

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

Подписано в печать 31.10.2021.

Формат 60×90<sup>1/8</sup>.

Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии  
«Буки Веди», [www.bukivedi.com](http://www.bukivedi.com).  
E-mail: [info@bukivedi.com](mailto:info@bukivedi.com).

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии  
Роспотребнадзора, 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.

5

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:

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)

**Яшкульов 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](mailto: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](mailto: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 October 31, 2021.

Print format 60 × 90<sup>1/8</sup>.  
Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.  
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.  
E-mail: [info@bukivedi.com](mailto:info@bukivedi.com).  
[www.bukivedi.com](http://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

5

Volume 66 • 2021

## EDITORIAL BOARD

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

Assistant editor 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

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

**Гарбузенко Д.В.**

Роль противовирусной терапии в лечении больных циррозом печени, ассоциированным с хронической HBV- и HCV-инфекцией ..... 331

**Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.**

Дельта-подобные вирусы (*Kolmioviridae: Deltavirus*) животных и происхождение вируса гепатита D (hepatitis D virus) человека ..... 340

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Найденова Е.В., Карташов М.Ю., Захаров К.С., Шевцова А.П., Диалло М.Г., Нурдин И., Ба М.Б., Бумбали С., Щербакова С.А., Кутырев В.В.**

Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к некоторым арбовирусам\* ..... 346

**Лобанова В.А., Клюкина В.И.**

Оптимизация схемы вакцинации собак против бешенства (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) при помощи математической модели\* ..... 354

**Алимбарова Л.М., Амбросов И.В., Матело С.К., Баринский И.Ф.**

Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) ..... 368

**Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Моханова Е.В., Новиков В.В.**

Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*) ..... 383

## ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 90-летию академика Феликса Ивановича Ершова ..... 390

## CONTENTS

## REVIEWS

**Garbuzenko D.V.**

The role of antiviral therapy in the management of patients with liver cirrhosis associated with chronic HBV and HCV infection . . . . . 331

**Isaeva O.V., Kyuregyan K. K., Mikhailov M. I.**

Animal delta-like viruses (*Kolmioviridae: Deltavirus*) and the origin of the human hepatitis D virus (HDV) . . . . . 340

## ORIGINAL RESEARCHES

**Naidenova E.V., Kartashov M.Yu., Zakharov K.S., Shevtsova A.P., Diallo M.G.,****Nouridine I., Bah M.B., Boumbaly S., Scherbakova S.A., Kuttyrev V.V**

Study of the prevalence of antibodies to some arboviruses in the population of the Republic of Guinea\* . . . . . 346

**Lobanova V.A., Klyukina V.I.**

Optimization of rabies (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) dog vaccination schedule using a mathematical model\* . . . . 354

**Alimbarova L.M., Ambrosov I.V., Matelo S.K., Barinsky I.F.**

Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against the herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems . . . . . 368

**Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A.,****Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V.**

Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*) . . . . . 383

## ANNIVERSARY DATES

To the 90<sup>th</sup> birth anniversary of Felix I. Ershov, Full member of Russian Academy of Sciences . . . . . 390

## ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-70>

© ГАРБУЗЕНКО Д.В., 2021



# Роль противовирусной терапии в лечении больных циррозом печени, ассоциированным с хронической HBV- и HCV-инфекцией

Гарбузенко Д.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, Челябинск, Россия

Формирование цирроза печени (ЦП) служит неблагоприятным событием естественного течения её хронических заболеваний и может сопровождаться осложнениями, которые нередко становятся причиной фатального исхода. Изучение эффективности лекарственных средств (ЛС), влияющих на различные этиопатогенетические механизмы этого состояния, представляет собой одну из актуальных проблем современной гепатологии. Цель обзора – показать роль противовирусной терапии (ПВТ) в лечении ЦП, ассоциированного с хронической инфекцией, вызываемой вирусами гепатитов В (hepatitis B virus, HBV) и С (hepatitis C virus, HCV).

Для поиска научных статей использовались база данных PubMed, поисковая система Google Scholar, Кокрейновские систематические обзоры, электронная научная библиотека eLIBRARY.RU, а также пристатейные списки литературы. В соответствии с задачами работы отбирались публикации за период 2000–2021 гг. по поисковым запросам: «цирроз печени»; «фиброз печени»; «хроническая HBV-инфекция»; «хроническая HCV-инфекция»; «портальная гипертензия»; «лечение». Критерии включения ограничивались проблемой терапии ЦП, ассоциированного с хронической HBV- и HCV-инфекцией.

Текущие гайдлайны рекомендуют беспрерывное лечение пациентов с HBV-ассоциированным ЦП аналогами нуклеозидов/нуклеотидов (АН/Н) независимо от сывороточных уровней ДНК HBV; стандартом же терапии HCV-ассоциированного ЦП стала современная концепция использования комбинаций противовирусных препаратов прямого действия. Исследования показали способность ПВТ ингибировать и реверсировать фибротические процессы, что, в свою очередь, может уменьшить выраженность портальной гипертензии (ПГ) и снизить риск связанных с ней осложнений, а также нормализовать печёночную функцию. Кроме того, отмечается, что осуществление перед ортотопической трансплантацией печени (ОТП) эрадикации HBV/HCV повышает общую выживаемость в долгосрочной перспективе. Таким образом, обеспечение доступности препаратов для нуждающихся в данных лечебных мероприятиях будет способствовать не только профилактике ЦП, но также позволит улучшить качество и увеличить продолжительность жизни страдающих им пациентов.

**Ключевые слова:** обзор; цирроз печени; хроническая HBV-инфекция; хроническая HCV-инфекция; противовирусная терапия

**Для цитирования:** Гарбузенко Д.В. Роль противовирусной терапии в лечении больных циррозом печени, ассоциированным с хронической HBV- и HCV-инфекцией. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 331-339  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-70>

**Для корреспонденции:** Гарбузенко Дмитрий Викторович, д-р мед. наук, профессор кафедры факультетской хирургии, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, 454092, Челябинск, Россия. E-mail: garb@inbox.ru

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 09.06.2021  
Принята в печать 07.10.2021  
Опубликована 31.10.2021

## REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-70>

## The role of antiviral therapy in the management of patients with liver cirrhosis associated with chronic HBV and HCV infection

Garbuzenko D.V.

FSBEI HE «South Ural State Medical University» of the Ministry of the Health of Russia, 454092, Chelyabinsk, Russia

The formation of the liver cirrhosis (LC) is an unfavorable event of the natural history of chronic liver diseases being accompanied by complications that often cause a fatal outcome. The study of the effectiveness of drugs that affect various etiopathogenetic mechanisms of this condition is an urgent problem of modern hepatology.

The aim of the review was to show the role of antiviral therapy (AVT) in the management of patients with LC associated with chronic HBV (hepatitis B virus) and HCV (hepatitis C virus) infection.

PubMed database, Google Scholar search engine, Cochrane Systematic Reviews, eLIBRARY.RU electronic scientific library, as well as the reference lists of articles were used to search for scientific articles. The relevant objectives of the review of the publications were identified for the period since 2000 up to 2021 by the search queries as following: «liver cirrhosis», «liver fibrosis», «chronic HBV infection», «chronic HCV infection», «portal hypertension», «treatment». The inclusion criteria were restricted to the management of patients with LC associated with chronic HBV and HCV infection.

Current guidelines recommend indefinite treatment of patients with HBV-associated LC with nucleos(t)ide analogues regardless of serum HBV DNA levels, while the modern concept of using direct-acting antiviral drug combinations has become the standard treatment for HCV-associated cirrhosis. Studies have shown the ability of AVT to inhibit and reverse fibrotic processes in LC associated with chronic HBV and HCV infection. It has also been reported that HBV/HCV eradication prior to orthotopic liver transplantation improves long-term overall survival. This, in turn, can reduce the severity of portal hypertension and decrease the risk of associated complications, as well as normalize liver function. Thus, ensuring the availability of drugs for those in need of AVT will not only help prevent the development of LC, but also improve the quality of life and increase its expectancy of patients suffering from this disease.

**Keywords:** review; liver cirrhosis; chronic HBV infection; chronic HCV infection; antiviral therapy

**For citation:** Garbuzenko D.V. The role of antiviral therapy in the management of patients with liver cirrhosis associated with chronic HBV and HCV infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 331-339 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-70>

**For correspondence:** Dmitry V. Garbuzenko, D.Sci. (Med.), Professor of Department of Faculty Surgery, FSBEI HE «South Ural State Medical University» of the Ministry of the Health of Russia, 454092, Chelyabinsk, Russia. E-mail: [garb@inbox.ru](mailto:garb@inbox.ru)

**Information about the author:**Garbuzenko D.V., <https://orcid.org/0000-0001-9809-8015>

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

Received 09 June 2021  
Accepted 07 October 2021  
Published 31 October 2021

### Введение

К настоящему времени установлено, что этиотропная терапия заболеваний, естественное течение которых сопровождается развитием цирроза печени (ЦП), является действенным способом не только его профилактики, но и обратного развития гистологических нарушений с восстановлением структуры и функции органа, иногда до нормального/субнормального состояния [1]. В этой связи целесообразно проанализировать особенности лечебного воздействия на цирротический процесс, связанный с хронической инфекцией, вызванной HBV (hepatitis B virus, вирус гепатита В) и HCV (hepatitis C virus, вирус гепатита С).

#### HBV-ассоциированный цирроз печени

На сегодняшний день серологические доказательства наличия HBV-инфекции в прошлом или настоя-

щем во всём мире имеют >2 млрд человек, а 250 млн входят в группу риска связанных с ней заболеваний печени. Ежегодно регистрируется >4 млн клинических случаев острого вирусного гепатита (ВГ) В; примерно у 1–5% взрослых и 30% детей он переходит в хроническую форму. У 15–40% хронически инфицированных пациентов на протяжении жизни формируется ЦП, который может сопровождаться печёночной недостаточностью (ПН) и портальной гипертензией (ПГ), а в дальнейшем – прогрессировать до гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Смертность от связанных с HBV заболеваний печени достигает 1 млн в год [2].

Актуальные гайдлайны Европейской ассоциации по изучению печени (European Association for the Study of the Liver, EASL) и Американской ассоциации по изучению заболеваний печени (American Association for

the Study of Liver Diseases, AASLD) предписывают лечение как HBeAg-положительной (HBeAg – антиген инфекционности вируса гепатита В, hepatitis B envelope antigen), так и HBeAg-отрицательной хронической HBV-инфекции при наличии признаков клинически активного патологического процесса, а также фиброза печени (ФП) либо ЦП, причём отбор кандидатов для терапии в значительной степени основывается на биохимических и вирусологических показателях. В настоящее время для лечения хронической HBV-инфекции одобрены интерфероны (IFN) (обычный и пегилированный (Peg-IFN)) и 6 аналогов нуклеозидов/нуклеотидов (АН/Н): ламивудин, адефовир, телбивудин, энтекавир, тенофовира дизопроксил фумарат и тенофовира алафенамид фумарат. Ряд препаратов, перспективных в отношении хронического ВГ В, в частности эмтрицитабин, клевудин, прадефовир и валторцитабин, находятся на разных стадиях клинических испытаний.

Пациентам с HBV-ассоциированным ЦП рекомендуется бессрочная терапия лекарственными средствами (ЛС) группы АН/Н независимо от сывороточного уровня ДНК HBV [3]. Так, S. Kim и соавт. [4] в своей работе исследовали 41 пациента с HBeAg-положительной ( $n = 31$ ) и HBeAg-отрицательной ( $n = 10$ ) хронической HBV-инфекцией. Все участники имели клинически значимый ФП или ЦП стадии F2 ( $n = 12$ ), F3 ( $n = 6$ ) и F4 ( $n = 23$ ) по METAVIR (табл. 1), нормальные или незначительно повышенные значения активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и определяемый генетический материал HBV в сыворотке. В процессе противовирусного лечения

АН/Н выявлено значительное снижение показателей жёсткости печени, измеренных методом транзитной эластографии (ТрЭЛГ), и сывороточных уровней вирусной ДНК через 12 ( $p = 0,018$  и  $p < 0,001$  соответственно) и 24 мес наблюдения ( $p = 0,017$  и  $p < 0,001$  соответственно). Подобная динамика не сопровождалась изменением активности АЛТ ( $p = 0,063$  и  $p = 0,082$  соответственно).

Многоцентровое рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование, проводившееся в параллельных группах и включавшее 651 больного компенсированным HBV-ассоциированным ЦП, показало, что приём ламивудина (100 мг/сут) длительностью в среднем 32,4 мес вызывал замедление прогрессирования заболевания. При этом если у получавших терапию значения шкалы Child–Pugh (Чайлд–Пью) (табл. 2) увеличились в 3,4% случаев, то в группе плацебо – в 8,8% (отношение рисков (ОР) 0,45;  $p = 0,02$ ), а ГЦК развилась в 3,9 и 7,4% случаев соответственно (ОР 0,49;  $p = 0,047$ ) [5].

Далее, в протоколе с участием 69 пациентов с HBeAg-положительной ( $n = 50$ ) и HBeAg-негативной ( $n = 19$ ) хронической HBV-инфекцией (из них 57 с выраженным ФП/ЦП – F4-6 по шкале K.G. Ishak, К.Г. Ицхак) назначение энтекавира (0,5 мг/сут) на протяжении 12 мес способствовало более существенному улучшению гистологической структуры печени, показателей вирусологических и биохимических конечных точек по сравнению с применением ламивудина [6].

Ещё одно исследование 320 пациентов с HBV-ассоциированным ЦП продемонстрировало, что лечение

Таблица 1. Стадии фиброза/цирроза печени по шкалам Ishak и METAVIR  
 Table 1. Stages of liver fibrosis/cirrhosis according to Ishak and METAVIR scales

Баллы	Ishak	METAVIR
0	Фиброз отсутствует No fibrosis	Фиброз отсутствует No fibrosis
1	Фиброзное расширение портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них Fibrous enlargement of portal tracts with or without short fibrous septa	Звёздчатое расширение портальных трактов без образования фиброзных септ Stellate dilatation of portal tracts without formation of fibrous septa
2	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с короткими фиброзными септами или без них Fibrous enlargement of most portal tracts with or without short fibrous septa	Расширение портальных трактов с единичными портопортальными фиброзными септами Dilatation of portal tracts with single portoportportal fibrous septa
3	Фиброзное расширение большинства портальных трактов с единичными мостовидными портопортальными септами Fibrous enlargement of most portal tracts with single bridge-like portoportportal septa	Портоцентральные септы без цирроза Portocentral septa without cirrhosis
4	Фиброзное расширение портальных трактов с выраженными мостовидными портопортальными и портоцентральными септами Fibrous enlargement of portal tracts with pronounced bridge-like portoportportal and portocentral septa	Цирроз Cirrhosis
5	Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз) Multiple bridge-like septa with single nodules (incomplete cirrhosis)	–
6	Цирроз вероятный или достоверный Cirrhosis, probable or credible	–

энтекавиром способствует улучшению печёночной функции, оценённой в соответствии с динамикой показателей шкал MELD (model for end-stage liver disease, модель для оценки терминальных стадий заболеваний печени), рассчитываемых по формуле

$$\text{MELD} = 11,2 \times \ln(\text{МНО}) + 9,57 \times \ln(\text{креатинин, мг/дл}) + 3,78 \times \ln(\text{билирубин, мг/дл}) + 6,43 \quad (1),$$

и Child–Pugh: с  $8,5 \pm 4,6$  до  $6,2 \pm 4,2$  ( $p < 0,001$ ) и с  $6,2 \pm 1,6$  до  $5,6 \pm 0,9$  баллов ( $p < 0,001$ ) соответственно, а также уменьшению выраженности ФП по индексам APRI (AST to platelet ratio index, отношение активности аспарагинаминотрансферазы к количеству тромбоцитов) и FIB-4 (Fibrosis-4):

$$\text{FIB-4} = \frac{\text{возраст (годы)} \times \text{АСТ} \left( \frac{\text{Ед}}{\text{л}} \right)}{\text{тромбоциты} \left( \frac{10^9}{\text{л}} \right) \times \sqrt{\text{АЛТ} \left( \frac{\text{Ед}}{\text{л}} \right)}} \quad (2)$$

У испытуемых значения APRI снизились с  $3,6 \pm 4,5$  до  $1,5 \pm 1,5$  ( $p = 0,037$ ), а FIB-4 – с  $7,0 \pm 6,2$  до  $3,9 \pm 2,8$  ( $p < 0,001$ ) [7].

Наконец, в рандомизированном двойном слепом исследовании, включавшем 641 участника с HBeAg-положительной и HBeAg-отрицательной хронической HBV-инфекцией, долгосрочная (на протяжении 5 лет) супрессия репликации вируса тенофовира дизопроксила фумаратом была безопасной и способствовала регрессии ФП и ЦП в 51 и 74% случаев соответственно [8].

При декомпенсированном HBV-ассоциированном ЦП своевременно начатая ПВТ уменьшает некро-

воспаление и прогрессирование фибротических изменений, улучшает функцию печени и увеличивает выживаемость, что предполагает проведение такого лечебного вмешательства неограниченное время, теоретически – до трансплантации органа [9]. При этом в отличие от интерферонотерапии оральные АН/Н хорошо переносятся и входят в большинство действующих клинических рекомендаций [3].

Ф. Yao и соавт. [10] продемонстрировали резкое снижение значений шкалы Child–Pugh (на  $\geq 3$  баллов) у 69% получавших ламивудин (150 мг/сут) пациентов с тяжёлым декомпенсированным HBV-ассоциированным ЦП, причём в 38% случаев показатели достигли  $< 7$ . Однако после 5 лет непрерывной терапии этим препаратом у 70% пациентов развилась резистентность [11], тогда как спустя 4 года лечения энтекавиром она встречалась лишь в  $< 0,5\%$  случаев [12].

В открытом многоцентровом международном исследовании с участием 128 резистентных к ламивудину больных декомпенсированным HBV-ассоциированным ЦП при лечении адефовиром (10 мг/сут) через 48 нед в 81% случаев достигнут неопределяемый уровень ДНК HBV в сыворотке ( $< 400$  копий/мл) с улучшением показателей Child–Pugh у  $> 90\%$  пациентов [13]. Вместе с тем потенциальный риск нефротоксичности остаётся проблемой, препятствующей рутинному использованию указанного ЛС в качестве терапии 1 линии у данной категории лиц [14].

Более высокой активностью против HBV дикого типа по сравнению с адефовиром обладает энтекавир. Рандомизированное открытое исследование срав-

Таблица 2. Шкала Child–Pugh для оценки тяжести цирроза печени

Table 2. Child–Pugh score for assessing the severity of liver cirrhosis

Показатель Parameter	Баллы Points		
	1	2	3
Асцит Ascites	Отсутствует Absent	Небольшой Mild	Умеренный/выраженный Moderate/severe
Энцефалопатия Encephalopathy	Отсутствует Absent	Небольшая/умеренная (I–II степень) Mild/moderate (I–II degree)	Умеренная/выраженная (III–IV степень) Moderate/severe (III–IV degree)
Уровень билирубина сыворотки, мг/дл Serum bilirubin level, mg/dl	$< 2,0$	2,0–3,0	$> 3,0$
Уровень альбумина сыворотки, мг/л Serum albumin level, mg/l	$> 3,5$	2,8–3,5	$< 2,8$
Протромбиновое время, с Prothrombin time, sec	1–3	4–6	$> 6,0$
или/ор протромбиновый индекс, % prothrombin index, %	$> 60$	40–60	$< 40$
или/ор международное нормализованное отношение international normalized ratio	$< 1,70$	1,70–2,20	$> 2,20$

**Примечание.** Интерпретация результатов:

5–6 баллов: класс А (хорошо компенсированная функция печени);

7–9 баллов: класс В (выраженные нарушения функции печени);

10–15 баллов: класс С (декомпенсация заболевания и функции печени).

**Note.** Interpretation of the results:

5–6 points, grade A (well-compensated liver function);

7–9 points, class B (marked impairment of liver function);

10–15 points, class C (decompensated disease and liver function).

нивало эффективность ежедневного приёма энтекавира 1 мг ( $n = 100$ ) или адефовира 10 мг ( $n = 94$ ) на протяжении 96 нед у имеющих декомпенсированный HBV-ассоциированный ЦП ( $\geq 7$  баллов по шкале Child–Pugh). В группе энтекавира зарегистрированы более значительное снижение сывороточных уровней ДНК HBV ( $p < 0,0001$ ) и бóльшая доля участников, достигавших значений  $< 300$  копий/мл через 24 (49% для энтекавира по сравнению с 16% в случае адефовира;  $p < 0,0001$ ) и 48 нед (57 и 20% соответственно;  $p < 0,0001$ ). В обеих группах  $\frac{2}{3}$  испытуемых показали улучшение или стабилизацию показателей шкал Child–Pugh и MELD. Заболеваемость ГЦК и совокупный уровень смертности среди получавших энтекавир составили 12 и 23%, у леченных адефовиром – 20 и 33 % соответственно [15].

Далее, в протоколе с участием 55 человек, страдавших декомпенсированным HBV-ассоциированным ЦП ( $\geq 7$  баллов по Child–Pugh), лечение энтекавиром в дозе 0,5 мг/сут в течение 12 мес способствовало достижению кумулятивной бестрансплантационной выживаемости за этот период, равной 87,1%, наряду с улучшением показателей по Child–Pugh (с 8,1 до 6,6;  $p < 0,05$ ) и MELD (с 11,1 до 8,8;  $p < 0,05$ ). При этом 36 пациентов (66%) достигли класса А по Child–Pugh, а у 27 (49%) значения этой шкалы улучшились на 2 балла. Кумулятивная степень отсутствия ДНК HBV и потери HBeAg за 12 мес составили 92,3 и 54,0% соответственно, частота возникновения ГЦК за 24 мес – 6,9% при совокупном уровне смертности 17% [16].

В другом двойном слепом рандомизированном исследовании 232 больных HBV-ассоциированным ЦП с декомпенсацией (Child–Pugh  $\geq 7$  баллов) на протяжении 104 нед получали терапию телбивудином (600 мг/сут) и ламивудином (100 мг/сут) в соотношении 1 : 1. Назначение телбивудина было независимым предиктором достижения сывороточного уровня вирусной нуклеиновой кислоты  $< 300$  копий/мл и нормализации активности АЛТ ( $p = 0,037$ ). Изменения показателей шкал Child–Pugh и MELD были сопоставимы между обеими группами. В целом у 27% получавших телбивудин и у 36% – ламивудин за 24-месячный период развивалась генотипическая резистентность. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что из-за высокой скорости вирусологического прорыва телбивудин может иметь ограниченное применение в качестве 1 линии терапии у имеющих HBV-ассоциированный ЦП в состоянии декомпенсации [17].

Ретроспективное когортное исследование с участием 57 больных декомпенсированным HBV-ассоциированным ЦП, получавших 12 мес тенофовир в дозе 300 мг/сут, показало, что годовой устойчивый вирусологический ответ (УВО) (отсутствие ДНК HBV в сыворотке через 12 или 24 нед после завершения лечения) и сероконверсия HBeAg наблюдались соответственно в 70,2 и 14,2% случаев. Применение тенофовира привело к улучшению значений MELD и Child–Pugh ( $p < 0,001$ ), при этом по последней шкале 39 (68,4%) пациентов достигли соответствующих

классу А показателей, а у 27 (49,1%) значения улучшились на 2 балла. Частота подтверждённого повышения сывороточного уровня креатинина на 0,5 мг/дл составила 7,0% [18].

