тестируемое соединение на осно-

ве субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не оказывало отрицательного воздействия на генеративную функцию самцов и самок аутбредных крыс при многократном внутривидовом введении. Данный препарат в 2 исследованных дозах (1 и 10 ТД) не ухудшал оплодотворяющую способность самцов и плодовитость самок этих животных, не влиял на строение и функционирование репродуктивной системы у особей обоих полов (рис. 2). Кроме того, не установлено эмбрио- и фетотоксического действия препарата, а также отрицательного влияния на пред- и постимплантационную смертность. Наконец, не выявлено его негативного воздействия на физическое и зоопсихологическое развитие потомства.

При оценке эмбрио- и фетотоксического действия ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил показано отсутствие негативного воздействия на общее состояние беременных са-

мок крыс, эмбрио-, фетотоксических и тератогенных свойств (рис. 3), а также отрицательного влияния на пред- и постимплантационную смертность. Тестируемый препарат не вызвал увеличения уровня смертности потомства, а также не влиял на физическое и зоопсихологическое развитие выживших детёнышей.

По результатам оценки генотоксического действия изучаемое вещество в дозах 1 и 10 ТД не обладало мутагенной активностью в микроядерном тесте в эритроцитах мышей. В группе негативного контроля показатели количества НХЭ и ПХЭ с микроядрами находились в пределах нормальных значений (1–2% с учётом погрешности измерений) [6, 9]. Межгрупповой анализ данных показал значимое увеличение содержания клеток с микроядрами, а также процентного соотношения ПХЭ/НХЭ у животных, получивших однократно внутривидово циклофосфамид, по сравнению с особями группы плацебо (табл. 1). Этот факт свидетельствует о корректной постановке эксперимен-

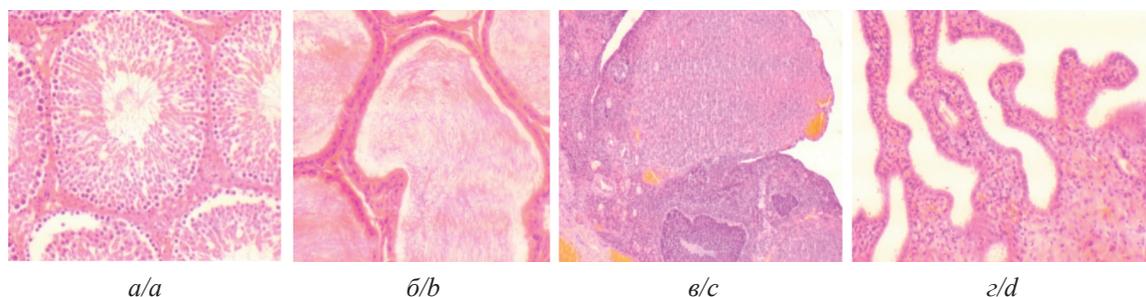


Рис. 2. Гистологические препараты репродуктивных органов крыс, получавших препарат на основе 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в дозе 10 ТД.

a – срез семенника самца; *b* – срез придатка семенника самца; *в* – срез яичника самки (определяются преимущественно жёлтые тела); *г* – срез матки самки (картина эндометрия при беременности). Во всех образцах патологические изменения отсутствуют. Микрофотографии, окраска гематоксилин-эозином, увеличение $\times 40$ –100.

Fig. 2. Histological slides of the reproductive system of rats treated with the drug based on 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil at 10 TD dose.

a, section of a male testis; *b*, section of a male epididymis; *c*, section of a female ovary (predominantly yellow bodies); *d*, section of a female uterus (endometrium during pregnancy). Pathological changes are absent in all samples. Microphotographs, hematoxylin-eosin staining, magnification $\times 40$ –100.

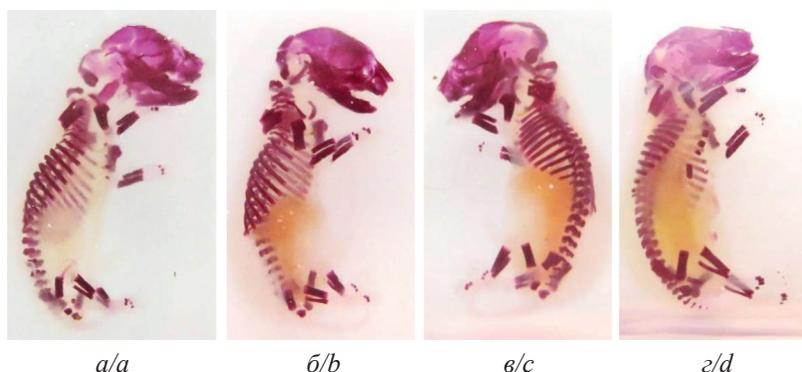


Рис. 3. Скелеты крысиных эмбрионов, окрашивание ализариновым красным.

a – интактная группа; *b* – группа плацебо; *в* – лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в дозе 9 мг/кг; *г* – лекарственное средство на основе этой же субстанции в дозе 90 мг/кг. Существенные отличия между эмбрионами интактной и опытных групп, а также группы плацебо не установлены.

Pic. 3. Rat embryo skeletons, alizarin red staining.

a, intact group; *b*, placebo group; *c*, drug based on the 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance at dose 9 mg/kg; *d*, drug based on the same substance at dose 90 mg/kg. Significant differences between the embryos of the intact and experimental groups, as well as the placebo group, have not been observed.

та. Статистически значимых межгрупповых различий между животными, получавшими ЛС в обеих дозах, и входившими в группу плацебо не выявлено.

Результаты ДНК-комет-теста показали, что процентное содержание ДНК в хвосте комет клеток intactных животных и особей, получавших плацебо, не превышало $8,7 \pm 0,24\%$ и соответствовало внутрилабораторной норме для здоровых животных (в среднем 5–15%). Позитивный контроль ЭМС в дозе 200 мг/кг достоверно ($p < 0,05$) увеличивал этот показатель для клеток всех анализируемых органов. Полученные результаты для позитивного контроля также указывают на корректность проведения эксперимента (табл. 2). Межгрупповое сравнение данных с помощью критерия Тьюки показало отсутствие влияния тестируемого препарата в обеих дозах на величину содержания ДНК в хвосте комет ($p > 0,05$).

С целью подтверждения адекватности поставленной реакции в эксперимент по оценке аллергизирующих свойств для тестов РОА и АКА были включены группы контроля, особей которых сенсibilизировали раствором овальбумина. В результате в РОА у животных регистрировалось развитие умеренного анафилактического шока, шока тяжёлой степени и шока со смертельным исходом согласно анафилактическому индексу Вейгля. В группах морских свинок, сенсibilизированных тестируемым препаратом в исследуемых дозах и плацебо, не отмечено

признаков анафилактической реакции по индексу Вейгля после введения субстанции изучаемого ЛС в разрешающей дозе. В тесте АКА также зафиксирована реакция (большой размер окрашенных пятен) в контрольной группе с сенсibilизацией овальбумином. Применение препарата в анализируемых дозах, как и плацебо, не привело к развитию активной кожной анафилаксии у сенсibilизированных морских свинок (табл. 3).

В тесте ГЗТ в качестве контроля выступали особи, сенсibilизированные 2% раствором ДНХБ. У них отмечался достоверно более высокий индекс реакции по сравнению с получавшими тестируемый препарат и плацебо. Это подтверждает корректность выполненного теста и позволяет заключить, что однократное внутрижелудочное введение ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не приводит к развитию ГЗТ у мышей (табл. 4).

Стандартным показателем активации гуморального иммунитета в ответ на введение антигена является продукция АТ В-лимфоцитами. В проведённом исследовании иммунизация мышей осуществлялась внутрибрюшинным введением модельного для иммунологических экспериментов антигена – ЭБ [6]. В результате поставленной реакции у животных развился гуморальный иммунный ответ. Установлено, что многократное внутрижелудочное введение тестируемого препарата в дозах 21 и 210 мг/кг соответственно

Таблица 1. Результаты теста учёта микроядер в эритроцитах периферической крови мышей после введения исследуемых веществ ($n = 10$)

Table 1. Results of micronucleus assay in the erythrocytes of peripheral blood of mice after administration of the test compounds ($n = 10$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Пол Sex	Соотношение ПХЭ/НХЭ, % ($M \pm m$) PCE/NCE ratio, % ($M \pm m$)	НХЭ с микроядрами, % ($M \pm m$) NCE with micronuclei, % ($M \pm m$)	ПХЭ с микроядрами, % ($M \pm m$) PCE with micronuclei, % ($M \pm m$)
Циклофосфамид (позитивный контроль) Cyclophosphamide (positive control)	50	Самцы Male	$7,6 \pm 0,53^*$	$7,3 \pm 0,91^*$	$7,0 \pm 0,72^*$
		Самки Female	$8,2 \pm 0,38^*$	$8,3 \pm 0,90^*$	$7,9 \pm 0,98^*$
Плацебо Placebo	–	Самцы Male	$1,0 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,17$	$2,3 \pm 0,30$
		Самки Female	$1,0 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,17$	$1,7 \pm 0,16$
Препарат на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси) этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy) ethyl]-6-methyluracil	21	Самцы Male	$1,2 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,21$	$1,3 \pm 0,16$
		Самки Female	$1,2 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,23$	$1,2 \pm 0,17$
	210	Самцы Male	$1,2 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,14$	$1,0 \pm 0,12$
		Самки Female	$1,2 \pm 0,07$	$1,5 \pm 0,14$	$1,4 \pm 0,20$

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля (получавших плацебо) (ANOVA, критерий Тьюки); $p < 0,05$.

ПХЭ – полихроматофильные эритроциты; НХЭ – нормохроматофильные эритроциты.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of negative control animals (administered with placebo), ANOVA, Tukey's test; $p < 0.05$.

PCE, polychromatic erythrocytes; NCE, normochromatic erythrocytes.

Таблица 2. Результаты теста ДНК-комет ($n = 500$)

Table 2. Results of the DNA comet test ($n = 500$)

Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Пол Sex	ДНК в хвосте комет, % ($M \pm m$) DNA in a comet's tail, % ($M \pm m$)				
			Костный мозг Bone marrow	Печень Liver	Почки Kidneys	Селезёнка Spleen	Головной мозг Brain
Интактные животные Intact animals	—	Самцы Male	7,7 ± 0,22	8,0 ± 0,22	8,0 ± 0,23	6,8 ± 0,18	7,6 ± 0,23
		Самки Female	7,2 ± 0,17	8,5 ± 0,25	7,9 ± 0,25	7,4 ± 0,20	7,9 ± 0,25
Этилметансульфонат Ethylmethanesulfonate	200	Самцы Male	39,7 ± 1,11*	35,6 ± 1,04*	36,2 ± 1,05*	51,8 ± 1,05*	42,6 ± 1,15*
		Самки Female	36,6 ± 1,13*	46,0 ± 1,09*	35,2 ± 1,10*	40,3 ± 1,16*	37,2 ± 1,12*
Плацебо Placebo	—	Самцы Male	7,4 ± 0,23	7,9 ± 0,22	7,8 ± 0,20	7,6 ± 0,19	7,6 ± 0,21
		Самки Female	7,8 ± 0,21	8,7 ± 0,24	8,0 ± 0,23	7,5 ± 0,21	7,4 ± 0,21
Препарат на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	9	Самцы Male	7,6 ± 0,22	7,7 ± 0,22	7,9 ± 0,23	7,4 ± 0,21	7,9 ± 0,21
		Самки Female	7,2 ± 0,18	9,1 ± 0,25	7,7 ± 0,19	7,1 ± 0,19	7,8 ± 0,23
	90	Самцы Male	7,2 ± 0,21	8,2 ± 0,23	8,1 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,4 ± 0,18
		Самки Female	7,8 ± 0,22	7,4 ± 0,21	8,4 ± 0,22	7,8 ± 0,21	7,5 ± 0,24

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группами животных негативного контроля (получавших плацебо) (критерий Тьюки); $p < 0,05$.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of negative control animals (administered with placebo), Tukey's test; $p < 0.05$.

Таблица 4. Результаты теста реакции гиперчувствительности замедленного типа на самцах и самках мышей ($n = 10$)

Table 4. Results of the test of delayed-type hypersensitivity reaction on the mice male and female ($n = 10$)

Сенсибилизация (агент) Sensitization (compound)	Доза Dose	Разрешение (агент) Provocation (agent)	Концентрация Concentration	Индекс реакции, % ($M \pm m$) Reaction index, % ($M \pm m$)	
				Самцы Male	Самки Female
2% раствор динитрохлорбензола 2% dinitrochlorobenzene solution	4 мг на мышшь в объёме 0,2 мл на мышшь 4 mg per mouse in a volume of 0.2 ml per mouse	Динитрохлорбензол Dinitrochlorobenzene	0,1% раствор, 1 мг/мл в объёме 50 мкл на мышшь 0.1% solution, 1 mg/ml in 50 µl per mouse	14,1 ± 1,34	16,9 ± 0,59
Плацебо Placebo	—	Субстанция 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	0,1 мг/мл в объёме 50 мкл 0.1 mg/ml in a volume of 50 µl	3,5 ± 0,79*	2,5 ± 0,21*
Лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	21 мг/кг 21 mg/kg			3,0 ± 0,85*	3,4 ± 0,45*
	210 мг/кг 210 mg/kg			4,6 ± 0,90*	4,2 ± 0,46*

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 2% раствор динитрохлорбензола (ANOVA, критерий Тьюки); $p < 0,05$.

Note. *, the differences are statistically significant compared to the group of animals treated with 2% dinitrochlorobenzene solution, ANOVA, Tukey's test; $p < 0.05$.

Таблица 5. Результаты оценки иммунного ответа самцов и самок мышей линии BALB/c при внутрижелудочном введении субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил в 3 тестах ($n = 10$)Table 5. Results of assessing the immune response of male and female BALB/c mice after intragastric administration of 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil substance in three tests ($n = 10$)

Агент Compound	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Титр антител к эритроцитам барана (log ₂ n), Me (Q1; Q3) Titer of antibodies to sheep erythrocytes (log ₂ n), Me (Q1; Q3)		Индекс реакции, % ($M \pm m$) Reaction index, % ($M \pm m$)		Индекс фагоцитарной активности ($M \pm m$) Phagocytic activity index ($M \pm m$)	
		Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female	Самцы Male	Самки Female
Плацебо Placebo	–	7,0 (7,0; 8,0)	7,0 (7,0; 8,0)	40,0 ± 1,6	40,0 ± 2,0	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1
Лекарственное средство на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил Medication based on the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil	21	7,0 (7,0; 8,0)	7,0 (7,0; 8,0)	42,0 ± 2,2	37,0 ± 1,7	3,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1
	210	7,5 (7,0; 8,0)	7,5 (7,0; 8,0)	39,0 ± 2,2	35,0 ± 1,6	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1

и плацебо не повлияло на титр АТ и формирование гуморального иммунного ответа (табл. 5).

Согласно данным статистического анализа плацебо и изучаемый препарат при курсовом внутрижелудочном введении в дозах 1 и 10 ТД не влияли на развитие неспецифических иммунологических реакций у мышей линии BALB/c (как самцов, так и самок) в тесте по определению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов с помощью флуоресцентной микроскопии, а также с использованием конъюгированных с FITC частиц латекса диаметром 1 мкм. Не отмечено также воздействия ЛС на основе субстанции на формирование клеточного иммунного ответа у самцов и самок этих животных (табл. 5).

Заключение

По результатам исследований репродуктивной токсичности установлено, что ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил не оказало негативного влияния на генеративную функцию самцов и самок аутбредных крыс и их потомство при многократном внутрижелудочном введении до спаривания. Кроме того, препарат не имел эмбрио-, фетотоксического и тератогенного действия при указанном характере введения самкам в период беременности.

На основании изучения генотоксических свойств (тест учёта микроядер в эритроцитах крови мышей), а также данных ДНК-комет-теста можно констатировать отсутствие в эксперименте генотоксических и канцерогенных свойств у препарата, предназначенного для лечения инфекции ВИЧ. У данного ЛС отсутствовали также сенсibilизирующие свойства. Препарат не влиял на формирование гуморального, неспецифического и клеточного иммунитета лабораторных моделей.

Поскольку в клинической практике АРТ назначается для пожизненного приёма, крайне важным представляется доказанное отсутствие у анти-ВИЧ-препаратов репродуктивной токсичности, аллергизирующих,

генотоксических свойств и канцерогенного потенциала. Установленный в ходе изучения специфической токсичности благоприятный профиль безопасности ЛС на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил позволяет рассматривать его в качестве перспективного терапевтического кандидата, предназначенного для лечения вызванной ВИЧ-1 инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВИЧ/СПИД в мире. Available at: <http://aids-centr.perm.ru/Статистика/ВИЧ/СПИД-в-мире> (accessed August 8, 2021).
2. Озеров А.А. Пиримидиновые нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 – история разработки и перспективы. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2012; (3): 10–7.
3. Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19(19): 5794–802.
4. Озеров А.А., Новиков М.С., Луганченко А.И., Хартман Т., Бухайт Р.У. Новые N-[2-(Бензоилфенокси)этил]производные нуклеиновых оснований – синтез и анти-ВИЧ-1 активность *in vitro*. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2012; (4): 15–8.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб.; 2012.
6. Миронов А.Н., ред. *Руководство по доклиническим исследованиям лекарственных средств*. М.; 2012.
7. OECD Guidelines for testing of chemicals. Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en (accessed August 8, 2021).
8. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-415-one-generation-reproduction-toxicity-study_9789264070844-en (accessed August 8, 2021).
9. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (accessed August 8, 2021).
10. OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (accessed August 8, 2021).

11. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.* 1960; 85: 469–77.

REFERENCES

- HIV/AIDS in the world [VICH/SPID v mire]. Available at: <http://aids-centr.perm.ru/Статистика/ВИЧ/СПИД-в-мире> (accessed August 8, 2021). (in Russian)
- Ozerov A.A. Pyrimidine non-nucleoside HIV-1 Inhibitors: history of their development and perspectives [Pirimidinovye nenukleozidnye inhibitory obratnoy transkriptazy VICH-1 – istoriya razrabotki i perspektivy]. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2012; (3): 10–7. (in Russian)
- Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Temburnikar K., et al. 1-[2-(2-Benzoyl- and 2-benzylphenoxy)ethyl]uracils as potent anti-HIV-1 agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19(19): 5794–802.
- Ozerov A.A., Novikov M.S., Luganchenko A.I., Khartman T., Bukkhayt R.U. New N-[2-(Benzoylphenoxy)ethyl] derivatives of nucleic bases – synthesis and anti-HIV-1 activity *in vitro* [Novye N-[2-(Benzoilfenoksi)etil]proizvodnye nukleinykh osnovaniy – sintez i anti-VICH-1 aktivnost' *in vitro*]. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal.* 2012; (4): 15–8. (in Russian)
- Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union.* 20.10.2010. I. 276/33–79. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:en:PDF> (accessed August 8, 2021).
- Mironov A.N., ed. *Guide to Preclinical Research of Medicines [Rukovodstvo po doklinicheskim issledovaniyam lekarstvennykh sredstv]*. Moscow; 2012. (In Russian)
- OECD Guidelines for testing of chemicals. Test No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-414-prenatal-development-toxicity-study_9789264070820-en (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No.415: One-Generation Reproduction Toxicity Study. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-415-one-generation-reproduction-toxicity-study_9789264070844-en (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus test. Available at: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.htm> (accessed August 8, 2021).
- OECD Guideline for the testing of chemicals. Test No. 489: *In Vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay_9789264264885-en (accessed August 8, 2021).
- Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in the guinea pig and rabbit. *J. Immunol.* 1960; 85: 469–77.

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*)

Борисевич Г.В.¹, Кириллова С.Л.¹, Шатохина И.В.¹, Лебедев В.Н.¹, Шагарова Н.В.¹, Сыромятникова С.И.¹, Андрус А.Ф.¹, Ковальчук Е.А.¹, Кириллов В.Б.¹, Беспалов М.Л.², Петров А.А.¹, Ковальчук А.В.¹, Пантюхов В.Б.¹, Кутаев Д.А.¹, Борисевич С.В.¹, Кузнецов С.Л.³

¹ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия;

²ООО «МедисКоМ», 127254, Москва, Россия;

³Управление начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооружённых Сил Министерства обороны Российской Федерации, 119160, Москва, Россия

Введение. Возникающие в последнее десятилетие вспышки болезни, вызываемой вирусом Эбола (ВЭ) (БВВЭ), определяют необходимость изучения патогенеза этой нозологической формы, формирования специфического иммунитета, а также создания эффективных средств профилактики и лечения. Все звенья борьбы с распространением заболевания невозможны без экспериментального моделирования инфекции на чувствительных к ней лабораторных животных, которыми для БВВЭ являются макаки резусы.

Цель исследования – оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии (цитофлуориметрии) (ПЦ) после экспериментального инфицирования ВЭ.

Материал и методы. Самцов макаков резусов внутримышечно инфицировали ВЭ, штамм Заир, в дозе 15 LD₅₀ (доза возбудителя, вызывающая гибель 50% инфицированных животных). С использованием метода ПЦ определены уровни 18 популяций/субпопуляций лимфоцитов периферической крови животных до экспериментального инфицирования возбудителем и в терминальной стадии заболевания.

Результаты и обсуждение. Выявлено достоверное изменение после инфицирования уровня популяций/субпопуляций лимфоцитов, указывающее на сочетание активации и супрессии иммунной системы при БВВЭ. Увеличение содержания отмечено для Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие маркёры ранней активации. Снижение количества показано для Т-лимфоцитов и дубль-позитивных Т-лимфоцитов с экспрессией соответствующих маркёров поздней активации, а также натуральных киллеров, экспрессирующих CD8 (статистическая значимость оценивалась величиной $p < 0,05$).

Заключение. Впервые в Российской Федерации методом ПЦ проведено сравнение характеристик клеточного иммунитета макаков резусов до и после экспериментального инфицирования ВЭ. Информация по динамике изменений популяций лимфоцитов может иметь диагностическую значимость в ходе изучения патологического процесса при инфицировании данным возбудителем, контроле эффективности терапии, прогнозе возникновения и течения заболевания, а также его исхода.

Ключевые слова: вирус Эбола; макаки резусы; лимфоциты; проточная цитометрия

Для цитирования: Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Шагарова Н.В., Сыромятникова С.И., Андрус А.Ф., Ковальчук Е.А., Кириллов В.Б., Беспалов М.Л., Петров А.А., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л. Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 289-298. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

Для корреспонденции: Борисевич Галина Валентиновна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела, «48 Центральный научно-исследовательский институт» («48 ЦНИИ») Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mil.ru

Участие авторов: Борисевич Г.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, написание текста; Кириллова С.Л. – статистическая обработка данных, написание текста; Шатохина И.В. – работа с животными; Лебедев В.Н. – статистическая обработка данных, редактирование статьи; Шагарова Н.В. – работа с животными; Сыромятникова С.И. – работа с животными; Андрус А.Ф. – работа с животными; Ковальчук Е.В. – сбор и обработка материалов; Кириллов В.Б. – статистическая обработка данных; Беспалов М.Л. – сбор и обработка материала; Петров А.А. – написание текста; Ковальчук А.В. – работа с животными; Пантюхов В.Б. – редактирование статьи; Кутаев Д.А. – концепция и дизайн исследования; Борисевич С.В. – редактирование статьи; Кузнецов С.Л. – редактирование статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, заведующему лабораторией иммунорегуляции отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» И.В. Кудрявцеву (Санкт-Петербург) за консультативно-методическую помощь при проведении работ по проточной цитометрии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. 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 «48 ЦНИИ» Минобороны России (Протокол № 2 от 29 мая 2020 г.).