Наконец, в многоцентровом ретроспективном исследовательском протоколе сравнивались эффективность и безопасность длительного применения АН/Н у 227 взрослых с хронической HBV-инфекцией, 104 из которых имели декомпенсированный ЦП. Среди получавших тенофовир, энтекавир и ламивудин содержание ДНК HBV в сыворотке  $< 400$  копий/мл зарегистрировано соответственно в 91,5, 92,5 и 77% случаев, а значения активности сывороточной АЛТ нормализовались соответственно у 86,8, 92,1 и 71,8% больных. Показатели по Child–Pugh ухудшились у 8,5% участников группы тенофовира, 15,6% – энтекавира и 27,4% – ламивудина. Частота осложнений ЦП, включая печёночную энцефалопатию (ПЭ), кровотечение из варикозно расширенных вен (ВРВ) пищевода, ГЦК, а также уровни смертности во всех группах были одинаковыми. Ламивудин был вынужденно заменён на другое ЛС у 32,4% пациентов [19].

Таким образом, с учётом профилей противовирусной активности и лекарственной устойчивости тенофовир и энтекавир превосходят ламивудин, адефовир и телбивудин, что позволяет рассматривать эти 2 препарата как терапию 1 линии при декомпенсированном HBV-ассоциированном ЦП.

### НСV-ассоциированный цирроз печени

Инфекция, вызываемая НСV, – широко распространённое контагиозное заболевание, которым страдают ~180 млн населения планеты. Хронический ВГ С, который определяется как персистенция РНК НСV в сыворотке крови свыше 6 мес после начала острого инфекционного процесса, развивается у 55–85% больных. По прошествии этого периода спонтанное разрешение хронической НСV-инфекции встречается редко, причём её естественное течение часто сопровождается нарастающим ФП, что в конечном итоге может привести к развитию цирроза с прогрессированием до терминальной стадии и формированием ГЦК [20].

В соответствии с текущими клиническими рекомендациями EASL все пациенты с хроническим ВГ С должны получать ПБТ, основная цель которой – эрадикация инфекции, а именно достижение состояния УВО (отсутствие РНК НСV в сыворотке спустя 12 или 24 нед от момента завершения терапии). Последний соответствует излечению от НСV-инфекции с очень низкой вероятностью позднего рецидива. Обычно УВО ассоциируется с нормализацией активности ферментов печени, улучшением либо исчезновением некровоспаления и обратным развитием ФП у пациентов без ЦП. Лица с выраженным ФП (METAVIR F3) (табл. 2) или ЦП (METAVIR F4) остаются в группе риска опасных для жизни осложнений. Однако фибротические явления могут регрессировать, и риск таких осложнений, как ПН и ПГ, после УВО снижается. Вместе с тем ПБТ не рекомендуется пациентам с незначительной ожидаемой продолжительностью оставшейся жизни вслед-

ствии других, экстрагепатических сопутствующих заболеваний [21].

Современная концепция комбинированного использования противовирусных препаратов прямого действия стала стандартом лечения хронического ВГ С. Она направлена на одновременное ингибирование нескольких мишеней жизненного цикла возбудителя, а именно – неструктурных белков NS3, -4A, -5A и -5B. Варианты ПВТ зависят от генотипа, наличия либо отсутствия ЦП, клинического опыта и финансовых возможностей [22]. Её эффективность напрямую связана с улучшением структуры и функции печени [23], а при HCV-ассоциированном ЦП на фоне УВО могут иметь место признаки регрессии заболевания [24].

В многоцентровом обсервационном исследовании когорты из 392 пациентов с хроническим ВГ С, получавших на протяжении 12 нед лечение противовирусными препаратами прямого действия и достигших УВО, наблюдалось улучшение значений ТрЭЛГ (на 32,4%) и показателей FIB-4 и APRI в течение 18 мес после терапии. Значение исходной медианы ТрЭЛГ 12,65 кПа (межквартильный диапазон (МКД) 9,45–19,2 кПа) снизилось до 8,55 (МКД 5,93–15,25;  $p < 0,001$ ). Медианные показатели FIB-4 и APRI уменьшились с 2,54 (МКД 1,65–4,43) и 1,10 (МКД 0,65–2,43) до 1,80 (МКД 1,23–2,84) и 0,43 (МКД 0,30–0,79) соответственно ( $p < 0,001$  в обоих случаях) [25].

В связи с неодинаковым течением и прогнозом хронической HCV-инфекции, вызываемой разными генотипами вируса, целесообразно отдельно рассмотреть особенности каждого из них.

**Генотип 1.** В клинических испытаниях III фазы больные компенсированным HCV-ассоциированным ЦП получали либо софосбувир/ледипасвир [26], либо комбинацию омбитасвир/паритапревир/ритонавир + дасабувир (3D-режим) [27]. Показатели УВО при этом превышали 90%, лечение хорошо переносилось. Отрицательными прогностическими факторами в плане достижения УВО на фоне схемы 3D были присутствие гена *IL28B(rs8099917)TT* (аллели тимин–тимин), предшествующее отсутствие реакции на терапию и генотип HCV 1a [28]. Другими описанными режимами были комбинации софосбувир/симепревир с наличием и отсутствием УВО среди терапевтически «наивных» больных HCV-ассоциированным ЦП (88 и 79% соответственно) [29], даклатасвир/рибавирин с показателем УВО 82% [30]. При применении обеих схем УВО достигался значительно реже у имевших показатели, соответствующие классу С по Child–Pugh, либо  $\geq 10$  по MELD [26]. Наилучшие результаты достигнуты во французском многоцентровом обсервационном исследовательском протоколе, в котором применялась комбинация софосбувира (400 мг/сут) и даклатасвира (60 мг/сут) с присоединением рибавирина (1000–1200 мг/сут) или без него в течение 12 или 24 нед. Частота УВО составила 95% в диапазоне от 92% (софосбувир/даклатасвир 12 нед) до 99% (софосбувир/даклатасвир/рибавирин на протяжении 24 нед) [31].

В ретроспективном когортном исследовании, включавшем 143 пациентов с хронической HCV-инфекцией (80 с хроническим ВГ и 63 – с ЦП) преимущественно генотипа 1, после достижения УВО на фоне противовирусных препаратов прямого действия средние значения измеренных при ТрЭЛГ показателей жёсткости печени спустя 48 нед лечения снизились с  $19,2 \pm 15,3$  до  $11,7 \pm 8,0$  кПа ( $p < 0,001$ ), а уровни сывороточного биомаркера N-концевого пропептида проколлагена III типа (PIIINP) через 24 и 48 нед лечения – с  $43,6 \pm 22,0$  до  $35,7 \pm 21,1$  нг/мл и до  $29,4 \pm 15,0$  нг/мл соответственно ( $p < 0,001$ ) [32].

**Генотип 2.** В доступной литературе информация о клиническом изучении эффективности препаратов прямого действия исключительно у больных HCV-ассоциированным ЦП данного генотипа отсутствует. Тем не менее в 4 исследованиях фазы III, где эти ЛС использовались в том числе у такой группы пациентов, показатели достижения УВО на фоне комбинации софосбувир/рибавирин составили от 60 до 93% [33].

**Генотип 3.** Несмотря на его распространённость, больные HCV-ассоциированным ЦП этого генотипа хуже поддаются лечению программами без Peg-IFN $\alpha$ -2a. Действительно, в исследовании G. Foster и соавт. [34] усиленная этим ЛС комбинация софосбувир/рибавирин на протяжении 12 нед была более эффективной, чем только указанное сочетание 2 препаратов в течение 24 нед, с частотой УВО 86–91 и 77–82% соответственно. Значение данного параметра при 12-недельном приёме софосбувира/даклатасвира оказалось равным лишь 63% [35]. Аналогичные данные получены у лиц, которым назначалась комбинация софосбувир/ледипасвир с добавлением рибавирина [36].

**Генотипы 4–6.** Сведения относительно эффективности ПВТ у больных компенсированным HCV-ассоциированным ЦП генотипов 4–6 в настоящее время присутствуют в весьма незначительном объёме. В ретроспективном исследовании с участием 337 пациентов с хроническим ВГ С (главным образом генотип 4) достижение УВО в ходе лечения на основе софосбувира продолжительностью 12 нед способствовало клинически значимому уменьшению определённых посредством ТрЭЛГ значений жёсткости печени с  $14,8 \pm 10,7$  до  $11,8 \pm 8,8$  кПа ( $p = 0,0001$ ) [37].

Эффективность и безопасность препаратов прямого действия изучены для прогностически неблагоприятного HCV-ассоциированного ЦП в состоянии декомпенсации. Так, в исследовании N. Afdhal и соавт. [38] 50 пациентам как с компенсированным, так и декомпенсированным ЦП назначалась комбинация софосбувира/рибавирина в течение 48 нед сразу или после 24 нед наблюдения. Спустя 24 нед показатели количества тромбоцитов возросли только у компенсированных больных, тогда как сывороточные уровни альбумина увеличились в обеих группах. Терапия улучшила также значения по шкале MELD. Асцит и ПЭ разрешились у всех получивших лечение.

В работе S. Flamm и соавт. [39] 108 испытуемых с декомпенсированным HCV-ассоциированным ЦП генотипов 1 и 4 класса В и С по Child–Pugh, ранее пролеченных или терапевтически «наивных», получали комбинацию софосбувир/ледипасвир с присоединением рибавирина (начиная с 600 мг/сут с возможностью эскалации) в течение 12 или 24 нед. У всех участников показатели MELD не превышали 21, а функция почек была нормальной. УВО был достигнут в 87 и 89% случаев в группах, пролеченных 12 и 24 нед соответственно, и оказался сопоставимым среди имевших ЦП класса В и С Child–Pugh. Необходимость в прекращении лечения из-за побочных эффектов была незначительной. Сывороточные концентрации общего билирубина снизились, уровни альбумина – напротив, поднялись в обеих группах, что свидетельствовало о стабилизации функции печени. Показатели шкалы Child–Pugh улучшились у 70% пациентов, остались неизменными у 20% и ухудшились – у 10%. В большинстве случаев отмечалось также улучшение значений шкалы MELD.

В исследовании Y. Такаока и соавт. [40] (72 пациента с декомпенсированным HCV-ассоциированным ЦП (генотип 1 и 2) класса В и С по Child–Pugh) после 12-недельного лечения софосбувиром/велпатасвиром УВО в целом достигнут в 95,8% случаев (69/72), для классов В в 94,9% (56/59) и С – в 100% (13/13) случаев. В отличие от уровней общего билирубина сыворотки и степени ПЭ наблюдалось значительное улучшение показателей сывороточного альбумина, протромбинового времени и уменьшение выраженности асцита ( $p < 0,01$ ). Среди достигших УВО 75% пациентов показали снижение, а 5,9% – повышение значений шкалы Child–Pugh. Независимыми факторами, которые препятствовали нормализации её показателей, были наличие больших портосистемных шунтов ( $\geq 6$  мм в диаметре) и гипербилирубинемии ( $\geq 2,0$  мг/дл) ( $p < 0,05$ ). Среди побочных явлений наиболее часто встречались энцефалопатия (15,3%) и кожные симптомы (7,9%), что в 2 случаях заставило прекратить лечение.

До настоящего времени продолжается дискуссия о «точке невозврата» естественного течения ассоциированного с HCV-инфекцией декомпенсированного ЦП. С учётом неблагоприятного прогноза остаётся не вполне ясным, показана ли «паллиативная» ПВТ пациентам, не являющимся кандидатами на ортотопическую трансплантацию печени (ОТП). Тем не менее кажется очевидным, что даже они могут получить пользу от противовирусного лечения с режимами без Peg-IFN $\alpha$ -2a благодаря уменьшению выраженности ПГ, связанному с эрадикацией HCV [41]. У тех же, кому планируется проведение подобного вмешательства, потенциальные преимущества ПВТ заключаются в улучшении печёночной функции, в некоторых случаях столь значительном, что пациента исключают из листа ожидания трансплантации [42]. Кроме того, успешная эрадикация HCV перед ОТП предотвращает ускоренное прогрессирование поражения органа после выполнения этой операции [43].

### Влияние устойчивого вирусологического ответа на портальную гипертензию при циррозе, ассоциированном с хронической HBV- и HCV-инфекцией

За последние годы установлено, что УВО при ассоциированном с хронической HBV- и HCV-инфекцией ЦП позитивно влияет не только на гистологическую структуру печени, но и на динамику ПГ [44]. Например, S. Manolakopoulos и соавт. [45] в проспективном исследовании показали, что вирусологический и биохимический ответы через 12 мес после начала приёма ламивудина (100 мг/сут) сопровождалась значительной редукцией величины портального давления при наличии HBV-ассоциированного ЦП и клинически значимой ПГ. У 10 из 13 больных с исходным градиентом печёночно-венозного давления (ГПВД)  $\geq 12$  мм рт. ст. он снизился более чем на 20% или ниже порога 12 мм рт. ст.

В работе P. Lampertico и соавт. [46] изучено влияние применения АН/Н в течение 12-летнего периода (медиана; диапазон 2–17 лет) на состояние пищеводных варикозов среди 107 HBeAg-отрицательных пациентов с HBV-ассоциированным компенсированным ЦП, у 93% из которых показатели по Child–Pugh соответствовали классу А. Первоначально все участники получали ламивудин (100 мг/сут), однако при появлении резистентности он был заменён адефовиром (10 мг/сут) либо тенофовиром (245 мг/сут). У 18 из 27 участников исходный пищеводный варикоз 1 степени регрессировал, в 8 случаях оставался неизменным и у 1 больного – прогрессировал. Кумулятивная частота обратного развития этого состояния на протяжении 12 лет составила 83% (95% ДИ 52–92%). Пищеводный варикоз *de novo* 1–2 степени образовался лишь у 6 из 80 пациентов с показателем 12-летней кумулятивной частоты, равным 10% (95% ДИ 5–20%). Кровотечений из локализаций варикоза не отмечалось. 12 больных умерли (9 из них с ГЦК), 15 перенесли трансплантацию печени (13 – с ГЦК). 12-летняя кумулятивная частота возникновения ГЦК и общая выживаемость составили 33% (95% ДИ 24–42%) и 76% (95% ДИ 67–83%) соответственно.

M. Mandorfer и соавт. [47] в ретроспективном исследовании оценили влияние достижения УВО после терапии без Peg-IFN $\alpha$ -2a на динамику ПГ у имеющих HCV-ассоциированный ЦП класса А и В по Child–Pugh. Им назначались софосбувир (400 мг/сут) в комбинации с рибавирином (доза рассчитывалась по массе тела и варьировала от 1000 до 1200 мг/сут), симепревивир (150 мг/сут), даклтасвир или ледипасвир (60 и 90 мг/сут соответственно), симепревивир или ледипасвир (150 и 90 мг/сут соответственно) либо 3D-режим (омбитасвир 12,5 мг/сут/паритапревивир 75 мг/сут/ритонавир 50 мг/сут + дасабувир 500 мг/сут) с присоединением рибавирина или без него. Длительность лечения составляла от 12 до 24 нед. Среди пациентов с исходным ГПВД 6–9 мм рт. ст. у 63% данный показатель снизился до нормы и ни в одном случае не прогрессировал до клинически значимой ПГ ( $\geq 10$  мм рт. ст.). Тем не менее при ГПВД  $> 15$  мм рт. ст. эффективность лечения была неодинаковой, а в 20% случаев имело место увеличение исходного значения даже по-

сле достижения УВО. Таким образом, данные исследования показали позитивное влияние терапии схемами, не содержащими Peg-IFN $\alpha$ -2a, исключительно на субклиническую ПГ (ГПВД 6–9 мм рт. ст.).

В проспективном многоцентровом протоколе с участием 226 страдающих HCV-ассоциированным ЦП клинически значимая ПГ сохранялась у >50% из них к 96 нед, несмотря на достижение УВО на фоне ПВТ препаратами прямого действия [48].

Несколько иные результаты получены в ходе клинических испытаний, проведённых в 9 международных центрах среди 50 больных с HCV-ассоциированным ЦП класса А и В Child-Pugh, имевших ГПВД >6 мм рт. ст., а в ряде случаев и пищево-двигательный варикоз. Все они в течение 48 нед получали лечение соfosбувиром 400 мг/сут и рибавирином, доза которого рассчитывалась исходя из массы тела (1000–1200 мг/сут). Из 9 пациентов с изначально клинически значимой ПГ, достигших УВО, 8 (89%) показали снижение ГПВД на >20%, а 3 – до <12 мм рт. ст. [49].

В ещё одном проспективном многоцентровом исследовании (247 больных HCV-ассоциированным ЦП) определено влияние достижения УВО как результата ПВТ препаратами прямого действия на динамику гастроэзофагеального варикоза (ГЭВ). Из 64/151 (42,4%) не имевших этого осложнения оно развилось у 8 (12,5%). Обнаружено прогрессирование варикоза данной локализации у 50/151 (33,1%) пациентов с изначально низким риском его образования (<5 мм); при этом у 64,7% из них исходные показатели ТрЭЛГ составляли  $\geq 25$ , а у 66,7% –  $\geq 20$  кПа (после лечения). Только 6% испытуемых без ГЭВ и значениями ТрЭЛГ <25 кПа до терапии и 10% – с исходными результатами этого исследования <25 кПа и <20 кПа после лечения продемонстрировали прогрессирование ГЭВ спустя 36 мес [50].

Наконец, в исследовании, включавшем 33 582 пациентов с хронической HCV-инфекцией, достижение УВО в процессе ПВТ препаратами прямого действия было независимо связано с меньшим риском варикозного кровотечения на протяжении длительного периода наблюдения как у имевших ЦП до начала лечебных мероприятий (ОР 0,73; 95% ДИ 0,57–0,93), так и без него (ОР 0,33; 95% ДИ 0,17–0,65) [51].

### Заключение

Успехи ПВТ, вызывающей ингибирование и обратное развитие фибротических процессов в печени при хронической HBV- и HCV-инфекции, дают веские основания считать ЦП потенциально обратимым заболеванием. Регрессия ФП, в свою очередь, может уменьшить выраженность ПГ и снизить риск связанных с ней осложнений, а также нормализовать печёночную функцию. Кроме того, отмечается, что эрадикация HBV и HCV перед ОТП повышает общую выживаемость в долгосрочной перспективе. Таким образом, обеспечение доступности препаратов для нуждающихся в противовирусном лечении будет способствовать не только профилактике развития ЦП, но также улучшит качество и увеличит продолжительность жизни страдающих им пациентов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Jung Y.K., Yim H.J. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J. Intern. Med.* 2017; 32(2): 213–8. <https://doi.org/10.3904/kjim.2016.268>
- Feld J., Janssen H.L., Abbas Z., Elewaut A., Ferenci P., Isakov V., et al. Review Team. World Gastroenterology Organisation Global Guideline Hepatitis B: September 2015. *J. Clin. Gastroenterol.* 2016; 50(9): 691–703. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000647>
- Cornberg M., Lok A.S., Terrault N.A., Zoulim F. 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference Faculty. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B – Report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference. *J. Hepatol.* 2020; 72(3): 539–57. <https://doi.org/10.1002/hep.31030>
- Kim S.U., Park J.Y., Kim D.Y., Ahn S.H., Choi E.H., Seok J.Y., et al. Non-invasive assessment of changes in liver fibrosis via liver stiffness measurement in patients with chronic hepatitis B: impact of antiviral treatment on fibrosis regression. *Hepatol. Int.* 2010; 4(4): 673–80. <https://doi.org/10.1007/s12072-010-9201-7>
- Liaw Y.F., Sung J.J., Chow W.C., Farrell G., Lee C.Z., Yuen H., et al. Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(15): 1521–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa033364>
- Chang T.T., Liaw Y.F., Wu S.S., Schiff E., Han K.H., Lai C.L., et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2010; 52(3): 886–93. <https://doi.org/10.1002/hep.23785>
- Shin S.K., Kim J.H., Park H., Kwon O.S., Lee H.J., Yeon J.E., et al. Improvement of liver function and non-invasive fibrosis markers in hepatitis B virus-associated cirrhosis: 2 years of entecavir treatment. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2015; 30(12): 1775–81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13020>
- Marcellin P., Gane E., Buti M., Afdhal N., Sievert W., Jacobson I.M., et al. Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *Lancet.* 2013; 381(9865): 468–75. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61425-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61425-1)
- Terrault N.A., Lok A.S.F., McMahon B.J., Chang K.M., Hwang J.P., Jonas M.M., et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance. *Hepatology.* 2018; 67(4): 1560–99. <https://doi.org/10.1002/hep.29800>
- Yao F.Y., Bass N.M. Lamivudine treatment in patients with severely decompensated cirrhosis due to replicating hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 2000; 33(2): 301–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80371-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80371-2)
- Lok A.S.F., McMahon B.J. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology.* 2009; 50(3): 661–2. <https://doi.org/10.1002/hep.23190>
- Ono A., Suzuki F., Kawamura Y., Sezaki H., Hosaka T., Akuta N., et al. Long-term continuous entecavir therapy in nucleos(t)ide-naïve chronic hepatitis B patients. *J. Hepatol.* 2012; 57(3): 508–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.037>
- Schiff E.R., Lai C.L., Hadziyannis S., Neuhaus P., Terrault N., Colombo M., et al. Adefovir Dipivoxil Study 435 International Investigators Group. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology.* 2003; 38(6): 1419–27. <https://doi.org/10.1016/j.hep.2003.09.040>
- Hadziyannis S.J., Tassopoulos N.C., Heathcote E.J., Chang T.T., Kitis G., Rizzetto M., et al. Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology.* 2006; 131(6): 1743–51. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.09.020>
- Liaw Y.F., Raptopoulou-Gigi M., Cheinquer H., Sarin S.K., Tanwandee T., Leung N., et al. Efficacy and safety of entecavir versus adefovir in chronic hepatitis B patients with hepatic decompensation: a randomized, open-label study. *Hepatology.* 2011; 54(1): 91–100. <https://doi.org/10.1002/hep.24361>
- Shim J.H., Lee H.C., Kim K.M., Lim Y.S., Chung Y.H., Lee Y.S., et al. Efficacy of entecavir in treatment-naïve patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J. Hepatol.* 2010; 52(2): 176–82. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.11.007>
- Chan H.L., Chen Y.C., Gane E.J., Sarin S.K., Suh D.J., Piratvisuth T., et al. Randomized clinical trial: efficacy and safety of telbivudine and lamivudine in treatment-naïve patients with HBV-related decompensated cirrhosis. *J. Viral. Hepatol.* 2012; 19(10): 732–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01600.x>
- Lee S.K., Song M.J., Kim S.H., Lee B.S., Lee T.H., Kang Y.W., et al. Safety and efficacy of tenofovir in chronic hepatitis B-relat-

- ed decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23(13): 2396–403. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i13.2396>
19. Köklü S., Tuna Y., Gülşen M.T., Demir M., Köksal A.Ş., Koçkar M.C., et al. Long-term efficacy and safety of lamivudine, entecavir, and tenofovir for treatment of hepatitis B virus-related cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 11(1): 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.10.003>
20. Lingala S., Ghany M.G. Natural history of hepatitis C. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2015; 44(4): 717–34. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.003>
21. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* 2018; 69(2): 461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
22. Kardashian A.A., Pockros P.J. Novel emerging treatments for hepatitis C infection: a fast-moving pipeline. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 2017; 10(2): 277–82. <https://doi.org/10.1177/1756283X16683875>
23. Miyaki E., Imamura M., Hiraga N., Murakami E., Kawaoka T., Tsuge M., et al. Daclatasvir and asunaprevir treatment improves liver function parameters and reduces liver fibrosis markers in chronic hepatitis C patients. *Hepatol. Res.* 2016; 46(8): 758–64. <https://doi.org/10.1111/hepr.12621>
24. Rockey D.C., Friedman S.L. Fibrosis Regression After Eradication of Hepatitis C Virus: From Bench to Bedside. *Gastroenterology.* 2021; 160(5): 1502–20. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.065>
25. Bachofner J.A., Valli P.V., Kröger A., Bergamin I., Künzler P., Baserga A., et al. Direct antiviral agent treatment of chronic hepatitis C results in rapid regression of transient elastography and fibrosis markers fibrosis-4 score and aspartate aminotransferase-platelet ratio index. *Liver Int.* 2017; 37(3): 369–76. <https://doi.org/10.1111/liv.13256>
26. Reddy K.R., Bourlière M., Sulkowski M., Omata M., Zeuzem S., Feld J.J., et al. Ledipasvir and sofosbuvir in patients with genotype 1 hepatitis C virus infection and compensated cirrhosis: An integrated safety and efficacy analysis. *Hepatology.* 2015; 62(1): 79–86. <https://doi.org/10.1002/hep.27826>
27. Fried M., DiBisceglie A., Vierling J.M., Gane E.J., Nevens F., Strasser S.I., et al. TURQUOISE-II: regimens of ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin achieve high SVR12 rates in HCV genotype 1-infected patients with cirrhosis, regardless of baseline characteristics. *Hepatology.* 2014; 60(Suppl): 1145A. Available at: [https://www.natap.org/2014/AASLD/AASLD\\_03.htm](https://www.natap.org/2014/AASLD/AASLD_03.htm) (accessed September 18, 2021).
28. Feld J.J., Kowdley K.V., Coakley E., Sigal S., Nelson D.R., Crawford D., et al. Treatment of HCV with ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(17): 1594–603. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1315722>
29. Lawitz E., Matusow G., DeJesus E., Yoshida E.M., Felizarta F., Ghalib R., et al. Simeprevir plus sofosbuvir in patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection and cirrhosis: A phase 3 study (OPTIMIST-2). *Hepatology.* 2016; 64(2): 360–9. <https://doi.org/10.1002/hep.28422>
30. Poordad F., Schiff E.R., Vierling J.M., Landis C., Fontana R.J., Yang R., et al. Daclatasvir with sofosbuvir and ribavirin for hepatitis C virus infection with advanced cirrhosis or post-liver transplantation recurrence. *Hepatology.* 2016; 63(5): 1493–505. <https://doi.org/10.1002/hep.28446>
31. Pol S., Bourlière M., Lucier S., Hezode C., Dorival C., Larrey D., et al. ANRS/AFEF HEPATHER study group. Safety and efficacy of daclatasvir-sofosbuvir in HCV genotype 1-mono-infected patients. *J. Hepatol.* 2017; 66(1): 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.08.021>
32. Sriphoosanaphan S., Thanapirom K., Suksawatamnuay S., Thaimai P., Sittisomwong S., Sonsiri K., et al. Changes in hepatic fibrosis and vitamin D levels after viral hepatitis C eradication using direct-acting antiviral therapy. *BMC Gastroenterol.* 2020; 20(1): 346. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01485-8>
33. Ferenci P., Kozbial K., Mandorfer M., Hofer H. HCV targeting of patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* 2015; 63(4): 1015–22. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.003>
34. Foster G.R., Pianko S., Brown A., Forton D., Nahass R.G., George J., et al. BOSON Study Group. Efficacy of sofosbuvir plus ribavirin with or without peginterferon-alfa in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection and treatment-experienced patients with cirrhosis and hepatitis C virus genotype 2 infection. *Gastroenterology.* 2015; 149(6): 1462–70. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.043>
35. Nelson D.R., Cooper J.N., Lalezari J.P., Lawitz E., Pockros P.J., Gitlin N., et al. ALLY-3 Study Team. All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology.* 2015; 61(4): 1127–35. <https://doi.org/10.1002/hep.27726>
36. Gane E.J., Hyland R.H., An D., Svarovskaia E., Pang P.S., Brainard D., et al. Efficacy of ledipasvir and sofosbuvir, with or without ribavirin, for 12 weeks in patients with HCV genotype 3 or 6 infection. *Gastroenterology.* 2015; 149(6): 1454–61. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.063>
37. Elsharkawy A., Alem S.A., Fouad R., El Raziky M., El Akel W., Abdo M., et al. Changes in liver stiffness measurements and fibrosis scores following sofosbuvir based treatment regimens without interferon. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 32(9): 1624–30. <https://doi.org/10.1111/jgh.13758>
38. Afdhal N., Everson G., Calleja J.L., McCaughan G., Symonds W.T., Denning J., et al. Sofosbuvir and ribavirin for the treatment of chronic HCV with cirrhosis and portal hypertension with and without decompensation: early virologic response and safety. *J. Hepatol.* 2014; 60(Suppl. 1): S28. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(14\)60070-2](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(14)60070-2)
39. Flamm S.L., Everson G.T., Charlton M., Denning J.M., Arterburn S., Brandt-Sarif T., et al. Ledipasvir/sofosbuvir with ribavirin for the treatment of HCV in patients with decompensated cirrhosis: preliminary results of a prospective, multicenter study. *Hepatology.* 2014; 60(Suppl): 320A. Available at: [https://www.natap.org/2014/AASLD/AASLD\\_36.htm](https://www.natap.org/2014/AASLD/AASLD_36.htm) (accessed September 18, 2021).
40. Takaoka Y., Miura K., Morimoto N., Ikegami T., Kakizaki S., Sato K., et al. Liver Investigators in the Northern Kanto Study (LINKS) group. Real-world efficacy and safety of 12-week sofosbuvir/velpatasvir treatment for patients with decompensated liver cirrhosis caused by hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.* 2021; 51(1): 51–61. <https://doi.org/10.1111/hepr.13576>
41. Iacobellis A., Siciliano M., Perri F., Annicchiarico B.E., Leandro G., Caruso N., et al. Peginterferon alfa-2b and ribavirin in patients with hepatitis C virus and decompensated cirrhosis: a controlled study. *J. Hepatol.* 2007; 46(2): 206–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.08.020>
42. Ruiz I., Feray C., Pawlotsky J.M., Hézode C. Patient with decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis delisted for liver transplantation after successful sofosbuvir-based treatment. *Liver Transpl.* 2015; 21(3): 408–9. <https://doi.org/10.1002/lt.24051>
43. Gane E.J. The natural history of recurrent hepatitis C and what influences this. *Liver Transpl.* 2008; 14(Suppl. 2): S36–44. <https://doi.org/10.1002/lt.21646>
44. Garbuzenko D.V., Arefyev N.O. Primary prevention of bleeding from esophageal varices in patients with liver cirrhosis: An update and review of the literature. *J. Evid. Based Med.* 2020; 13(4): 313–24. <https://doi.org/10.1111/jebm.12407>
45. Manolakopoulos S., Triantos C., Theodoropoulos J., Vlachogiannakos J., Kougioumtzan A., Papatheodoridis G., et al. Antiviral therapy reduces portal pressure in patients with cirrhosis due to HBeAg-negative chronic hepatitis B and significant portal hypertension. *J. Hepatol.* 2009; 51(3): 468–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.031>
46. Lampertico P., Invernizzi F., Viganò M., Loglio A., Mangia G., Facchetti F., et al. The long-term benefits of nucleos(t)ide analogs in compensated HBV cirrhotic patients with no or small esophageal varices: a 12-year prospective cohort study. *J. Hepatol.* 2015; 63(5): 1118–25. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.006>
47. Mandorfer M., Kozbial K., Schwabl P., Freissmuth C., Schwarzer R., Stern R. Sustained virologic response to interferon-free therapies ameliorates HCV-induced portal hypertension. *J. Hepatol.* 2016; 65(4): 692–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.027>
48. Lens S., Baiges A., Alvarado-Tapias E., Llop E., Martínez J., Fortea J.I., et al. Clinical outcome and hemodynamic changes following HCV eradication with oral antiviral therapy in patients with clinically significant portal hypertension. *J. Hepatol.* 2020; 73(6): 1415–24. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.050>
49. Afdhal N., Everson G.T., Calleja J.L., McCaughan G.W., Bosch J., Brainard D.M., et al. Effect of viral suppression on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C with cirrhosis and portal hypertension. *J. Viral Hepat.* 2017; 24(10): 823–31. <https://doi.org/10.1111/jvh.12706>
50. Puigvehí M., Londoño M.C., Torras X., Lorente S., Vergara M., Morillas R.M., et al. Impact of sustained virological response with DAAs on gastroesophageal varices and Baveno criteria in HCV-cirrhotic patients. *J. Gastroenterol.* 2020; 55(2): 205–16. <https://doi.org/10.1007/s00535-019-01619-0>
51. Moon A.M., Green P.K., Rockey D.C., Berry K., Ioannou G.N. Hepatitis C eradication with direct-acting anti-virals reduces the risk of variceal bleeding. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020; 51(3): 364–73. <https://doi.org/10.1111/apt.15586>

## НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-78>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



## Дельта-подобные вирусы (*Kolmioviridae: Deltavirus*) животных и происхождение вируса гепатита D (hepatitis D virus) человека

Исаева О.В.<sup>1,2</sup>, Кюрегян К.К.<sup>1,2</sup>, Михайлов М.И.<sup>1,2</sup><sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

Вирус гепатита D (дельта, δ) (hepatitis D virus, HDV) открыт более 40 лет назад, однако представления о его происхождении и эволюции крайне ограничены. Причиной этому служило отсутствие до недавнего времени данных о существовании каких-либо вирусов, подобных HDV. Обнаружение в последние годы последовательностей новых дельта-подобных вирусов у широкого спектра представителей позвоночных (*Vertebrata*) и беспозвоночных (*Invertebrata*) позволило пересмотреть взгляды на возникновение HDV и способствовало пониманию места этого уникального вируса среди зоонозных инфекционных агентов вирусной природы. Целью данного обзора является анализ недавно опубликованных исследований, посвящённых новым дельта-подобным вирусам и их биологической характеристике.

**Ключевые слова:** вирус гепатита D (дельта) (HDV); HDV-подобные вирусы; обзор

**Для цитирования:** Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Дельта-подобные вирусы (*Kolmioviridae: Deltavirus*) животных и происхождение вируса гепатита D (hepatitis D virus) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 340-345. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-78>

**Для корреспонденции:** Исаева Ольга Владиславовна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия. E-mail: isaeva.06@mail.ru

**Участие авторов:** Исаева О.В. – анализ литературы, написание текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи; Кюрегян К.К. – анализ литературы, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи, общее руководство; Михайлов М.И. – утверждение окончательного варианта статьи, общее руководство.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

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

Поступила 20.08.2021

Принята в печать 07.10.2021

Опубликована 31.10.2021

## REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-78>

## Animal delta-like viruses (*Kolmioviridae: Deltavirus*) and the origin of the human hepatitis D virus (HDV)

Ol'ga V. Isaeva<sup>1,2</sup>, Karen K. Kyuregyan<sup>1,2</sup>, Mikhail I. Mikhailov<sup>1,2</sup><sup>1</sup>FSBSI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;<sup>2</sup>FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

Hepatitis D (delta, δ) virus (HDV) was discovered more than 40 years ago, but the understanding of its origin and evolution is poor. This is mainly due to the lack, until recently, of data on the existence of any viruses similar to HDV. The discovery in recent years of sequences of new delta-like agents in a wide range of vertebrate (*Vertebrata*) and invertebrate (*Invertebrata*) species has facilitated a revision of views on the origin of HDV and contributed to understanding the place of this unique virus among other animals' viral agents. The purpose of this review is to analyze the latest published data on new delta-like agents and their biological characteristics.

**Keywords:** hepatitis D (delta) virus (HDV); delta-like agents; review

**For citation:** Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Animal delta-like viruses (*Kolmioviridae: Deltavirus*) and the origin of the human hepatitis D virus (HDV). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 340-345 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-78>

**For correspondence:** Ol'ga V. Isaeva, Ph.D. (Biol.), Lead Researcher of the Viral Hepatitis Laboratory, FSBSI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; Lead Researcher of the Molecular and Personalized Medicine Research Institute, FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia. E-mail: [isaeva.06@mail.ru](mailto:isaeva.06@mail.ru)

**Information about the authors:**

Isaeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2656-3667>  
Kyuregyan K.K., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>  
Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

**Contribution:** Isaeva O.V. – literature analysis, writing of the text, approval of the final version of the article; Kyuregyan K.K. – literature analysis, editing of the article, approval of the final version of the article, general guidance; Mikhailov M.I. – approval of the final version of the article, general guidance.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

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

Received 20 August 2021  
Accepted 07 October 2021  
Published 31 October 2021

## Введение

Вирус гепатита D (дельта,  $\delta$ ) (*Deltavirus italicense*; hepatitis D virus, HDV), вызывающий у лиц, коинфицированных вирусом гепатита B (*Hepadnaviridae*; *Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (HBV), тяжёлый быстро прогрессирующий гепатит, открыт более 40 лет назад [1]. Хронический вирусный гепатит D ассоциирован с ускоренным прогрессированием в цирроз печени, гепатоцеллюлярную карциному и является в настоящее время наиболее трудно поддающимся терапии заболеванием печени вирусной природы [2]. По расчётным данным, коинфекцию HDV имеют примерно 5% инфицированных HBV [3]. HDV выделен в род *Deltavirus*, не отнесённый пока ни к одному семейству [4], и характеризуется самыми малыми размерами среди известных РНК-вирусов человека. Геном вируса имеет ряд отличительных особенностей и представлен ковалентно замкнутой кольцевой одноцепочечной РНК отрицательной полярности, образующей вириодоподобную самокомплементарную неразветвлённую палочковидную структуру длиной 1700 п.н. [5]. Отличительная черта как HDV, так и вириодов – репликация РНК по принципу катящегося кольца, важным этапом которой является саморазрезание с помощью рибозима, кодируемого геномной и антигеномной вирусными РНК [6]. Геном HDV кодирует единственный белок – дельта-антиген (HDAg,  $\delta$ Ag), участвующий в репликации и формировании рибонуклеокапсида вируса [7].

Проблема происхождения и распространения HDV в человеческой популяции на сегодняшний день остаётся нерешённой. До недавнего времени отсутствовали данные о существовании каких-либо вирусов, подобных HDV человека. Это оказало большое влияние на теории его возникновения и эволюции [8, 9]. Ещё в 1996 г. обсуждался вопрос о том, что капсидный белок HDV (HDAg) имеет сходство последовательностей с человеческими белками [10]. В 2006 г. K. Salehi-Ashtiani и соавт. предположили, что этот вирус, возможно, возник как ускользнувший челове-

ский ген [11]. Была также предложена гипотеза о том, что рибозим HDV произошёл от интрона в гене белка 3, связывающего цитоплазматический элемент полиаденилирования человека, либо от кольцевой клеточной РНК, найденной в гепатоцитах [5]. Однако обнаружение в последние годы последовательностей новых дельта-подобных вирусов у широкого спектра видов позвоночных (*Vertebrata*) и беспозвоночных (*Invertebrata*) [12] позволило пересмотреть взгляды на происхождение HDV и способствовало пониманию места этого уникального микроорганизма среди зоонозных вирусных патогенов. Целью настоящей работы явился анализ недавно опубликованных данных, посвящённых новым HDV-подобным вирусам и их биологической характеристике.

## Дельта-подобные вирусы животных

Первым шагом на пути к изучению разнообразия дельтавирусов (ДВ) стало открытие HDV-подобных вирусов у птиц (*Aves*) в 2018 г. [9] и змей (*Serpentes*) в 2019 г. [13]. M. Wille и соавт. проанализировали данные, полученные при анализе смешанных образцов из ротоглоток и клоак уток (*Anatinae*). Эти образцы были отобраны в 2012–2013 гг. при отлове водоплавающих птиц Австралии. В результате методом сборки полноразмерного транскриптома на основании данных секвенирования РНК (RNA-Seq) без использования эталонного генома получены 15 последовательностей РНК HDV-подобного вируса птиц (avHDV). Авторы представили сравнительные характеристики геномов этого вируса и HDV человека, продемонстрировав сходства и различия в их строении. Этими же исследователями высказана гипотеза о возможности непарентеральной передачи avHDV. Важно отметить, что в наборе последовательностей, содержащем его геном, отсутствовали таковые ортогепаднавируса (*Hepadnaviridae; Orthohepadnavirus*) уток, который, исходя из аналогии с HDV человека и HBV, представлялся необходимым в качестве вируса-помощника для дельта-вируса птиц.

U. Hetzel и соавт. открыли HDV-подобный вирус у змей (sHDV) [13]. В качестве образцов для исследования были взяты мозг, кровь и печень пары удавов (*Boa constrictor*) и их потомства, а также водяного питона (*Liasis*) из той же колонии змей. Установлено, что РНК sHDV длиной 1711 п.н. имеет кольцевую структуру, напоминающую таковую HDV человека. Аминокислотная последовательность антигена sHDV (sHDAg) имела 55 и 37% сходства с антигенами HDV (HDAg) и avHDV (avHDAg) соответственно. Доказательством активной репликации вновь открытого вируса послужили следующие данные: вирусная РНК определялась в различных количествах в разных тканях; вирус обнаруживался у некоторых, но не у всех потомков (вертикальная передача <100%); уровень экспрессии sHDAg варьировал в положительных клетках, при этом экспрессия sHDAg наблюдалась не в каждой клетке; большая (L-) и малая (S-) формы sHDAg присутствовали в печени, но только L-sHDAg определялся в головном мозге. Обнаружение авторами РНК sHDV у потомства водяного питона, содержащегося вместе с инфицированными удавами, позволило сделать предположение как о вертикальной, так и о горизонтальной передаче вируса.

Новые дельта-подобные вирусы позвоночных и беспозвоночных описали в 2019 г. W. Chang и соавт. [12]. Они провели скрининг на HDV-подобные вирусные последовательности в обеднённых рибосомальной РНК (рРНК) библиотеках полученных ранее комплементарных ДНК (кДНК) амфибий (*Amphibia*), рыб (*Pisces*), рептилий (*Reptilia*) и беспозвоночных [14, 15]. Все идентифицированные последовательности образовывали самокомплементарные неразветвлённые палочковидные структуры. Поиск консервативных доменов продемонстрировал, что предсказанные дельта-антигены в HDV-подобных вирусах тритона (*Lissotriton*) (amHDAg), жабы (*Bufo*) (tfHDAg), рыб (fiHDAg) и термитов (*Isoptera*) (tHDAg) кодировали белки из 225, 186, 180 и 184 а.о. соответственно.

В 2021 г. список HDV-подобных вирусов ещё более расширился; M. Iwamoto и соавт. идентифицировали новые дельта-вирусы у воробьиных (*Passeridae*), сурков (*Marmota*) и белохвостых оленей (*Odocoileus virginianus*) с помощью метатранскриптомного анализа [16]. Всего авторами описано 5 вирусов – tgDeV (вирус зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*)), scDeV (вирус домашней канарейки (*Serinus canaria*)), egDeV (вирус гульдовой амадины (*Erythrura gouldiae*)), mmDeV (вирус восточного сурка (*Marmota monax*)) и ovDeV (вирус белохвостого оленя). Кроме того, подобные tgDeV последовательности идентифицированы этой же группой исследователей ещё у нескольких представителей семейства воробьиных: черноголовой овсянки (*Emberiza melanocephala*) и желтобрюхой синицы (*Pardaliparus venustulus*). Последовательности tgDeV, mmDeV и ovDeV, содержащие ~1700 п.н., кодировали одну открытую рамку считывания с последовательностью и были на 36,0–66,7% идентичны аналогичной структуре генов HDAg. Авторами

установлено, что глубина считывания предсказанных транскрибируемых областей (участков, кодирующих HDAg) оказалась намного большей по сравнению с другими геномными участками, что указывает на происхождение большинства прочтений вирусного генома из матричных РНК (мРНК) вирусов. Эти данные являются косвенным подтверждением того, что новые ДВ реплицируются в своих хозяевах.

Выполненный исследователями филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей HDV человека и новых HDV-подобных вирусов опроверг первоначальное предположение о длительной коэволюции ДВ и их хозяев [16]. Так, нуклеотидные последовательности tgDeV, выделенные от разных видов воробьиных, отделившихся от общего предка свыше 40 млн лет назад, оказались схожими между собой более чем на 98%. Для дельта-вирусов млекопитающих (*Mammalia*) также показано несоответствие топологии филогенетических деревьев с эволюцией предполагаемых видов-хозяев. В частности, выявленный у оленей вирус ovDeV оказался наиболее близким человеческому HDV, а обнаруженный у сурков mmDeV продемонстрировал значительную эволюционную дистанцию от другого ДВ, выделенного ранее S. Paraskevopoulou и соавт. у грызунов (*Rodentia*) [17]. Приведённые факты указывают на вероятную передачу ДВ среди разных видов животных и их эволюцию в результате межвидового перехода.

Таким образом, к настоящему времени описано значительное количество вирусов, подобных HDV человека. Это привело к необходимости классифицировать их. В результате P. Walker с соавт. предложили выделить новое семейство *Kolmioviridae*, включающее в себя род *Deltavirus* и 7 новых родов, содержащих 15 видов [18].

#### Биологические свойства новых дельта-подобных вирусов

Следует отметить, что новые HDV-подобные вирусы выявляются не только в печени. Они обнаружены одновременно в различных органах и в крови животных; продемонстрирована их способность реплицироваться в клетках разных типов [19]. По-видимому, ДВ способны инфицировать различные ткани, а также вызывать системную инфекцию и виремию. Кроме того, для змеиного sHDV показана возможность репликации в организме млекопитающих [19], а для вирусов tgDeV и mmDeV – в клетках человека [16]. В **таблице** представлены характеристики геномов известных в настоящее время дельта-подобных вирусов в сравнении с геномом HDV человека.