Поступила 06.04.2021

Принята к печати 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection

Galina V. Borisevich¹, Svetlana L. Kirillova¹, Irina V. Shatokhina¹, Vitaly N. Lebedev¹, Natalia V. Shagarova¹, Svetlana I. Syromyatnikova¹, Alexandr F. Andrus¹, Elena A. Koval'chuk¹, Vladimir B. Kirillov¹, Mikhail L. Bepalov², Alexandr A. Petrov¹, Aleksey V. Koval'chuk¹, Vladimir B. Pantyukhov¹, Dmitry A. Kutayev¹, Sergey V. Borisevich¹, Sergey L. Kuznetsov³

¹FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russia;

²LLC «MedisCoM», 127254, Moscow, Russia;

³Directorate of the Chief of the Radiation, Chemical, and Biological Defence Troops of the Armed Forces of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 119160, Moscow, Russia

Introduction. The outbreaks of the Zaire ebolavirus (ZE) disease (ZED) that have arisen in the last decade determine the need to study the infection pathogenesis, the formation of specific immunity forming as well as the development of effective preventive and therapeutic means. All stages of fight against the ZED spread require the experimental infection in sensitive laboratory animals, which are rhesus monkeys in case of this disease.

The **aim** of the study is to evaluate the rhesus monkey cellular immunity following the ZE experimental infection by the means of flow cytometry (cytofluorimetry).

Material and methods. Male rhesus monkeys were intramuscularly infected by the dose of 15 LD₅₀ (dose of the pathogen that causes 50% mortality of infected animals) of the ZE, the Zaire strain (ZEBOV). Levels of 18 peripheral blood lymphocyte populations of the animals before the ZE experimental infection and at the terminal stage of the disease were assessed using flow cytometry.

Results and discussion. The certain changes in the levels of the lymphocyte populations were observed following infection, indicating simultaneous activation and suppression of the immune system during ZED. The increase in content was observed for T-lymphocytes, T-helper and cytotoxic T-lymphocytes expressing the corresponding markers of early activation. The decrease was recorded for T-lymphocytes and double-positive T-lymphocytes expressing corresponding markers of late activation, as well as natural killer cells expressing CD8 ($p < 0.05$).

Conclusion. For the first time in the Russian Federation, the rhesus monkey cellular immunity before and after the ZE experimental infection was assessed using flow cytometry.

Key words: *Ebola virus; rhesus monkeys; lymphocytes; flow cytometry*

For citation: Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Shagarova N.V., Syromyatnikova S.I., Andrus A.F., Koval'chuk E.A., Kirillov V.B., Bepalov M.L., Petrov A.A., Koval'chuk A.V., Pantyukhov V.B., Kutayev D.A., Borisevich S.V., Kuznetsov S.L. Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 289-298 (In Russ.) DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-64>

For correspondence: Galina V. Borisevich, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of the Department, FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad-6, Russia. E-mail: 48cnii@mil.ru

Information about the authors:

Borisevich G.V., <https://orcid.org/0000-0002-0843-9427>

Kirillova S.L., <https://orcid.org/0000-0003-1245-9225>

Shatokhina I.V., <https://orcid.org/0000-0002-9503-5120>

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

Shagarova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-9523-8676>
Syromyatnikova S.I., <https://orcid.org/0000-0002-1490-9448>
Andrus A.F., <https://orcid.org/0000-0002-7430-9401>
Koval'chuk E.A., <https://orcid.org/0000-0002-7279-196x>
Kirillov V.B., <https://orcid.org/0000-0003-2916-0668>
Bespalov M.L., <https://orcid.org/0000-0003-3220-6153>
Petrov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>
Koval'chuk A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9681-9891>
Pantukhov V.B., <https://orcid.org/0000-0002-1313-2059>
Kutayev D.A., <https://orcid.org/0000-0001-9009-4909>
Borisevich S.V., <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>
Kuznetsov S.L., <https://orcid.org/0000-0003-2705-8774>

Contribution: Borisevich G.V. – research concept and design, collection and processing of the materials, writing of the text; Kirillova S.L. – statistical processing, writing of the text; Shatokhina I.V. – working with animals, writing of the text; Lebedev V.N. – statistical processing, editing of the article; Shagarova N.V. – working with animals; Syromyatnikova S.I. – working with animals; Andrus A.F. – working with animals; Koval'chuk E.A. – collection and processing of the materials; Kirillov V.B. – statistical processing; Bespalov M.L. – collection and processing of the materials; Petrov A.A. – writing of the text; Koval'chuk A.V. – working with animals; Pantukhov V.B. – editing of the article; Kutayev D.A. – research concept and design; Borisevich S.V. – editing of the article; Kuznetsov S.L. – editing of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to I.V. Kudryavtsev, Ph.D. (Biol.), Head of the Laboratory of Immunoregulation of the Immunology Department, FSBSI «Institute of Experimental Medicine» (Saint Petersburg), for consultative and methodical aid during the fulfillment of flow cytometry works.

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

Ethics approval. 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 FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» (FSBI «48 CSR») of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Protocol No. 2 dated May 29, 2020).

Received 06 April 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Вспышки болезни, вызываемой вирусом Эбола (ВЭ) (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) (БВВЭ), возникающие в последнее десятилетие [1], определяют необходимость изучения патогенеза данной нозологической формы, формирования специфического иммунитета, а также разработки действенных средств профилактики и лечения [2]. Одно из перспективных направлений в современной инфекционной иммунологии – определение роли наиболее значимых поверхностных антигенов, экспрессируемых на иммунокомпетентных клетках, в реализации иммунного ответа при инфекционных заболеваниях [3]. К настоящему времени доказано, что именно клеточный иммунитет играет ключевую роль в патогенезе БВВЭ и формировании протективной иммунной защиты по отношению к ВЭ [4–7]. Для создания эффективных медицинских средств необходимым этапом является экспериментальное моделирование инфекции на чувствительных к ней лабораторных животных, которыми для БВВЭ являются низшие приматы (*Primates: Strepsirrhini*), в т.ч. макаки резусы (*Macaca mulatta, Macaca rhesus*). [8]. В связи с этим оценка клеточного иммунитета представителей этого вида с использованием метода проточной цитометрии (ПЦ) после экспериментального инфицирования ВЭ представляет собой в настоящее время актуальную задачу.

В процессе изучения характеристик Т-клеточного иммунного ответа на внедрение инфекционного агента у человека в дополнение к оценке основных популяций лимфоцитов [9] определяется также экспрессия маркеров ранней (CD25) и поздней активации (антигены главного комплекса гистосовместимости (major

histocompatibility complex, МНС) II класса HLA-DR) на субпопуляциях Т-лимфоцитов [10]. При исследовании крови инфицированных ВЭ обезьян ввиду схожести кроветворной и иммунной систем человека и макака резуса [11], а также с учётом возможностей приборно-реагентной базы можно придерживаться этого же перечня.

Целью настоящей работы являлась оценка методом (ПЦ) клеточного иммунитета макаков резусов после экспериментального инфицирования ВЭ.

Материал и методы

Животные. В опытах использовали 6 здоровых самцов макаков резусов в возрасте 2,0–2,5 года массой 2,5–3,0 кг, доставленных из питомника Адлерского приматологического центра (г. Сочи) и прошедших месячную акклиматизацию с ежедневным измерением ректальной температуры, осмотром кожных покровов и слизистых оболочек. Эксперименты на животных проводили в соответствии с ГОСТ 33218-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за нечеловекообразными приматами) и Федеральным законом РФ «Об ответственном обращении с животными» (N 498-ФЗ от 27.12.2018).

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 «48 ЦНИИ» Минобороны России (Протокол № 2 от 29.05.2020 г.).

Вывод. Культура ВЭ, штамм Заир, прошедшего 4 пассажа через печень павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*), с биологической активностью $2,1 \times 10^5$ Ig БОЕ/мл (БОЕ – бляшкообразующая единица), $3,0 \times 10^7$ LD₅₀/мл (LD₅₀ – доза возбудителя, вызывающая гибель 50% инфицированных животных), получена из Специализированной коллекции эталонных культур штаммов вирусов – возбудителей геморрагических лихорадок I группы патогенности, депонированной в коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Работы с вирусом проводили в соответствии с требованиями Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Обезьян инфицировали внутримышечно в дозе 15 LD₅₀. Для сбора образцов крови животных анестезировали путём внутримышечного введения золептила (тилетамин гидрохлорид и золазепам гидрохлорид) из расчёта 4–6 мг препарата на 1 кг массы тела. Биологическую активность возбудителя в пробах крови определяли титрованием на культуре клеток GMK-АН-1(Д) по методу негативных колоний [12].

После введения инфекционного агента, начиная с 3–5 сут, у обезьян развивалась типичная картина БВВЭ, проявлявшаяся геморрагической сыпью, кровотечениями, отказом от пищи, снижением двигательной активности. Гибель наступала на 7–10 сут после инфицирования.

Проточно-цитометрический анализ

С целью выявления популяций лимфоцитов периферической крови обезьян применяли 3 панели конъюгированных с флуорохромами мышинных античеловеческих моноклональных антител (МКАТ), перекрёстно реагирующих с антигенами лимфоцитов макаков резусов: CD16-FITC/CD19-PE/CD3-PE-Cy7, CD25-FITC/CD4-PE/HLA-DR-ECD/CD8-PC5/ CD3-PE-Cy7 и CD25-FITC/CD4-PE/CD127-PE-Cy5/CD3-PE-Cy7.

Поскольку процедура иммунофенотипирования лимфоцитов обезьян идентична используемой для человека [13], составление цитометрических панелей и настраивание протоколов анализа проводили в соответствии со стандартизированной технологией [14] и принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [15].

Использовали следующие МКАТ, входящие в состав цитометрических панелей: Affymetrix eBioscience («ThermoFisher Scientific», США) (CD25-FITC, кат. № 11-0257; CD4-PE, кат. № 12-0048; CD127-PE-Cy5, кат. № 15-1278); Beckman Coulter (США) (CD8-PC5, кат. № A07758; HLA-DR-ECD, кат. № IM3636); Becton Dickinson (США) (CD3-PE-Cy7, кат. № 557749); Novus (США) (CD19-PE, кат. № 6602868); Serotec (США) (CD16-FITC, кат. № MCA1569F). Рабочие объёмы МКАТ определяли путём титрования, рассчитывая для каждого разведения индекс окрашивания (stain index) [16]. При использовании антител против маркёров CD25, CD127 и HLA-DR для настраивания протоколов анализа применяли соответствующие изотипические контроли Affymetrix eBioscience

(IgG2b-FITC, кат. № 11-4732; IgG1-PE-Cy5, кат. № 15-4714) и Beckman Coulter (IgG1-ECD, кат. № A07797). Корректность компенсации проверяли с использованием FMO-подхода (Fluorescence-Minus-One, флуоресценция минус один) [17].

Для проточно-цитометрического анализа забор крови у животных проводили в «чистой» зоне за 1 сут до инфицирования (с целью определения фоновых показателей) и в «заразной» зоне при заключительной (терминальной) стадии заболевания. Из пробирки с калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (КЗ-ЭДТА) отбирали по 50 мкл крови в 3 цитометрические пробирки с предварительно внесёнными антителами. После 15-минутной инкубации в темноте при комнатной температуре (18–24 °С) для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов в пробирки вносили реагент OptiLyse C («Beckman Coulter»), кат. № 11895, в объёме 250 мкл. Входящий в состав реагента формальдегид (CH₂O) (1,5%) обеспечивал инактивацию вируссодержащего материала. Реакционную смесь повторно инкубировали в темноте при комнатной температуре 15 мин, затем добавляли 250 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Концентрация формальдегида в пробе на этой стадии составляла 0,75%. Каждый этап внесения реагентов в пробирки сопровождали перемешиванием на лабораторной мешалке типа вортекс в течение 1 с. После добавления буфера пробирки на 1 ч помещали в передаточный шлюз для обработки аэрозолем 10% пероксида водорода (H₂O₂) из расчёта 10 мл на 1 м³ объёма камеры в целях безопасной передачи из «заразной» зоны в «чистую». Далее образцы дважды отмывали в PBS, центрифугируя по 5 мин при 400 g, после чего клетки ресуспендировали для анализа в 200 мкл фиксирующего буфера, содержащего 0,1% формальдегида. Иммунофенотипирование осуществляли на цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter»), оснащённом аргоновым лазером с длиной волны излучения 488 нм с программным обеспечением СХР, версия 2.3. В каждой пробе анализировали не менее 10 000 лимфоцитов.

Показатели анализировали с использованием порядковых (непараметрических) статистических методов – критерия знаков и критерия Уайта средствами Microsoft Office Excel 2016. За уровень статистической значимости принимали величину $p < 0,05$ [18].

Результаты

Поскольку в ряде случаев изменения уровней основных популяций лимфоцитов оказываются недостаточно информативными, дополнительно были исследованы малые популяции/субпопуляции лимфоцитов и пулы активированных клеток [10]. С использованием 3 цитометрических панелей определены уровни 18 популяций лимфоцитов периферической крови (в процентном выражении для соответствующих популяций/субпопуляций) у 6 макаков резусов до экспериментального инфицирования ВЭ и в терминальной стадии заболевания. Средние значения (X_{cp}) содержания лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитаны по результатам 3 измерений (табл. 1).

Таблица 1. Средние значения уровней лимфоцитов до и после экспериментального инфицирования обезьян вирусом Эбола
Table 1. Average values of the lymphocytes counts before and after the experimental infection of monkeys with Zaire ebolavirus

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов для обезьян №№ 1–6 до и после инфицирования (X_{cp})* Average values of the lymphocytes counts before and after infection of monkeys Nos. 1–6 ($X_{average}$)*											
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5		№ 6	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after
Т-лимфоциты общие (CD3+CD19–) ¹ T-lymphocytes, total (CD3+CD19–) ¹	61,7	61,9	52,6	51,1	67,7	45,5	57,7	43,8	68,8	35,4	63,1	58,5
В-лимфоциты общие (CD3–CD19+) ¹ B-lymphocytes, total (CD3–CD19+) ¹	21,2	27,0	40,4	34,6	27,0	33,7	20,9	13,4	10,4	5,8	26,1	22,2
Натуральные киллеры (CD3–CD16+) ¹ Natural killer cells (CD3–CD16+) ¹	13,5	0,6	5,4	0,6	3,5	1,6	17,7	4,3	18,6	8,6	7,1	8,4
Т-NK клетки (CD3+CD16+) ¹ T-NK cells (CD3+CD16+) ¹	2,2	0,2	0,1	0,3	2,0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2
Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3–CD8+) ¹ Natural killer cells expressing CD8 (CD3–CD8+) ¹	16,5	4,1	3,6	4,0	9,8	9,5	15,4	2,9	21,1	8,3	6,2	5,0
Т-хелперы (CD3+CD4+) ² T-helper cells (CD3+CD4+) ²	33,6	57,0	50,4	45,0	46,5	39,4	54,3	41,9	43,3	49,0	53,1	41,4
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+) ² Cytotoxic T-lymphocytes (CD3+CD8+) ²	60,2	37,0	42,8	44,1	42,9	50,4	39,5	46,3	52,9	44,7	37,6	47,1
Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3+CD4+CD8+) ² Double-positive T-lymphocytes (CD3+CD4+CD8+) ²	3,3	2,7	2,0	2,3	6,9	4,5	2,1	1,4	2,8	4,0	6,8	9,7
Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4–CD8–) ² Double-negative T-lymphocytes (CD3+CD4–CD8–) ²	2,4	3,2	4,2	8,3	3,1	5,5	3,4	10,3	1,0	2,4	2,0	1,7
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD25+) ² T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD25+) ²	2,3	6,4	3,1	4,1	2,6	6,9	5,2	7,7	3,4	6,9	6,7	7,7
Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD25+HLA-DR–) ³ T-helper cells expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD25+HLA-DR–) ³	4,7	8,9	3,9	9,6	4,2	8,5	6,6	17,2	5,1	9,3	7,8	10,9
Т-регуляторные клетки (CD3+CD4+CD25+CD127–) ³ T-regulatory cells (CD3+CD4+CD25+CD127–) ³	3,7	6,9	5,3	6,7	4,0	7,5	5,0	10,8	3,7	6,1	8,1	7,5
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD8+CD25+HLA-DR–) ⁴ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD8+CD25+HLA-DR–) ⁴	0,1	2,8	0,2	1,5	0,1	0,9	0,2	3,4	0,1	1,5	0,4	0,6
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR–) ⁵ Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR–) ⁵	2,4	24,6	8,7	30,8	1,6	5,0	15,0	44,2	7,7	15,0	8,0	6,3
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4–CD8–CD25+HLA-DR–) ⁶ Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4–CD8–CD25+HLA-DR–) ⁶	1,0	1,1	0,2	0,3	0,1	0,3	0,4	4,3	1,9	5,7	1,6	3,2

Продолжение табл. 1 см. на стр. 293.

Продолжение табл. 1.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов для обезьян №№ 1–6 до и после инфицирования (X_{cp})* Average values of the lymphocytes counts before and after infection of monkeys Nos. 1–6 ($X_{average}$)*											
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4		№ 5		№ 6	
	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after	до before	после after
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+) ² T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+HLA-DR+) ²	8,1	0,4	3,6	1,0	2,2	0,5	2,1	1,0	1,2	0,1	5,7	0,8
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD25–HLA-DR+) ³ T-helper cells expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD25–HLA-DR+) ³	5,9	0,1	9,5	0,2	4,8	0,1	3,1	0,5	6,1	3,5	16,9	10,7
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD8+CD25–HLA-DR+) ⁴ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD8+CD25–HLA-DR+) ⁴	5,1	5,2	7,7	3,5	13,9	5,9	1,8	0,4	5,4	6,4	9,2	2,1
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD8+CD25–HLA-DR+) ⁵ Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25–HLA-DR+) ⁵	6,8	0,5	5,9	4,4	2,2	0,5	3,2	0,2	2,7	0,1	8,7	0,6
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4–CD8–CD25–HLA-DR+) ⁶ Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4–CD8–CD25–HLA-DR+) ⁶	30,1	24,1	9,6	7,1	12,9	6,5	6,1	2,9	3,5	1,6	22,1	29,1
Время жизни после инфицирования до гибели, сут Life time after infection until death, days	9		9		7		7		8		10	
Активность возбудителя в пробах крови, Ig БОЕ/мл Activity of the pathogen in blood samples, Ig PFU/ml	7,2		6,7		7,8		7,1		7,3		6,9	

Примечание. *Средние значения (X_{cp}) уровня лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитывали по результатам 3 измерений. Данные представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоцитов, 2 – Т-лимфоцитов, 3 – Т-хелперов, 4 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 5 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 6 – дубль-негативных Т-лимфоцитов; БОЕ – бляшкообразующая единица.

Note. *Average values ($X_{average}$) of the lymphocytes counts before and after the infection calculated after three measurement results for every animal. Data are shown as percentage of the total amount: 1, lymphocytes; 2, T-lymphocytes; 3, T-helpers; 4, cytotoxic T-lymphocytes; 5, double-positive T-lymphocytes; 6, double-negative T-lymphocytes; PFU, plaque-forming units.

Значительная вариабельность исследуемых показателей и малочисленность выборки не позволили использовать методы параметрической статистики, поэтому статистическую обработку результатов эксперимента провели с использованием порядковых (непараметрических) статистических методов – критерия знаков и критерия Уайта (табл. 2) [18].

У каждого из 6 животных (№№ 1–6) после инфицирования выявлено уменьшение уровней следующих популяций/субпопуляций:

- Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации;
- Т-хелперов, экспрессирующих маркер поздней активации;
- дубль-позитивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер поздней активации;

– натуральных киллеров (NK), экспрессирующих CD8.

В противоположность этому отмечено повышение содержания:

- Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- Т-хелперов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- дубль-негативных Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации;
- цитотоксических лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации.

В соответствии с критерием знаков можно считать достоверным влияние инфицирования на изменение (рост или уменьшение) значений перечисленных показателей ($p < 0,05$).

Таблица 2. Статистические характеристики уровня лимфоцитов макаков резусов до и после экспериментального инфицирования вирусом Эбола

Table 2. Statistical characteristics of lymphocytes level of the rhesus monkeys before and after the Zaire ebolavirus experimental infection

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов и их коэффициенты вариации в группе из 6 животных* Average values of the lymphocytes counts and its variation coefficients in the group of 6 animals*				Различия показателей по критерию** Differences between indicators by test**	
	до инфицирования		после инфицирования		знаков signs	Уайта White
	X_{cp} $X_{average}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation	X_{cp} $X_{average}$	Коэффициент вариации The coefficient of variation		
Т-лимфоциты общие (CD3+CD19-) ¹ T-lymphocytes, total (CD3+CD19-) ¹	61,9	9,9	49,4	19,8	—	—
В-лимфоциты общие (CD3-CD19+) ¹ B-lymphocytes, total (CD3-CD19+) ¹	24,3	40,3	22,8	50,0	—	—
Натуральные киллеры (CD3-CD16+) ¹ Natural killer cells (CD3-CD16+) ¹	11,0	59,1	4,0	92,5	—	—
Т-NK клетки (CD3+CD16+) ¹ T-NK cells (CD3+CD16+) ¹	0,8	125,0	0,2	50,0	—	—
Натуральные киллеры, экспрессирующие CD8 (CD3-CD8+) ¹ Natural killer cells expressing CD8 (CD3-CD8+) ¹	12,1	55,4	5,6	46,4	↓	—
Т-хелперы (CD3+CD4+) ² T-helper cells (CD3+CD4+) ²	46,9	16,4	45,6	14,3	—	—
Цитотоксические Т-лимфоциты (CD3+CD8+) ² Cytotoxic T-lymphocytes (CD3+CD8+) ²	46,0	18,9	44,9	10,0	—	—
Дубль-позитивные Т-лимфоциты (CD3+CD4+CD8+) ² Double-positive T-lymphocytes (CD3+CD4+CD8+) ²	4,0	57,5	4,1	73,2	—	—
Дубль-негативные Т-лимфоциты (CD3+CD4-CD8-) ² Double-negative T-lymphocytes (CD3+CD4-CD8-) ²	2,7	40,7	5,2	67,3	—	—
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD25+) ² T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD25+) ²	3,9	43,6	6,6	19,7	↑	↑
Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD25+HLA-DR-) ³ T-helper cells expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD25+HLA-DR-) ³	5,4	27,8	10,7	30,8	↑	↑
Т-регуляторные клетки (CD3+CD4+CD25+CD127-) ³ T-regulatory cells (CD3+CD4+CD25+CD127-) ³	5,0	34,0	7,6	22,4	—	—
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD8+CD25+HLA-DR-) ⁴ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD8+CD25+HLA-DR-) ⁴	0,2	50,0	1,8	61,1	↑	↑
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR-) ⁵ Double-positive T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25+HLA-DR-) ⁵	7,2	68,1	21,0	72,4	—	—
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации (CD3+CD4-CD8-CD25+HLA-DR-) ⁶ Double-negative T-lymphocytes expressing the early activation marker (CD3+CD4-CD8-CD25+HLA-DR-) ⁶	0,9	88,9	2,5	92,0	↑	—
Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+HLA-DR+) ² T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+HLA-DR+) ²	3,8	68,4	0,6	66,7	↓	↓
Т-хелперы, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD25-HLA-DR+) ³ T-helper cells expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD25-HLA-DR+) ³	7,7	64,9	2,5	168,0	↓	—

Продолжение табл. 2 см. на стр. 296.