Для всех выявленных к настоящему времени геномных последовательностей HDV-подобных вирусов характерны черты, присущие HDV человека – одноцепочечная РНК длиной 1500–1700 п.н., кольцевая палочковидная структура, самокомплементарность, наличие одной открытой рамки считывания, кодирующей δAg, и присутствие последовательности, ответственной за кодирование рибозима. Первоначально HDV-подобные рибозимы были описаны только у ДВ

амниот (*Amniota*) [9, 13, 17], но не у вирусов амфибий, рыб и беспозвоночных [12]. Однако позднее M. de la Peña и соавт. обнаружили характерные для HDV последовательности рибозимов у ДВ тритонов и рыб [20]. Кроме того, у HDV-подобных вирусов жаб и термитов этой группой авторов описаны рибозимы другого ти-

па (hammerhead-рибозимы III типа), характерные для растений и их вириодов. Полученные в условиях *in vitro* транскрипты последовательностей, кодирующих предполагаемые рибозимы, продемонстрировали способность к самонарезанию, что подтвердило функциональность обнаруженных мотивов. Таким образом,

**Сравнительная характеристика геномов вируса гепатита D человека и HDV-подобных вирусов**

**Comparative characteristics of human hepatitis D virus genomes and HDV-like viruses**

Хозяин Host	Год открытия вируса The year the virus was discovered	Вирус Virus	Размер генома (п.н.) Genome length (bp)	Содержание GC (%) GC content (%)	Сходство аминокислот- ных последовательностей с вирусом гепатита D (%) Amino acid sequences homology with hepatitis D virus (%)	Тип рибозима Ribozyme type
Человек Human <i>Homo sapiens</i>	1977	HDV	1700	60	–	HDVR
Водоплавающие птицы Waterfowl	2018	avHDV	1706	51	32,2	HHR I, II типа HHR type I, II
Ложноногие змеи Boas <i>Boidae</i>	2019	sHDV	1711	53,3	55	Нет данных No data
Карликовый тритон Chinese fire belly newt <i>Cynops orientalis</i>	2019	amHDAg	1735	53,8	23	Атипичный HHR III типа, Atypical HHR type III
Жаба Toad <i>Bufo</i>	2019	tfHDAg	1547	54,3	26	Атипичный HHR типа III, Atypical HHR type III
Рыбы (лучепёрые, хрящевые и бесчелюстные) Fishes (ray-finned fishes, cartilag- inous fishes and jawless fishes) <i>Actinopterygii, Chondrichthyes, Agnatha</i>	2019	fiHDAg	1606	46,3	23	Атипичный HHR III типа, Atypical HHR type III
Термиты Termites <i>Isoptera</i>	2019	tHDAg	1591	56,8	26	Атипичный HHR III типа, Atypical HHR type III
Восточный сурок Woodchuck <i>Marmota monax</i>	2021	mmDeV	1712	53,4	60	HHR I, II типа HHR type I, II
Белохвостый олень White-tailed deer <i>Odocoileus virginianus</i>	2021	ovDeV	1690	56,4	66,7	HHR I, II типа HHR type I, II
Зебровая амадина Zebra finch <i>Taeniopygia guttata</i>	2021	tgDeV	1706	56,6	63,3	HHR I, II типа HHR type I, II
Домашняя канарейка Canary <i>Serinus canaria</i>	2021	scDeV	761*	54,4	36	HHR I, II типа HHR type I, II
Гульдовая амадина Gouldian finch <i>Erythrura gouldiae</i>	2021	egDeV	596*	59,4	62,4	HHR I, II типа HHR type I, II
Желтобрюхая синица Yellowbellied tit <i>Pardaliparus venustulus</i>	2021	pvDeV	1708	55,8	62,4	HHR I, II типа HHR type I, II
Бенгальский зяблик Bengalese finch <i>Lonchura striata var. domestica</i>	2021	isDeV	1708	56,2	62,9	HHR I, II типа HHR type I, II

**Примечание.** \* – известна только частичная нуклеотидная последовательность генома; HDVR – рибозим вируса гепатита D; HHR – hammerhead-рибозим.

**Note.** \*, only a partial nucleotide sequence of the genome is known; HDVR, hepatitis D virus ribozyme; HHR, hammerhead ribozyme.

у всех описанных к настоящему времени HDV-подобных вирусов установлено наличие рибозимов.

Для HDV человека характерно наличие 2 форм HDAg – малой (S-HDAg с молекулярной массой 24 кДа) и большой (L-HDAg, 27 кДа). Обе они транслируются с одной мРНК, при этом L-HDAg синтезируется в результате редактирования клеточным белком ADAR1 стоп-кодона, заменяемого на кодон триптофана (Trp, W). Дополнительные 19 аминокислотных остатков на С-конце L-HDAg содержат сайт пренилирования, необходимый для связывания с поверхностным белком HBV [21]. В отличие от HDV человека у большинства дельта-подобных вирусов, в т.ч. наиболее эволюционно близкого человеческого HDV ДВ оленя (ovDeV), не обнаружено редактирование РНК, приводящее к образованию L-HDAg, способного связываться с поверхностными белками гепаднавирусов (*Hepadnaviridae*) [9, 15–17].

#### Возможные вирусы-помощники новых дельта-подобных вирусов

Для сборки, репликации и инфицирования *in vivo* HDV человека необходима обязательная вспомогательная функция, обеспечиваемая поверхностными белками HBV, которые формируют внешнюю оболочку рибонуклеопротеина HDV [22]. При этом HBV не является единственным вирусом, белковые структуры которого могут использоваться человеческим HDV при формировании инфекционной вирусной частицы, по крайней мере в условиях эксперимента. Эту функцию способны выполнять поверхностные белки другого гепаднавируса – вируса гепатита сурков (WHV), что обеспечивает возможность экспериментальной коинфекции HDV/WHV [23]. Более того, в опытах *in vitro* показано, что белки оболочки вирусов из нескольких родов, включая везикуловирусы (*Vesiculoviridae*), флавивирусы (*Flaviviridae*) и гепацивирусы (*Hepaciviridae*), могут образовывать внешнюю оболочку рибонуклеопротеина HDV, обеспечивать успешную продукцию его вирионов в коинфицированных клетках и последующее проникновение в клетки, экспрессирующие соответствующие рецепторы [24].

До настоящего времени не обнаружено какой-либо связи между HDV-подобными вирусами животных и гепаднавирусами. Несмотря на то что ассоциация с HBV считается ключевым явлением в биологии HDV человека, ни один из недавно описанных ДВ не выявлен в связи с коинфекцией гепаднавирусами. Даже ДВ сурков (mmDeV) был обнаружен у животных, не имевших инфекции WHV, что исключает возможность функционирования данного агента в качестве вируса-помощника [16]. Вместо этого ряд последовательностей других вирусов обнаружен в соответствующих библиотеках, где присутствовали последовательности ДВ. Так, с последовательностями HDV-подобного вируса рыб оказались ассоциированными аренавирусы (*Arenaviridae*), хантавирусы (*Hantaviridae*) и реовирусы (*Reoviridae*); астровирусы (*Astroviridae*) присутствовали в библиотеках, содер-

жащих последовательности HDV-подобного вируса тритонов, а вместе с последовательностями ДВ жабы были идентифицированы таковые вируса гриппа (*Orthomyxoviridae: Influenzavirus*) и астровируса [15]. Содержащие последовательности ДВ термитов библиотеки также включали множество других вирусных агентов (таких как вирусы, подобные вирусу Мононега–Чу (Mononega–Chu-like viruses); вирус, подобный вирусу Нарна–Леви (Narna–Levi-like virus); флавиподобный вирус), в отношении которых в настоящее время проводятся углублённые исследования [12]. Пока неизвестно, способствуют ли какие-либо из них процессу репликации новых HDV-подобных вирусов. U. Hetzel и соавт. показали, что белки оболочки 2 вирусов – рептаренавируса (*Reptarenavirus*) и хартманивируса (*Hartmanivirus*) (но не гепаднавируса) придают инфекционность ДВ змеи (sHDV) [13]. Для других ДВ животных вирусы-помощники пока не установлены. Не исключается и возможность того, что некоторые HDV-подобные вирусы не нуждаются в присутствии вирусов-помощников, осуществляя выход из клетки и вход в неё через неизвестные пока механизмы либо используя для этого внеклеточные везикулы.

Таким образом, гепаднавирусы не служат в качестве вспомогательных агентов для отличных от HDV человека ДВ, и взаимоотношения дельтавирус– гепаднавирус, по-видимому, сформировались уже после отделения человеческого HDV от линии ДВ животных.

#### Происхождение HDV человека

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют, что HDV человека входит в довольно обширную группу ДВ и, очевидно, произошёл от ДВ млекопитающих. В то же время эволюция представителей рода *Deltavirus* намного сложнее, чем считалось ранее, и не всегда является результатом параллельного развития вируса и хозяина. Различия в топологии филогенетических деревьев макроорганизмов и ДВ позволяют считать, что межвидовые переходы являются значимой движущей силой в эволюции последних. На основании имеющихся на сегодняшний день сведений невозможно предположить, от какой именно группы животных человек приобрёл HDV. ДВ до сих пор не обнаружены у приматов (*Primates*), в т.ч. у человекообразных (*Hominioidea s. Anthropomorpha*), что указывает на вероятность возникновения HDV в результате смены хозяина [25]. Наиболее эволюционно близкими человеческому HDV из известных в настоящее время являются ДВ оленя, сурка и летучей мыши вампира (*Desmodus rotundus*) [26], однако нельзя исключить возможность возникновения данного вируса при заражении человека неизвестными ДВ млекопитающих, филогенетически расположенными между этими вирусными линиями.

#### Заключение

Таким образом, открытие ДВ животных позволило определить место HDV среди РНК-содержащих вирусов и предположить, что этот уникальный ми-

кроорганизм был приобретён человеком в результате межвидового перехода. Вместе с тем понимание возникновения и эволюции HDV до настоящего времени крайне ограничено. Очевидно, открытие значительного числа новых ДВ позволит получить дополнительные знания об эволюционной биологии этой таксономической группы.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Rizzetto M., Canese M.G., Aricò S., Crivelli O., Trepo C., Bonino F., et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977; 18(12): 997–1003. <https://doi.org/10.1136/gut.18.12.997>
- Lok A.S., Negro F., Asselah T., Farci P., Rizzetto M. Endpoints and new options for treatment of chronic hepatitis D. *Hepatology*. 2021. <https://doi.org/10.1002/hep.32082>
- Urban S., Neumann-Haefelin C., Lampertico P. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease. *Gut*. 2021; 70(9): 1782–94. <https://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323888>
- Magnius L., Taylor J., Mason W.S., Sureau C., Dény P., Norder H. ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Deltavirus. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(12): 1565–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001150>
- Taylor J., Pelchat M. Origin of hepatitis delta virus. *Future Microbiol.* 2010; 5(3): 393–402. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.15>
- Lasda E., Parker R. Circular RNAs: Diversity of form and function. *RNA*. 2014; 20(12): 1829–42. <https://doi.org/10.1261/rna.047126.114>
- Riccitelli N., Lupták A. HDV family of self-cleaving ribozymes. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2013; 120: 123–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381286-5.00004-4>
- Huang C.R., Lo S.J. Evolution and diversity of the human hepatitis D virus genome. *Adv. Bioinformatics*. 2010; 2010: 323654. <https://doi.org/10.1155/2010/323654>
- Wille M., Netter H.J., Littlejohn M., Yuen L., Shi M., Eden J.S., et al. A divergent hepatitis D-like agent in birds. *Viruses*. 2018; 10(12): 720. <https://doi.org/10.3390/v10120720>
- Brazas R., Ganem D. A cellular homolog of hepatitis delta antigen: Implications for viral replication and evolution. *Science*. 1996; 274(5284): 90–4. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.90>
- Salehi-Ashtiani K., Lupták A., Litovchick A., Szostak J.W. A genome-wide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human *CPEB3* gene. *Science*. 2006; 313(5794): 1788–92. <https://doi.org/10.1126/science.1129308>
- Chang W.S., Pettersson J.H., Le Lay C., Shi M., Lo N., Wille M., et al. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates. *Virus Evol.* 2019; 5(2): vez021. <https://doi.org/10.1093/ve/vez021>
- Hetzl U., Szirovicza L., Smura T., Prähäuser B., Vapalahti O., Kipar A., et al. Identification of a novel deltavirus in *Boa constrictors*. *mBio*. 2019; 10(2): e00014–19. <https://doi.org/10.1128/mbio.00014-19>
- Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 2016; 540(7634): 539–43. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- Shi M., Lin X.D., Chen X., Tian J.H., Chen L.J., Li K., et al. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature*. 2018; 556(7700): 197–202. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0012-7>
- Iwamoto M., Shibata Y., Kawasaki J., Kojima S., Li Y.T., Iwami S., et al. Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution. *Virus Evol.* 2021; 7(1): veab003. <https://doi.org/10.1093/ve/veab003>
- Paraskevopoulou S., Pirzer F., Goldmann N., Schmid J., Corman V.M., Gottula L.T., et al. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(30): 17977–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006750117>
- Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). *Arch. Virol.* 2021; 166(9): 2633–48. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05156-1>
- Szirovicza L., Hetzel U., Kipar A., Martínez-Sobrido L., Vapalahti O., Hepojoki J. Snake deltavirus utilizes envelope proteins of different viruses to generate infectious particles. *mBio*. 2020; 11(2): e03250–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03250-19>
- de la Peña M., Ceprián R., Casey J.L., Cervera A. Hepatitis delta virus-like circular RNAs from diverse metazoans encode conserved hammerhead ribozymes. *Virus Evol.* 2021; 7(1): veab016. <https://doi.org/10.1093/ve/veab016>
- Taylor J.M. Infection by hepatitis delta virus. *Viruses*. 2020; 12(6): 648. <https://doi.org/10.3390/v12060648>
- Lai M.M. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: Surprises from hepatitis delta virus. *J. Virol.* 2005; 79(13): 7951–8. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.7951-7958.2005>
- Fiedler M., Roggendorf M. Vaccination against Hepatitis Delta Virus Infection: Studies in the Woodchuck (*Marmota monax*) Model. *Intervirology*. 2001; 44(2-3): 154–61. <https://doi.org/10.1159/000050042>
- Perez-Vargas J., Amirache F., Boson B., Mialon C., Freitas N., Sureau C., et al. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo. *Nat. Commun.* 2019; 10(1): 2098. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10117-z>
- Netter H.J., Barrios M.H., Littlejohn M., Yuen L.K.W. Hepatitis Delta Virus (HDV) and delta-like agents: Insights into their origin. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 652962. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.652962>
- Bergner L.M., Orton R.J., Broos A., Tello C., Becker D.J., Carreira J.E., et al. Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021; 118(3): e2019907118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019907118>

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

### НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-74>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



# Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к некоторым арбовирусам

Найденова Е.В.<sup>1</sup>, Карташов М.Ю.<sup>2</sup>, Захаров К.С.<sup>1</sup>, Шевцова А.П.<sup>1</sup>, Диалло М.Г.<sup>3</sup>, Нурдин И.<sup>4</sup>, Ба М.Б.<sup>4</sup>, Бумбали С.<sup>4</sup>, Щербакова С.А.<sup>1</sup>, Кутырев В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, Саратов, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, Кольцово, Россия;

<sup>3</sup>Региональный Университет Киндиа, Киндиа, Гвинейская Республика;

<sup>4</sup>Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндиа, Гвинейская Республика

---

**Введение.** Ежегодно в странах Западной Африки от острых лихорадочных заболеваний погибают свыше 250 тыс. человек. Большую часть в общей структуре регистрируемых лихорадок традиционно занимают малярия и брюшной тиф. Однако эти сведения не в полной мере отражают реальные данные обо всей конъюнктуре заболеваемости в западноафриканском регионе. Это связано с тем, что в качестве критериев постановки диагноза используются только клинические признаки инфекционного процесса, и не исключена вероятность того, что некоторое количество заболеваний может быть вызвано арбовирусами. Выявление специфических антител (АТ) к возбудителям инфекционных болезней в сыворотках крови жителей той или иной местности является достоверным показателем циркуляции этих патогенов на определённой территории.

**Цель работы** – определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики (Гвинеи) к ряду арбовирусов: денге (DENV), Западного Нила (WNV, ВЗН) (семейство *Flaviviridae*); Крымской-Конго геморрагической лихорадки (СCHFV, ККГЛ), Батаи (Batai virus), Бханджа (BHAV) (порядок *Bunyavirales*); чикунгунья (CHIKV) и Синдбис (SINV) (семейство *Togaviridae*).

**Материал и методы.** Для работы собрана панель из 2620 образцов сывороток крови людей, проживающих во всех ландшафтно-географических зонах Гвинеи. Выявление АТ класса IgG проводилось с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

**Результаты.** Всего за период исследования АТ к вирусу Батаи выявлены в 144 (5,5%) образцах; Бханджа – в 58 (2,2%); ВЗН – в 892 (34,0%); денге – в 659 (25,2%); ККГЛ – в 58 (2,2%); чикунгунья – в 339 (12,9%) и Синдбис – в 52 образцах (2,0%).

**Обсуждение.** Полученные результаты указывают на наличие иммунной прослойки населения всех ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики к данному спектру арбовирусов, что является подтверждением их активной циркуляции на этой территории.

**Заключение.** С учётом эпидемиологической значимости арбовирусных инфекций сохраняется актуальность дальнейшего изучения вопроса о доле инфекционных агентов этой экологической группы в общей структуре лихорадочных заболеваний, зарегистрированных на территории Гвинеи.

**Ключевые слова:** арбовирусы, Гвинейская Республика, иммунная прослойка, иммуноглобулины класса IgG, иммуноферментный анализ

**Для цитирования:** Найденова Е.В., Карташов М.Ю., Захаров К.С., Шевцова А.П., Диалло М.Г., Нурдин И., Ба М.Б., Бумбали С., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к некоторым арбовирусам. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 346-353. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-74>

**Для корреспонденции:** Найденова Екатерина Владимировна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусологии отдела диагностики инфекционных болезней, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, Саратов, Россия. E-mail: [katim2003@mail.ru](mailto:katim2003@mail.ru)

**Участие авторов:** Найденова Е.В. – планирование, организация и проведение исследований, анализ литературных данных, оформление результатов, написание текста статьи; Карташов М.Ю. – проведение исследований, статистическая обработка данных; Захаров К.С. – проведение исследований, оформление результатов, подготовка иллюстраций; Шевцова А.П. – проведение исследований; Диалло М.Г. – сбор и доставка проб биологического материала; Нурдин И. – сбор и доставка проб биологического материала, проведение исследований; Ба М.Б. –

сбор и доставка проб биологического материала; Бумбали С. – организация, сбор и доставка проб биологического материала; Щербакова С.А. – руководство исследованиями; Кутырев В.В. – общее руководство.

**Финансирование.** Исследования проводились в рамках распоряжений Правительства Российской Федерации N 1448-р от 25.07.2015, N 2904-р от 22.12.2017 и N 2985-р от 14.11.2020 г. о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

**Благодарность.** Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе образцов биологического материала руководству и сотрудникам региональных госпиталей городов Конакри (Cоnаkrу), Боке (Вокé), Боффа (Вoffа), Коя (Соуаh), Маму (Мамоu), Киндиа (Kindia), Лабе (Labé), Нзерекоре (Nzérékoré), Канкан (Kankan), Дабола (Dabola), Далаба (Dalaba), Фарана (Faranah) (Гвинейская Республика).

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

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением Национального этического комитета Министерства Здравоохранения Гвинейской Республики (Протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015 г.).

Поступила 29.06.2021  
Принята в печать 07.10.2021  
Опубликована 31.10.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-74>

## Study of the prevalence of antibodies to some arboviruses in the population of the Republic of Guinea

Ekaterina V. Naidenova<sup>1</sup>, Mikhail Yu. Kartashov<sup>2</sup>, Kirill S. Zakharov<sup>1</sup>, Anastasiia P. Shevtsova<sup>1</sup>, Mamadou G. Diallo<sup>3</sup>, Ibrahim Nouridine<sup>4</sup>, Mamadou B. Bah<sup>4</sup>, Sanaba Boumbaly<sup>4</sup>, Svetlana A. Shcherbakova<sup>1</sup>, Vladimir V. Kutyrev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSHI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 410005, Saratov, Russia;

<sup>2</sup>FSBI State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 630559, Novosibirsk Region, Kol'tsovo, Russia;

<sup>3</sup>Regional University of Kindia, Kindia, Republic of Guinea;

<sup>4</sup>Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

**Introduction.** Acute febrile diseases kill more than 250,000 people annually in West Africa. Malaria and typhoid fever traditionally occupy most of the total structure of registered fevers. However, these data do not fully reflect the true overall disease patterns in the West African region. This is due to the fact that diagnosis is mainly based on the clinical signs of the infectious process, suggesting that a certain number of diseases may be caused by arboviruses. The detection of specific antibodies (ABs) to infectious pathogens in the blood sera of residents of a particular area is a reliable indicator of the circulation of these pathogens in a particular territory.

The **aim** of this study was to determine the prevalence of antibodies to a number of arboviruses: Dengue (DENV), West Nile (WNV) (family *Flaviviridae*), Crimean-Congo hemorrhagic fever (orthonairo)virus (CCHFV), Batai (Batai virus), Bhanja (BHAV) (order *Bunyavirales*), Chikungunya (CHIKV), and Sindbis (SINV) (family *Togaviridae*) in the population of the Republic of Guinea.

**Material and methods.** In total, a panel of 2,620 blood serum samples from people living in all landscape and geographical areas of Guinea was collected for the study. Detection of IgG antibodies was performed using an enzyme-linked immunoassay (ELISA).

**Results.** In total, ABs to Batai virus were detected in 144 samples (5.5%), BHAV in 58 (2.2%), WNV in 892 (34.0 %), DENV in 659 (25.2 %), CCHFV in 58 (2.2 %), CHIKV in 339 (12.9 %), and SINV in 52 samples (2.0 %).

**Discussion.** The obtained results indicate serological evidence of the spectrum of arboviruses in the population of all landscape and geographical zones of the Republic of Guinea, confirming their active circulation in this territory.

**Conclusion.** Given the high epidemiological significance of arbovirus infectious diseases, it is an urgent task to continue studying its share in the structure of febrile diseases in the territory of the Republic of Guinea.

**Key words:** arboviruses, Republic of Guinea, antibody prevalence, IgG immunoglobulins, enzyme-linked immunosorbent assay

**For citation:** Naidenova E.V., Kartashov M.Yu., Zakharov K.S., Shevtsova A.P., Diallo M.G., Nouridine I., Bah M.B., Boumbaly S., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. Study of the prevalence of antibodies to some arboviruses in the population of the Republic of Guinea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 346-353.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-74>

**For correspondence:** Ekaterina V. Naidenova, Ph.D. (Biol.), Lead Researcher of the Virology Laboratory of the Infectious Diseases Diagnostic Department, FSHI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 410005, Saratov, Russia. E-mail: [katim2003@mail.ru](mailto:katim2003@mail.ru)

**Information about the authors:**

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Zakharov K.S., <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Shevtsova A.P., <https://orcid.org/0000-0001-9600-3801>

Diallo M.G., <https://orcid.org/0000-0003-4507-4575>

Nouridine I., <https://orcid.org/0000-0002-2970-9676>

Bah M.B., <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>

Boumbaly S., <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Shcherbakova S.A., <https://orcid.org/0000-0003-1143-4069>

Kutyrev V.V., <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

**Contribution:** Naidenova E.V. – planning, organization and conducting of research, analysis of literary data, registration of results, writing of the text of the article; Kartashov M.Yu. – conducting research, statistical data processing; Zakharov K.S. – conducting research, registration of results, preparation of illustrations; Shevtsova A.P. – conducting research; Diallo M.G. – collection and delivery of the biological material samples; Nouridine I. – collection and delivery of the biological material samples, conducting research; Bah M.B. – collection and delivery of the biological material samples; Boumbaly S. – organization, collection and delivery of the biological material samples; Shcherbakova S.A. – research management; Kutyrev V.V. – general guidance.

**Funding.** The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation Nos. 1448-r of July 25, 2015, 2904-r of December 22, 2017, and 2985-r of November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

**Acknowledgement.** The authors' team is grateful for the help in collecting samples of biological material to the management and employees of the regional hospitals of the cities of Conakry, Boké, Boffa, Coyah, Mamou, Kindia, Labé, Nzérékoré, Kankan, Dabola, Dalaba, Faranah (Republic of Guinea).

**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 National Ethics Committee Ministry of Health of the Republic of Guinea (Approval No. 129/CNERS/16 dated August 31, 2015).

Received 29 June 2021

Accepted 07 October 2021

Published 31 October 2021

## Введение

Согласно официальным данным, представленным Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), в странах Западной Африки от острых лихорадочных заболеваний каждый год погибают более 250 тыс. человек [1]. При этом основную долю в общей структуре нозологий регистрируемых лихорадок традиционно занимают малярия и брюшной тиф. Однако указанные данные не дают полного представления обо всей конъюнктуре заболеваемости в западноафриканском регионе. Это чаще всего связано с тем, что в качестве критериев постановки диагноза используются только клинические признаки инфекционного процесса. Лабораторные исследования при этом либо отсутствуют, либо используются недостаточно [2, 3]. После завершения эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола (*Filoviridae; Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) (БВВЭ), которая охватила территории Гвинейской Республики (Гвинеи), Республики Либерии и Республики Сьерра-Леоне в 2014–2016 гг., уровень лабораторной диагностики инфекционной патологии в данном регионе значительно повысился. В то же время, несмотря на отработанную схему индикации отдельных возбудителей, часто регистрируются случаи заболеваний, этиологический агент которых установить не удаётся. Возможно, это объясняется отсутствием осведомлён-

ности медицинского персонала в отношении других инфекций, а также ограниченным набором диагностических препаратов. При этом не исключена вероятность того, что определённое количество лихорадочных заболеваний может быть вызвано арбовирусами, которые нередко даже не рассматриваются в качестве возможного инфекционного агента [4]. В связи с этими причинами научные данные о распространении вирусов данной экологической группы в Западной Африке, а также достоверные и актуальные сведения по заболеваемости арбовирусными инфекционными болезнями среди населения этого региона в настоящее время отсутствуют.

Государство Гвинея находится в западной части Африканского континента. Население страны по данным на август 2021 г. составляет около 14 млн человек и очень разнообразно по этническому составу [5]. Территорию государства условно разделяют на 4 ландшафтно-географические зоны (рис. 1). Нижняя, или Приморская Гвинея, расположенная на побережье Атлантического океана, представляет собой плоскую низменность с высотами <150 м над уровнем моря. Через другую зону – Среднюю Гвинею – проходит большой песчаниковый массив Фута-Джаллон с пиками, достигающими 1400 м. Это природное образование пересекает страну с севера на юг. В дан-

ном регионе преобладают ландшафты саванн, встречаются горные луга. К востоку от Фута-Джаллон, на равнинах бассейна верхнего течения р. Нигер, находится Верхняя Гвинея – район африканской саванны. В Лесной Гвинее, располагающейся на юго-востоке страны, большинство ландшафтов также составляют саванны, но в долинах рек сохранились и участки тропического леса. Для Гвинеи характерна чётко выраженная сезонность климата. Влажный сезон длится с июня по октябрь (на побережье несколько дольше, чем в глубине страны), сухой – с ноября по май. Влажность воздуха зависит от местности. Так, на побережье, в районе г. Конакри, среднегодовое количество осадков достигает 4300 мм, при этом в регионах внутри страны выпадает в среднем 1300 мм в год. Среднемесячные температуры на большей части территории составляют от 18 до 28 °C [6].

На территории Гвинейской Республики в 70-е – 80-е гг. прошлого столетия на базе советско-гвинейской научно-исследовательской вирусологической и микробиологической лаборатории была начата работа по изучению распространения арбовирусов. Выявлена циркуляция вирусов денге (DENV),

жёлтой лихорадки (YFV), Западного Нила (WNV, ВЗН), Зика (ZIKV) (семейство *Flaviviridae*); Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ССНФV, ККГЛ) (семейство *Nairoviridae*); лихорадки долины Рифт (Рифт-Валли) (RVFV), Батаи (Batai virus) (семейство *Peribunyaviridae*, порядок *Bunyavirales*); чикунгунья (CHIKV) (семейство *Togaviridae*) и других вирусных агентов, которые способны вызывать лихорадочные заболевания и гибель людей [7]. Маркёры арбовирусов также обнаружены в биоматериалах от носителей и переносчиков, отловленных в разных географических зонах Гвинеи [7, 8]. Однако в связи с тяжёлой экономической ситуацией, складывавшейся в стране в последние десятилетия, работа по изучению циркуляции возбудителей арбовирусных инфекций на её территории была прервана более чем на 30 лет. В настоящее время исследования в этом направлении возобновлены.

Одним из основных показателей циркуляции арбовирусов в определённом регионе и наличия природных очагов арбовирусных инфекционных болезней является выявление специфических антител (АТ) к возбудителю в сыворотках крови людей, прожива-

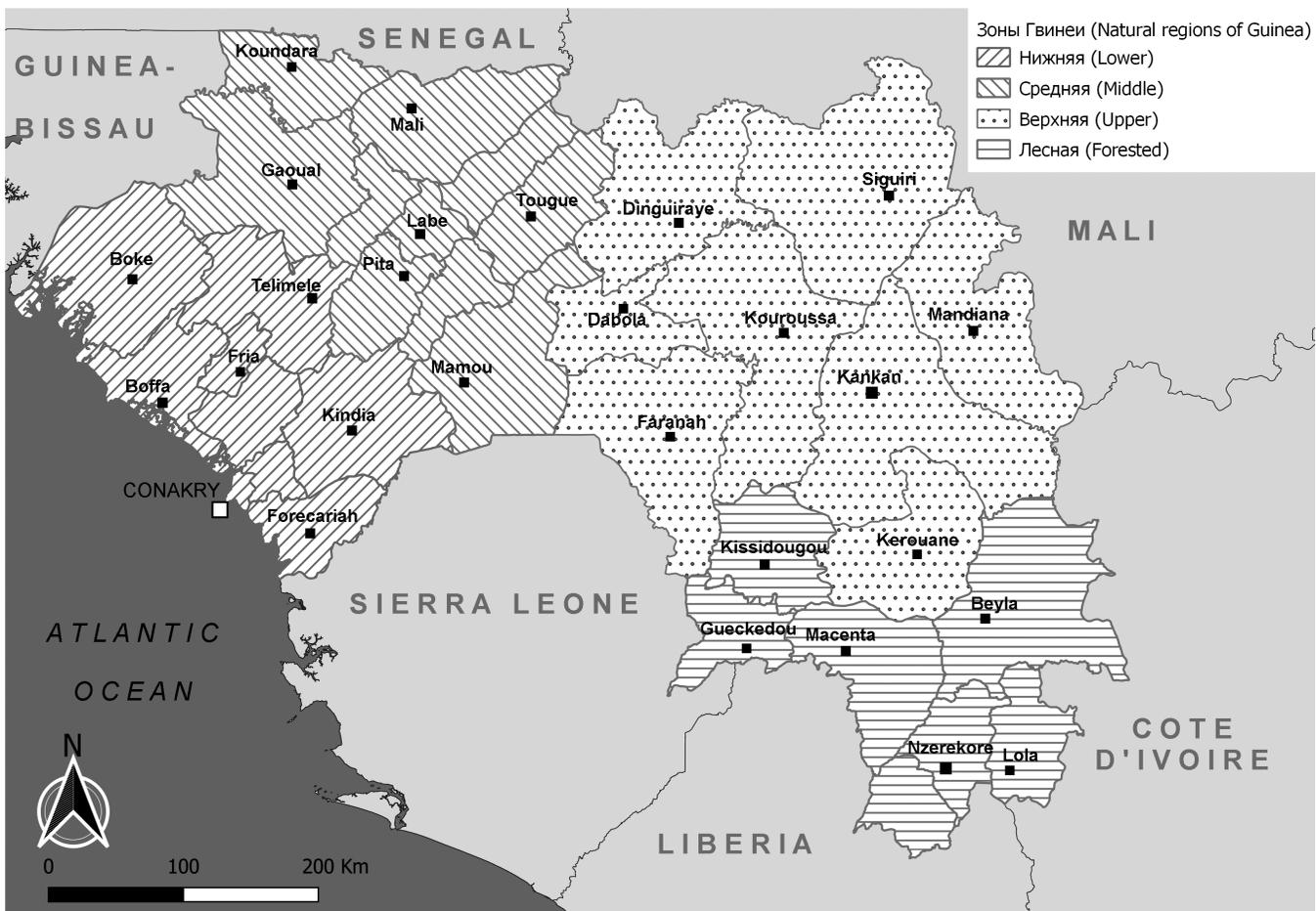


Рис. 1. Ландшафтно-географические зоны Гвинеи.  
 Fig. 1. Landscape and geographical zones of Guinea.

ющих в данной местности [9]. В предыдущих исследованиях проведена работа по определению уровня иммунной прослойки к арбовирусам населения провинции Киндиа (Гвинейская Республика). В результате получены данные, указывающие на достаточно высокий уровень содержания специфических АТ к ВЗН, вирусам денге, ККГЛ и чикунгунья [10, 11]. В последующем исследования осуществляли уже на всей территории Гвинеи, а спектр изучаемых арбовирусов был расширен.

Таким образом, целью настоящей работы было определение уровней иммунной прослойки населения различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики к ряду арбовирусов: денге, Западного Нила (сем. *Flaviviridae*), ККГЛ (сем. *Nairoviridae*), Багаи (сем. *Peribunyaviridae*), Бханджа (семейство *Phenuiviridae*), Чикунгунья и Синдбис (семейство *Togaviridae*) методом иммуноферментного анализа (ИФА).

### Материал и методы

Исследования осуществлялись российскими и гвинейскими специалистами на базе Российско-гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, который открыт в 2017 г. и расположен на территории Исследовательского института прикладной биологии в г. Киндиа, Гвинейская Республика [12].

Сыворотки крови практически здоровых людей были собраны в региональных госпиталях гвинейскими специалистами и доставлены в лабораторию с соблюдением правил биологической безопасности и температурного режима. Сбор материала проводили по предварительной договорённости после подписания соответствующих документов.

В связи с тем, что на территории Гвинеи в 2014–2016 гг. отмечалась эпидемия БВВЭ, а также с целью обеспечения биобезопасности при проведении научных исследований полученные образцы крови протестировали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора реагентов «АмплиСенс EBOV Zaire-FL» (ООО «Интерлаб-сервис», Россия). Во всех случаях РНК вируса Эбола не обнаружена. Материал исследовали также методом иммунохроматографического анализа (ИХА) для выявления антигенов малярийных плазмодиев (*Plasmodium malariae*, *Pl. vivax*, *Pl. falciparum*, *Pl. ovale*) с наборами реагентов SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan (Standart Diagnostics, Inc., Южная Корея). Образцы, в которых присутствовали антигены возбудителей малярии, в последующую работу не вошли.

Таким образом, для исследования была составлена панель из 2620 сывороток крови людей, проживающих во всех 4 ландшафтно-географических зонах Гвинеи. В протокол включили представителей возрастных групп от 1 до 90 лет: 1224 (46,7%) женщин и 1396 (53,3%) мужчин.

Полученные сыворотки изучали методом ИФА с целью выявления специфических АТ класса IgG к вирусам денге, ВЗН, ККГЛ, Багаи, Бханджа, Синдбис и чикунгунья. Образцы тестировали с применением комплектов реагентов производства ЗАО БТК «Био-

сервис» (Россия) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к препаратам. Для исключения наличия острой стадии заболевания и вероятности получения неспецифических результатов все сыворотки дополнительно исследовали методом ИФА на наличие иммуноглобулинов класса IgM ко всем перечисленным выше вирусам с использованием наборов того же производителя. Образцы, в которых выявляли одновременно АТ класса IgG к 3 и более возбудителям, в дальнейшем исследование не включали. В связи с большим количеством положительных образцов и возможностью перекрёстных реакций все пробы, в которых обнаруживали специфические АТ к ВЗН и вирусам денге, дополнительно протестировали с наборами реагентов «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» и «Anti-Dengue Virus ELISA (IgG)» (Euroimmun, Германия). Во всех случаях результаты совпали с полученными ранее. Из указанного перечня диагностических препаратов регистрационные удостоверения оформлены для наборов «БиоСкрин-ВЗН (IgM)», «БиоСкрин-ВЗН (IgG)» (№ ФСР 2012/13840), выпускаемые ЗАО «Биосервис» и «Anti-West Nile Virus ELISA (IgG)» «Anti-Dengue Virus ELISA (IgG)» (ФСЗ 2010/07294), производства «Euroimmun» (Германия), остальные предназначены для научных исследований.

При проведении статистической обработки результатов рассчитывали долю положительных ответов в каждой выборке и 95% доверительные интервалы (ДИ) для долей иммунной прослойки по методу Уилсона [13]. Статистически значимые различия уровня иммунной прослойки жителей Лесной Гвинеи со средним показателем по стране оценивали с использованием критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ ). Наличие или отсутствие статистически значимых различий выявляли путём сопоставления величин ДИ.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением Национального этического комитета Министерства Здравоохранения Гвинейской Республики (Протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015 г.).

### Результаты

При исследовании 2620 образцов сывороток крови людей АТ класса IgG к арбовирусам обнаружены в 1595 (60,9% от общего количества) случаях, что не исключает факт заражения и свидетельствует о контакте обследованных лиц с возбудителями. Положительные пробы получены во всех возрастных группах, при этом чёткой зависимости уровня иммунной прослойки от гендерной принадлежности не наблюдалось. Данные по выявлению АТ к различным арбовирусам представлены в **таблице**.

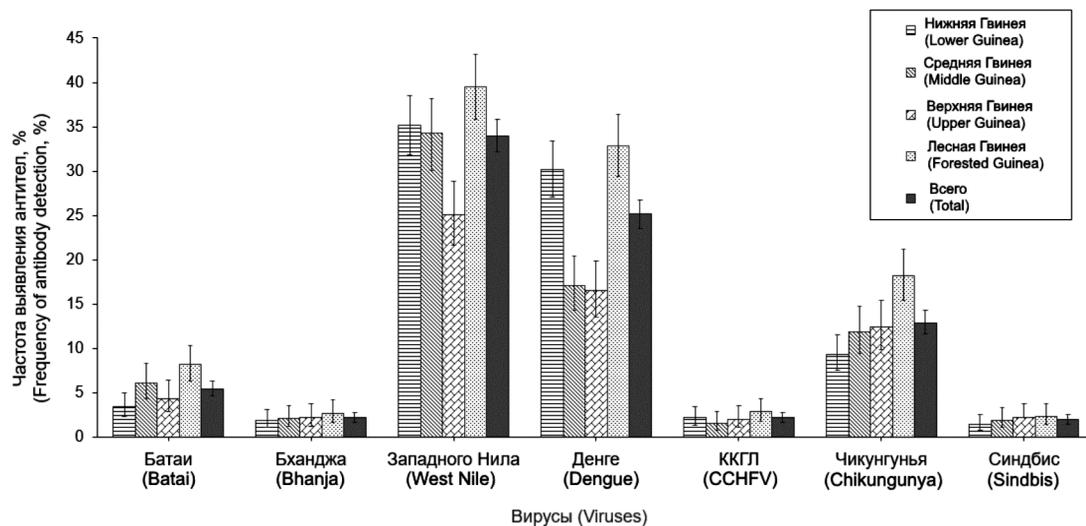
Следует обратить внимание на то, что чаще всего исследуемые сыворотки содержали специфические АТ к 3 возбудителям (34,0% к ВЗН, 25,2% к вирусам денге и 12,9% – к вирусу чикунгунья) (**рис. 2**).

### Обсуждение

На территории Гвинеи один из самых высоких уровней иммунной прослойки населения зарегистриро-

вался в отношении ВЗН (34,0% всех исследованных сывороток). Такая частая встречаемость АТ к данному возбудителю статистически значима по сравнению с тем же показателем для иммуноглобулинов класса IgG к другим арбовирусам, что подтверждается отсутствием трансгрессии ДИ (таблица).

Обращает на себя внимание тот факт, что АТ класса IgG к ВЗН в районе Лесной Гвинеи встречались значительно чаще (в 39,5%), чем на территории всей страны. Отсутствие трансгрессии ДИ также свидетельствует о статистической достоверности наблюдаемых различий. В то же время среди жителей Верхней Гвинеи АТ



**Рис. 2.** Распределение специфических антител к арбовирусам в разных ландшафтно-географических зонах Гвинеи. **Fig. 2.** Distribution of detection rates of specific antibodies to arboviruses in different landscape and geographical zones of the Republic of Guinea.

**Результаты выявления антител к арбовирусам в различных ландшафтно-географических зонах Гвинеи**  
**Results of detection of antibodies to arboviruses in various landscape and geographical zones of the Republic of Guinea**

Ландшафтно-географические зоны Landscape and geographical zones	Общее количество исследованных образцов, n Total number of tested samples, n	Вирусы Viruses						
		Результаты выявления антител класса IgG: количество положительных проб, n; доля положительных проб, %; ДИ						
		Results of detection of IgG antibodies: number of positive samples, n; proportion of positive samples, %; CI						
		Батаи Batai	Бханджа Bhanja	Западного Нила West Nile	Денге Dengue	ВККГЛ CCHFV	Чикунгунья Chikungunya	Синдбис Sindbis
Нижняя Гвинея Lower Guinea	799	28 3,5 2,4–5,0	15 1,9 1,1–3,1	281 35,2 31,9–38,5	241 30,2 27,1–33,4	18 2,3 1,4–3,5	75 9,4 7,6–11,6	12 1,5 0,8–2,6
Средняя Гвинея Middle Guinea	578	35 6,1 4,4–8,3	12 2,1 1,2–3,6	198 34,3 30,1–38,2	99 17,1 14,3–20,4	9 1,6 0,8–2,9	69 11,9 9,5–14,8	11 1,9 1,1–3,4
Верхняя Гвинея Upper Guinea	545	24 4,4 2,9–6,5	12 2,2 1,3–3,8	137 25,1 21,7–28,9	90 16,5 13,6–19,9	11 2,0 1,1–3,6	68 12,5 9,9–15,5	12 2,2 1,3–3,8
Лесная Гвинея Forest Guinea	698	57 8,2 6,4–10,4	19 2,7 1,7–4,2	276 39,5 35,9–43,2	229 32,8 29,4–36,4	20 2,9 1,8–4,4	127 18,2 15,5–21,2	17 2,4 1,5–3,8
Итого по всей стране Total across the country	2620	144 5,5 4,7–6,4	58 2,2 1,7–2,8	892 34,0 32,2–35,9	659 25,2 23,5–26,8	58 2,2 1,7–2,8	339 12,9 11,7–14,3	52 2,0 1,5–2,6

**Примечание.** ВККГЛ – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки; ДИ – доверительный интервал.

**Note.** CCHFV, Crimean-Congo hemorrhagic fever (orthonairo)virus; CI is the confidence interval.

к этой инфекции обнаруживались значительно реже, чем в целом по стране (25,1%).

Одно из ведущих мест по уровню иммунной прослойки населения к арбовирусам занимают вирусы денге. Из **таблицы** видно, что частота выявления специфических АТ к ним составляет 25,2% от общего количества сывороток. В этом случае наибольшая доля полученных положительных результатов также отмечалась в образцах, собранных на территории Лесной Гвинеи (32,8% случаев). Наименьшее же число проб, содержащих АТ к вирусам денге, зарегистрировано в Верхней Гвинеи (16,5%). Как и в случае ВЗН, выявлены статистически значимые различия в уровнях иммунной прослойки к этому возбудителю у населения Лесной Гвинеи (достоверно выше) и Верхней Гвинеи (достоверно ниже, чем в среднем по стране).

Достаточно высокий уровень иммунной прослойки населения страны выявлен и к вирусу чикунгунья (12,9% от общего количества проб). В этой связи следует отметить, что наибольшее количество положительных результатов (18,2%) зафиксировано в сыворотках лиц, проживающих в Лесной Гвинеи (значимо выше, чем среднестатистический показатель по стране), а наименьшее – в Нижней (9,4%).

Относительно изучения распространённости АТ к вирусу Батаи (5,5% от общего количества проб) показано, что процент их выявления на территории Лесной Гвинеи существенно выше, чем в других регионах, и составляет 8,2%. В сравнении с другими территориями отличия статистически достоверны, поскольку трансгрессия ДИ также не наблюдается.

При изучении уровней гуморального иммунитета к остальным арбовирусам в целом по стране получены следующие данные: иммуноглобулины класса IgG к вирусам ККГЛ и Бханджа содержали по 2,2 % исследованных образцов, а к вирусу Синдбис – 2,0%. Несмотря на то что всех случаях наибольшее количество позитивных проб также выявлено в сыворотках крови жителей Лесной Гвинеи (что свидетельствует о наибольшей вероятности встречи людей с возбудителями), наличие трансгрессии ДИ показателей встречаемости АТ не позволяет говорить о статистически достоверных различиях.

### Заключение

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о распространении широкого спектра арбовирусов на всей территории Гвинейской Республики. Следует отметить, что наиболее активная циркуляция возбудителей арбовирусных инфекций регистрируется в Лесной Гвинеи, где уровни специфических АТ класса IgG к ВЗН, вирусам денге, Батаи и чикунгунья достоверно выше среднестатистических значений по стране, а самая низкая – в Верхней Гвинеи. Этот факт можно объяснить различием климатических условий, доли населения и видового состава носителей и переносчиков в указанных регионах.

Учитывая большую эпидемическую значимость вызываемых арбовирусами инфекций, актуальной задачей остаётся дальнейшее изучение вопроса об их

месте в общем количестве лихорадочных заболеваний, зарегистрированных в Гвинеи. Кроме того, необходимо проведение регулярного эпизоотологического мониторинга с целью выявления и определения видов носителей/переносчиков арбовирусов на территории различных ландшафтно-географических зон Гвинейской Республики.

### ЛИТЕРАТУРА

1. ВОЗ. Болезнь, вызванная вирусом Эбола. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/ru/> (accessed October 4, 2021).
2. Park S.E., Pak G.D., Aaby P., Adu-Sarkodie Y., Ali M., Aseffa A., et al. The relationship between invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, other bacterial bloodstream infections, and Malaria in Sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(Suppl. 1): S.23–31. <https://doi.org/10.1093/cid/civ893>
3. Schoepp R.J., Rossi C.A., Khan S.H., Goba A., Fair J.N. Undiagnosed acute viral febrile illnesses, Sierra Leone. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7): 1176–82. <https://doi.org/10.3201/eid2007.131265>
4. Jentes E.S., Robinson J., Johnson B.W., Conde I., Sakouvogui Y., Iverson J., et al. Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(2): 388–94. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0688>
5. Countrymeters. Население Гвинеи. Available at: <https://countrymeters.info/ru/guinea> (accessed October 4, 2021).
6. Черч Гаррисон Р.Д. *Западная Африка. Природная среда и ее хозяйственное использование*. М.: Изд-во иностр. лит.; 1959.
7. Бутенко А.М. Изучение циркуляции арбовирусов в Гвинейской Республике. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 1996; 2: 40–5.
8. Константинов О.К., Диалло С.М., Инапоги А.П., Ба А., Камара С.К. Млекопитающие Гвинеи как резервуары и носители арбовирусов. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2006; (1): 34–9.
9. Титенко А.М. Факторы, способствующие появлению и обнаружению новых вирусных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2004; (1): 51–5.
10. Найденова Е.В., Пьянков С.А., Крицкий А.А., Касьян Ж.А., Раздорский А.С., Лопатин А.А., и др. Выявление специфических антител к арбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих в провинции Киндиа, Гвинейская Республика. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (3): 62–5. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-62-65>
11. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V., et al. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5): 101475. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101475>
12. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломеец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., и др. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015>
13. PEDro. Confidence interval calculator. Available at: <https://pedro.org.au/english/resources/confidence-interval-calculator> (accessed October 4, 2021).