Продолжение табл. 2.

Популяции и субпопуляции лимфоцитов (фенотип) Populations and subpopulations of lymphocytes (phenotype)	Средние значения уровней лимфоцитов и их коэффициенты вариации в группе из 6 животных* Average values of the lymphocytes counts and its variation coefficients in the group of 6 animals*				Различия показателей по критерию** Differences between indicators by test**	
	до инфицирования		после инфицирования		знаков signs	Уайта White
	X_{cp} X_{average}	Коэффициент вариации The coefficient of variation	X_{cp} X_{average}	Коэффициент вариации The coefficient of variation		
Цитотоксические Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD8+CD25-HLA-DR+) ⁴ Cytotoxic T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD8+CD25-HLA-DR+) ⁴	7,2	56,9	3,9	59,0	—	—
Дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4+CD8+CD25-HLA-DR+) ⁵ Double-positive T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4+CD8+CD25-HLA-DR+) ⁵	4,9	53,1	1,1	154,5	↓	↓
Дубль-негативные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации (CD3+CD4-CD8-CD25-HLA-DR+) ⁶ Double-negative T-lymphocytes expressing the late activation marker (CD3+CD4-CD8-CD25-HLA-DR+) ⁶	14,1	72,3	11,9	98,3	—	—

Примечание. *Средние значения (X_{cp}) уровней лимфоцитов для каждого животного до и после инфицирования рассчитывали по результатам 3 измерений. Данные представлены в виде процентов от общего количества: 1 – лимфоцитов, 2 – Т-лимфоцитов, 3 – Т-хелперов, 4 – цитотоксических Т-лимфоцитов, 5 – дубль-позитивных Т-лимфоцитов, 6 – дубль-негативных Т-лимфоцитов;

**↑ или ↓ – рост или снижение значения показателя после инфицирования; «—» – отсутствие различий между значениями показателя до и после инфицирования.

Note. *Average measures (X_{average}) of the lymphocytes levels before and after the infection calculated after three measurement results for every animal. Data are shown as percentage of the total amount: 1, lymphocytes; 2, T-lymphocytes; 3, T-helpers; 4, cytotoxic T-lymphocytes; 5, double-positive T-lymphocytes; 6, double-negative T-lymphocytes;

**↑, or ↓ mean the increase or decrease of the index value following the infection; «—» means the absence of differences between the index values before and after the infection.

Использование критерия Уайта выявило достоверное снижение средних значений уровней Т-лимфоцитов и дубль-позитивных Т-лимфоцитов, экспрессирующих соответствующие маркеры поздней активации. Выявлен достоверный рост уровня Т-лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов с экспрессией соответствующих маркеров ранней активации.

Для 5 популяций лимфоцитов выявлены достоверные различия как по критерию знаков, так и по критерию Уайта. К ним относятся:

- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации;
- Т-хелперы, экспрессирующие маркер ранней активации;
- цитотоксические лимфоциты, экспрессирующие маркер ранней активации;
- Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации;
- дубль-позитивные Т-лимфоциты, экспрессирующие маркер поздней активации ($p < 0,05$).

Указанный факт свидетельствует о выраженном количественном изменении показателей иммунного статуса моделей в результате инфицирования.

Обсуждение

В настоящее время ввиду отсутствия условий для проведения исследований при соответствующем

уровне биологической защиты количество доступных публикаций, отражающих иммунный ответ на введение ВЭ (в особенности с применением метода ПЦ), весьма ограничено.

Высокий показатель летальности при БВВЭ указывает на то, что иммунная система во многих случаях не может подавлять репликацию возбудителя. При изучении экспериментально вызванной ВЭ инфекции у яванских макаков (*Macaca fascicularis*) выявлен массовый лимфоцитарный апоптоз, проявляющийся снижением экспрессии маркеров CD4 и CD8 и увеличением экспрессии апоптотического фактора CD95 на Т-клетках. Также отмечено уменьшение популяции CD8low-лимфоцитов, состоящих в основном из НК-клеток. В то же время количество CD20+ В-лимфоцитов за время болезни существенно не изменялось [19].

Пациенты, погибшие во время вспышки БВВЭ (штамм Судан) в Уганде в 2000 г., имели сниженный уровень общих (common) Т-лимфоцитов, а также CD8+ и активированных (HLA-DR+) CD8+ популяций Т-клеток, в то время как у переживших заболевание отмечены обратные показатели [20].

В результате изучения коллекции из 56 образцов крови 42 умерших и 14 выживших больных БВВЭ, полученной во время 5 вспышек, произошедших с 1996 по 2003 г. в Габоне и Республике Конго, обнаружено, что летальный исход связан с аберрантными врожденными иммун-

ными ответами и с глобальным подавлением адаптивного иммунитета. Отклонения во врождённом иммунитете характеризовались цитокиновым штормом, гиперсекрецией многочисленных провоспалительных медиаторов и характерным отсутствием противовирусного интерферона IFN α 2. Иммуносупрессия заключалась в наличии крайне низких уровней продуцируемых Т-лимфоцитами циркулирующих цитокинов и массивной потере периферических CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитов, вероятно, через Fas/FasL-опосредованный апоптоз, который проявлялся увеличением экспрессии апоптотического фактора CD95 на Т-клетках [4].

Далее, исследования клеточного и гуморального иммунного ответа 4 человек с установленным диагнозом БВВЭ, проходивших лечение в госпитале при Университете Эмори (Атланта, Соединённые Штаты Америки (США)), выявили повышенное количество плазмобластов и активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток у всех пациентов по сравнению с неинфицированным контингентом (30–60% CD8⁺ Т-лимфоцитов экспрессировали маркёры активации CD38 и HLA-DR). На основании полученных данных сформулированы две модели, объясняющие неспособность иммунной системы контролировать ВЭ (ЕВОВ) при летальных инфекциях. Модель 1 (ЕВОВ-супрессия) отражает значительное подавление иммунных реакций в результате инфицирования, что предотвращает развитие эффективного иммунного ответа макроорганизма. Сущностью модели 2 является предположение о том, что ключевыми для исхода инфекции являются время и кинетика репликации возбудителя и иммунного ответа, поскольку последний, будучи поздним или незавершившимся, не способен подавлять репликационный процесс, что ведёт к летальному исходу. Напротив, ранний иммунный ответ уменьшает репликацию патогена и приводит к выздоровлению [21].

Опубликован отчёт об изучении методом ПЦ динамики содержания лимфоцитов у выжившего после БВВЭ пациента, получавшего только поддерживающую терапию. Образцы крови были отобраны на 37 и 46 сут после болезни. Доля активированных (CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺) Т-клеток составила 68%, что существенно превышало аналогичные показатели контрольной группы, которые колебались в пределах 4–12%. Популяция регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low}) была количественно сопоставима с таковой в контрольной группе. Таким образом, активация системы иммунитета способствовала подавлению репликации возбудителя и выздоровлению [5].

В исследованиях NK- и $\gamma\delta$ T-клеток у 19 пациентов с БВВЭ независимо от клинического исхода зафиксировано низкое содержание последних, которые массово экспрессировали маркёр апоптоза CD95. У пациентов с фатальной инфекцией отмечена меньшая доля NK-клеток по сравнению с выжившими [22].

Полученные в нашей работе результаты по анализу клеточного иммунитета макаков резусов после экспериментального инфицирования ВЭ, представленные в табл. 1 и 2, практически полностью согласуются с опубликованными ранее сведениями и подтверждают

сочетание активации и супрессии иммунной системы при БВВЭ [21]. Достоверное повышение в большинстве субпопуляций Т-лимфоцитов экспрессии CD25 свидетельствует об активации системы иммунитета при воздействии ВЭ (ЕВОВ). Увеличение у 5 из 6 особей уровня Т-регуляторных клеток также указывает на иммунологическую гиперактивность. Зарегистрировано повышение содержания активированных цитотоксических лимфоцитов в 9 раз (против 2 раз для Т-хелперов), что подтверждает ведущую роль CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в противовирусном ответе [7].

Подтверждённые в выполненных экспериментах значимое уменьшение популяции экспрессирующих CD8 NK-клеток, обладающих литическими функциями [23], а также снижение популяции натуральных киллеров у всех обезьян, кроме одной, указывает на подавление реакции врождённого иммунитета. Результаты опытов позволяют также сделать вывод об иммуносупрессивном действии ВЭ, поскольку у 4 из 6 приматов произошло сокращение популяций Т- и В-лимфоцитов, а также Т-хелперов; кроме того, достоверно уменьшились популяции/субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующих маркёры поздней активации.

Заключение

В данной работе впервые в Российской Федерации проведена оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом ПЦ после экспериментального инфицирования ВЭ. Полученная информация по динамике изменений популяций и субпопуляций лимфоцитов может быть диагностически значимой при изучении патологического процесса при инфицировании вирусом Эбола, контроле эффективности терапии, прогнозе возникновения, течения и исхода заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Ebola virus disease Democratic Republic of Congo: external situation report 98/ 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332654> (accessed 16 August 2021).
2. Cenciarelli O., Gabbarini V., Pietropaoli S., Malizia A., Tamburrino A., Ludovicic G.M., et al. Viral bioterrorism: learning the lesson of Ebola virus in West Africa 2013–2015. *Virus. Res.* 2015; 210(12): 318–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.002>
3. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5): 347–54. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099>
4. Wauquier N., Becquart P., Padilla C., Baize S., Leroy E.M. Human fatal Zaire Ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(10): e837. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000837>
5. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., et al. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2): 287–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw508>
6. Wilson J.A., Hart M.K. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2660–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2660-2664.2001>
7. Warfield K.L., Olinger G.G. Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 984241. <https://doi.org/10.1155/2011/984241e>
8. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1-2): 12–7. <https://doi.org/10.1242/dmm.000471>
9. Хантов Р.М. *Иммунология: структура и функции иммунной системы: учебное пособие*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2019.
10. Хайдуков С.В., Зурочка А.В., Тоголян А.А., Черешнев В.А. Основные и малые популяции лимфоцитов периферической крови

- человека и их нормативные значения (методом многоцветного цитометрического анализа). *Медицинская иммунология*. 2009; 11(2-3): 227–38. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238>.
11. Лапин Б.А. К вопросу об использовании в медицинских экспериментах лабораторных приматов. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2010; (2): 3–6.
 12. Пшеничных В.А., Махлай А.А., Михайлов В.В. Исследования с вирусами Марбург, Ласса и Эбола. *Вопросы вирусологии*. 1993; 38(2): 54–9.
 13. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 119(1-2): 21–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.011>
 14. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян А.А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов». *Российский иммунологический журнал*. 2014; (4): 974–92. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
 15. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестицветного цитофлуориметрического анализа. *Медицинская иммунология*. 2015; 17(1): 19–26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
 16. Telford W.G., Babin S.A., Khorev S.V., Rowe S.H. Green fiber lasers: an alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2009; 75(12): 1031–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20790>
 17. Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Cham: Springer; 2018: 75–103. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6
 18. Лакин Г.Ф. *Биометрия: Учебное пособие*. М.: Высшая школа; 1990.
 19. Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W. Depletion of Peripheral Blood T Lymphocytes and NK Cells During the Course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Viral. Immunol.* 2004; 17(3): 390–400. <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.390>
 20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
 21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedy A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
 22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrero M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
 23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>
 6. Wilson J.A., Hart M.K. Protection from Ebola virus mediated by cytotoxic T lymphocytes specific for the viral nucleoprotein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2660–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2660-2664.2001>
 7. Warfield K.L., Olinger G.G. Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011; 2011: 984241. <https://doi.org/10.1155/2011/984241e>
 8. Bente D., Gren J., Strong J.E., Feldmann H. Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Dis. Model. Mech.* 2009; 2(1-2): 12–7. <https://doi.org/10.1242/dmm.000471>
 9. Khaitov R.M. *Immunology: Structure and Function of Immune System [Immunologiya: struktura i funktsii immunnogo sistema: uchebnoe posobie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2019. (in Russian)
 10. Khaydukov S.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A., Chereshev V.A. Major and lymphocyte populations of human peripheral blood lymphocytes and their reference values, as assayed by multi-colour cytometry [Osnovnye i malye populatsii limfotsitov perifericheskoy krovi cheloveka i ikh normativnye znacheniya (metodom mnogotsvetnogo tsitometricheskogo analiza)]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2009; 11(2-3): 227–38. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-227-238> (in Russian)
 11. Lapin B.A. On the question of use of laboratory primates in medical experiments [K voprosu ob ispol'zovanii v meditsinskikh eksperimentakh laboratornykh primatov]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2010; (2): 3–6. (in Russian)
 12. Pshenichnov V.A., Makhlay A.A., Mikhaylov V.V. Research with the Marburg, Lassa and Ebola viruses [Issledovaniya s virusami Marburg, Lassa i Ebola]. *Voprosy virusologii*. 1993; 38(2): 54–9. (in Russian)
 13. Sestak K., Scheiners C., Wu X.W., Hollemweguer E. Identification of anti-human CD antibodies reactive with rhesus macaque peripheral blood cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007; 119(1-2): 21–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.011>
 14. Khaydukov S.V., Baydun L.V., Zurochka A.V., Totolyan A.A. The standardized technique: «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry» [Standartizovannaya tekhnologiya «Issledovanie subpopulyatsionnogo sostava limfotsitov perifericheskoy krovi s primeneniem protochnykh tsitofluorimetrov-analizatorov»]. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal*. 2014; (4): 974–92. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268> (in Russian)
 15. Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring [Opyt izmereniya parametrov immunnogo statusa s ispol'zovaniem shestitsvetnogo tsitofluorimetriceskogo analiza]. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 17(1): 19–26. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26> (in Russian)
 16. Telford W.G., Babin S.A., Khorev S.V., Rowe S.H. Green fiber lasers: an alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry A*. 2009; 75(12): 1031–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20790>
 17. Hammerbeck C., Goetz C., Bonnevier J. Primary and secondary antibodies and flow cytometry controls. In: *Flow Cytometry Basics for the Non-Expert*. Cham: Springer; 2018: 75–103. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-98071-3_6
 18. Lakin G.F. *Biometrics: Textbook [Biometriya: Uchebnoe posobie]*. Moscow: Vysshaya shkola; 1990. (in Russian)
 19. Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W. Depletion of Peripheral Blood T Lymphocytes and NK Cells During the Course of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Viral. Immunol.* 2004; 17(3): 390–400. <https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.390>
 20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
 21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedy A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
 22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrero M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
 23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>

REFERENCES

1. WHO. Ebola virus disease Democratic Republic of Congo: external situation report 98/ 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-332654> (accessed 16 August 2021).
2. Cenciarelli O., Gabbarini V., Pietropaoli S., Malizia A., Tamburrini A., Ludovicic G.M., et al. Viral bioterrorism: learning the lesson of Ebola virus in West Africa 2013–2015. *Virus. Res.* 2015; 210(12): 318–26. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.09.002>
3. Wieland E., Shipkova M. Lymphocyte surface molecules as immune activation biomarkers. *Clin. Biochem.* 2016; 49(4-5): 347–54. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.099>
4. Wauquier N., Beccart P., Padilla C., Baize S., Leroy E.M. Human fatal Zaire Ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(10): e837. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000837>
5. Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., et al. Comprehensive characterization of cellular immune responses following Ebola virus infection. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(2): 287–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw508>
20. Sanchez A., Lukwiya M., Bausch D., Mahanty S., Sanchez A.J., Wagoner K.D., et al. Analysis of human peripheral blood samples from fatal and nonfatal cases of Ebola (Sudan) hemorrhagic fever: cellular responses, virus load, and nitric oxide levels. *J. Virol.* 2004; 78(190): 10370–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10370-10377.2004>
21. McElroy A.K., Akondy R.S., Davisc C.W., Ellebedy A.H., Mehtae A.K., Krafc C.S., et al. Human Ebola virus infection results in substantial immune activation. *PNAS*. 2015; 112(15): 4719–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502619112>
22. Cimini E.C., Viola D., Cabeza-Cabrero M., Romanelli A., Tumino N., Sacchi A., et al. Different features of Vδ2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections. *PLoS Trop. Dis.* 2017; 11(5): e0005645. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005645>
23. Addison E.G., North J., Bakhsh I., Marden C., Haq S., Al-Sarraj S., et al. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005; 116(3): 354–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02235.x>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-54>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Новосибирской области на фоне пандемии COVID-19

Попова А.Ю.¹, Смирнов В.С.⁴, Ежлова Е.Б.¹, Мельникова А.А.¹, Самойлова Л.В.²,
Лялина Л.В.⁴, Семёнова Е.В.³, Гурский М.А.³, Аксёнова Е.А.⁵, Арбузова Т.В.⁴, Тотолян А.А.⁴

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 127994, Москва, Россия;

²Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) по Новосибирской области, 630132, Новосибирск, Россия;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области», 630099, Новосибирск, Россия;

⁴ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, Санкт-Петербург, Россия;

⁵Министерство здравоохранения Новосибирской области, 630007, Новосибирск, Россия

Цель. Определить уровень серопревалентности SARS-CoV-2 среди населения Новосибирской области на фоне пандемии COVID-19.

Материалы и методы. Работу проводили в 2 фазы: 1) поперечное когортное исследование выполняли с 28.06. по 15.07.2020 г.; 2) продольный когортный 3-этапный серомониторинг: 1-й этап 28.06–15.07.2020 г., 2-й – 14.09–04.10.2020 г., 3-й – 10–30.12.2020 г. Работу проводили по единой методике, разработанной Роспотребнадзором при участии НИИЭМ им. Пастера с учетом рекомендаций ВОЗ. Содержание антител IgG к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 определяли методом ИФА с использованием набора реагентов производства ГНЦПМИБ (г. Оболенск) по инструкции производителя. Статистический анализ проводили с помощью Microsoft Excel 2010 и других программ.

Результаты. Серопревалентность населения области составила 9,1% (95% ДИ 8,0–10,2): максимум у детей 14–17 лет (17,6%; 95% ДИ 12,3–23,9) и лиц в возрасте 75+ лет (14,8%; 95% ДИ 11,4–18,8), минимум – среди лиц в возрасте 30–39 лет (4,9%; 95% ДИ 3,0–8,0). Повышенные показатели отмечены у неработающих (15,4%; 95% ДИ 9,9–17,1) и прочих лиц (13,0%; 95% ДИ 8,6–18,5). Среди реконвалесцентов COVID-19 она была равной 33,3% (95% ДИ 16,3–59,0); у контактных лиц – 19,0% (95% ДИ 13,9–25,0). Более 94,7% (95% ДИ 91,2–97,2) серопозитивных лиц не имели манифестных проявлений. При серологическом мониторинге серопревалентность увеличивалась от 7,4% (95% ДИ 6,2–8,9) на 1-м этапе до 12,4% (95% ДИ 10,6–14,3) на 2-м и 31% (95% ДИ 28,8–33,3) – на 3-м этапах.

Заключение. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 не достиг порогового уровня, что не исключает обострения эпидемического процесса.

Ключевые слова: *коронавирус; SARS-CoV-2; COVID-19; антитела; серопревалентность; Новосибирская область; население*

Для цитирования: Попова А.Ю., Смирнов В.С., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Самойлова Л.В., Лялина Л.В., Семёнова Е.В., Гурский М.А., Аксёнова Е.А., Арбузова Т.В., Тотолян А.А. Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Новосибирской области на фоне пандемии COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(4): 299-309. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-54>

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, Санкт-Петербург, Россия. E-mail vssmi@mail.ru

Участие авторов: Попова А.Ю. – разработка концепции и программы исследования; Тотолян А.А. – разработка концепции и программы исследования, подготовка текста статьи; Ежлова Е.Б. – информационная и административная организация исследования; Мельникова А.А. – информационная и административная организация исследования; Самойлова Л.В. – сбор данных; Семёнова Е.В. – сбор данных; Гурский М.А. – сбор данных; Аксёнова Е.А. – сбор данных; Лялина Л.В. – обработка результатов; Арбузова Т.В. – обработка результатов; Смирнов В.С. – подготовка текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора (Протокол № 64 от 26.05.2020).

Поступила 30.03.2021
Принята в печать 08.08.2021
Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-54>

Herd immunity to SARS-CoV-2 in the Novosibirsk Region population amid the COVID-19 pandemic

Anna Yu. Popova¹, Vyacheslav S. Smirnov⁴, Elena B. Ezhlova¹, Al'bina A. Mel'nikova¹, Lada V. Samoilo², Lyudmila V. Lyalina⁴, Elena V. Semenova³, Maxim A. Gurskiy³, Elena A. Aksenova⁵, Tatiana V. Arbuzova⁴, Areg A. Totolian⁴

¹Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 127994, Moscow, Russia;

²Administration of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor) for the Novosibirsk Region, 630132, Novosibirsk, Russia;

³FBIH «Center for Hygiene and Epidemiology in the Novosibirsk Region», 630099, Novosibirsk, Russia;

⁴FBSI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 197101, Saint Petersburg, Russia;

⁵Ministry of Health of the Novosibirsk Region, 630007, Novosibirsk, Russia

Aim. To determine the level of SARS-CoV-2 seroprevalence among the Novosibirsk Region population against the background of the COVID-19 pandemic.

Material and methods. The work was carried out in 2 phases: 1) a cross-sectional cohort study performed 28.06–15.07.2020; 2) longitudinal cohort 3-stage seromonitoring: 1st stage 28.06–15.07.2020; 2nd 14.09–04.10.2020; 3rd 10–30.12.2020. The work was carried out according to a unified methodology developed by Rospotrebnadzor with the participation of St-Petersburg Pasteur Institute, taking into account the recommendations of the WHO. IgG antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein were detected by ELISA using a kit of reagents produced by the SRCMSB (Obolensk) according to the manufacturer's instructions. Statistical analysis was performed using Microsoft Excel 2010 and other programs.