### REFERENCES

1. WHO. Ebola virus disease [VOZ. Bolezn', vyzzvannaya virusom Ebola]. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease> (in Russian) (accessed October 4, 2021).
2. Park S.E., Pak G.D., Aaby P., Adu-Sarkodie Y., Ali M., Aseffa A., et al. The relationship between invasive nontyphoidal *Salmonella* disease, other bacterial bloodstream infections, and Malaria in Sub-Saharan Africa. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(Suppl. 1): S.23–31. <https://doi.org/10.1093/cid/civ893>
3. Schoepp R.J., Rossi C.A., Khan S.H., Goba A., Fair J.N. Undiagnosed acute viral febrile illnesses, Sierra Leone. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7): 1176–82. <https://doi.org/10.3201/eid2007.131265>

4. Jentes E.S., Robinson J., Johnson B.W., Conde I., Sakouvoogui Y., Iverson J., et al. Acute arboviral infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(2): 388–94. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0688>
5. Countrymeters. Guinea Population [Naseleniye Gvinei]. Available at: <https://countrymeters.info/en/Guinea> (in Russian) (accessed October 4, 2021).
6. Church Harrison R.J. *West Africa: A Study of the Environment and of Man's Use of It*. London–New York–Toronto; 1957.
7. Butenko A.M. Studies on arboviruses circulation in the Republic of Guinea [Izuchenie tsirkulyatsii arbovirusov v Gvineyskoy Respublike]. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 1996; 2: 40–5. (in Russian)
8. Konstantinov O.K., Diallo S.M., Inapogi A.P., Ba A., Kamara S.K. The mammals of guinea as reservoirs and earners of arboviruses [Mlekopitayushchie Gvinei kak rezervuary i nositeli arbovirusov]. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*. 2006; (1): 34–9. (in Russian)
9. Titenko A.M. Factors contributing to the appearance and detection of new viral infections [Faktory, sposobstvuyushchie poyavleniyu i obnaruzheniyu novykh virusnykh infektsiy]. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2004; (1): 51–5. (in Russian)
10. Naydenova E.V., P'yankov S.A., Kritsky A.A., Kas'an Zh.A., Razdorsky A.S., Lopatin A.A., et al. Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of Persons Residing in Kindia Province, the Republic of Guinea [Vyavlenie spetsificheskikh antitel k arbovirusam v syvorotkakh krovi lyudey, prozhivayushchikh v provintsii Kindia, Gvineyskaya Respublika]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (3): 62–5. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-3-62-65> (in Russian)
11. Naidenova E.V., Zakharov K.S., Agafonov D.A., Senichkina A.M., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V., et al. Prevalence of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in rural areas of Guinea. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020; 11(5): 101475. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101475>
12. Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., et al. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea [Obespechenie biologicheskoy bezopasnosti pri provedenii protivoepidemicheskikh meropriyatiy v period likvidatsii epidemii likhoradki Ebola v Gvineyskoy Respublike]. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie*. 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015> (in Russian)
13. PEDro. Confidence interval calculator. Available at: <https://pedro.org.au/english/resources/confidence-interval-calculator> (accessed October 4, 2021).

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-75>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



## Оптимизация схемы вакцинации собак против бешенства (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) при помощи математической модели

Лобанова В.А.<sup>1,2</sup>, Клюкина В.И.<sup>1</sup><sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», 141142, Московская область, Щёлковский р-н, пос. Биокомбината, Россия;<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Москва, Россия

**Введение.** Большинство случаев бешенства (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) у людей вызвано укусами домашних и диких собак (*Canis lupus familiaris*). В этой связи одной из актуальных задач является организация программ массовой вакцинации этих животных.

**Цель работы** – выявить факторы, влияющие на синтез вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу бешенства у вакцинированных собак, сформировать рекомендации по корректировке схемы вакцинации с использованием методов математического моделирования (ММ).

**Материал и методы.** Разработана двухкомпарментная математическая модель, параметры которой откалиброваны на лог-трансформированных данных о содержании ВНА в сыворотке крови вакцинированных собак с использованием нелинейного моделирования с фиксированными эффектами. Результаты получены методами RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test, анализ быстрого ингибирования фокусов флюоресценции) и FAVN (fluorescent antibody virus-neutralization test, тест нейтрализации вируса флюоресцентными антителами).

**Результаты.** Установлено, что при двукратной первичной вакцинации у щенков в возрасте от 3 мес до 1 года формируется более напряжённый иммунный ответ по сравнению с таковым у взрослых особей. При первичной вакцинации и ревакцинации спустя 1 год и более ВНА у взрослых уличных собак синтезируются более интенсивно, чем у домашних.

**Обсуждение.** Менее длительный иммунный ответ у животных, вакцинированных в возрасте до 3 мес, объясняется как наличием колостральных антител, так и активным развитием организма в этот период. Результаты наших исследований и данные работ других авторов подтверждают наличие у большинства собак протективного уровня ВНА к вирусу бешенства  $\geq 0,5$  МЕ/мл на протяжении 2 и более лет после вакцинации. Однако лишь регулярная ежегодная ревакцинация способствует достижению и поддержанию этого показателя у особей, плохо отвечающих на вакцинацию в силу различных факторов.

**Заключение.** Рекомендована следующая схема вакцинации собак против бешенства: первичное введение вакцинного препарата в возрасте от 3 мес до 1 года с 1–2-месячным интервалом, в дальнейшем ежегодная ревакцинация. Настоящая работа демонстрирует возможность более широкого применения методов ММ для решения задач вакцинопрофилактики.

**Ключевые слова:** бешенство, профилактика, вируснейтрализующие антитела, вакцинация, математическое моделирование, нелинейное моделирование

**Для цитирования:** Лобанова В.А., Клюкина В.И. Оптимизация схемы вакцинации собак против бешенства (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) при помощи математической модели. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 354–367. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-75>

**Для корреспонденции:** Лобанова Варвара Андреевна, аспирант отдела иммунологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» (ВНИТИБП), 141142, Московская область, Щёлковский р-н, пос. Биокомбината, Россия; ассистент кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», 127434, Москва, Россия. E-mail: [varvara.ustinova1995@gmail.com](mailto:varvara.ustinova1995@gmail.com)

**Участие авторов:** Лобанова В.А. – концепция и дизайн исследования, сбор и статистическая обработка данных, разработка и калибровка математической модели, построение симуляций, интерпретация результатов, написание текста; Клюкина В.И. – концепция и дизайн исследования, интерпретация результатов, консультативная помощь, редактирование текста, утверждение окончательной версии статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику ООО «M&S Decisions» В.В. Соколову за консультативную помощь в ходе калибровки и валидации математической модели.

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

Поступила 07.08.2021

Принята в печать 07.10.2021

Опубликована 31.10.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-75>

# Optimization of rabies (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) dog vaccination schedule using a mathematical model

Varvava A. Lobanova<sup>1,2</sup>, Valentina I. Klyukina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI «All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry», 141142, Moscow Region, Shchelkovsky district, Biokombinat vill., Russia;

<sup>2</sup>FSBEI HE «Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy», 127434, Moscow, Russia

**Introduction.** Most cases of human rabies are caused by dog (*Canis lupus familiaris*) bites. Therefore, the implementation of vaccination programs of these animals is one of the urgent tasks.

The work aims to identify the factors influencing the production of antirabies virus-neutralizing antibodies (VNAs) in vaccinated dogs, and to formulate recommendations for adjusting the vaccination schedule using mathematical modeling (MM).

**Material and methods.** We used a fixed-effects modeling procedure to estimate the two-compartment model parameters using log-transformed data (obtained by RFFIT, rapid fluorescent focus inhibition test; and FAVN, fluorescent antibody virus-neutralization test) on the VNAs levels in the serum of vaccinated dogs.

**Results.** More vigorous immune response after a two-dose primary vaccination is formed in juvenile dogs at the age of 3 months to 1 year compared to the adult dogs. Following the primary vaccination and revaccination 1 year after, VNAs were produced more intensively in adult stray dogs than in domestic dogs.

**Discussion.** The short-term immune response observed in dogs aged up to 3 months is due to the presence of colostral antibodies and the active growth of the organism at this age. The results of our study confirm that most of the dogs have a level of antirabies VNAs of  $\geq 0.5$  IU/ml up to two or more years following immunization. However, only regular annual revaccination ensures the protective VNAs level in animals that responded poorly to vaccination due to various factors.

**Conclusion.** The following antirabies vaccination schedule is recommended: primary vaccination of the dog at the age of 3 months up to 1 year with 1–2 month intervals, then revaccination annually. This work also demonstrates the possibility of a wider application of MM methods for solving problems of vaccine prevention.

**Keywords:** rabies, prevention and control, virus-neutralizing antibodies, vaccination, mathematical modeling, non-linear modeling

**For citation:** Lobanova V.A., Klyukina V.I. Optimization of rabies (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) dog vaccination schedule using a mathematical model. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 354-367. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-75>

**For correspondence:** Varvara A. Lobanova, Postgraduate Student of the Immunology Department, FSBI «All-Russian Research and Technological Institute of Biological Industry», 141142, Moscow Region, Shchelkovsky district, Biokombinat vill., Russia; Assistant Professor of Biotechnology, FSBEI HE «Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy», 127434, Moscow, Russia. E-mail: varvara.ustinova1995@gmail.com

**Information about the authors:**

Lobanova V.A., <https://orcid.org/0000-0001-9757-784X>

Klyukina V.I., <https://orcid.org/0000-0002-4295-1424>

**Contribution:** Lobanova V.A. – research concept and design, data collection and exploration, mathematical model development and calibration, preparing of the mathematical model simulations, interpretation of research results, writing of the text; Klyukina V.I. – research concept and design, interpretation of research results, consultations, editing of the text, approval of the final version of the article.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Acknowledgement.** The authors express their gratitude to Viktor V. Sokolov, Senior Researcher, «M&S Decisions» LLC, for his advice in the course of data exploration and mathematical model calibration.

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

Received 07 August 2021  
Accepted 07 October 2021  
Published 31 October 2021

## Введение

Бешенство (rabies) – острая особо опасная нейротропная инфекция животных и человека, от которой ежегодно во всём мире умирает около 59 тыс. человек. Половина населения планеты

проживает в эндемичных по этому заболеванию районах, и более 80% смертей происходят в сельской местности, где широко распространено бешенство домашних и диких плотоядных (*Carnivora*), а доступ к медицинскому обслуживанию ограничен или

отсутствует. Подавляющее большинство случаев бешенства людей вызвано укусами домашних и диких собак (*Canis lupus familiaris*), поэтому в настоящее время для борьбы с данной инфекцией в ряде стран организованы кампании массовой вакцинации представителей этого вида [1]. Актуальной задачей является контроль напряженности поствакцинального иммунитета, необходимый при планировании программ антирабической вакцинации. Для оценки уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови животных Международным эпизоотическим бюро (МЭБ; World Organisation for Animal Health, OIE) рекомендованы методы RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test, тест быстрого ингибирования фокусов флуоресценции) и FAVN (fluorescent antibody virus neutralization test, тест нейтрализации вируса флуоресцентными антителами) [2].

Применение методов математического моделирования (ММ) позволяет конкретизировать и количественно охарактеризовать теоретические и практические аспекты различных биологических процессов [3]. ММ представляет собой неотъемлемую составляющую при разработке лекарственных средств [4, 5], изучении иммунологических процессов [6], а также планировании и оценке эффективности программ массовой вакцинации животных [7, 8].

Целью нашей работы было выявить факторы, влияющие на синтез ВНА к вирусу бешенства у вакцинированных собак, а также сформировать рекомендации по корректировке схемы вакцинации животных в зависимости от их физиологического статуса с использованием методов ММ.

### Материал и методы

**Данные о содержании вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотке крови собак.** В ходе разработки математической модели использованы агрегированные литературные данные о концентрациях антирабических ВНА в сыворотке крови вакцинированных собак, полученные методами RFFIT и FAVN в 3 исследованиях на временном интервале до 3 лет после первой вакцинации (всего 14 опытных групп, 180 измерений) (рис. 1, доп. табл. 1\*<sup>1</sup>) [9–11].

Предварительно была проведена работа по тщательному выявлению различий между идентичными группами из разных исследований, обоснованию указанных различий и исключению из датасета аутлайеров (подробности этой части работы в настоящей статье не приводятся). Данные по взрослым домашним собакам с регулярной ежегодной ревакцинацией из исследования R. Pimburage и соавт., 2017 [10] исключены из датасета в связи с существенным несоответствием другим имеющимся результатам. Информация по домашним щенкам в возрасте до 3 мес из исследования R. Wallace и соавт., 2017 [11] не включена в калибровочный датасет в связи с «шумностью» данных. Также были ис-

ключены отдельные значения из групп «домашние щенки 3–4 мес» (3 измерения) и «домашние щенки от 4 мес до 1 года» (1 измерение) исследования R. Wallace и соавт., 2017 [11].

**Разработка и калибровка модели.** Нами разработана, откалибрована и провалидирована двухкомпарментная модель, учитывающая различную интенсивность антителогенеза после первичной вакцинации и ревакцинации животных (рис. 2) [12]. Результаты исследования F. Cliquet и соавт. подтверждают наличие линейной зависимости между результатами RFFIT и FAVN, что позволило соотнести данные, полученные разными методами, непосредственно внутри математической модели [13]. В предлагаемой модели динамика уровня ВНА, вне зависимости от методологии измерения и сроков вакцинации, определяется одними и теми же фитируемыми параметрами: константой абсорбции  $ka$ , отражающей динамику синтеза и накопления ВНА в сыворотке крови собак; константой элиминации  $k_{el}$ , описывающей динамику деградации ВНА, а также константами перетока ВНА из центрального компартамента в периферический ( $k_{12}$ ) и обратно ( $k_{21}$ ).

Определяемые методами RFFIT и FAVN уровни ВНА к вирусу бешенства представлены в виде суммы концентраций ВНА (формула 1), синтезированных в результате первичной вакцинации животных, а также ревакцинации через 1–2 мес и 1 год после первого введения вакцины:

$$VNA_{\log} = \ln(Ac_1 + Ac_2 + Ac_3) \quad (1),$$

где  $VNA_{\log}$  ( $VNA_{RFFIT_{\log}}$  и  $VNA_{FAVN_{\log}}$ ) – уровни ВНА, определяемые методами RFFIT и FAVN соответственно;

$Ac_1$ ,  $Ac_2$  и  $Ac_3$  – концентрации в сыворотке крови ВНА, синтезируемых в результате первичной вакцинации, ревакцинации спустя 1–2 мес и 1 год соответственно.

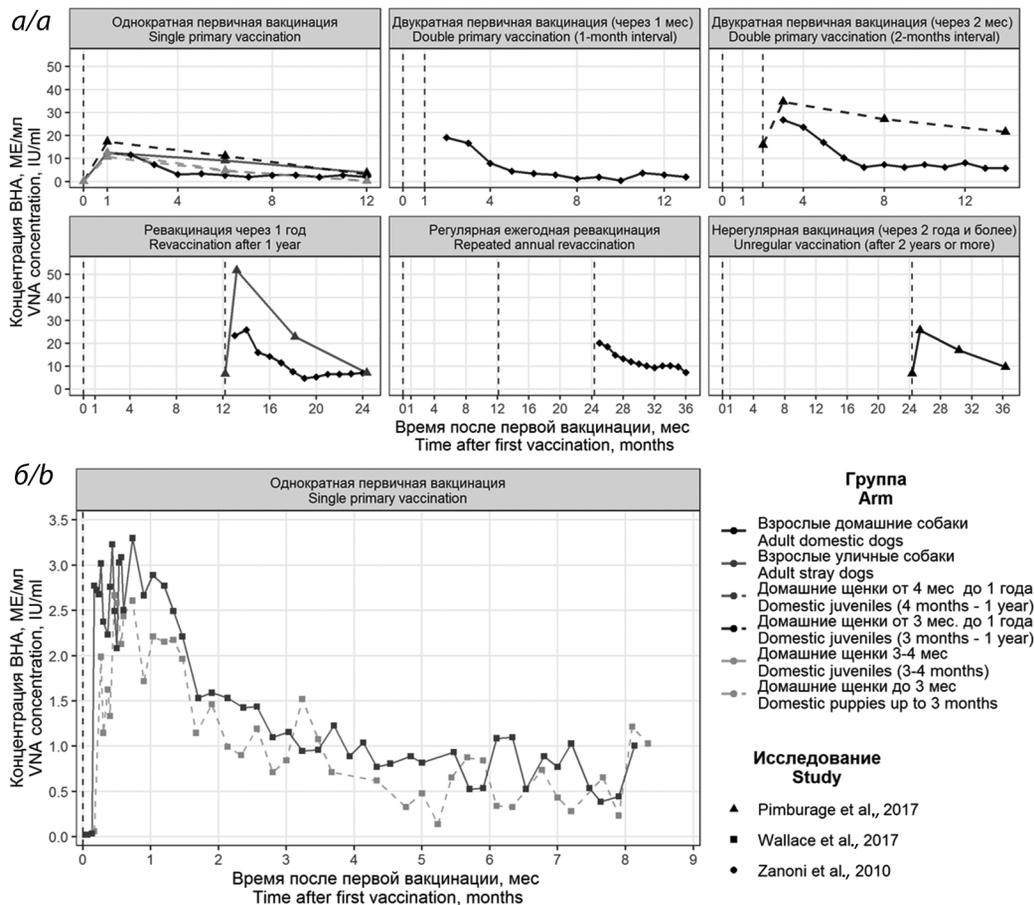
Калибровку модели проводили на лог-трансформированных данных. Лог-трансформация позволяет уменьшить степень вариабельности показателей и приводит их к большему соответствию нормальному распределению. Помимо этого, с её помощью можно лучше учесть нижний диапазон концентраций, что особенно актуально в связи с установленным на данный момент протективным уровнем ВНА 0,5 МЕ/мл. Данные об их концентрациях вводились в модель в абсолютных значениях (МЕ/мл). В качестве оптимальной для лог-трансформированных данных о содержании ВНА в сыворотке крови собак (полученных методами RFFIT и FAVN) определена аддитивная остаточная ошибка (формулы 2 и 3 соответственно):

$$y_1 = VNA_{RFFIT_{\log}} + a_1 \times e \quad (2),$$

$$y_2 = VNA_{FAVN_{\log}} + a_2 \times e \quad (3),$$

где  $y_1$  и  $y_2$  – натуральные логарифмы наблюдаемых значений ВНА, полученных методами RFFIT и FAVN соответственно;  $VNA_{RFFIT_{\log}}$  и  $VNA_{FAVN_{\log}}$  –

\*<sup>1</sup>дополнительные материалы, стр. 7.



**Рис. 1.** Данные о содержании антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови собак, использованные для калибровки математической модели: *a* – полученные методом RFFIT, *б* – полученные методом FAVN.

**Fig. 1.** Data on the antirabies virus-neutralizing antibodies (VNAs) levels in dogs' serum used for mathematical model calibration: *a*), obtained by the RFFIT method; *b*), obtained by the FAVN method.

**Note.** Vertical dashed lines represent vaccination times.

предсказываемые моделью значения;  $a_1$  и  $a_2$  – остаточные ошибки для каждого из способов измерения;  $e = 2,71828$  (основание натурального логарифма).

Различие в полученных методами RFFIT и FAVN концентрациях ВНА описывается параметром условной «биодоступности»  $F$ , распределённым логнормально, что позволяет представить вакцинацию в виде условной дозы размерностью 1. Модель позволяет учитывать разницу в динамике синтеза ВНА при первичной и повторной вакцинации путём введения отдельных фитируемых параметров  $F1$ ,  $F2$ ,  $F3$ . Соотношение между ними для RFFIT и FAVN определяется фитируемым параметром *coef*: значения  $F1_{FAVN}$ ,  $F2_{FAVN}$ ,  $F3_{FAVN}$  получены при делении на значение *coef* параметров  $F1_{RFFIT}$ ,  $F2_{RFFIT}$ ,  $F3_{RFFIT}$  соответственно. Время начала синтеза ВНА после первичного контакта с антигеном выражали параметром  $t_{lag}$ , который, как и параметр  $ka$ , фитировали только на данных, полученных методом FAVN.

При моделировании динамики уровня ВНА важно учитывать начальные значения данного показателя до первичной вакцинации. В связи с отсутствием ин-

формации о содержании ВНА в сыворотке крови собак до вакцинации для каждой группы эти значения фитировались отдельно для методов RFFIT (параметр  $BLr$ ) и FAVN ( $BLf$ ).

Фитируемые параметры для разработанной системы обыкновенных дифференциальных уравнений были откалиброваны на основе полученных методами RFFIT и FAVN данных о содержании ВНА в сыворотке крови вакцинированных животных с использованием нелинейного метода моделирования с фиксированными эффектами (табл. 1). Качество модели оценивалось по следующим критериям: изменение значения целевой функции (логарифм функции правдоподобия; информационный критерий Акаике – Akaike's information criterion, AIC), контроль диагностических графиков (доп. рис. 1\*<sup>2</sup>, 2\*<sup>3</sup>), минимизация относительной стандартной ошибки (relative standard error, RSE), стабильность определения параметров при старте модели с различных начальных значений.

\*<sup>2</sup>дополнительные материалы, стр. 4.

\*<sup>3</sup>дополнительные материалы, стр. 5.

Ковариационный анализ позволил определить влияние различных характеристик популяции животных на динамику образования ВНА. Так, на константу перетока ВНА из центрального компартмента в периферический ( $k_{12}$ ) влияют условия содержания собак (яв-

ляется ли собака домашней или уличной). Для уличных собак параметр  $k_{12}$  определяется через параметр  $\beta_{-k_{12}}$  (уличные собаки) (формула 4):

$$k_{12} \text{ (для уличных собак)} = k_{12} \times e^{\beta_{-k_{12}} \text{ (уличные собаки)}} \quad (4).$$

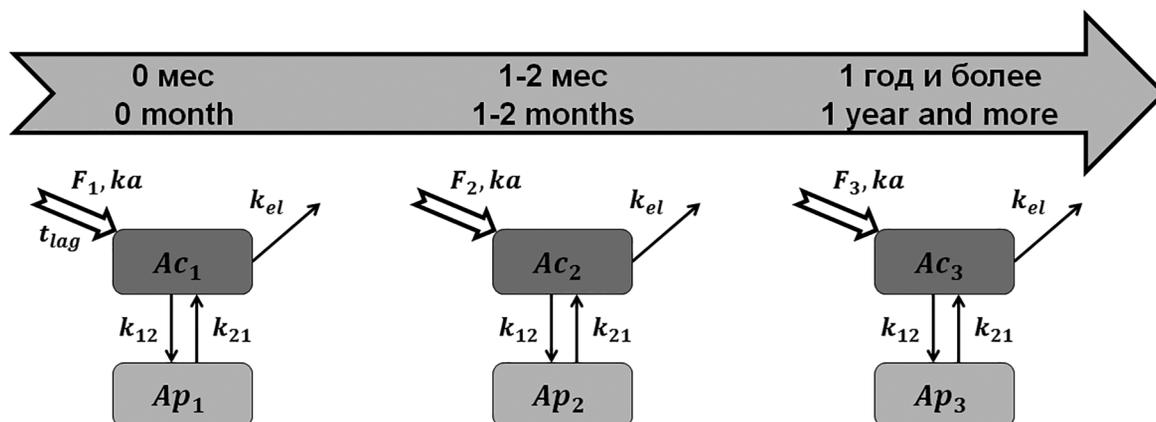


Рис. 2. Структурная математическая модель синтеза вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства после вакцинации собак.

Fig. 2. Structural mathematical model of the synthesis of antirabies virus-neutralizing antibodies after vaccination of dogs.