Results. The seroprevalence in the region's population was 9.1% (95% CI 8.0–10.2): maximum in children 14–17 years old (17.6%, 95% CI 12.3–23.9) and persons over 75 years (14.8%, 95% CI 11.4–18.8), minimum among persons 30–39 years old (4.9%, 95% CI 3.0–8.0). Increased rate was noted among the unemployed (15.4%, 95% CI 9.9–17.1) and other individuals (13.0%, 95% CI 8.6–18.5). Seroprevalence was 33.3% (95% CI 16.3–59.0) in COVID-19 convalescents and 19.0% (95% CI 13.9–25.0) in contact persons. More than 94.7% (95% CI 91.2–97.2) of seropositive individuals were asymptomatic. During the serological monitoring, seroprevalence increased from 7.4% (95% CI 6.2–8.9) at 1st stage 1 to 12.4% (95% CI 10.6–14.3) at 2nd, and 31% (95% CI 28.8–33.3) at 3rd stage.

Conclusion. SARS-CoV-2 herd immunity has not reached the threshold level, this does not exclude exacerbation of the epidemic process.

Keywords: coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; antibodies; seroprevalence; Novosibirsk Region; population

For citation: Popova A.Yu., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Samoilo L.V., Lyalina L.V., Semenova E.V., Gurskiy M.A., Aksenova E.A., Arbuzova T.B., Totolian A.A. Herd immunity to SARS-CoV-2 in the Novosibirsk Region population amid the COVID-19 pandemic. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 299-309 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-54>

For correspondence: Vyacheslav S. Smirnov, D.Sci. (Med.), Professor, Leading Researcher of the Laboratory of Molecular Immunology, St Petersburg Pasteur Institute 197101, Saint Petersburg, Russia. E-mail vssmi@mail.ru

Information about the authors:

Popova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-2567-9032>

Smirnov V.S., <https://orcid.org/0000-0002-2723-1496>

Ezhlova E.B., <https://orcid.org/0000-0002-8701-280X>

Mel'nikova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-5651-1331>

Samoilo L.V., <https://orcid.org/0000-0003-4836-9010>

Lyalina L.V., <https://orcid.org/0000-0001-9921-3505>

Semenova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-7715-7036>

Gurskiy M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5951-0940>

Aksenova Yu.A., <https://orcid.org/0000-0001-6515-2169>

Arbuzova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-3074-8656>

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

Contribution: Popova A.Yu. – development of the concept and research program; Totolian A.A. – development of the concept and research program, preparing of the text of the article; Ezhlova E.B. – informational and administrative organization of the study; Melnikova A.A. – informational and administrative organization of the study; Samoilo L.V. – data collection; Semenova E.V. – data collection; Gurskiy M.A. – data collection; Aksenova E.A. – data collection; Lyalina L.V. – processing of the research results; Arbuzova T.V. – processing of the research results; Smirnov V.S. – preparing of the text of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the St Petersburg Pasteur Institute (Protocol No. 64 of 26.05.2020).

Received 30 March 2021

Accepted 08 August 2021

Published 31 August 2021

Введение

С декабря 2019 г., когда в г. Ухань (Китайская Народная Республика (КНР)) была зарегистрирована первая вспышка новой пневмонии [1], человечество оказалось перед новым вызовом – глобальной пандемией новой коронавирусной инфекции COVID-19. После первого кластера пневмонии необычного течения, вызванной новым представителем коронавирусов, заболевание в течение 1 мес распространилось по КНР, затем охватило Тайвань, Австралию, страны Юго-Восточной Азии, Японию, а также европейские страны (Францию, Федеративную Республику Германию (ФРГ), Финляндию) [2]. В конце января 2020 г. было опубликовано сообщение о первом случае COVID-19 в Соединённых Штатах Америки (США) [3]. К середине июня заболеваемость новой инфекцией была зарегистрирована практически во всех государствах мира. Подобных сообщений не поступало только из Туркменистана и Корейской Народно-Демократической Республики (КНДР), что можно было объяснить особенностями существующих в этих странах политических режимов. Столь стремительное распространение COVID-19 вызвало серьёзную озабоченность в медицинских кругах и послужило основанием Генеральному директору Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) Т.А. Гебрейесусу (Т.А. Ghebreyesus) 11 февраля 2020 г. объявить пандемию новой коронавирусной инфекции, названной «коронавирусной болезнью 2019 года» (COVID-19, или 2019-nCoV); при этом вирус, послуживший этиологической причиной заболевания, получил наименование SARS-CoV-2 [4].

Россия традиционно занимала 4-е место в рейтинге заболеваемости после США, Индии и Бразилии. По состоянию на конец июля 2021 г. в РФ суммарно зарегистрировано 5 538 142 заражения, из них 135 214 летальных исходов (2,44% (95% ДИ 2,43–2,45) от числа заражённых) [5].

В Новосибирской области первый случай болезни выявлен 19 марта 2020 г. у 47-летней жительницы Новосибирска, прибывшей в город из Италии транзитом через Москву. Последующее развитие эпидемического процесса характеризовалось периодом единичной заболеваемости продолжительностью 5 нед, не выходящей за пределы 1 случая на 100 тыс. населения (рис. 1). Началом эпидемического нарастания можно считать 17-ю неделю, когда заболеваемость выросла до 7 случаев на 100 тыс. жителей. В дальнейшем количество инфицированных быстро нарастало до 29-й недели, после чего наметилось 4-недельное снижение с выходом на 5-недельное плато, сменившееся восходящим трендом. В период первого повышения заболеваемости проведено поперечное исследование популяционного иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 и сформирована когорта волонтеров для 3-этапного серомониторинга. 2-й этап был реализован на 38-й – 40-й нед, а 3-й – на 50-й – 53-й нед.

Известно, что противовирусный иммунитет представляет собой сложную многокомпонентную систему, в структуре которой доминирующую роль играют

клеточные факторы [6, 7]; тем не менее гуморальное звено иммунного ответа также во многом определяет исход инфекции и эпидемический прогноз заболевания в целом [8, 9]. Считается, что порог серопревалентности минимум 60% достаточен для того, чтобы произошло спонтанное угасание эпидемического процесса если не при всех, то при многих инфекционных болезнях [10, 11]. В этой связи определение доли лиц с наличием специфических антител (АТ) класса IgG к нуклеокапсиду (nucleocapsid, Nc) вируса SARS-CoV-2 может оказаться удобным инструментом для прогнозирования течения эпидпроцесса в рамках восприимчивой популяции [7, 12].

Целью предпринятого исследования явилось определение уровня и структуры популяционного иммунитета к SARS-CoV-2 среди населения Новосибирской области на фоне эпидемии COVID-19.

Материал и методы

Исследования серопревалентности населения к новому коронавирусу SARS-CoV-2 проведены в 26 модельных регионах РФ по единой методике, разработанной Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) при участии ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» (НИИЭМ) Роспотребнадзора с учётом рекомендаций ВОЗ [13]. Программа исследования рассмотрена и одобрена локальным этическим комитетом НИИЭМ (Протокол № 64 от 26.05.2020). Перед началом работы все участвовавшие в ней волонтеры или их юридические представители были ознакомлены с целью, методикой исследования и подписали информированное согласие.

Отбор добровольцев проводили методом анкетирования с использованием облачных технологий и рандомизации по возрастному и территориальному принципам. Критерием исключения было наличие манифестной формы COVID-19 на момент анкетирования. Объём выборки определяли по формуле расчёта необходимой её численности [14]:

$$n = \frac{t^2 \times p(1-p)}{m^2} \quad (1);$$

где:

n – объём выборки;

t – уровень точности (для 95% доверительного интервала $t = 1,96$);

p – оценочная распространённость изучаемого явления (в данном случае при 50% = 0,5);

m – допустимая ошибка (5%).

Расчёт объёма возрастной группы:

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,5(1-0,5)}{0,05^2} \quad (2);$$

$n = 384$ человека.

Всего в 1-ю фазу специфические АТ к Nc SARS-CoV-2 в крови определили у 2732 человек. Исследуемая когорта была рандомизирована

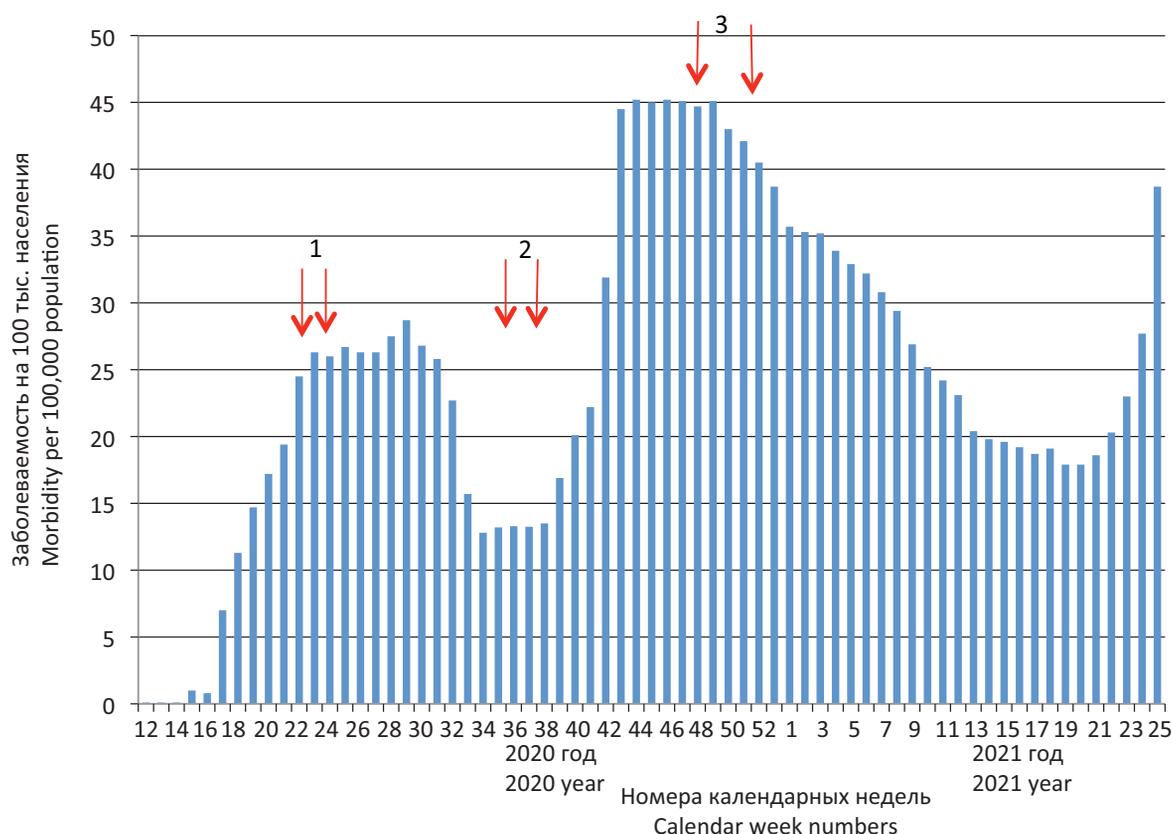


Рис. 1. Понедельная заболеваемость COVID-19 жителей Новосибирской области.

Примечание. Стрелками отмечены недели начала и завершения взятия проб крови на каждом этапе для определения доли серопревалентных лиц к нуклеокапсидному антигену SARS-CoV-2: 1-я фаза и одновременно 1-й этап серомониторинга – с 28.06.2020 по 15.07.2020 г.; 2-й этап – с 14.09.2020 по 04.10.2020 г.; 3-й этап – с 10.12.2020 по 30.12.2020 г. Номера над стрелками соответствуют этапам серомониторинга.

Fig. 1. Weekly incidence of COVID-19 in residents of the Novosibirsk Region.

Note. The arrows mark the weeks when blood sampling at each stage of the seromonitoring was started and completed to determine the proportion of individuals positive to antibodies to the SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen: phase 1 and at the same time 1st stage of seromonitoring, from June 28 to July 15, 2020; 2nd stage, from September 14 to October 04, 2020; 3rd stage, from December 10 to December 30, 2020. The numbers above the arrows correspond to the seromonitoring stages.

на 7 возрастных групп численностью от 377 до 409 чел. (табл. 1). Учитывая процессы созревания иммунной системы у детей [15], представителей группы 1–17 лет дополнительно разделили на 3 подгруппы: 1–6 лет (55 чел.), 7–13 (151 чел.) и 14–17 лет (182 чел.).

Соотношение мужчин и женщин составило 803 (29,4%) и 1929 чел. (70,6%) соответственно, т.е. участие женщин в исследовании было в 2,4 раза более представительным.

При распределении волонтеров по населённым пунктам Новосибирской области репрезентативная выборка была достигнута в 6 её районах, в 14 районах выборка оказалась нерепрезентативной (количество обследованных волонтеров <30 чел.); в 11 районах волонтеров не обследовали. Рандомизация по территориальному принципу предполагала равномерное привлечение волонтеров в когорту пропорционально численности населения в одном населённом пункте, причём с одного предприятия привлекали не более 30 представителей. Такой подход позволил избежать включения в протокол волонтеров из организованных коллективов.

Исследование проводили в 2 фазы, 1-я из которых представляла собой однократное поперечное исследование популяционного иммунитета в ранний период эпидемии COVID-19. Из когорты, сформированной в 1-ю фазу, отбирали репрезентативную группу волонтеров, согласившихся участвовать в 3-этапном мониторинге серопревалентности: 1637 чел. на 1-м этапе, 1273 на 2-м и 1651 чел. – на 3-м этапах.

Доля переболевших COVID-19 с диагнозом, установленным в лечебно-профилактическом учреждении (ЛПУ), составила 0,7% (18 чел.). Несмотря на то что выборка была нерепрезентативной, мы посчитали возможным привести данные по серопревалентности реконвалесцентов в качестве справочного материала.

Оценку серопревалентности проводили иммуноферментным методом (ИФА). С этой целью у волонтеров брали 3 мл крови из кубитальной вены. Плазму отделяли от клеточных элементов и анализировали ИФА-методом на любом подходящем анализаторе с использованием набора реагентов для определения АТ к Nc SARS-CoV-2 производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

(ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора (Россия, Оболенск). Результаты учитывали качественным методом [13].

Статистический анализ проводили параметрическими и непараметрическими методами и с помощью пакета Microsoft Excel 2010. Доверительный интервал (ДИ) среднего значения доли рассчитывали по методу A. Wald, J. Wolfowitz [16] с поправкой A. Agresti, B. Coull [17]. Для оценки статистической значимости различий долей использовали Z-тест [18]. Статистическую значимость различий, если не указано иначе, оценивали с вероятностью $p > 0,05$.

Результаты

1. Возрастное, территориальное и профессиональное распределение серопревалентности

Доля серопревалентных лиц, обследованных в 1-й фазе, в целом по Новосибирской области составила 9,1% (95% ДИ 8,0–10,2); по возрастным группам она варьировала от 4,9% (95% ДИ 3,0–8,0) среди лиц в возрасте 30–39 лет до 14,8% (95% ДИ 11,4–18,8) у волонтеров в возрасте 70 лет и старше (70+) (в обоих случаях различия статистически значимы при $p = 0,0001$). В группе 1–17 лет отмечено статистически незначимое превышение доли серопозитивных респондентов, вероятно, за счёт детей в возрасте 14–17 лет, среди которых эта величина составила 17,6% (95% ДИ 12,3–23,9) (табл. 1) (различия со средним показателем статистически достоверны при $p < 0,0001$). Серопревалентность не имела гендерных различий и составила у мужчин 7,8% (95% ДИ 6,1–9,9), у женщин – 9,6% (95% ДИ 8,1–10,1); различия статистически незначимы.

Таким образом, для населения Новосибирской области характерна довольно высокая дисперсия се-

ропревалентности: статистически достоверно выше среднего значения (графа «Всего») в старшей детской и самой старшей (70+) возрастных группах, но также достоверно ($p < 0,0001$) ниже среднего значения по когорте среди активных групп населения в возрастном интервале 18–39 лет.

Исследование распределения серопревалентности по географическому принципу проведено в 20 районах области, однако только в 6 из них была сформирована репрезентативная выборка, позволившая оценить долю серопозитивных волонтеров (табл. 2).

Распределение по географическому принципу, так же как и по возрастному, характеризуется заметной дисперсностью. Так, наибольшая доля лиц с АТ к Nc SARS-CoV-2 выявлена в Тогучинском районе, а наименьшая – в Краснозёрском (табл. 2). Выявленные различия статистически значимы по сравнению со среднепопуляционным уровнем ($p < 0,001$). Указанные районы расположены практически в противоположных местах исследуемой области. Плотность населения в Тогучинском районе составляет 9,29 чел. на 1 км², в Краснозёрском – 5,33 чел. на 1 км². В других отношениях эти территории во многом схожи. Вероятно, именно различиями численности населения можно объяснить некоторую разницу в серопревалентности. При этом уровень коллективного иммунитета в областном центре – Новосибирске практически совпал с среднепопуляционным показателем.

Помимо территориального распределения существенное влияние на параметр серопревалентности мог оказать и профессиональный фактор. Общеизвестно, что при заболеваниях с респираторным путём передачи наиболее уязвимыми к заражению являются специалисты, имеющие соответственно

Таблица 1. Серопревалентность к вирусу SARS-CoV-2 в различных возрастных группах населения Новосибирской области в 1-ю фазу исследования

Table 1. Seroprevalence to the SARS-CoV-2 virus in different age groups of the population of the Novosibirsk Region in the 1st phase of the study

Возрастная группа, лет Age group, years	Количество обследованных Number of examined persons	Наличие в крови антител класса IgG к SARS-CoV-2 Presence of IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% CI)
		Есть Yes	Нет No	
1–17	388	51	337	13,0 (10,0–16,9)
В том числе Including	1–6	55	49	10,9 (4,1–22,2)
	7–13	151	138	8,6 (4,7–14,3)
	14–17	182	32	17,6 (12,3–23,9)*
18–29	399	22	377	5,5 (3,5–8,2)*
30–39	388	19	369	4,9 (3,0–8,0)*
40–49	391	38	353	9,7 (7,0–13,1)
50–59	409	31	378	7,6 (5,2–10,6)
60–69	376	30	346	8,0 (5,4–11,2)
70+	377	56	321	14,8 (11,4–18,8)*
Всего Total	2728	247	2481	9,1 (8,0–10,2)

Примечание. * значения статистически значимо выше или ниже среднепопуляционных. Статистическую значимость различий определяли с помощью Z-теста при $p < 0,001$. Расхождения по объёму выборки вызваны техническими причинами; ДИ – доверительный интервал.

Note. *, values that are statistically significantly higher or lower than the population mean. The static significance of differences was determined using a Z-test, at $p < 0.001$. The discrepancies in the sample size are due to technical reasons; CI, confidence interval.

Таблица 2. Уровень серопревалентности среди жителей разных районов Новосибирской области в 1-ю фазу исследования

Table 2. The seroprevalence rates among residents of different districts of the Novosibirsk Region in the 1st phase of the study

Район District	Количество обследованных Number of examined persons	Наличие в крови антител класса IgG к SARS-CoV-2 Presence of IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% CI)
		Есть Yes	Нет No	
Коченёвский Kochenevsky	42	4	38	9,5 (2,7–22,6)
Краснозёрский Krasnozyersky	92	5	87	5,4 (1,8–12,2)
Мошковский Moshkovsky	34	3	31	8,8 (1,8–23,7)
Новосибирск Novosibirsk	2203	195	2008	8,9 (7,7–10,1)
Посёлок Элитный Elitny Village	186	21	165	11,3 (7,1–16,7)
Тогучинский Toguchinsky	90	16	74	17,8 (11,1–27,0)*
Итого по районам с репрезентативной выборкой Total for districts with the representative sample	2647	244	2403	9,2 (8,1–10,4)
Всего по всем районам Total for all districts	2732	248	2484	9 (10,8–10,2)

Примечание. * различия статистически значимы при сравнении со средним показателем серопревалентности $p < 0,0001$.

Note. * differences are statistically significant when compared with the mean seroprevalence, $p < 0.0001$.

роду деятельности активный контакт с окружающим населением. К числу таких специалистов можно отнести медиков, работников сферы обслуживания и транспорта, а также государственных служащих. Как показали проведённые обследования населения из разных профессиональных групп, наибольшая доля серопозитивных лиц имела место среди работников культуры и искусства. Однако выборка в этой группе была в 2 раза ниже порога репрезентативности, в связи с чем этот результат нельзя рассматривать как достоверный (табл. 3).

Среди других обследованных наибольшая доля серопозитивных выявлена в группе неработающих, большая часть которых – женщины, находящиеся в дорожном или послеродовом отпусках, а также прочие лица, не относящиеся ни к одной из перечисленных профессиональных категорий (табл. 3). Наименьший показатель серопревалентности зарегистрирован среди госслужащих и работников образования. Следует заметить, что значительная часть работников 2 последних категорий относится главным образом к среднему возрасту (18–39 лет). Среди волонтеров этих возрастных групп отмечен наименьший уровень серопревалентности (табл. 1).

2. Уровень серопозитивности у лиц, переболевших или имевших контакт с больными COVID-19

При обследовании 18 респондентов, перенёвших манифестную форму COVID-19, диагноз которой был соответствующим образом подтверждён в ЛПУ, АТ к Nc SARS-CoV-2 выявлены только у 6 из них (33,3; 95% ДИ 16,3–59,0). Данный результат оказался ниже ожидаемого, однако он не может считаться репрезентативным (выборка <30 чел.).

Наиболее важным фактором эпидемического процесса при многих, если не при всех, респираторных инфекциях является высокая контагиозность, способствующая распространению вирусов среди лиц, контактирующих с их источниками, каковыми могут быть больные или бессимптомные носители. Считается, что один больной COVID-19 может заразить не менее 3 контактировавших с ним человек [10, 19], причём это только «видимая часть айсберга». Показано, что до 85% случаев контактного заражения остаются нераспознанными [20, 21]. Учитывая столь высокую инфекционность SARS-CoV-2, мы оценили серопревалентность среди волонтеров, у которых в анамнезе были зафиксированные контакты с больными COVID-19. Из 205 подобных лиц АТ к Nc SARS-CoV-2 без каких-либо иных проявлений болезни найдены у 39 чел. (19,0%; 95% ДИ 13,9–25,0), что практически в 2 раза выше, чем в среднем по всей когорте (9,1%; 95% ДИ 8,0–10,2). Относительно данной ситуации можно предположить, что все эти серопозитивные носители могли перенести инфекцию в лёгкой форме либо вообще бессимптомно, в связи с чем возникает вопрос о вероятности участия контактных лиц в эпидемическом распространении инфекции.

В процессе обследования выявлена ещё одна группа волонтеров, у которых при полном отсутствии каких-либо клинических симптомов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) детектирована РНК возбудителя COVID-19. Всего насчитывалось 15 подобных респондентов, из которых у 4 (27,0%; 95% ДИ 0,8–55,0) обнаружены специфические АТ класса IgG к SARS-CoV-2. Однако делать какие-либо выводы на основании данного факта не представляется возможным вследствие малой выборки.

Таблица 3. Серопревалентность к SARS-CoV-2 в различных профессиональных группах населения в 1-ю фазу исследования
Table 3. Seroprevalence to SARS-CoV-2 in various occupational groups in the 1st phase of the study

Род занятий Occupation	Численность человек в группе Sample size	Наличие в крови антител класса IgG к SARS-CoV-2 Presence of IgG anti-SARS-CoV-2 antibodies		Серопревалентность, % (95% ДИ) Seroprevalence, % (95% CI)
		Есть Yes	Нет No	
Медицина Medicine	287	29	258	10,1 (6,8–14,2)
Наука Science	21	0	21	0
Бизнес Business	61	6	55	9,8 (3,7–20,2)
Образование Education	106	5	101	4,7 (1,7–10,8)
Искусство/Культура Arts/Culture	15	5	10	33,3 (1,6–10,7)
Производство Manufacture	111	6	105	5,4 (2,0–11,4)
Транспорт Transport	36	2	34	5,5 (0,6–18,7)
Государственная служба Public service	599	28	571	4,7 (3,1–6,9)
Офисные служащие Office workers	145	7	138	4,8 (2,0–10,0)
Неработающие Not working	365	48	317	15,4 (9,9–17,1)
Дети Children	388	51	337	13,0 (10,0–16,9)
Прочие Other	193	25	168	13,0 (8,6–18,5)

Примечание. Показатели серопозитивности среди работников науки и искусства ниже порога репрезентативности и носят только справочный характер; * показатель представлен в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего $M \pm m$.

Note. Indicators of seropositivity among employees in science and arts are below the threshold of representativeness and are for reference only; * the indicator is presented as the arithmetic mean and the standard error of the mean $M \pm m$.

3. Оценка доли бессимптомных форм

С целью расчёта распространённости бессимптомных форм среди серопозитивных волонтеров в 1-ю фазу исследования вычисляли долю лиц, у которых за исключением АТ к Nc SARS-CoV-2, отсутствовали какие-либо иные проявления манифестного заболевания. Полученные данные были сгруппированы по возрастным группам (табл. 4). Как можно видеть, результаты оказались сравнительно однородными. Размах варьирования серопозитивности составил от 89,5% (95% ДИ 67,0–98,7) до 100% без достоверных возрастных различий (табл. 4).

Таким образом, полученные результаты подтвердили существующие взгляды на существование значительной доли лиц, так или иначе вовлечённых в эпидемический процесс, но не имеющих всего комплекса клинических проявлений. Считается, что бессимптомные носители способны эффективно распространять вирус, и это может существенно затруднить борьбу с эпидемией [22]. Тем не менее не все такие лица являются распространителями инфекции. Некоторая часть из них способна вырабатывать специфический, хотя и краткосрочный, иммунитет к SARS-CoV-2, повышая тем самым общий уровень популяционного иммунитета до порогового значения, при котором происходит разрыв эпидемической цепи [10].

4. Динамическая оценка популяционного иммунитета к SARS-CoV-2

Представленные материалы раскрывают особенности популяционного иммунитета на пике первой волны эпидемии COVID-19 (1-я фаза исследования). В Новосибирской области в этот период наблюдалась низкая серопревалентность, слабо ассоциированная как с территориальным, так и с профессиональным факторами. Дальнейшим развитием программы стал анализ динамики популяционного иммунитета на 3-х этапах серомониторинга (рис. 1). Отбор проб для серологического анализа пришёлся на разные фазы эпидпроцесса: 1-й этап, представлявший собой часть поперечного исследования, выполнен на пике первой волны, когда заболеваемость варьировала в пределах $26\text{--}28\text{‰}_{0000}$; 2-й пришёлся на конец фазы стабилизации, при этом заболеваемость составила $13,5\text{--}20,1\text{‰}_{0000}$. Наконец, 3-й этап проводился в конце третьей волны на фоне заболеваемости в $42,1\text{--}38,7\text{‰}_{0000}$. В данной связи особый интерес представляла динамика формирования популяционного иммунитета (рис. 2).

Как видно из рис. 2, показатель серопозитивности изменялся по мере развития эпидемии. Суммарно исходный уровень на 1-м этапе был равен 7,4% (95% ДИ 6,2–8,9). На 2-м этапе он увеличился в 1,7 раза

Таблица 4. Доля лиц с бессимптомным течением инфекции из общего числа серопозитивных жителей разных возрастных групп Новосибирской области

Table 4. The proportion of people with asymptomatic infection among the seropositive residents of different age groups in the Novosibirsk Region

Возрастная группа, лет Age group, years	Общее число серопозитивных лиц Total number of seropositive persons		Доля серопозитивных лиц с бессимптомным течением, % (95% ДИ) The proportion of the seropositive persons with asymptomatic course, % (95% CI)
	Всего Total	В том числе с бессимптомным течением Including asymptomatic course	
1–17	51	50	98,0 (89,0–100,0)
18–29	22	22	100,0
30–39	19	17	89,5 (67,0–98,7)
40–49	38	36	94,7 (82,2–99,4)
50–59	31	28	90,3 (74,2–98,0)
60–69	30	28	93,3 (78,0–99,1)
70+	56	53	94,6 (85,1–99,0)
Всего Total	247	234	94,7 (91,2–97,2)

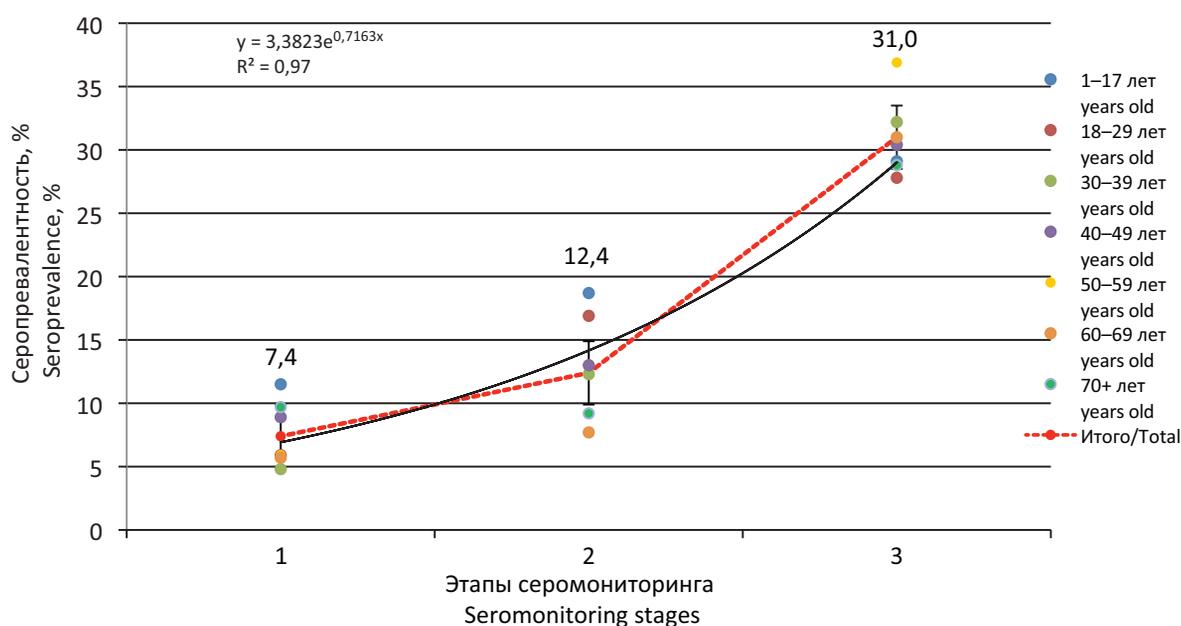


Рис. 2. Уровни серопревалентности к SARS-CoV-2 у волонтеров всех возрастных групп на этапах серомониторинга.

Примечание. Цветами показаны возрастные группы волонтеров. Чёрная кривая – линия тренда. Уравнение степенной функции и коэффициент детерминации приведены в левом верхнем углу. Числовые значения над и под итоговой кривой – доля серопревалентных волонтеров в когорте на этапе серомониторинга. Вертикальные линии – показатели доверительного интервала итогового значения серопозитивности.

Fig. 2. The rates of seroprevalence to SARS-CoV-2 in volunteers of all age groups at the different stages of seromonitoring.

Note. Colors indicate age groups of volunteers. The black curve is the trend line. The power function equation and the coefficient of determination are shown in the upper left corner. Numerical values above and below the final curve are the proportion of seroprevalent volunteers in the cohort at the seromonitoring stage. Vertical lines are the values of the confidence interval of the final seropositivity index.

и составил 12,4% (95% ДИ 10,6–14,3) (различия статистически значимы при $p < 0,0001$). В дальнейшем на 3-м этапе данный показатель возрос в 4,2 раза относительно 1-го этапа и в 2,5 раза – относительно 2-го, составив 31% (95% ДИ 28,8–33,3). Таким образом, в динамике процесса наблюдался рост серопозитивности, который можно описать уравнением: $y = 3,3834e^{0,7163x}$ с высокой степенью вероятности (коэффициент детерминации $R^2 = 0,97$). Учитывая, что в период проведения данного исследования програм-

ма вакцинации населения ещё не стартовала, очевидно, что весь прирост серопозитивности был обусловлен процессами формирования естественного иммунитета: частично за счёт реконвалесценто и частично – за счёт бессимптомных форм инфекции.

Обсуждение

Исследование, проведённое в рамках 1-й фазы программы, показало, что уровень серопревалентности среди населения Новосибирской области

составил 9,1% (95% ДИ 8,0–10,2). В возрастном аспекте повышенная доля серопозитивных лиц, как и ранее [13, 23, 24], пришлась на детей, однако в этот раз в большей степени – на возрастную группу от 14 до 17 лет. Особенностью территории была минимальная серопревалентность среди наиболее активной части населения в возрасте 18–39 лет на фоне первой волны эпидемии. Примечательно, что в близкой по географическому расположению территории Иркутской области имело место аналогичное снижение доли серопозитивных лиц, но со сдвигом в старшие возрастные группы (от 30 до 69 лет); при этом максимальная доля серопозитивности также зарегистрирована у детей в 14–17 лет [25].

Распределение по профессиональному принципу выявило наибольшее количество АТ-позитивных лиц в 3 социальных группах: дети, неработающие и прочие. Первая из них охарактеризована выше; группа неработающих представлена в основном женщинами, находящимися в дородовом и послеродовом отпусках. Объяснить подобную ситуацию на данный момент времени сложно, можно лишь отметить, что преобладание среди серопозитивных лиц женщин продемонстрировано и в других исследованиях [26]. В группу «прочие» вошли респонденты, не отнесенные ни в одну из перечисленных выше профессионально-социальных категорий; это чаще всего работники косметических, массажных и спа-салонов, парикмахерских, спортивных клубов и т.д., т.е. люди, профессионально контактирующие с широким кругом населения.

В составе исследованной когорты находилась небольшая группа волонтеров, указавших наличие в анамнезе COVID-19. Частота выявления АТ IgG среди них оказалась ниже ожидаемой и не превысила 33,3% (95% ДИ 16,3–59). Принято считать, что в раннем периоде реконвалесценции уровень IgG достигает своего максимума к концу 1-го месяца после начала болезни и постепенно снижается к 70-му дню [27]. Кроме того, недавно продемонстрировано, что до 30% реконвалесцентов вырабатывают специфические АТ в титрах ниже порога чувствительности метода [28]. В данном контексте остаётся открытым вопрос об эпидемиологической опасности переболевших и вероятности их повторного заражения. Тем не менее участие реконвалесцентов в распространении SARS-CoV-2 многократно подтверждено [10, 19] и уже не вызывает сомнений. В связи с этим особый интерес представляют лица, имевшие бытовой или профессиональный контакт с больными COVID-19 и/или реконвалесцентами. Таких в когорте волонтеров Новосибирской области насчитывалось 205 чел., среди которых 19,0% (95% ДИ 13,9–25,0) имели АТ к SARS-CoV-2 без каких-либо клинических симптомов. Вероятно, часть из них перенесли инфекцию в бессимптомной форме, относительно которой среди исследователей продолжается активная дискуссия. С одной стороны, показано, что срок выделения вируса у таких пациентов значительно продолжительнее, чем у имеющих манифестную форму COVID-19, вследствие сниженной воспалительной

реакции, характеризующейся низкими концентрациями цито- и хемокинов в крови [22]. В то же время не все серопозитивные бессимптомные лица являются вирусоносителями. Хотя считается, что иммунный ответ у последних существенно слабее и короче, тем не менее его наличие могло оказать некоторое позитивное воздействие на формирование коллективной защиты в популяции, особенно до начала широкого применения вакцин [10, 29].

Все факторы в совокупности, обеспечивающие становление естественного иммунитета к SARS-CoV-2, могли определённым образом повлиять на уровень серопревалентности населения Новосибирской области, динамика которого продемонстрирована в ходе 3-этапного серомониторинга (рис. 2). В период первой волны COVID-19 (1-й этап мониторинга) уровень серопозитивности не поднимался выше 9,1% и едва ли мог иметь сколько-нибудь существенное значение для коллективного иммунитета в целом. Логично предположить, что в этот период степень контактного распространения возбудителя была невелика, о чём свидетельствует не превышающий $29\%_{0000}$ рост понедельного уровня заболеваемости (рис. 1). Спустя 16 нед (2-й этап) зарегистрирован статистически значимый рост серопозитивности даже на фоне сравнительно низкой заболеваемости. К 3-му этапу темпы последней ускорились практически в 2 раза относительно 2-го этапа и одновременно с этим доля серопозитивного населения Новосибирской области возросла в 2,5 раза (рис. 2). Таким образом, показана вероятность роста естественного иммунитета по мере увеличения заболеваемости, причём этот рост довольно точно описывается экспоненциальной кривой. Можно было бы предположить, что указанный путь способен привести к формированию порогового уровня иммунитета, при достижении которого эпидемический процесс спонтанно угасает. К сожалению, на протяжении 6 мес, когда проводился 3-этапный серомониторинг, уровень серопревалентности достиг $\frac{1}{3}$ от необходимого, причём согласно Q. Lei [29] у большинства из бессимптомных лиц он может снизиться в течение 2–3 мес. Полученные результаты мониторинга свидетельствуют о низкой вероятности достижения значения порогового иммунитета (60–65%) естественным путём, поскольку далеко не все заболевшие окончательно выздоравливают без существенных последствий и длительность временного периода, на протяжении которого у них будет сохраняться гуморальный иммунитет, неизвестна [30, 31]. Отсюда следует, что единственным реальным путём достижения эффективного популяционного иммунитета на уровне 60–65% (по некоторым данным он должен составлять около 80%) [10, 11, 30] может стать только массовая вакцинация населения.

Заключение

На основании представленных данных можно сделать следующие выводы:

1. Коллективный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 совокупного населения Новосибирской области в 1-ю фазу исследования составил 9,1% (95% ДИ 8,0–10,2).

2. Максимальный уровень серопревалентности в 1-ю фазу исследования выявлен среди детей в возрасте 14–17 лет – 17,6% (95% ДИ 12,3–23,9). Наименьшая величина показателя зарегистрирована в группах «государственная служба» и «образование»: 4,7% (95% ДИ 3,1–6,9) и 4,8% (95% ДИ 2,0–10,0) соответственно.

3. При наличии контактов с больными COVID-19 вероятность сероконверсии у контактных лиц увеличивается приблизительно в 2,3 раза.

4. У лиц с позитивным результатом ПЦР-анализа, полученным ранее, АТ обнаруживались в 27,0% (95% ДИ 0,8–55,0) случаев.

5. Доля бессимптомных форм инфекции среди серопозитивных жителей Новосибирской области составила 94,7% (95% ДИ 91,2–97,2).

6. В процессе 3-этапного серомониторинга установлен достоверный рост уровня серопозитивности с 7,4% (95% ДИ 6,2–8,9) на 1-м этапе до 31% (95% ДИ 28,8–33,3) на 3-м. Показано, что рост серопревалентности носил экспоненциальный характер, описывавшийся уравнением $y = 3,3834e^{0,7163x}$ с коэффициентом детерминации (R^2), равным 0,97.

ЛИТЕРАТУРА

- WHO. Disease outbreak news – China. Available at: <https://www.who.int/ru/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON229> (accessed August 12, 2021).
- NovelCoronavirus(2019-nCoV). SituationReport-10. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf> (accessed August 12, 2021).
- Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929–36. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001191>
- WHO. Director-General’s remarks at 2019-nCoV coronavirus infection press briefing, 11 February 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (accessed August 12, 2021).
- Коронавирус. Онлайн карта распространения коронавируса. Коронавирус в России и мире. Available at: <https://www.coronavirus-monitor.ru> (accessed August 12, 2021).
- Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(6): 363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity.* 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
- Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology.* 2020; 9(5): e01136. <https://doi.org/10.1002/cti2.11363>
- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Cochrane COVID-19 diagnostic test accuracy group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: Understanding COVID-19. *Immunity.* 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
- Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benitez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., et al. Dynamics of Population Immunity Due to the Herd Effect in the COVID-19 Pandemic. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(2): E236. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020236>
- Iyer A.S., Jones F.K., Nodoushani A., Kelly M., Becker M., Slater D., et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv.* 2020; 5(52): eabe0367. <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Башкетова Н.С., Фридман Р.К., Лялина Л.В., и др. Популяционный иммунитет к вирусу SARS-CoV-2 среди населения Санкт-Петербурга в период эпидемии COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; (3): 124–30. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130>
- Расчёт необходимой численности выборки. Available at: https://bstudy.net/672834/sotsiologiya/raschet_neobhodimoy_chislennosti_vyborki (accessed August 12, 2021).
- Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.* 2015; 282(1821): 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>
- Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *Ann. Math. Stat.* 1939; 10(2): 105–18.
- Agresti A., Coull B.A. Approximate Is Better than “Exact” for Interval Estimation of Binomial Proportions. *Am. Stat.* 1998; 52(2): 119–26. <https://doi.org/10.2307/2685469>
- Исследовательская компания «РАДАР». Калькулятор значимых различий (z-test). Available at: https://radar-research.ru/software/z-test_calculator/ (accessed August 12, 2021).
- Sanche S., Lin Y.T., Xu C., Romero-Severson E., Hengartner N., Ke R. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(7): 1470–7. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200282>
- Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., Wang Y.H., Hsueh S.C., Yen M.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3): 404–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
- Li R., Pei S., Chen B., Song Y., Zhang T., Yang W., Shaman J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science.* 2020; 368(6490): 489–93. <https://doi.org/10.1126/science.abb3221>
- Long Q.X., Tang X.J., Shi Q.L., Li Q., Deng H.J., Yuan J., et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* 2020; 26(8): 1200–4. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Смирнов В.С., Лялина Л.В., Козловских Д.Н. Особенности серопревалентности к SARS-CoV-2 населения Среднего и Южного Урала в ранний период пандемии COVID-19. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2021; 20(3): 8–18. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-3-8-18>
- Попова А.Ю., Андреева Е.Е., Бабура Е.А., Балахонов С.В., Башкетова Н.С., Буланов М.В., и др. Особенности формирования серопревалентности населения Российской Федерации к нуклеокапсиду SARS-CoV-2 в первую волну эпидемии COVID-19. *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11(2): 297–323. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-FOD-1684>
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Балахонов С.В., Чеснокова М.В., Дубровина В.И., и др. Опыт исследования серопревалентности к вирусу SARS-CoV-2 населения Иркутской области в период вспышки COVID-19. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-106-113>
- Borges L.P., Martins A.F., de Melo M.S., de Oliveira M.G.B., de Rezende Neto J.M., Dósea M.B., et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in an asymptomatic population in Sergipe, Brazil. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 2020; 44: e108. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.108>
- Iyer A.S., Jones F.K., Nodoushani A., Kelly M., Becker M., Slater D., et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv.* 2020; 5(52): 20155374. <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374>
- Wu F., Wang A., Liu M., Wang Q., Chen J., Xia S., et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv.* 2020; 20047365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
- Lei Q., Li Y., Hou H.Y., Wang F., Ouyang Z.Q., Zhang Y., et al. Antibody dynamics to SARS-CoV-2 in asymptomatic COVID-19 infections. *Allergy.* 2021; 76(2): 551–61. <https://doi.org/10.1111/all.14622>
- Schaeffer B., Taylor B., Bushman M., Hanage W.P. The devil in the details: Herd immunity and pandemic response. *Cell*

Host Microbe. 2021; 27(7): 1048. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.017>

31. Vabret N. Antibody responses to SARS-CoV-2 short-lived. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(9): 519. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0405-3>