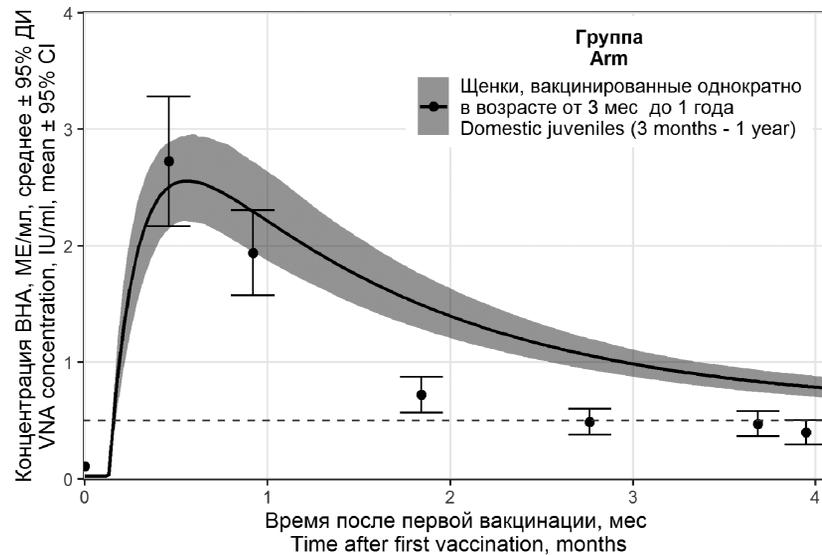
Таблица 1. Параметры разработанной математической модели

Table 1. Parameters of the developed mathematical model

Параметр, единицы измерения Parameter, units	Среднее значение (M) Mean value (M)	Величина RSE (%) RSE value (%)	p-критерий p-value	Дополнительные характеристики и комментарии Additional features and comments
$BLr$ , МЕ/мл $BLr$ , IU/ml	0,1	27,9	–	–
$BLf$ , МЕ/мл $BLf$ , IU/ml	0,0227	30,8	–	–
$F1_{RFFIT}$	281	29,2	–	–
$F2_{RFFIT}$	229	36,6	–	–
$F3_{RFFIT}$	453	31,3	–	–
$coef$	9,82	17,4	–	–
$ka$ , сут <sup>-1</sup> $ka$ , days <sup>-1</sup>	0,0237	26,4	–	Откалиброваны на данных, полученных методом FAVN Fitted using FAVN data
$t_{lag}$ , сут $t_{lag}$ , days	3,98	0,69	–	–
$k_{ep}$ , сут <sup>-1</sup> $k_{ep}$ , days <sup>-1</sup>	0,00095	–	–	Зафиксирован Fixed
$k_{12}$ , сут <sup>-1</sup> $k_{12}$ , days <sup>-1</sup>	0,203	24,9	–	–
$\beta_{-k_{12}}$ (уличные собаки) $\beta_{-k_{12}}$ (stray dogs)	-0,605	39,2	0,011	См. формулу 4 See equation 4
$k_{21}$ , дни <sup>-1</sup> $k_{21}$ , days <sup>-1</sup>	0,00166	16,9	–	–
$\beta_{-k_{21}}$ (щенки 3 мес – 1 год) $\beta_{-k_{21}}$ (juveniles aged 3 months – 1 year)	0,935	21,8	<0,001	См. формулу 5 See equation 5
$\beta_{-k_{21}}$ (щенки до 3 мес) $\beta_{-k_{21}}$ (puppies up to 3 months)	-1,64	28,9	<0,001	См. формулу 6 See equation 6
$a_1$ , МЕ/мл $a_1$ , IU/ml	0,0559	7,54	–	См. формулу 2 See equation 2
$a_2$ , МЕ/мл $a_2$ , IU/ml	0,475	7,37	–	См. формулу 3 See equation 3

Примечание. RSE – относительная стандартная ошибка; «–» – отсутствие данных.

Note. RSE, relative standard error; «–» indicates the absence of data.



**Рис. 3.** Валидация математической модели на данных J. Minke и соавт. [14] (метод определения вируснейтрализующих антител (ВНА) FAVN).

**Примечание.** Точками обозначены данные J. Minke и соавт. [14] (со стандартной ошибкой среднего – standard error of the mean, SEM), линиями – модельные предсказания (с 95% доверительным интервалом, ДИ). Горизонтальная пунктирная линия обозначает протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл.

**Fig. 3.** Validation of the mathematical model using the data from J. Minke et al. [14] (FAVN as a method for virus-neutralizing antibodies (VNAs) detection).

**Note.** The dots represent the data from J. Minke et al. [14] (with the standard error of the mean, SEM), and the lines represent the model predictions (with 95% confidence interval, CI). The horizontal dashed line indicates a protective antibody level of 0.5 IU/ml.

Кроме того, нами выявлено влияние возраста на константу перетока ВНА из периферического компартмента в центральный. Для домашних щенков в возрасте до 3 мес и от 3 мес до 1 года параметр  $k_{21}$  определяется через параметры  $\beta_{k_{21}}$  (щенки до 3 мес) и  $\beta_{k_{21}}$  (щенки 3 мес – 1 год) соответственно (формулы 5 и 6 соответственно):

$$k_{21} \text{ (для щенков до 3 мес)} = k_{21} \times e^{\beta_{k_{21}}} \text{ (щенки до 3 мес)} \quad (5);$$

$$k_{21} \text{ (для щенков 3 мес – 1 год)} = k_{21} \times e^{\beta_{k_{21}}} \text{ (щенки 3 мес – 1 год)} \quad (6).$$

**Программное обеспечение.** Разработку и анализ математической модели проводили с использованием программы Monolix версии 2019R2 (Lixoft, Франция). Подготовку, эксплораторный анализ датасета, а также валидацию модели и построение модельных симуляций выполняли с применением программного обеспечения R версии 3.5.1. На симуляционных графиках и в таблицах с фармакокинетическими параметрами ВНА представлены средние значения ( $M$ ) с 95% доверительными интервалами (ДИ), количество симулируемых популяций  $n = 1000$ . Различия определяли как статистически достоверные при уровне значимости ( $p$ -критерий)  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

**Валидация модели.** Разработанная математическая модель достоверно описывает агрегированные литературные данные содержания антирабических ВНА у вакцинированных собак, полученные методами RF-

FIT и FAVN (доп. рис. 1\*<sup>2</sup> и 2\*<sup>3</sup>). При этом наблюдается перепредсказание моделью концентраций ВНА для показателей, полученных методом RFFIT и превышающих 20 МЕ/мл (доп. рис. 1,  $\alpha^{*2}$  и 1,  $\sigma^{*2}$ ).

Также была проведена внешняя валидация модели на литературных данных, не вошедших в калибровочный датасет [14]. Модель хорошо описывает изменение концентрации ВНА в первый месяц после вакцинации, однако недопредсказывает снижение их уровня через 1 мес после инъекции (рис. 3). Данные в исследовании J. Minke и соавт. были получены на небольшом количестве 3–4-месячных щенков породы бигль, и различия в ответе на вакцинацию между биглями и другими породами собак ранее уже описывались в исследованиях [15]. В связи с отсутствием для собак этой породы данных, полученных методом RFFIT, не представляется возможным установить влияние породной принадлежности на динамику уровня ВНА.

Откалиброванные при помощи модели начальные значения антирабических ВНА в сыворотке крови собак до вакцинации составили 0,1 МЕ/мл для метода RFFIT и 0,0227 МЕ/мл – для метода FAVN, что полностью согласуется с полученными ранее различными авторами сведениями об уровне ВНА до вакцинации ниже порогового протективного значения 0,5 МЕ/мл (табл. 1) [10, 14].

**Различия в содержании вируснейтрализующих антител у домашних собак разных возрастов.** Оценено влияние на уровень ВНА к вирусу бешенства та-

\*<sup>2</sup>дополнительные материалы, стр. 4; \*<sup>3</sup>дополнительные материалы, стр. 5.

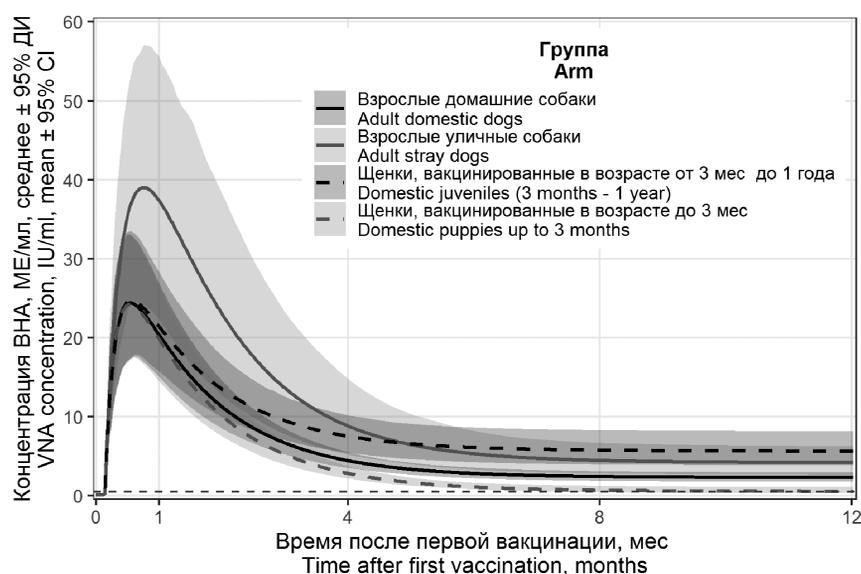
ких параметров, как возраст животных и условия их содержания (является ли собака домашней или уличной). Разработанная модель учитывает также различный эффект первичной вакцинации и последующих ревакцинаций на синтез ВНА.

При однократной вакцинации площади под фармакокинетической кривой «концентрация–время» (area under the curve, AUC) для ВНА, выявляемых в течение 1 года после вакцинации ( $AUC_{365}$ ) у взрослых домашних собак и домашних щенков в возрасте 3 мес – 1 год, оказываются сопоставимыми (табл. 2). Не выявлено также существенных различий в максимальных концентрациях ВНА ( $C_{max}$ ) в сыворотке крови животных данных возрастных групп (табл. 2), однако при симуляции временных профилей содержания ВНА зарегистрированы более высокие значения у щенков спустя 2 мес и более после введения вакцины, что может свидетельствовать о лучшей иммунологической защите на протяжении всего года после проведения вакцинации (рис. 4). При сравнении литературных данных о концентрациях ВНА у собак разных возрастов отмечены более высокие уровни ВНА у домашних щенков от 3 мес до 1 года по сравнению с показателями взрослых домашних собак после двукратной вакцинации с 2-месячным интервалом (рис. 1, а). Различия установлены не только для общего профиля концентрации ВНА в течение 1-годового поствакцинального периода (рис. 5), но и для  $AUC_{365}$  (табл. 2). Подобный феномен может быть обусловлен как разницей в массе животных и, следовательно, в объёме распределения вакцинного препарата и синтезированных впоследствии ВНА, так и неодинаковой сте-

пенью интенсивности иммунного ответа у особей разных возрастов. Отсутствие точной информации о массе и породной принадлежности собак не позволяет включить в модель ковариаты, учитывающие данный аспект развития животных.

Не установлено достоверных различий в содержании ВНА у щенков в возрасте до 3 мес, рождённых от вакцинированных и ранее не вакцинированных собак (рис. 1, а), поэтому в калибровочном датасете эти 2 группы объединены в категорию «домашние щенки до 3 мес». Несформированность иммунной системы у щенков в этом возрасте обуславливает низкую устойчивость во времени гуморального иммунитета к возбудителю бешенства как при однократной, так и при двукратной первичной вакцинации с 1- или 2-месячным интервалом (рис. 4, 5).

**Различия в содержании вируснейтрализующих антител у домашних и уличных собак.** Нас интересовало также, влияют ли условия, в которых проживает животное, на интенсивность иммунного ответа: домашние собаки живут в более благоприятных условиях, чем уличные, которые, однако, лучше приспособлены к различным изменениям окружающей среды и при этом чаще контактируют с антигенами вируса бешенства. Установлено, что при первичной вакцинации (рис. 4; табл. 2), а также при ревакцинации через 1 год и более после первого введения вакцинного препарата у взрослых уличных собак ВНА синтезируются более интенсивно, чем у домашних (рис. 1, а; рис. 6; табл. 3). Это проявляется как в различных максимальных значениях концентраций ВНА ( $C_{max}$ ), так и в неодинаковой площади под



**Рис. 4.** Содержание вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови собак после однократной первичной вакцинации (метод определения антител RFFIT), результаты модельных симуляций.

**Примечание.** Горизонтальная пунктирная линия обозначает протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл; ДИ – доверительный интервал.

**Fig. 4.** Virus-neutralizing antibodies (VNAs) levels in dogs' serum after a single primary vaccination (RFFIT as a method for antibodies detection): the results of model simulations.

**Note.** The horizontal dashed line indicates a protective antibody level of 0.5 IU/ml; CI is the confidence interval.

фармакокинетической кривой для ВНА за второй и третий годы после вакцинации (табл. 3). При этом время достижения максимальных концентраций ВНА ( $T_{max}$ ) в сыворотке крови взрослых уличных собак увеличено на 5–6 сут по сравнению с домашними (табл. 2).

**Оптимизация схемы вакцинации домашних собак.** На основании модельных симуляций уровней ВНА в сыворотке крови домашних собак, вакцинированных против бешенства по различным схемам, установлено, что длительный гуморальный иммунный ответ формируется при ежегодной ревакцинации независимо от того, была ли первая вакцинация одно- или двукратной. В связи с несформированностью иммунной системы у щенков в возрасте до 3 мес и высокой вероятностью наличия у них колостральных антител мы не рекомендуем проводить первую вакцинацию в данном возрас-

те. Несмотря на то что протективный уровень ВНА на протяжении первого года после вакцинации достигается уже при первичном введении вакцинного препарата как взрослым особям, так и щенкам в возрасте 3 мес – 1 год, это не исключает возможности слабого гуморального ответа на первую вакцинацию у отдельных животных. В этой связи можно рекомендовать двукратную вакцинацию собак в возрасте от 3 мес с введением второй дозы спустя 1–2 мес после первой. При этом проведение первичной вакцинации в возрасте от 3 мес до 1 года позволяет обеспечить более высокие концентрации ВНА в первый год после вакцинации и, следовательно, снизить риск заражения животного при контакте с возбудителем бешенства в данный период. Таким образом, мы рекомендуем следующую общую схему вакцинации: первую и вторую вакцинацию проводить в возрасте от 3 мес до 1 года с 1–2-месячным

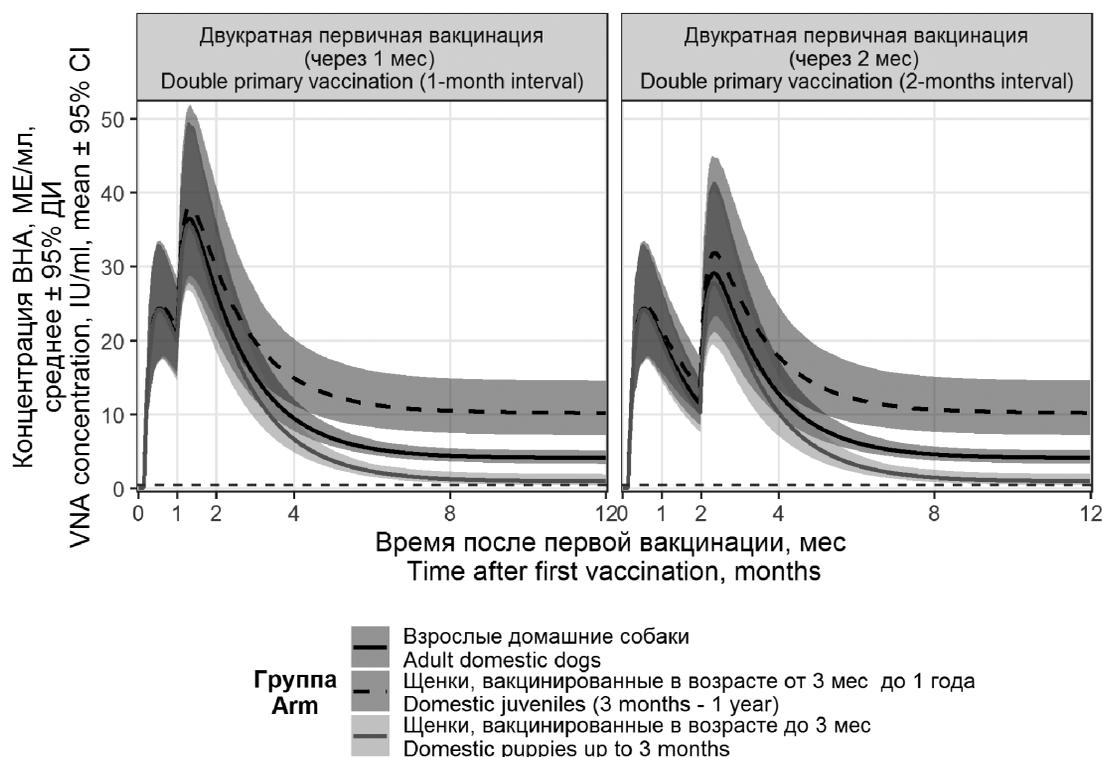
**Таблица 2. Фармакокинетические параметры вируснейтрализующих антител в первый год после вакцинации собак, результаты модельных симуляций (метод определения антител RFFIT)**

**Table 2. Pharmacokinetic parameters of virus-neutralizing antibodies in the first year after dog vaccination: the results of model simulations (RFFIT as a method for antibodies detection)**

Схема вакцинации Vaccination schedule	Группа собак Age	Площадь под фармакокинетической кривой $AUC_{365}^*$ , МЕ/мл Area under the curve $AUC_{365}^*$ , IU/ml	Максимальная концентрация ( $C_{max}$ )*, МЕ/мл Maximum concentration ( $C_{max}$ )*, IU/ml	Время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ), сут Time to reach maximum concentration ( $T_{max}$ ), days
Однократная первичная вакцинация Single primary vaccination	Взрослые уличные Adult stray dogs	3819 (2356; 5749)	38,84 (25,32; 58,73)	23
	Взрослые домашние Adult domestic dogs	2119 (1678; 2691)	24,63 (18,21; 33,02)	17
	Домашние щенки от 3 мес до 1 года Domestic juveniles 3 months – 1 year	3154 (2313; 4224)	24,97 (18,52; 33,67)	18
	Домашние щенки до 3 мес Domestic puppies up to 3 months	1569 (1211; 2019)	24,46 (18,12; 32,82)	16
Двукратная первичная вакцинация (через 1 мес) Double primary vaccination (1-month interval between doses)	Взрослые уличные Adult stray dogs	6785 (4084; 10 221)	60,76 (36,92; 93,83)	44
	Взрослые домашние Adult domestic dogs	3729 (3033; 4609)	36,25 (27,36; 48,53)	40
	Домашние щенки от 3 мес до 1 года Domestic juveniles 3 months – 1 year	5520 (4200; 7207)	37,92 (28,60; 50,54)	40
	Домашние щенки до 3 мес Domestic puppies up to 3 months	2782 (2153; 3611)	35,39 (26,60; 47,80)	40
Двукратная первичная вакцинация (через 2 мес) Double primary vaccination (2-months interval between doses)	Взрослые уличные Adult stray dogs	6686 (4018; 10 085)	48,24 (28,20; 76,14)	76
	Взрослые домашние Adult domestic dogs	3675 (2989; 4527)	28,83 (21,09; 39,96)	71
	Домашние щенки от 3 мес до 1 года Domestic juveniles 3 months – 1 year	5386 (4105; 7019)	31,51 (23,16; 43,50)	72
	Домашние щенки до 3 мес Domestic puppies up to 3 months	2770 (2141; 3599)	27,43 (19,39; 38,78)	71

**Примечание.** \* – данные представлены в виде среднего значения ( $M$ ) с 95% доверительным интервалом.

**Note.** \*, data are presented as mean ( $M$ ) with 95% confidence interval.



**Рис. 5.** Содержание вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови собак после двукратной первичной вакцинации с интервалом 1 и 2 мес (метод определения антител RFFIT), результаты модельных симуляций.

**Примечание.** Горизонтальная пунктирная линия обозначает протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл.

**Fig. 5.** Virus-neutralizing antibodies (VNAs) levels in dogs' serum after double primary vaccination with an interval of 1 and 2 months (RFFIT as a method for antibodies detection): the results of model simulations.

**Note.** The horizontal dashed line indicates a protective antibody level of 0.5 IU/ml.

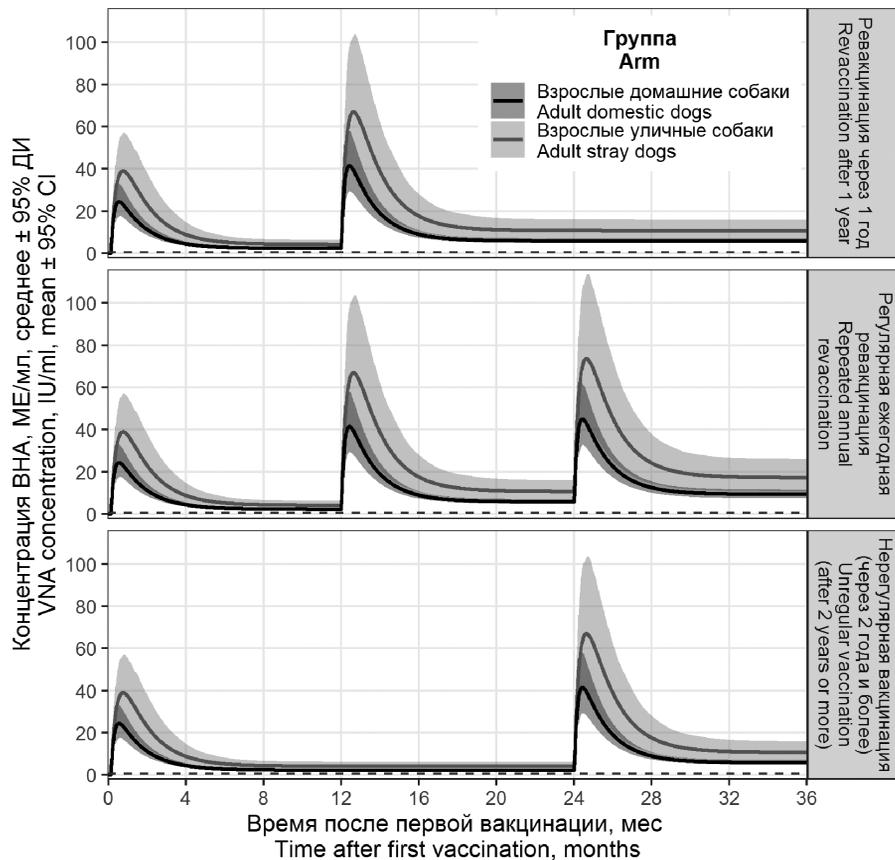
**Таблица 3. Фармакокинетические параметры вируснейтрализующих антител у домашних и уличных собак, результаты модельных симуляций (метод определения антител RFFIT)**

**Table 3. Pharmacokinetic parameters of virus-neutralizing antibodies in domestic and stray dogs: the results of model simulations (RFFIT as a method for antibodies detection)**

Группа собак Arm	Схема вакцинации Vaccination schedule	Площадь под фармакокинетической кривой AUC*, МЕ/мл Area under the curve AUC*, IU/ml			Максимальная концентрация (C <sub>max</sub> )*, МЕ/мл Maximum concentration (C <sub>max</sub> )*, IU/ml		
		1 год 1 <sup>st</sup> year	2 год 2 <sup>nd</sup> year	3 год 3 <sup>rd</sup> year	1 год 1 <sup>st</sup> year	2 год 2 <sup>nd</sup> year	3 год 3 <sup>rd</sup> year
Взрослые уличные Adult stray dogs	Ревакцинация через 1 год Revaccination after 1 year	3819 (2356; 5749)	7586 (4641; 11 297)	3875 (2466; 5707)	38,84 (25,32; 58,73)	66,02 (39,85; 99,92)	–
	Регулярная ежегодная ревакцинация Repeated annual revaccination			9941 (6032; 14 820)			72,49 (43,76; 109,24)
	Нерегулярная вакцинация (через 2 года и более) Unregular vaccination (after 2 years or more)		1520 (972; 2310)	7576 (4636; 11 281)		–	65,98 (39,83; 99,87)
Взрослые домашние Adult domestic dogs	Ревакцинация через 1 год Revaccination after 1 year	2119 (1678; 2691)	4182 (3347; 5242)	2153 (1754; 2623)	24,63 (18,21; 33,02)	41,39 (29,13; 55,81)	–
	Регулярная ежегодная ревакцинация Repeated annual revaccination			5480 (4343; 6845)			44,95 (31,97; 60,31)
	Нерегулярная вакцинация (через 2 года и более) Unregular vaccination (after 2 years or more)		855 (659; 1101)	4180 (3343; 5239)		–	41,38 (29,12; 55,80)

**Примечание.** \* – данные представлены в виде среднего значения (M) с 95% доверительным интервалом; «–» – расчеты не проводились.