References

- WHO. Pneumonia of unknown cause – China; 2020. Available at: <https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unknown-cause-china/en/> (accessed August 12, 2021). (in Russian)
- Novel Coronavirus(2019-nCoV). Situation Report - 10. Available at: <https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200130-sitrep-10-ncov.pdf> (accessed August 12, 2021).
- Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S, Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929–36. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001191>
- WHO. Director-General’s remarks at 2019-nCoV coronavirus infection press briefing, 11 February 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/dg/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020> (accessed August 12, 2021).
- Coronavirus. Online map. Tracking the Spread of the Outbreak [Koronavirus. Onlayn karta rasprostraneniya koronavirusa. Koronavirus v Rossii i mire]. Available at: <https://coronavirus-monitor.ru/en/> (accessed August 12, 2021). (in Russian)
- Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(6): 363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*. 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
- Hou H., Wang T., Zhang B., Luo Y., Mao L., Wang F., et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin. Transl. Immunology*. 2020; 9(5): e01136. <https://doi.org/10.1002/cti2.11363>
- Deeks J.J., Dinnes J., Takwoingi Y., Davenport C., Spijker R., Taylor-Phillips S., et al. Cochrane COVID-19 diagnostic test accuracy group. Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2020; 6(6): CD013652. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>
- Randolph H.E., Barreiro L.B. Herd immunity: Understanding COVID-19. *Immunity*. 2020; 52(5): 737–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
- Clemente-Suárez V.J., Hormeño-Holgado A., Jiménez M., Benitez-Agudelo J.C., Navarro-Jiménez E., Perez-Palencia N., et al. Dynamics of Population Immunity Due to the Herd Effect in the COVID-19 Pandemic. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): E236. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020236>
- Iyer A.S., Jones F.K., Nodoushani A., Kelly M., Becker M., Slater D., et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv*. 2020; 5(52): eabe0367. <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374>
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel’nikova A.A., Bashketova N.S., Fridman R.K., Lyalina L.V., et al. Herd immunity to SARS-CoV-2 among the population in Saint Petersburg during the COVID-19 epidemic [Populyatsionnyy immunitet k virusu SARS-CoV-2 sredi naseleniya Sankt-Peterburga v period epidemii COVID-19]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 124–30. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-124-130> (in Russian).
- Calculation of the required sample size [Raschet neobkhodimoy chislennosti vyborki]. Available at: https://bstudy.net/672834/sotsiologiya/raschet_neobhodimoy_chislennosti_vyborki (accessed August 12, 2021). (in Russian)
- Simon A.K., Hollander G.A., McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.* 2015; 282(1821): 20143085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>
- Wald A., Wolfowitz J. Confidence limits for continuous distribution functions. *Ann. Math. Stat.* 1939; 10(2): 105–18.
- Agresti A., Coull B.A. Approximate Is Better than “Exact” for Interval Estimation of Binomial Proportions. *Am. Stat.* 1998; 52(2): 119–26. <https://doi.org/10.2307/2685469>
- Research company «RADAR». Calculator of significant differences (z-test) [Issledovatel’skaya kompaniya «RADAR». Kal’kulyator znachimykh razlichiy (z-test)]. Available at: https://radar-research.ru/software/z-test_calculator/ (accessed August 12, 2021). (in Russian)
- Sanche S., Lin Y.T., Xu C., Romero-Severson E., Hengartner N., Ke R. High contagiousness and rapid spread of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(7): 1470–7. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200282>
- Lai C.C., Liu Y.H., Wang C.Y., Wang Y.H., Hsueh S.C., Yen M.Y., et al. Asymptomatic carrier state, acute respiratory disease, and pneumonia due to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): Facts and myths. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2020; 53(3): 404–12. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.02.012>
- Li R., Pei S., Chen B., Song Y., Zhang T., Yang W., Shaman J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*. 2020; 368(6490): 489–93. <https://doi.org/10.1126/science.abb3221>
- Long Q.X., Tang X.J., Shi Q.L., Li Q., Deng H.J., Yuan J., et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* 2020; 26(8): 1200–4. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0965-6>
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel’nikova A.A., Smirnov V.S., Lyalina L.V., Kozlovskikh D.N. Peculiarities of seroprevalence to SARS-CoV-2 in the population of the Middle and Southern Urals in the early period of the COVID-19 pandemic [Osobennosti seroprevalentnosti k SARS-CoV-2 naseleniya Srednego i Yuzhnogo Urala v ranniy period pandemii COVID-19]. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2021; 20(3): 8–18. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-3-8-18> (in Russian)
- Popova A.Yu., Andreeva E.E., Babura E.A., Balakhonov S.V., Bashketova N.S., Bulanov M.V., et al. Features of developing SARS-CoV-2 nucleocapsid protein population-based seroprevalence during the first wave of the COVID-19 epidemic in the Russian Federation [Osobennosti formirovaniya seroprevalentnosti naseleniya Rossijskoy Federatsii k nukleokapsidu SARS-CoV-2 v pervuyu volnu epidemii COVID-19]. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(2): 297–323. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-FOD-1684> (in Russian)
- Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Mel’nikova A.A., Balakhonov S.V., Chesnokova M.V., Dubrovina V.I., et al. Experience in studying seroprevalence to SARS-CoV-2 virus in the population of the Irkutsk Region during COVID-19 outbreak [Opyt issledovaniya seroprevalentnosti k virusu SARS-CoV-2 naseleniya Irkutskoy oblasti v period vspyshki COVID-19]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 106–13. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-106-113> (in Russian)
- Borges L.P., Martins A.F., de Melo M.S., de Oliveira M.G.B., de Rezende Neto J.M., Dósea M.B., et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in an asymptomatic population in Sergipe, Brazil. *Rev. Panam. Salud. Publica*. 2020; 44: e108. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.108>
- Iyer A.S., Jones F.K., Nodoushani A., Kelly M., Becker M., Slater D., et al. Dynamics and significance of the antibody response to SARS-CoV-2 infection. *medRxiv*. 2020; 5(52): 20155374. <https://doi.org/10.1101/2020.07.18.20155374>
- Wu F., Wang A., Liu M., Wang Q., Chen J., Xia S., et al. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. 2020; 20047365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
- Lei Q., Li Y., Hou H.Y., Wang F., Ouyang Z.Q., Zhang Y., et al. Antibody dynamics to SARS-CoV-2 in asymptomatic COVID-19 infections. *Allergy*. 2021; 76(2): 551–61. <https://doi.org/10.1111/all.14622>
- Schaeffer B., Taylor B., Bushman M., Hanage W.P. The devil in the details: Herd immunity and pandemic response. *Cell Host Microbe*. 2021; 27(7): 1048. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.017>
- Vabret N. Antibody responses to SARS-CoV-2 short-lived. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(9): 519. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0405-3>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период

Мельникова О.В.¹, Адельшин Р.В.^{1,2}, Лопатовская К.В.¹, Трушина Ю.Н.¹, Яковчиц Н.В.¹, Андаев Е.И.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 664047, Иркутск, Россия; ²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», 664003, Иркутск, Россия

Введение. Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – важнейший с медицинской точки зрения представитель одноимённой серогруппы рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. По мнению разных исследователей, существует от 3 до 5 субтипов ВКЭ, самым распространённым из которых является сибирский.

Цель работы – сравнение биологических свойств и выявление филогенетических связей большой группы изолятов ВКЭ сибирского субтипа, циркулирующего в природных очагах юга Восточной Сибири в современный период (2006–2019 гг.).

Материал и методы. Иксодовых клещей (*Ixodidae*) и мелких млекопитающих (*Mammalia*) из природных очагов клещевого энцефалита (КЭ) Иркутской области, Республики Бурятия и Республики Тыва, а также материал от пациентов исследовали на маркеры ВКЭ в иммуноферментном анализе (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Из суспензий, показавших положительные результаты, изолировали вирус и изучали его патогенность для белых мышей (*Mus*) (БМ) при разных путях введения. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *E* изолятов проводили на уровне 1 пассажа. Филогенетическое дерево строили в программе MEGA X.

Результаты. Филогенетический анализ показал, что в природных очагах на исследуемой территории циркулирует ВКЭ сибирского субтипа 2 генетических линий – «Васильченко» и «Заусаев» – со значительным преобладанием первой. Выявлены различия между группами штаммов разных линий по биологическим свойствам. Большинство штаммов обеих групп оказались высоковирулентными для БМ как при внутримозговом, так и при периферическом путях введения инфекционного агента. Пониженную нейроинвазивность продемонстрировали лишь 4 штамма. Вместе с тем филогенетический анализ последовательностей гена *E* установил наличие связи штаммов с местом их изоляции, но не с хозяином или патогенностью для БМ.

Заключение. Дальнейшие работы по поиску участков генома ВКЭ, ассоциированных с патогенностью, требуют определения и изучения полногеномных последовательностей репрезентативной группы штаммов, обладающих разными биологическими свойствами.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; субтип; группы «Заусаев», «Васильченко»; вирулентность; филогенетический анализ

Для цитирования: Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Лопатовская К.В., Трушина Ю.Н., Яковчиц Н.В., Андаев Е.И. Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 310-321. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

Для корреспонденции: Мельникова Ольга Витальевна, д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых вирусных инфекций, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 664047, Иркутск, Россия.
E-mail: melnikovaovit@gmail.com

Участие авторов: Мельникова О.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Адельшин Р.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Лопатовская К.В. – проведение экспериментов; Трушина Ю.Н. – проведение экспериментов; Яковчиц Н.В. – проведение экспериментов; Андаев Е.И. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории природно-очаговых инфекций и зоолого-паразитологического отдела ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, а также сотрудникам ФГБУН «Институт географии им. В.Б. Сочавы» Сибирского отделения Российской академии наук (ИГ СО РАН) (Иркутск) научному сотруднику лаборатории теоретической географии, кандидату географических наук Н.Е. Красноштановой и старшему научному сотруднику той же лаборатории, кандидату географических наук С.И. Лесных, в разные годы принимавшим участие в сборе материалов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. 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 № 1 от 01.04.2021).

Поступила 13.04.2021

Принята в печать 14.07.2021

Опубликована 31.08.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East siberia in modern period

Ol'ga V. Mel'nikova¹, Renat V. Adel'shin^{1,2}, Kristina V. Lopatovskaya¹, Yulia T. Trushina¹, Nikolai V. Yakovchits¹, Evgeny I. Andaev¹

¹FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 664047, Irkutsk, Russia;

²FSBEI HE «Irkutsk State University», 664003, Irkutsk, Russia

Introduction. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is medically most important representative of the same-name serogroup of genus *Flavivirus* (*Flaviviridae*). In the view of various researchers there are 3 to 5 TBEV subtypes, of them siberian being the most prevalent. The aim of the work is to compare the biological properties and to reveal phylogenetic relationships of large group of modern (2006–2019) TBEV isolates of siberian subtype from natural foci in southern East Siberia.

Material and methods. Ixodid ticks (*Ixodidae*) and small mammals (*Mammalia*) from tick-borne encephalitis (TBE) natural foci in Irkutsk Region, Republic of Buryatia and Republic of Tuva, as well as specimens from TBE patients, were examined for TBEV markers using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Virus was isolated from suspensions with positive result, and its pathogenicity for white mice (*Mus*) (WM) was studied by different inoculation ways. Analysis of the nucleotide sequences of E gene was performed for isolates at 1st passage. Phylogenetic tree was constructed using MEGA X program.

Results. The phylogenetic analysis has shown that TBEV of siberian subtype that circulates in natural foci of the studied territory belong to two genetic lines. These lines are «Vasilchenko» and «Zausaev» with a strong predominance of the first. The differences in biological properties between the two groups of strains have been demonstrated. Most of the strains from both groups showed high virulence for WM both after intracerebral and subcutaneous inoculation. Only four strains demonstrated the reduced ability to overcome the blood-brain barrier. However, the analysis of the E protein coding sequences revealed evident correlation between phylogenetic clustering and geographical origin of isolates, but not with TBE host or pathogenicity for WM.

Conclusion. Further search for TBE genome regions associated with pathogenicity require the analysis of complete genome sequences of representative group of strains with different biological properties.

Key words: tick-borne encephalitis virus; subtype; «Zausaev», «Vasilchenko» groups; virulence; phylogenetic analysis

For citation: Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Lopatovskaya K.V., Trushina Yu.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I. Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East Siberia in modern period. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(4): 310-321 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-55>

For correspondence: Ol'ga V. Mel'nikova, D.Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Natural-Foci Viral Infections, FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 664047, Irkutsk, Russia. E-mail: melnikovaoit@gmail.com

Information about the authors:

Mel'nikova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5133-0323>

Adel'shin R.V., <https://orcid.org/0000-0003-3690-3992>

Lopatovskaya K.V., <https://orcid.org/0000-0002-8772-5842>

Trushina Yu.N., <https://orcid.org/0000-0003-4501-146X>

Yakovchits N.V., <https://orcid.org/0000-0002-9994-0371>

Andaev E.I., <https://orcid.org/0000-0002-6612-479X>

Contribution: Mel'nikova O.V. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Adel'shin R.V. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Lopatovskaya K.V. – conducting of the experiments; Trushina Yu.N. – conducting of the experiments; Yakovchits N.V. – conducting of the experiments; Andaev E.I. – final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors are grateful to the scientists working in the Laboratory of Natural Foci Infections and Department of Zoology and Parasitology of the FSHI «Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), and the scientists of the «V.B. Sochava Institute of Geography» Siberian Branch of RAS (Irkutsk), Researcher of the Laboratory of Theoretical Geography, Ph.D. (Geogr.) N.E. Krasnoshtanova and Senior Researcher of the same laboratory, Ph.D. (Geogr.) S.I. Lesnykh for their help in collecting the materials in different periods.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. 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 institution (Protocol No 1 dated 01.04.2021).

Received 13 April 2021

Accepted 14 July 2021

Published 31 August 2021

Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – важнейший с медицинской точки зрения представитель одноимённой серогруппы рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. На сегодняшний день признано существование 3 субтипов вируса – европейского (западного), дальневосточного и сибирского [1]. Некоторые исследователи предлагают выделять ещё как минимум 3 субтипа: 886-84-подобный (байкальский), 178-79 [2–4] и гималайский [5]. Из них наиболее широко распространён и разнообразен сибирский субтип, в котором выделяют 4 группы: «Заусаев», «Васильченко», «Балтийская» и «Обская» [6]. Совсем недавно к ним предложено добавить ещё одну – «Боснийскую». Показано различное географическое распространение этих линий, при этом в Западной Сибири отмечено их наибольшее разнообразие [7]. На территории Восточной Сибири зафиксирована циркуляция групп «Васильченко» и «Заусаев» [8], причём как минимум с 60-х гг. прошлого века [9].

Штамм «Васильченко» («Vasilchenko») был выделен доктором медицинских наук, профессором, многолетним руководителем лаборатории иммунологии и патогенеза клещевого энцефалита ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (Омск) Э.А. Кветковой из крови пациента со стёртой формой клещевого энцефалита (КЭ), оказавшегося серонегативным как при обследовании по поводу данного заболевания, так и при дальнейшей иммунизации живой вакциной из штамма «Еланцев» («Elantsev») [10]. Штамм «Заусаев» («Zausaev») изолирован в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва) от умершего больного с прогрессирующим на протяжении 2 лет хроническим (КЭ), который развился после латентного периода, равного 10 годам, с момента присасывания клеща в Томской области. Т.С. Грицун и соавт. [11] показали различия между двумя этими штаммами по признакам патогенности для сирийских хомячков, цитопатогенности для клеток PS, морфологии бляшек и электрофоретическим

профилям вирусспецифических неструктурных белков и предположили, что пациент, от которого был выделен вирус «Заусаев», скончался вследствие усилившейся патогенности латентного возбудителя вслед за спонтанным мутагенезом. В Челябинской области на протяжении последнего десятилетия наблюдается изменение структуры клинических форм КЭ с увеличением доли менингеальных и очаговых форм [12]. Молекулярно-генетические исследования полученного от таких лиц материала с последующим филогенетическим анализом позволили отнести исследуемые образцы к сибирскому субтипу, группе «Заусаев». Авторы связывают патоморфоз КЭ на Южном Урале в сторону более тяжёлого течения болезни с особенностями циркулирующего в данной местности ВКЭ.

Штаммы сибирского субтипа способны вызывать весь спектр вариантов клинического течения КЭ у человека – от инаппарантных до тяжёлых очаговых форм с летальным исходом [13, 14], что может быть обусловлено в числе других факторов гетерогенностью популяции инфекционного агента по признаку вирулентности.

Цель данного исследования заключалась в сравнении биологических свойств и выявлении филогенетических связей большой группы изолятов ВКЭ сибирского субтипа, циркулирующего в природных очагах юга Восточной Сибири в современный период.

Материал и методы

Голодных имаго иксодовых клещей (*Ixodidae*), 97,7% из которых составили представители *Ixodes persulcatus* Schulze, 1930, собирали на флаг с конца апреля по начало июля на протяжении 2006–2019 гг. на разных участках Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия) с длительно существующими природными очагами КЭ. Мелких млекопитающих (*Mammalia*) отлавливали ловушками типа Геро на тех же участках в июле–сентябре 2008–2014 гг. Кровь больной с диагнозом «клещевой энцефалит?» и секционный материал от погибшей пациентки с диагнозом «микст-инфекция: клещевой энцефалит, менингоэнцефалополиомиелитическая форма тяжёлого

течения, ассоциированный с клещевым боррелиозом беззрителемной формы тяжёлого течения» были направлены на исследование в референс-центр по мониторингу за клещевым вирусным энцефалитом на базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора из ОГБУЗ «Иркутская областная инфекционная клиническая больница» (Иркутск). Кроме того, в 2011 г. было исследовано 1450 клещей *I. persulcatus*, собранных сотрудниками Тувинской противочумной станции Роспотребнадзора (Кызыл) на территории 7 административных образований Республики Тыва.

Особей клещей ($n = 30\ 599$) исследовали индивидуально методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора реагентов ИФА ТС АГ ВКЭ («Микроген», Россия, Томск) в соответствии с инструкцией производителя. Из вещества мозга мелких млекопитающих ($n = 82$) готовили 10% суспензию на физиологическом растворе и исследовали на той же тест-системе. Положительные по результатам ИФА суспензии клещей и мозга мелких млекопитающих с 2012 г. верифицировали в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (комплект реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophillum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL») ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» (ЦНИИЭ) Роспотребнадзора (Москва). Выделение вирусной РНК из материала суспензий осуществляли при помощи набора «АмплиПрайм® РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Россия, Москва). Обратную транскрипцию выполняли с использованием набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора). На протяжении 2018–2019 гг. ввиду нехватки тест-систем для проведения ИФА 998 клещевых суспензий дополнительно исследовали посредством ОТ-ПЦР в реальном времени (набор реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B. burgdorferi* sl., *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL»).

Из клещевых и мозговых суспензий, показавших положительный и/или сомнительный результат на наличие антигена (АГ) и РНК ВКЭ изолировали вирус на беспородных белых мышах (БМ) 2–3-дневного возраста [15] со сроком наблюдения 21 сут. Часть клещевых суспензий, отрицательных и/или сомнительных по результатам ИФА, преимущественно полученных с территорий с низкой численностью клещей (Усть-Ордынский Бурятский округ, УОБ), исследовали на микрокультуре клеток СПЭВ (SPEV) по наличию цитопатического действия (ЦПД) вируса [15] с последующим ИФА-тестированием и закреплением в пассажах на мышах.

С целью оценки нейровирулентности и периферической активности изоляты ВКЭ титровали на беспородных БМ с массой тела 6–8 г путём их внутримозгового (по 0,025 мл) и подкожного (по 0,25 мл) заражения. За животными наблюдали на протяжении 14 сут. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча [15]. Нейроинвазивность оценивали по индексу инвазивности (ИИ) – разности титров вируса при внутримозговом

(в/м) (mNis) и подкожном (п/к) (mNsc) заражении (Ig LD₅₀/мл) (LD₅₀ – средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы). Эксперименты на животных выполняли в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации N 708н от 23.08.2010).

Для расшифровки нуклеотидных последовательностей штаммы ВКЭ брали в работу не позднее уровня 1 пассажа, поскольку геном вируса может претерпевать изменения при адаптации к лабораторным животным [16]. В 29 случаях удалось секвенировать участок гена *E* непосредственно из клещевой суспензии, в 2 случаях – из мозговой суспензии первого заражения БМ (в пассажах штаммы не закрепились).

Полученные с помощью набора реагентов ПЦР-РВ («Синтол», Россия, Москва) и праймеров [17] ПЦР-продукты гена *E* (1193 п.н., позиции 169–1361) визуализировали в 1% агарозе и затем выделяли согласно стандартной методике [18] с некоторыми модификациями. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили, используя набор реактивов ABI Prism BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit на приборе Genetic Analyzer 3500 xL («Applied Biosystems», Japan). Анализ и выравнивание нуклеотидной последовательности осуществляли при помощи программного продукта BioEdit v.7.0.5.3 [19]. Поиск модели для построения филогенетического дерева [20] выполняли в программном обеспечении IQ-TREE (v.1.6.12) с помощью метода ModelFinder [21]. Филогенетическое дерево строили в программе MEGA X (v.10.1.2) [22]; визуализацию производили с использованием программы FigTree (Rambaut A., 2006–2014; available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Все взятые в анализ изоляты депонированы в международной базе данных GenBank; номера отражены на дереве (рис. 1).

В процессе статистической обработки результатов использовали общепринятые методы: определение *t*-критерия, критерия Манна–Уитни и коэффициента ранговой корреляции Спирмена r_s [23]. За уровень статистической значимости принимали величину $p < 0,05$ при 95% доверительном интервале. Расчёты проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007. Карта изолятов создана с использованием программного продукта ArcGIS 9.3 (ESRI, Redlands, CA, США).

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 № 1 от 01.04.2021).

Результаты

За исследуемый период (2006–2019 гг.) из клещей, от мелких млекопитающих и больных людей удалось получить 130 изолятов ВКЭ (табл. 1). Подавляющее большинство (126 из 130) штаммов и РНК-

изолятов получено из отдельных особей клещей *I. persulcatus*, 45% которых составили самцы. География изолятов представлена на **рис. 2**. Генотипирование 97 штаммов, 2 препаратов мозговых суспензий первого заражения БМ и 29 РНК-изолятов ВКЭ показало, что 4 из них относятся к европейскому субтипу и описаны ранее [17], остальные 124 (96,9%) – к сибирскому (**табл. 2**). При этом 2 изолята генотипировать не удалось. Среди штаммов и изолятов РНК

сибирского субтипа преобладает генетическая линия «Васильченко» ($n = 97$; 78,2%); 1 штамм представляет собой микст сибирского субтипа, остальные отнесены к группе «Заусаев» ($n = 26$; 21,0%).

Нами изучены патогенные свойства штаммов ВКЭ сибирского субтипа для БМ и проведено сравнение групп штаммов генетических линий «Васильченко» ($n = 73$) и «Заусаев» ($n = 19$) по нескольким параметрам. Результаты представлены в **табл. 3**.

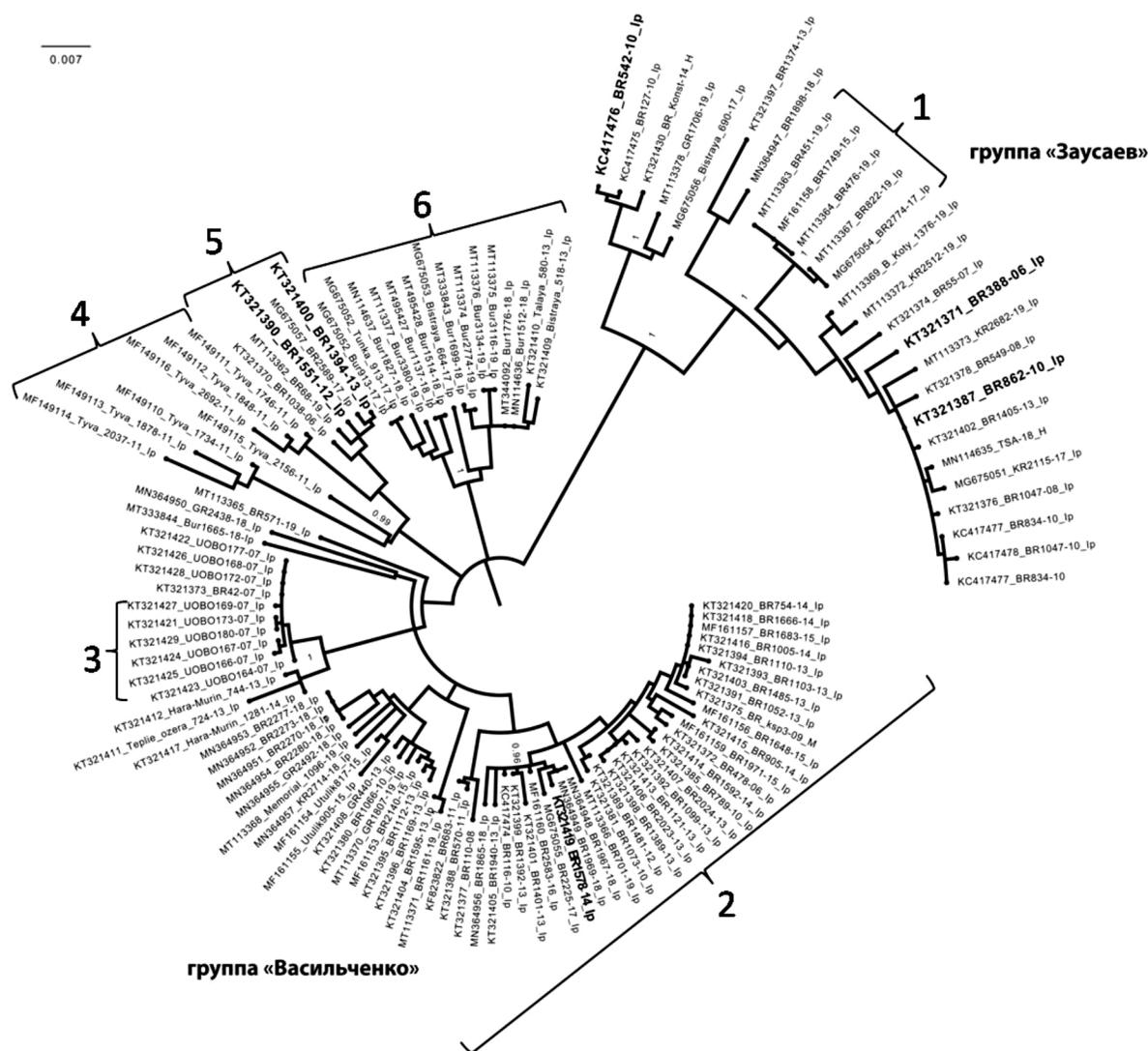


Рис. 1. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей гена *E* (1193 п.н.) штаммов и изолятов вируса клещевого энцефалита, выделенных на юге Восточной Сибири (модель GTR+F+I+G4).

Примечание. Условные обозначения в названиях последовательностей в зависимости от источника изоляции: Ip – *Ixodes persulcatus*, H – human, M – mouse. Указана поддержка основных узлов >0,5.

Цифрами обозначены филогенетические кластеры, связанные с местом изоляции: 1, 2, 5 – Иркутская область, Иркутский район, Байкальский тракт; 3 – Иркутская область, Усть-Ордынский Бурятский округ; 4 – Республика Тыва; 5 – Республика Бурятия.

Fig. 1. Dendrogram for the nucleotide sequences of *E* gene (1193 bp) of the tick-borne encephalitis virus isolates from Southern East Siberia territory (the GTR+F+I+G4 model).

Note. The symbols in the sequences names indicate the source of isolation: Ip, *Ixodes persulcatus*; H, human; M, mouse. Main nodes support >0.5. Numbers mark phylogenetic clusters associated with place of isolation: 1, 2, 5 – Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road; 3 – Irkutsk Region, Ust'-Orda Buryat area; 4 – Republic of Tuva; 5 – Republic of Buryatia.

Таблица 1. Изоляты вируса клещевого энцефалита с территорий юга Восточной Сибири (2006–2019 гг.)

Table 1. The tick-borne encephalitis virus isolates from Southern part of East Siberia (2006–2019)

Место сбора материала Place of the material collection	Источник изоляции Isolation source	Способ изоляции Isolation technique			Всего изолятов Total isolates
		Белые мыши White mice	Культура клеток СПЭВ SPEV cell culture	ОТ-ПЦР RT-PCR	
Иркутская область, Иркутский район, Байкальский тракт Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road					
17 км 17 km	Кровь больной К. (укус клеща на 17 км Байкальского тракта) Blood of the sick person K. (tick bite at 17 km of Baikal road)	1	0	0	1
23 км 23 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	7	0	0	7
30 км 30 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	2	0	0	2
43 км 43 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	27	1	9	37
	Красно-серая полёвка (мозг) Large-toothed redback vole (brain) <i>Clethrionomys (Myodes) rufocanus</i>	1	0	0	1
	Бурозубка (мозг) Common shrewmouse (brain) <i>Sorex</i> sp.	1	0	0	1
47 км 47 km	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	17	3	10	30
Иркутская область, Иркутский район, Бай- кальский тракт, посёлок Никола Irkutsk Region, Irkutsk district, Baikal road, Nikola village	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Иркутский район, Мемориал Irkutsk district, Memory place	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Иркутский район, Голоустненский тракт Irkutsk district, Goloustnensky road	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	3	0	2	5
Иркутский район, посёлок Большие Коты Irkutsk district, Bol'shie Koty village	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	0	1
Шелеховский район Shelekhovsky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	1	0	1	2
	Секционный материал (вещество базальных ядер головного мозга больной, погибшей от клещевого энцефалита) Sectional material (substance of the basal nuclei of the brain of a patient who died of tick-borne encephalitis)	1	0	0	1
Слюдянский район Slyudyansky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	6	0	6	12
Усть-Ордынский Бурятский округ Ust'-Orda Buryat area	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	0	9	0	9
Республика Бурятия, Тункинский район Republic of Buryatia, Tunkinsky district	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	11	0	1	12
Республика Тыва Republic of Tuva	Клещ <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> tick	7	0	0	7
Всего Total		88	13	29	130

Примечание. ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Note. RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

На первом этапе исследования (изоляция на сосунках БМ) животные, как правило, заболели при первом заражении, за исключением 2 штаммов группы «Заусаев» и 2 – «Васильченко». Однако при инокуляции клещевых суспензий, содержащих вирус группы «Заусаев», инкубационный период оказался достоверно короче ($p < 0,01$; число степеней

свободы (degrees of freedom) $df = 79$). Это позволяет заключить, что изучаемая нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса у БМ по сравнению со штаммами «Васильченко». Корреляции между длительностью инкубационного периода при первичном заражении сосунков БМ и количеством АГ ВКЭ

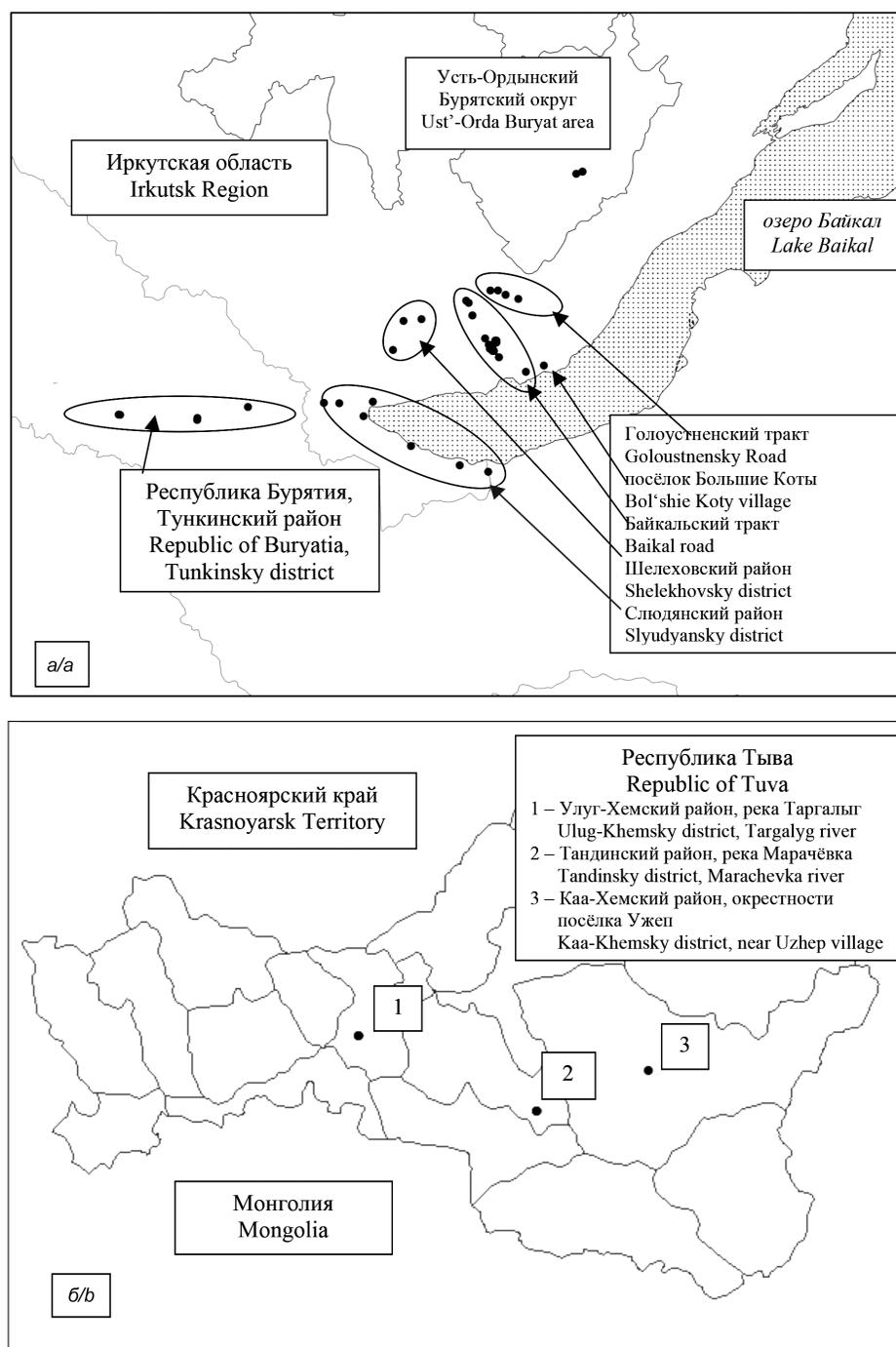


Рис. 2. Места изоляции вируса клещевого энцефалита на территории Прибайкалья (Иркутская область и Республика Бурятия) (а) и Республики Тыва (б) в 2006–2019 гг.

Fig. 2. Locations of the tick-borne encephalitis virus isolation in the territory of Baikal Region (Irkutsk Region and Republic of Buryatia) (a) and Tuva Republic (b) in 2006–2019.

Таблица 2. Генетическая принадлежность изолятов и биологические свойства групп штаммов вируса клещевого энцефалита с разных территорий Прибайкалья

Table 2. Genetic identity and biological features of strains from different areas of Baikal Region

Место сбора материала Place of the material collection	Количество изолятов Number of isolates	Количество генотипированных образцов Number of genotyped samples		Группа сибирского субтипа Siberian subtype group		Инкубационный период при первом заражении мышей (сут) Incubation period following primary mice inoculation (days)	Церебральная активность, lg LD ₅₀ /мл Cerebral activity, lg LD ₅₀ /ml	Периферическая активность, lg LD ₅₀ /мл Peripheral activity, lg LD ₅₀ /ml	Индекс инвазивности Invasiveness index	
		сибирский siberian	европейский european	«Васильченко» «Vasilchenko»	«Заусаев» «Zausaev»					
Иркутская область Irkutsk Region										
Иркутский район, Байкальский тракт Irkutsk district, Baikal road										
17 км 17 km	1	1	0	0	1	4	10,1	9,1	1,0	
23 км 23 km	7	7**	0	1	5	4–7	7,0–10,9	4,8–8,3	1,0–3,0	
30 км 30 km	2	2	0	2	0	5–7	7,4–10,2	6,3–6,9	1,1–3,3	
43 км 43 km	39*	36	3	31	5	4–19	6,9–11,0	3,3–9,9	0,7–3,7	
47 км 47 km	30*	27	1	19	8	4–15	3,6–10,98	2,4–9,3	1,2–2,8	
Иркутский район, Байкальский тракт, посёлок Никола Irkutsk district, Baikal road, Nikola village	1	1	0	1	0	4	8,3	6,4	1,9	
Иркутский район, Мемориал Irkutsk district, Memory place	1	1	0	1	0	4	10,3	8,9	1,4	
Иркутский район, Голоустненский тракт Irkutsk district, Goloustnensky road	5	5	0	4	1	4–8	8,1–10,4	6,8–8,9	0,9–1,5	
Иркутский район, посёлок Большие Коты Irkutsk district, Bol'shie Koty village	1	1	0	0	1	4–5	9,99	7,6	2,4	
Шелеховский район Shelekhovsky district	3*	3	0	1	2	5–8	8,3–9,1	6,9–7,8	1,3–1,4	
Слюдянский район Slyudyansky district	12*	12	0	9	3	4–15	8,1–10,4	6,9–8,3	1,1–2,9	
Усть-Ордынский Бурятский округ Ust'-Orda Buryat area	9	9	0	9	0	Изоляция на культуре клеток СПЭВ Isolation on SPEV cell culture	8,1–11,5	7,1–9,3	1,0–2,4	
Республика Бурятия Republic of Buryatia										
Тункинский район Tunkinsky district	12*	12	0	12	0	4–16	7,4–10,1	6,1–7,8	1,3–4,0	
Республика Тыва Republic of Tuva										
Улуг-Хемский, Тандинский, Каа-Хемский районы Ulug-Khemsy, Tandinsky, Kaа-Khemsy districts	7	7	0	7	0	2–7	8,0–10,4	6,1–9,4	0,2–2,8	
Всего Total	130	124	4	97	26	6	9,2	7,4	1,8	

Примечание. * данные приведены с учётом изолятов РНК; ** – один штамм – сибирский mix.

Note. * the data are given including RNA-isolates; **, one strain, siberian mix.

в клещевой суспензии, измеренным по величине экстинкции в ИФА, не выявлено ($r_s = -0,105$).

Степень вирулентности штаммов оценивали по 2 показателям – среднему инфекционному титру при в/м и п/к заражении беспородных БМ массой 6–8 г. Диапазон колебаний церебральной активности штаммов составлял в группе «Заусаев» 7,0–10,9 lg LD₅₀/мл при среднем значении 9,4 ± 0,25; в группе «Васильченко» – 6,9–11,6 lg LD₅₀/мл, среднее значение – 9,3 ± 0,11. В качестве критерия при оценке указанного параметра использована медиана значений церебрального титра 8,5 lg LD₅₀/мл. Ниже этой величины церебральная активность была у 2 (10,5%) штаммов группы «Заусаев» и 15 (20,5%) – группы «Васильченко».

Подавляющее большинство исследованных штаммов обеих генетических линий были высоковирулентными (≥6 lg LD₅₀/мл) и при периферическом пути введения: в 84,2% случаев для группы «Заусаев» и в 95,9% для «Васильченко». 3 штамма линии «Заусаев» и 2 – «Васильченко» проявили умеренную вирулентность (4,1–5,9 lg LD₅₀/мл), и только 1 (из группы «Васильченко» № KT321400 в базе GenBank) оказался слабовирулентным (3,3 lg LD₅₀/мл). Следует отметить, что его церебральная активность тоже была сниженной (6,9 lg LD₅₀/мл). Диапазон колебаний периферической активности составил в группе «Заусаев» 4,5–9,1 lg LD₅₀/мл при среднем значении 7,6 ± 0,31, «Васильченко» – 3,3–9,9 lg LD₅₀/мл, среднее значение – 7,5 ± 0,13. Для характеристики периферической активности использовали ИИ, представляющий собой разность показателей lg LD₅₀/мл титров

mNis и mNsc в опыте параллельного титрования на мышах. Данный параметр количественно характеризует способность штамма достигать центральной нервной системы (ЦНС) при инокуляции вируса экстраневральным путём [24]. Принято считать, что показатель ИИ ≤2,0 свидетельствует о высоких инвазивных свойствах штамма, его способности преодолевать гематоэнцефалический барьер, достигать ЦНС и размножаться в ней; величина 2,1–2,9 рассматривается как средний уровень, а значение ИИ ≥3,0 указывает на сниженную инвазивную активность. В изучаемых нами группах «Заусаев» и «Васильченко» низкий уровень ИИ продемонстрировали соответственно 5,3 и 6,5% штаммов, средний – 15,8 и 25,8%, высокий – 78,9 и 67,8%. При этом низкий показатель ИИ всего в 3 случаях совпал с пониженной вирулентностью штаммов при п/к введении.

С целью дополнительной характеристики вирулентных свойств штаммов определяли среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и процентную величину летальности БМ при разных путях заражения. Показатели СПЖ животных после инфицирования различными штаммами варьировали от 4 до 14 сут (срок наблюдения) в зависимости от способа введения патогена, группы вируса и разведения инокулируемой суспензии. При в/м заражении гибель особей наступала в среднем на 1–2 сут раньше, чем при периферическом. Эта разница сохраняется статистически достоверной вплоть до разведения вируса 1 × 10⁻⁹ для штаммов линии «Заусаев» ($p < 0,01$ для разведения 1 × 10⁻³, $p < 0,05$ для разведений 1 × 10⁻⁴–1 × 10⁻⁹; df от 20 до 36) и до разведе-

Таблица 3. Результаты сравнения групп штаммов «Заусаев» и «Васильченко» сибирского субтипа вируса клещевого энцефалита
Table 3. The results of comparison of tick-borne encephalitis Siberian subtype «Zausaev» and «Vasilchenko» groups of strains

Параметр сравнения Comparison criteria	«Заусаев» «Zausaev»	«Васильченко» «Vasilchenko»	p (95% доверительный интервал) p (95% confidence level)
Средняя величина экстинкции суспензии клеща с положительным результатом иммуноферментного анализа Average extinction level of tick suspensions with positive enzyme-linked immunosorbent assay results	5,1 ± 0,89	4,6 ± 0,35	>0,05
Доля (в процентах) изоляции штаммов при первичном заражении мышей Percentage of strains isolation after primary infection of mice	89,5 ± 7,04	96,8 ± 2,21	>0,05
Инкубационный период при первичном заражении мышей, сут Incubation period following primary mice inoculation (days)	5,0 ± 0,33	6,4 ± 0,30	<0,01
Средняя продолжительность жизни мышей при внутримозговом заражении высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³), сут Average life expectancy of mice following intracerebral inoculation with high viral dose (1 × 10 ⁻³) (days)	6,2 ± 0,13	6,4 ± 0,09	>0,05
Средняя продолжительность жизни мышей при подкожном заражении высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³), сут Average life expectancy of mice following subcutaneous inoculation with high viral dose (1 × 10 ⁻³) (days)	7,2 ± 0,33	8,0 ± 0,18	<0,05
Доля (в процентах) летальности при периферическом заражении мышей высокой дозой вируса (1 × 10 ⁻³) Percentage of the fatality rate following subcutaneous inoculation of mice with high viral dose (1 × 10 ⁻³)	98,0 ± 1,60	96,2 ± 1,11	>0,05
Доля (в процентах) выживших мышей при периферическом заражении низкой дозой вируса (1 × 10 ⁻⁹) Percentage of surviving mice following subcutaneous inoculation with low viral dose (1 × 10 ⁻⁹)	97,4 ± 1,83	89,7 ± 1,78	<0,01
Доля (в процентах) штаммов с высокой периферической активностью Percentage of strains with high peripheral activity	78,9 ± 9,35	67,7 ± 5,93	>0,05

ния 1×10^{-8} – для штаммов «Васильченко» ($p < 0,001$ для разведений $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-8}$; df от 96 до 144). Исключение составило разведение 1×10^{-6} группы штаммов «Заусаев», поскольку именно среди них чаще всего наблюдался «феномен зоны» [25]: мыши, заражённые супернатантом с высокой множественностью инфицирования (multiplicity of infection, MOI) ($1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-4}$), остаются здоровыми, а использование дальнейших разведений ($1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-7}$) приводит к увеличению доли летальных исходов.

СПЖ при п/к заражении штаммами группы «Заусаев» с высокой дозой вируса (разведение суспензии 1×10^{-3}) была значительно короче, чем у особей, инфицированных штаммами «Васильченко» (7,2 против 8 сут). В то же время при периферическом заражении низкой дозой (1×10^{-9}) выживало больше животных, заражённых штаммами «Заусаев» (97,4 против 89,7%; **табл. 3**).

В результате анализа 122 нуклеотидных последовательностей гена *E* (1193 п.н., позиции 169–1361) штаммов и изолятов РНК ВКЭ выявлено 317 переменных сайтов. Часть замен являются несинонимичными и приводят к замене аминокислот в 77 позициях из 397. Согласно байесовскому информационному критерию (Bayesian information criterion, BIC), оптимальной моделью для данной выборки нуклеотидных последовательностей является GTR+F+I+G4. Изученные штаммы и изоляты сибирского субтипа ВКЭ распались на 2 группы – «Васильченко» и «Заусаев» (**рис. 1**).

Объединение в кластеры внутри групп связано главным образом с географическим происхождением изолятов. Например, в группе «Васильченко» – это кластеры, в которые входят последовательности штаммов и изолятов ВКЭ из Республики Тыва (Tuva_1746-11_Ip, Tuva_1848-11_Ip, Tuva_2692-11_Ip и др.); Тункинской долины Республики Бурятия (Bur1776-18_Ip, Bur3116-19_Ip, Bur3134-19_Ip и др.) и соседних с ней долин рек Талая и Быстрая Слюдянского района Иркутской области (Talaya_580-13_Ip, Bistraya_518-13_Ip, Bistraya_664-17_Ip); Усть-Ордынского Бурятского округа (UOBO164-07_Ip, UOBO166-07_Ip, UOBO180-07_Ip и др.), а также кластер, в который объединяются последовательности, выделенные в Иркутском районе Иркутской области (Байкальский тракт – BR1005-14_Ip, BR1110-13_Ip, BR1666-14_Ip и др.). Если выделение штаммов на той или иной территории происходило на протяжении многих лет, то соответствующие кластеры включают в себя изоляты с данного участка независимо от года их получения. В то же время филогенетический анализ последовательностей гена *E* не показал связи изолятов по признаку патогенности для БМ: штаммы со сниженной патогенностью как из группы «Васильченко», так и из группы «Заусаев» (на **рис. 1** выделены жирным шрифтом) входят в кластеры с высокопатогенными штаммами с той же территории.

Обсуждение

Вопрос о детерминантах патогенности ВКЭ до сих пор не является однозначно решённым. Одни и те же штаммы обладают неодинаковой патогенностью для

разных видов животных [10]; штаммы, выделенные от больных людей, показывают разную степень инвазивности для лабораторных мышей [26]. Из рассматриваемой в данной работе совокупности штаммов только 2 были получены от пациентов: один от пациентки К. с лихорадочной формой заболевания (№ доступа в GBKT321430), второй – из секционного материала погибшей от КЭ больной (MN114635). Оба они принадлежат к группе «Заусаев» сибирского субтипа и демонстрируют высокую степень патогенности для мышей при двух путях введения. Между тем инкубационный период при первичном заражении сосунков БМ в первом случае составил 4 сут, а во втором – 8, и вирулентность для мышей штамма от пациентки с лёгкой формой заболевания оказалась даже несколько выше, чем от больной с летальным исходом (соответственно 10,6 и 9,1 lg LD₅₀/мл при в/м, 9,1 и 7,8 lg LD₅₀/мл – при п/к введении).

В литературе нам не встретилось работ, касающихся сравнения биологических свойств линий «Заусаев» и «Васильченко». В нашем исследовании при инокуляции клещевых суспензий, содержащих вирус группы «Заусаев», инкубационный период оказался достоверно короче, чем при заражении штаммами группы «Васильченко» ($p < 0,01$, $df = 79$). По-видимому, исследованная нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызывает развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению с группой «Васильченко». Этот феномен может быть обусловлен как свойствами вирусов, так и разницей в количестве вирусного агента в клещевой суспензии. Весьма вероятно, что при включении в выборку новых штаммов могут получиться другие результаты либо, напротив, увеличится достоверность уже имеющихся данных.

Гликопротеин *E* является основным белком оболочки ВКЭ и содержит штаммо-, типоспецифические, а также комплекс- и группореактивные детерминанты [27]. Филогенетический анализ по фрагменту гена *E* не показал связи вирусной нагрузки у пациентов и тяжести течения заболевания у них с положением изолята на дереве [28], равно как и с его зоологическим происхождением; в то же время кластеризация коррелировала с географией штамма [29]. Аналогично этому в нашем исследовании филогенетический анализ последовательностей данного гена продемонстрировал связь штаммов с местом их изоляции, но не с хозяином или патогенностью для БМ.

В то же время полногеномное секвенирование штаммов позволило выявить замены в генах неструктурных белков ВКЭ, вероятно, влияющие на изменение патогенности [30, 31]. По всей видимости, продолжение работы в данном направлении требует анализа полногеномных последовательностей репрезентативной группы штаммов с разной патогенностью для человека и лабораторных животных.

Заключение

Таким образом, анализ большой группы штаммов, изолированных на юге Восточной Сибири в современный период (2006–2019 гг.), показал, что

в природных очагах на данной территории циркулируют 2 генетические линии ВКЭ сибирского субтипа – «Васильченко» и «Заусаев» – со значительным преобладанием первой. Установлены различия между группами штаммов разных линий по биологическим свойствам. Исследованная нами группа штаммов «Заусаев» значительно быстрее вызвала развитие инфекционного процесса КЭ у БМ по сравнению с группой «Васильченко». СПЖ жизни мышей при п/к заражении штаммами группы «Заусаев» с высокой дозой вируса оказалась значительно короче, чем у животных, заражённых штаммами «Васильченко».

Подавляющее большинство изученных штаммов обеих генетических линий были высоковирулентными для беспородных БМ как при церебральном, так и при периферическом пути введения вируса. В то же время филогенетический анализ последовательностей гена *E* не показал связи изолятов по признаку патогенности для БМ: штаммы со сниженной патогенностью как из группы «Васильченко», так и из группы «Заусаев» (на рис. 1 выделены жирным шрифтом) входят в кластеры с высокопатогенными штаммами с той же территории вместе с РНК-изолятами, оказавшимися апатогенными для БМ.

Полученные нами сведения о молекулярно-генетических и биологических свойствах выделенных штаммов ВКЭ могут иметь как теоретическое, так и прикладное значение для комплексного мониторинга КЭ и планирования профилактических санитарно-противоэпидемических мероприятий, поскольку свойства вирусной популяции в природных очагах данного заболевания могут оказывать влияние на заболеваемость людей. В дополнение к этому данные о современной структуре популяции ВКЭ на юге Восточной Сибири вносят вклад в дальнейшее изучение некоторых аспектов эволюции вируса и вызываемой им инфекции в меняющейся экологической и эпидемиологической обстановке.

ЛИТЕРАТУРА

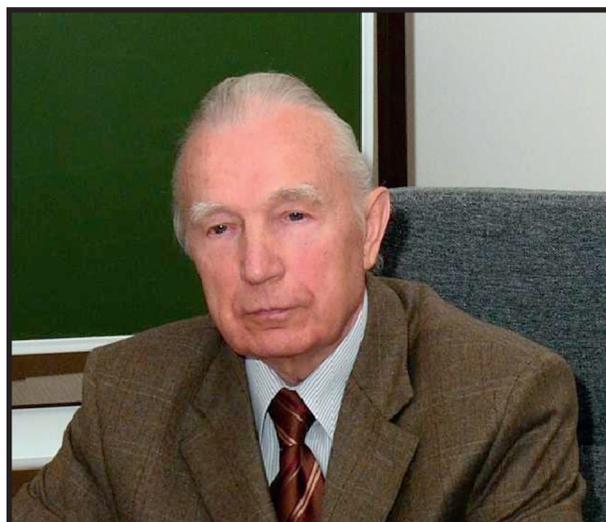
- Růžek D., Yoshii K., Bloom M.E., Gould E.A. Virology. Chapter 2a. In: Dobler G., Erber W., Bröker M., Schmitt H.J., eds. *The TBE Book*. Singapore: Global Health Press; 2019. https://doi.org/10.33442/978-981-14-0914-1_2a
- Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–76. <https://doi.org/10.1002/jmv.21765>
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 55: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.014>
- Adelshin R.V., Sidorova E.A., Bondaryuk A.N., Trukhina A.G., Sherbakov D.Y., White III R.A., et al. “886-84-like” tick-borne encephalitis virus strains: Intraspecific status elucidated by comparative genomics. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(5): 1168–72. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.006>
- Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes. Infect.* 2018; 7(1): 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>
- Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Zadora O.V., et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.020>
- Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2): 101327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019>
- Карань Л.С., Погодина В.В., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Герасимов С.Г., Маленко Г.В., и др. Сибирский подтип вируса клещевого энцефалита, доминирующий на территории России. Генетические кластеры. *Медицинская вирусология*. 2013; 27(1): 87.
- Сидорова Е.А., Адельшин Р.В., Мельникова О.В., Борисова Т.И., Андаев Е.И. Анализ полипротеина штаммов вируса клещевого энцефалита, выделенных в 60-х годах XX века и в современный период на территории Забайкалья и Прибайкалья. В кн.: Покровский В.И., ред. *Молекулярная диагностика. Сборник трудов. Том 2*. Тамбов: Юлис; 2017: 207–8.
- Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. *Хронический клещевой энцефалит. Этиология, иммунология, патогенез*. Новосибирск: Наука; 1986.
- Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77(1): 25–36. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.25-36.2003>
- Конькова-Рейдман А.Б., Злобин В.И. Патоморфоз клещевого энцефалита на Южном Урале: современное состояние проблемы. *Инфекционные болезни*. 2016; 14(S1): 141.
- Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М., Левина Л.С., Маленко Г.В., Гамова Е.Г., и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(5): 16–21.
- Козлова И.В., Верхозина М.М., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Карань Л.С., Ткачев С.Е., и др. Результаты генотипирования штаммов и изолятов РНК вируса клещевого энцефалита, выделенных от больных людей в Иркутской области и Республике Бурятия. В кн.: Покровский В.И., ред. *Молекулярная диагностика. Том 1*. М.: МБА; 2014; (1): 520–1.
- Мейхи Б., ред. *Вирусология. Методы*. Пер. с англ. Москва: Мир; 1988.
- Якименко В.В., Дрокин Д.А., Калмин О.Б., Богданов И.И., Иванов Д.И. К вопросу о влиянии host-эффекта на штаммовую изменчивость вируса клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1996; 41(3): 112–7.
- Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., Andaev E.I., Balakhonov S.V. Complete genome sequences of four European subtype strains of tick-borne encephalitis virus from Eastern Siberia, Russia. *Genome Announc.* 2015; 3(3): e00609–15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00609-15>
- Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. Пер. с англ. Москва: Мир; 1984.
- Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; (41): 95–8.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermiin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*. 2017; 14(6): 587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Закс Л. *Статистическое оценивание*. Пер. с нем. Москва: Статистика; 1976.
- Pogodina V.V., Savinov A.P. Variation in the pathogenicity of viruses of the tick-borne encephalitis complex for different animal species. I. Experimental infection of mice and hamsters. *Acta Virol.* 1964; 8: 424–34.
- Леонова Г.Н., Мураткина С.М., Кругляк С.П. Изучение вирулентности штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге советского Дальнего Востока. *Вопросы вирусологии*. 1990; 35(5): 399–401.
- Kurhade C., Schreier S., Lee Y.P., Zegenhagen L., Hjertqvist M., Dobler G., et al. Correlation of severity of human tick-borne encephalitis virus disease and pathogenicity in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1709–12. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171825>
- Злобин В.И., Горин О.З. *Клещевой энцефалит: Этиология, Эпидемиология и профилактика в Сибири*. Новосибирск: Наука; 1996.

28. Saksida A., Jakopin N., Jelovšek M., Knap N., Fajs L., Lusa L., et al. Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(7): 1315–23. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2407.180059>
29. Fajs L., Durmišič E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048420>
30. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
31. Muto M., Bazartseren B., Tsevel B., Dashzevge E., Yoshii K., Kariwa H. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5): 623–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.006>

REFERENCES

1. Růžek D., Yoshii K., Bloom M.E., Gould E.A. Virology. Chapter 2a. In: Dobler G., Erber W., Bröker M., Schmitt H.J., eds. *The TBE Book*. Singapore: Global Health Press; 2019. https://doi.org/10.33442/978-981-14-0914-1_2a
2. Demina T.V., Dzhiyev Yu.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 2010; 82(6): 965–76. <https://doi.org/10.1002/jmv.21765>
3. Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Reconsidering the classification of tick-borne encephalitis virus within the Siberian subtype gives new insights into its evolutionary history. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 55: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.014>
4. Adelshin R.V., Sidorova E.A., Bondaryuk A.N., Trukhina A.G., Sherbakov D.Y., White III R.A., et al. “886-84-like” tick-borne encephalitis virus strains: Intraspecific status elucidated by comparative genomics. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019; 10(5): 1168–72. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.006>
5. Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes. Infect.* 2018; 7(1): 74. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0081-6>
6. Tkachev S.E., Chicherina G.S., Golovljova I., Belokopytova P.S., Tikunov A.Y., Zadora O.V., et al. New genetic lineage within the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus found in Western Siberia, Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2017; 56: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.10.020>
7. Tkachev S.E., Babkin I.V., Chicherina G.S., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Demina T.V., et al. Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(2): 101327. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.12.006>
8. Karan' L.S., Pogodina V.V., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Gerasimov S.G., Malenko G.V., et al. Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus, dominating on the territory of Russia. Genetic clusters [Sibirskiy podtip virusa kleshchevogo entsefalita, dominiruyushchiy na territorii Rossii. *Geneticheskie klasteri*]. *Meditsinskaya virusologiya.* 2013; 27(1): 87. (in Russian)
9. Sidorova E.A., Adel'shin R.V., Mel'nikova O.V., Borisova T.I., Andaev E.I. The polyprotein analysis of tick-borne encephalitis virus strains, isolated in 1960s and in modern period in the territory of Transbaikalia and Baikal Regions. In: Pokrovskiy V.I., ed. *Molecular Diagnostics. Collection of Works. Volume 2 [Analiz poliproteina shtammov virusa kleshchevogo entsefalita, vydelenykh v 60-kh godakh XX veka i v sovremennyy period na territorii Zabajkalya i Pribajkalya V kn.: Molekulyarnaya diagnostika. Sbornik trudov. Tom 2]*. Tambov: Yulis; 2017: 207–8. (in Russian)
10. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. *The Persistent Tick-Borne Encephalitis. Etiology, Immunology, Pathogenesis [Khronicheskiy kleshchevoy entsefalit. Etiologiya, immunologiya, patogenez]*. Novosibirsk: Nauka; 1986. (in Russian)
11. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P., et al. Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77(1): 25–36. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.1.25-36.2003>
12. Kon'kova-Reydmann A.B., Zlobin V.I. Of Tick-borne encephalitis pathomorphosis in Southern Urals: up-to-date status [Patomorfoz kleshchevogo entsefalita na Yuzhnom Urale: sovremennoe sostoyaniye problemy]. *Infektsionnye bolezni.* 2016; 14(S1): 141. (in Russian)
13. Pogodina V.V., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Levina L.S., Malenko G.V., Gamova E.G., et al. The evolution of tick-borne encephalitis and the problem of pathogen's evolution [Evolutsiya kleshchevogo entsefalita i problema evolyutsii vzbudatelya]. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(5): 16–20. (in Russian)
14. Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Karan' L.S., Tkachev S.E., et al. The results of genotyping of tick-borne encephalitis virus strains and RNA-isolates obtained from patients in Irkutsk Region and Republic of Buryatia. In: Pokrovskiy V.I., ed. *Molecular Diagnostics. Volume 1 [Rezultaty genotipirovaniya shtammov i izolyatov RNK virusa kleshchevogo entsefalita, vydelenykh ot bol'nykh lyudey v Irkutskoy oblasti i Respublike Buryatiya. V kn.: Molekulyarnaya diagnostika. Tom 1]*. Moscow: MBA; 2014: 520–1. (in Russian)
15. Mahy B.W.J. *Virology: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press; 1985.
16. Yakimenko V.V., Drokin D.A., Kalmin O.B., Bogdanov I.I., Ivanov D.I. On the question of host-effect on the tick-borne encephalitis virus strains variability. *Voprosy virusologii [K voprosu o vliyaniy host-effekta na shtammovuyu izmenchivost' virusa kleshchevogo entsefalita]*. 1996; 51(3): 112–7. (in Russian)
17. Adelshin R.V., Melnikova O.V., Karan L.S., Andaev E.I., Balakhonov S.V. Complete genome sequences of four European subtype strains of tick-borne encephalitis virus from Eastern Siberia, Russia. *Genome Announc.* 2015; 3(3): e00609–15. <https://doi.org/10.1128/genomea.00609-15>
18. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
19. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 1999; (41): 95–8.
20. Kalyaanamoorthy S., Minh B.Q., Wong T.K.F., von Haeseler A., Jermin L.S. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods.* 2017; 14(6): 587–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
21. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
22. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
23. Sachs L. *Statistische auswertungsmethoden*. Berlin: Springer-Verlag; 2013.
24. Pogodina V.V., Savinov A.P. Variation in the pathogenicity of viruses of the tick-borne encephalitis complex for different animal species. I. Experimental infection of mice and hamsters. *Acta Virol.* 1964; 8: 424–34.
25. Leonova G.N., Muratkina S.M., Kruglyak S.P. Study of tick-borne encephalitis virus strains, isolated in the South of Soviet Far East [Izuchenie virulentnosti shtammov virusa kleshchevogo entsefalita, izolirovannykh na yuge sovetskogo Dal'nego Vostoka]. *Voprosy virusologii.* 1990; 35(5): 399–401. (in Russian)
26. Kurhade C., Schreier S., Lee Y.P., Zegenhagen L., Hjertqvist M., Dobler G., et al. Correlation of severity of human tick-borne encephalitis virus disease and pathogenicity in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1709–12. <https://doi.org/10.3201/eid2409.171825>
27. Zlobin V.I., Gorin O.Z. *Tick-Borne Encephalitis: Etiology, Epidemiology and Prevention in Siberia [Kleshchevoy entsefalit. Etiologiya, Epidemiologiya i profilaktika v Sibiri]*. Novosibirsk: Nauka; 1996. (in Russian)
28. Saksida A., Jakopin N., Jelovšek M., Knap N., Fajs L., Lusa L., et al. Virus RNA load in patients with tick-borne encephalitis, Slovenia. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(7): 1315–23. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2407.180059>
29. Fajs L., Durmišič E., Knap N., Strle F., Avšič-Županc T. Phylogeographic characterization of tick-borne encephalitis virus from patients, rodents and ticks in Slovenia. *PLoS One.* 2012; 7(11): e48420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048420>
30. Belikov S.I., Kondratov I.G., Potapova U.V., Leonova G.N. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties. *PLoS One.* 2014; 9(4): e94946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094946>
31. Muto M., Bazartseren B., Tsevel B., Dashzevge E., Yoshii K., Kariwa H. Isolation and characterization of tick-borne encephalitis virus from *Ixodes persulcatus* in Mongolia in 2012. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(5): 623–9. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.05.006>

НЕКРОЛОГИ



24 февраля 1932 г. – 30 июня 2021 г.

30 июня 2021 г.
после тяжёлой болезни ушёл из жизни
доктор биологических наук, профессор

Виктор Павлович ГРАЧЁВ

На протяжении многих лет В.П. Грачёв работал в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов» (ФНЦИРИП) им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Всю свою научную и творческую жизнь он посвятил изучению вирусных инфекционных заболеваний, разработке средств их профилактики и диагностики.

Профессор Грачёв – признанный в стране и за рубежом крупный специалист-вирусолог, внёсший значительный вклад в изучение фундаментальных и прикладных проблем вирусологии и вакцинологии. При его непосредственном участии в Советском Союзе было освоено производство инактивированной и живой полиомиелитных вакцин, а также вакцинных препаратов против вирусов клещевого энцефалита, кори, жёлтой лихорадки, японского энцефалита, энтеровируса 71 (EV71) и чумы плотоядных.

В.П. Грачёв дважды был награждён премией Совета Министров СССР: в 1984 г. – за создание вакцины против клещевого энцефалита, а спустя 3 года – за разработку живого культурального вакцинного препарата против чумы плотоядных «Вакчум». Вакцина оказалась весьма удачной; до настоящего времени она превосходит многие зарубежные аналоги

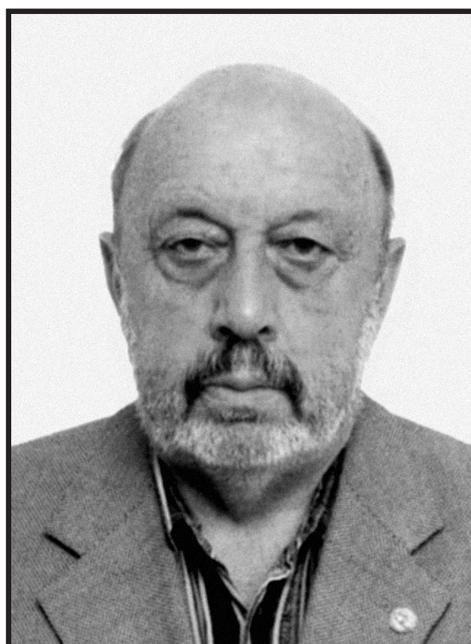
по характеристикам противоиного инфекционного иммунитета. Впоследствии на её основе были разработаны комплексные препараты – «Гексаканивак» (для профилактической иммунизации собак), в который «Вакчум» входит в качестве одного из компонентов, и другие.

Профессор В.П. Грачёв – автор свыше 300 научных работ; ему принадлежат 8 патентов на изобретения. За многолетнюю деятельность учёный воспитал многих специалистов в области вакцинологии, вирусологии, прикладной эпидемиологии и смежных дисциплин.

Виктора Павловича отличали высокие человеческие и моральные качества: доброта и теплота по отношению к людям, сочетавшиеся с высокой требовательностью к себе и окружающим, работоспособностью, целеустремлённостью в решении поставленных задач.

Светлая память о Викторе Павловиче Грачёве сохранится в наших сердцах – его коллег по работе и друзей.

*Коллектив ФГАНУ
«ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
(Институт полиомиелита)*



14 февраля 1937 года – 13 июля 2021 года

13 июля 2021 г.

**после тяжёлой болезни ушёл из жизни
доктор биологических наук, профессор**

Игорь Феликсович БАРИНСКИЙ

После окончания в 1960 г. 1-го Московского медицинского института имени И.М. Сеченова Игорь Феликсович Баринский поступил в аспирантуру НИИ вирусологии (Институт вирусологии) им. Д.И. Ивановского АМН СССР. Молодой учёный занимался проблемами вирусных гепатитов под руководством члена-корреспондента АМН СССР А.К. Шубладзе. Работы этого периода были обобщены исследователем в диссертационных работах на соискание степени кандидата медицинских наук «Серологическое исследование при вирусном гепатите» (1963 г.) и доктора медицинских наук «Сравнительное изучение патогенеза вирусных гепатитов человека и животных» (1969 г.), успешно защищённых в институте.

В дальнейшем вся научная жизнь И.Ф. Баринского была связана с этим учреждением. За 6 с лишним десятилетий им пройден путь от аспиранта до руководителя лаборатории сравнительной вирусологии (с 1974 г.) ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ), в состав которого вошёл Институт вирусологии. В 1976 г. Игорь Феликсович стал профессором по специальности «вирусология».

Основным направлением научных исследований профессора Баринского было сравнительное изучение этиологии, патогенеза и особенностей иммуни-

тета при вирусных инфекциях: герпетических заболеваний, бешенстве, вирусных гепатитах, энцефаломиелитах, лейкозе человека и животных, синдроме приобретённого иммунодефицита (СПИД), а также при системной красной волчанке. Эти работы имели результатом создание и внедрение в широкую клиническую практику 3 специфических инактивированных вакцинных препаратов, иммунологических методов лечения вирусных энцефаломиелитов и герпеса с применением иммуномодуляторов. Параллельно были разработаны иммуноферментные ПЦР-диагностикумы, используемые при герпесе и бешенстве.

И.Ф. Баринский и сотрудники возглавляемой им лаборатории получили новые факты о механизмах формирования нестерильного иммунитета при хронических вирусных гепатитах и лейкозах, предложили оригинальные тесты для диагностики и прогноза рецидивов при этих заболеваниях. Исследовательская группа изучала систему интерферона при хронических вирусных инфекциях и возможность её коррекции иммуномодулирующими препаратами – мегасином, ридостином и амиксином.

Под руководством Игоря Феликсовича Баринского созданы вакцины против рассеянного склероза, восточного и западного энцефаломиелитов лошадей, герпеса 1 и 2 типов для профилактики рецидивов (по-

следняя выпускается в Российской Федерации по сегодняшней день). В 2002 г. был разработан лабораторный регламент и получен патент на вирионную цитомегаловирусную вакцину.

Лаборатория сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу в течение многих лет являлась Сотрудничающим центром Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по изучению герпесвирусных инфекций, выполняя функции научно-методического центра Минздрава России по разработке и клиническому использованию диагностических и лечебных противогерпетических средств. И.Ф. Баринский был экспертом ВОЗ по этому направлению.

На протяжении ряда лет И.Ф. Баринский возглавлял в Институте вирусологии проблемную комиссию по отбору наиболее эффективных лекарственных веществ для лечения опасных вирусных инфекций. Культура лейкоцитов крови человека была использована для выделения от больных вирусным гепатитом инфекционного агента, получившего название «лейкоцитарный вирус гепатита». В дальнейшем он был детально изучен; продемонстрировано его сходство с вирусом гепатита С. Совместное культивирование ФГА-стимулированных культур лейкоцитов доноров и больных хроническим миелолейкозом позволило сотрудникам лаборатории, руководимой И.Ф. Баринским, выделить онковирус типа С («лейкоцитарный вирус лейкоза»), отличающийся от всех известных онковирусов человека и животных, и подробно исследовать его свойства.

И.Ф. Баринский был удостоен звания заслуженного деятеля науки РСФСР (1980), награжден премией Совета Министров СССР (1984). Общий стаж научно-исследовательской и педагогической работы учёного – 54 года. За это время им опубликовано более 560 научных работ (включая 9 монографий) на русском и английском языках, получено авторство на 12 патентов на изобретения и методических документов федерального уровня. Под руководством Игоря Феликсовича защищено 32 диссертации, в т.ч. 6 докторских.

Профессор Баринский долгое время состоял председателем проблемной комиссии республиканского значения «Герпетические инфекции», членом проблемной комиссии «Арбовирусы», членом редколлегии (ответственный секретарь) журнала «Вопросы вирусологии», руководителем Республиканского Центра по изучению герпесвирусов Минздрава России, членом Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНПОЭМП). Он активно участвовал в российских и международных конференциях, форумах и совещаниях, посвящённых профилактике и лечению инфекционной патологии.

Сотрудники и коллеги запомнят Игоря Феликсовича Баринского как профессионала высочайшего класса, преданного своему делу, доброжелательного и отзывчивого человека, обладавшего выдающейся эрудицией и компетенцией по широкому кругу различных вопросов.

*Редакционный совет
журнала «Вопросы вирусологии»*