**Note.** \*, data are presented as mean (M) with 95% confidence interval; «–» indicates the absence of data.



**Рис. 6.** Содержание вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови собак при ревакцинации через 1 год или позже от первого введения вакцины (метод определения антител RFFIT), результаты модельных симуляций.

**Примечание.** Горизонтальная пунктирная линия обозначает протективный уровень антител 0,5 МЕ/мл.

**Fig. 6.** Virus-neutralizing antibodies (VNAs) level in dogs' serum following the revaccination one year or more after the first vaccine administration (RFFIT as a method for antibodies detection): the results of model simulations.

**Note.** The horizontal dashed line indicates a protective antibody level of 0.5 IU/ml.

интервалом, в дальнейшем осуществлять ежегодные ревакцинации (рис. 7).

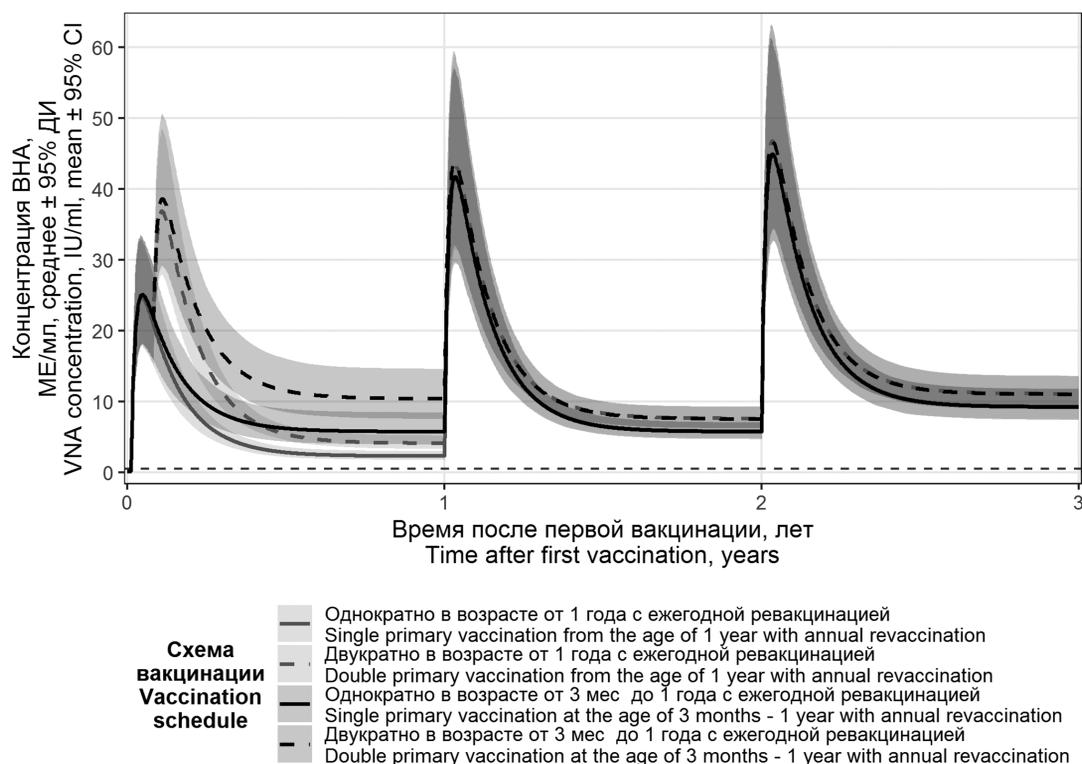
### Обсуждение

Для оценки уровней ВНА в сыворотке крови животных МЭБ рекомендованы 2 метода – RFFIT и FAVN [2]. Проведённые к настоящему времени исследования свидетельствуют о высоком уровне корреляции между результатами, полученными по данным методикам [13, 16]. Для удобства интерпретации принят единый для обоих методов протективный порог концентрации ВНА, равный 0,5 МЕ/мл [2], что даёт исследователям основание для интерпретации результатов RFFIT и FAVN как эквивалентных. Однако результаты нашего эксплораторного анализа полученных в этих тестах данных о концентрациях ВНА в сыворотке крови собак свидетельствуют о невозможности принятия их результатов в качестве эквивалентных. На это же указывают различные максимальные уровни ВНА для животных одного возраста (доп. рис. 3\*<sup>4</sup>), разное время уменьшения содержания ВНА ниже протективного порога, а также различные значения указанного параметра до вакцинации. Это

приводит к расхождениям результатов при исследовании образцов сывороток с концентрациями ВНА, близкими к 0,5 МЕ/мл [16, 17].

D. Briggs и соавт. полагают, что различия в получаемых результатах обусловлены не применением разных методик, а мутациями в контрольном вирусе бешенства, используемом в различных лабораториях для проведения тестов, и рекомендуют для сравнения результатов RFFIT и FAVN использовать полученные из одной референтной лаборатории охарактеризованные штаммы вируса бешенства [17]. Мы полностью согласны с нашими коллегами и считаем полученный в ходе исследования коэффициент соотношения результатов RFFIT и FAVN ( $coef = 9,82$ ;  $RSE = 17,4\%$ ) уместным исключительно в применении к нашей задаче. Мы не рассматриваем указанное значение в качестве истинного соотношения результатов RFFIT и FAVN и не рекомендуем использование данного параметра в других исследованиях и анализах. Следует отметить, что откали-

\*<sup>4</sup>дополнительные материалы, стр. 6.



**Рис. 7.** Содержание вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотке крови собак при различных схемах вакцинации (метод определения антител RFFIT), результаты модельных симуляций.

**Примечание.** Горизонтальная пунктирная линия обозначает протективный уровень антител 0,5 ME/мл.

**Fig. 7.** Virus-neutralizing antibodies (VNAs) levels in dogs' serum following different vaccination schedules (RFFIT as a method for antibodies detection): the results of model simulations.

**Note.** The horizontal dashed line indicates a protective antibody level of 0.5 IU/ml.

брованные с помощью модели начальные значения концентраций антирабических ВНА в сыворотке крови собак до вакцинации составили 0,1 ME/мл для метода RFFIT и 0,0227 ME/мл – для FAVN, что полностью согласуется с полученными ранее различными авторами сведениями об уровне ВНА до вакцинации ниже порогового протективного значения 0,5 ME/мл (табл. 1) [2, 10, 14].

Установление наличия менее длительного гуморального иммунного ответа у собак, вакцинированных в возрасте до 3 мес (рис. 4, 5), также соответствует данным других исследователей [15, 18, 19]. Данное явление объясняется как присутствием колостральных антител, препятствующих развитию полноценного гуморального иммунного ответа на введение вакцины, так и активным развитием иммунной системы и организма в целом в этом возрасте [11, 20]. Однако результаты наших исследований не согласуются с представленными Т. Nokireki и соавт., согласно которым у собак до 1 года больше вероятность выявления ВНА в концентрациях <0,5 ME/мл [21]. Это может быть связано с отсутствием в данном исследовании разделения собак на возрастные подгруппы до 3 мес и от 3 мес до 1 года. Также Т. Nokireki и соавт. отметили, что у собак в возрасте до 1 года риск недостижения указанного уровня антител был выше,

если время между вакцинацией и взятием образцов составляло более 3 месяцев, чем при более коротком промежутке времени. Y. Shimazaki и соавт. также отмечали у собак младше 1 года низкие концентрации ВНА, недостаточные для сохранения их протективного уровня в течение 1 года [22]. Подобные расхождения могут быть объяснены наличием в группах большого числа животных, вакцинированных однократно в возрасте до 3 мес.

К сожалению, отсутствие индивидуальных данных и подробной информации о породе, массе и возрасте животных, а также применяемых вакцинных препаратах не позволило нам выявить влияние указанных факторов на динамику содержания ВНА к вирусу бешенства в сыворотке крови собак, как это делали другие авторы [15, 18, 21, 23]. При этом так же, как L. Kennedy с соавт., мы отметили различия в иммунном ответе на вакцинацию против бешенства у щенков породы бигль [15]. По мнению некоторых исследователей, это может быть связано не с породными, а с возрастными особенностями животных [18, 21].

Особую сложность представляет соблюдение сроков ревакцинации уличных собак в связи с затрудненностью контроля за их перемещением и затратами на отлов животных. Наше исследование показывает, что ревакцинация уличных собак с интервалом

в 1, 2 и даже 3 года обеспечивает наличие у них ВНА в концентрациях  $\geq 0,5$  МЕ/мл на протяжении всего межвакцинального периода (рис. 6), что согласуется с данными других работ. Как и М. Моог и соавт. [24], мы полагаем, что более длительный по времени гуморальный иммунный ответ будет формироваться у уличных собак при двукратной первичной вакцинации.

Выявленные нами различия в содержании ВНА в сыворотке крови собак после одно- и двукратной первичной вакцинации (рис. 7) служат наглядным примером подтверждения и количественной конкретизации при помощи ММ гипотез, сформулированных ранее на основании результатов экспериментальных исследований. На необходимость двукратной первичной вакцинации и неэффективность однократной вакцинации у собак в возрасте до 1 года указывали многие исследователи [18, 23, 25–27]. Однако для количественной оценки влияния возраста животного и схемы вакцинации на динамику уровней ВНА к вирусу бешенства чаще использовали попарное сравнение групп на основании различных статистических критериев, а также регрессионный анализ [18, 27]. Лишь некоторые авторы применяли для этих целей методы ММ. Так, К. Suzuki и соавт. использовали нелинейную модель смешанных эффектов для оценки гуморального иммунного ответа при антирабической вакцинации собак в Боливии [7].

Вопрос о целесообразности ежегодных ревакцинаций животных (в т.ч. против бешенства) обсуждается на протяжении достаточно длительного времени [28, 29]. Результаты нашей работы (рис. 6), равно как и полученные другими авторами данные, позволяют предполагать у большинства собак наличие в сыворотке крови ВНА к вирусу бешенства в концентрациях  $\geq 0,5$  МЕ/мл в течение 2 и более лет после вакцинации [30–32]. Отказ от ежегодных ревакцинаций зачастую аргументируют желанием снизить вероятность проявления побочных эффектов при введении вакцин [33, 34]. Тем не менее мы рекомендуем проводить ежегодную ревакцинацию собак против бешенства в соответствии с российским законодательством<sup>1</sup> и международными рекомендациями [35], что связано с неблагоприятной эпизоотической ситуацией по этому заболеванию на территории Российской Федерации [36]. Регулярная ежегодная ревакцинация

способствует формированию и поддержанию протективных уровней ВНА у особей, недостаточно отвечающих на вакцинацию в силу различных факторов (хронических заболеваний, возраста, породы и др.), что позволяет защитить от бешенства как само животное, так и его хозяев.

### Заключение

На основании полученных результатов мы рекомендуем следующую схему вакцинации домашних собак против бешенства: первую и вторую вакцинацию выполнять в возрасте от 3 мес до 1 года с интервалом 1–2 мес, в дальнейшем проводить ежегодные ревакцинации. Дальнейшие исследования позволяют в том числе выработать индивидуальный подход к вопросу вакцинации и учитывать породную принадлежность, массу, возраст, календарь предыдущих прививок и общее состояние здоровья животного для обеспечения большей эффективности вакцинации и продолжительности иммунной защиты против различных инфекций. Кроме того, данная работа демонстрирует возможность более широкого применения методов ММ для решения задач вакцинопрофилактики, в т.ч. при разработке и оценке эффективности новых вакцинных препаратов, и, как можно предположить, послужит дополнительным стимулом к развитию данного направления исследований.

### ЛИТЕРАТУРА

1. United Against Rabies Collaboration. First annual progress report: Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-mediated Rabies by 2030. Geneva; 2019. Available at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/zeroby30annualreportfinal.pdf> (accessed September 25, 2021).
2. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018. Chapter 3.1.17. Rabies (infection with Rabies virus and other Lyssaviruses). Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_rabies.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_rabies.pdf) (accessed September 25, 2021).
3. Helmlinger G., Sokolov V., Peskov K., Hallow K.M., Kosinsky Y., Voronova V., et al. Quantitative systems pharmacology: an exemplar model-building workflow with applications in cardiovascular, metabolic, and oncology drug development. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2019; 8(6): 380–95. <https://doi.org/10.1002/psp4.12426>
4. Glassman P.M., Balthasar J.P. Physiologically-based pharmacokinetic modeling to predict the clinical pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2016; 43(4): 427–46. <https://doi.org/10.1007/s10928-016-9482-0>
5. Cilliers C., Guo H., Liao J., Christodolu N., Thurber G.M. Multi-scale modeling of antibody-drug conjugates: connecting tissue and cellular distribution to whole animal pharmacokinetics and potential implications for efficacy. *AAPS J.* 2016; 18(5): 1117–30. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9940-z>
6. Кузнецов С.Р. Математическая модель иммунного ответа. *Вестник Санкт-Петербургского университета. Прикладная математика. Информатика. Процессы управления.* 2015; (4): 72–87.
7. Suzuki K., González E.T., Ascarrunz G., Loza A., Pérez M., Ruiz G., et al. Antibody response to an anti-rabies vaccine in a dog population under field conditions in Bolivia. *Zoonoses Pub. Health.* 2008; 55(8–10): 414–20. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01126.x>
8. McClure K.M., Gilbert A.T., Chipman R.B., Rees E.E., Pepin K.M. Variation in host home range size decreases rabies vaccination effectiveness by increasing the spatial spread of rabies virus. *J. Anim. Ecol.* 2020; 89(6): 1375–86. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13176>

<sup>1</sup>Приказ Минсельхоза России от 25.11.2020 N 705 «Об утверждении Ветеринарных правил осуществления профилактических, диагностических, ограничительных и иных мероприятий, установления и отмены карантина и иных ограничений, направленных на предотвращение распространения и ликвидацию очагов бешенства». Available at: <https://rulaws.ru/acts/Prikaz-Minselhoza-Rossii-ot-25.11.2020-N-705/> (accessed 5 August, 2021).

<sup>1</sup>Order of Ministry of Agriculture of Russia dated November 25, 2020, No. 705 «On approval of the Veterinary rules for the implementation of preventive, diagnostic, restrictive and other measures, the establishment and cancellation of quarantine and other restrictions aimed at preventing the spread and elimination of rabies foci» (in Russian). Available at: <https://rulaws.ru/acts/Prikaz-Minselhoza-Rossii-ot-25.11.2020-N-705/> (accessed 5 August, 2021).

9. Zanoni R.G., Bugnon P., Deranleau E., Nguyen T.M., Brügger D. Walking the dog and moving the cat: rabies serology in the context of international pet travel schemes. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2010; 152(12): 561–8. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000125>
10. Pimburage R.M.S., Gunatilake M., Wimalaratne O., Balasuriya A., Perera K.A.D.N. Sero-prevalence of virus neutralizing antibodies for rabies in different groups of dogs following vaccination. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1038-z>
11. Wallace R.M., Pees A., Blanton J.B., Moore S.M. Risk factors for inadequate antibody response to primary rabies vaccination in dogs under one year of age. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(7): e0005761. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005761>
12. Tozer T.N., Rowland M. *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: the Quantitative Basis of Drug Therapy.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
13. Cliquet F., Aubert M., Sagné D., Wasniewski M., Guiot A.L., Lemaitre L., et al. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet. Microbiol.* 2009; 133(3): 283–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.024>
14. Minke J.M., Bouvet J., Cliquet F., Wasniewski M., Guiot A.L., Lemaitre L., et al. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet. Microbiol.* 2009; 133(3): 283–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.024>
15. Kennedy L.J., Lunt M., Barnes A., McElhinney L., Fooks A.R., Baxter D.N., et al. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine.* 2007; 25(51): 8500–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.015>
16. Meza D.K., Broos A., Becker D.J., Behdenna A., Willett B.J., Viana M., et al. Predicting the presence and titre of rabies virus-neutralizing antibodies from low-volume serum samples in low-containment facilities. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021; 68(3): 1564–76. <https://doi.org/10.1111/tbed.13826>
17. Briggs D.J., Smith J.S., Mueller F.L., Schwenke J., Davis R.D., Gordon C.R., et al. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals.* 1998; 26(4): 347–55. <https://doi.org/10.1006/biol.1998.0162>
18. Berndtsson L.T., Nyman A.K., Rivera E., Klingeborn B. Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 2011; 53(1): 22. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-22>
19. Mansfield K.L., Burr P.D., Snodgrass D.R., Sayers R., Fooks A.R. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. *Vet. Rec.* 2004; 154(14): 423–6. <https://doi.org/10.1136/vr.154.14.423>
20. Nishiura H., Mizumoto K. Epidemiological determinants of successful vaccine development. *Int. J. Med. Sci.* 2013; 10(4): 382–4. <https://doi.org/10.7150/ijms.5689>
21. Nokireki T., Jakava-Viljanen M., Virtala A.M., Sihvonon L. Efficacy of rabies vaccines in dogs and cats and protection in a mouse model against European bat lyssavirus type 2. *Acta Vet. Scand.* 2017; 59(1): 64. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0332-x>
22. Shimazaki Y., Inoue S., Takahashi C., Gamoh K., Etoh M., Kamiyama T., et al. Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003; 50(2): 95–8. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00627.x>
23. Непоклонова И.В., Лосич М.А., Зайкова О.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И. Сравнительный анализ факторов формирования антирабического иммунитета у мелких домашних животных. *Ветеринария.* 2017; (4): 26–34.
24. Moore M.C., Davis R.D., Kang Q., Vahl C.I., Wallace R.M., Hanlon C.A., et al. Comparison of anamnestic responses to rabies vaccination in dogs and cats with current and out-of-date vaccination status. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2015; 246(2): 205–11. <https://doi.org/10.2460/javma.246.2.205>
25. Hirayama N., Raharjo Jusa E., Aeny Rochman Noor M., Sakaki K., Ogata M. Immune state of dogs injected with rabies vaccines in the west Java, Indonesia. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1990; 52(5): 1099–101. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.52.1099>
26. Jakel V., König M., Cussler K., Hanschmann K., Thiel H.J. Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies. *Dev. Biol. (Basel).* 2008; 131: 431–7.
27. Olugasa B.O., Aiyedun J.O., Emikpe B.O. Prevalence of antibody against rabies among confined, free-roaming and stray dogs in a transit city of Nigeria. *Vet. Ital.* 2011; 47(4): 453–60.
28. Burr P. Serological testing – an alternative to boosters? *Vet. Microbiol.* 2006; 117(1): 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.008>
29. Орлова С.Т., Сидорчук А.А. Новый взгляд на поствакцинальный иммунитет у собак и кошек. Часть 2. Анализ данных, полученных в экспериментах по определению длительности иммунитета у собак. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* 2016; (1): 18–22.
30. Lakshmanan N., Gore T.C., Duncan K.L., Coyne M.J., Lum M.A., Sterner F.J. Three-year rabies duration of immunity in dogs following vaccination with a core combination vaccine against canine distemper virus, canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and rabies virus. *Vet. Ther.* 2006; 7(3): 223–31.
31. Ottiger H.P., Neimeier-Förster M., Stärk K.D., Duchow K., Bruckner L. Serological responses of adult dogs to revaccination against distemper, parvovirus and rabies. *Vet. Rec.* 2006; 159(1): 7–12. <https://doi.org/10.1136/vr.159.1.7>
32. Mauti S., Traoré A., Hattendorf J., Schelling E., Wasniewski M., Schereffer J.L., et al. Factors associated with dog rabies immunisation status in Bamako, Mali. *Acta Trop.* 2017; 165: 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.016>
33. Moore G.E., HogenEsch H. Adverse vaccinal events in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2010; 40(3): 393–407. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.002>
34. Valli J.L. Suspected adverse reactions to vaccination in Canadian dogs and cats. *Can. Vet. J.* 2015; 56(10): 1090–2.
35. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. WSAVA; 2016. Available at: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/WSAVA-Vaccination-Guidelines-2015.pdf> (accessed September 25, 2021).
36. Караулов А.К., Варкентин А.В., Петрова О.Н., Семёнова Н.А., Баташова Д.С., Коренной Ф.И. Отчет информационно-аналитического центра Управления ветнадзора РСХН (ФГБУ «ВНИИЗЖ») по эпизоотической ситуации в Российской Федерации на 2020 год. Available at: [https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020\\_all.pdf](https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020_all.pdf) (accessed September 25, 2021).

## REFERENCES

1. United Against Rabies Collaboration. First annual progress report: Global Strategic Plan to End Human Deaths from Dog-mediated Rabies by 2030. Geneva; 2019. Available at: <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/zeroby30annualreportfinal.pdf> (accessed September 25, 2021).
2. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2018. Chapter 3.1.17. Rabies (infection with Rabies virus and other Lyssaviruses). Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/current/chapitre\\_rabies.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/current/chapitre_rabies.pdf) (accessed September 25, 2021).
3. Helmlinger G., Sokolov V., Peskov K., Hallow K.M., Kosinsky Y., Voronova V., et al. Quantitative systems pharmacology: an exemplar model-building workflow with applications in cardiovascular, metabolic, and oncology drug development. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2019; 8(6): 380–95. <https://doi.org/10.1002/psp4.12426>
4. Glassman P.M., Balthasar J.P. Physiologically-based pharmacokinetic modeling to predict the clinical pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2016; 43(4): 427–46. <https://doi.org/10.1007/s10928-016-9482-0>
5. Cilliers C., Guo H., Liao J., Christodolu N., Thurber G.M. Multi-scale modeling of antibody-drug conjugates: connecting tissue and cellular distribution to whole animal pharmacokinetics and potential implications for efficacy. *AAPS J.* 2016; 18(5): 1117–30. <https://doi.org/10.1208/s12248-016-9940-z>
6. Kuznetsov S.R. Mathematical model of the immune response [Математическая модель иммунного ответа]. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Prikladnaya matematika. Informatika. Protessy upravleniya.* 2015; (4): 72–87. (in Russian)
7. Suzuki K., González E.T., Ascarrunz G., Loza A., Pérez M., Ruiz G., et al. Antibody response to an anti-rabies vaccine in a dog population under field conditions in Bolivia. *Zoonoses Pub. Health.* 2008; 55(8-10): 414–20. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01126.x>
8. McClure K.M., Gilbert A.T., Chipman R.B., Rees E.E., Pepin K.M. Variation in host home range size decreases rabies vaccination effectiveness by increasing the spatial spread of rabies virus. *J. Anim. Ecol.* 2020; 89(6): 1375–86. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13176>

9. Zanoni R.G., Bugnon P., Deranleau E., Nguyen T.M., Brügger D. Walking the dog and moving the cat: rabies serology in the context of international pet travel schemes. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 2010; 152(12): 561–8. <https://doi.org/10.1024/0036-7281/a000125>
10. Pimburage R.M.S., Gunatilake M., Wimalaratne O., Balasuriya A., Perera K.A.D.N. Sero-prevalence of virus neutralizing antibodies for rabies in different groups of dogs following vaccination. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1038-z>
11. Wallace R.M., Pees A., Blanton J.B., Moore S.M. Risk factors for inadequate antibody response to primary rabies vaccination in dogs under one year of age. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(7): e0005761. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005761>
12. Tozer T.N., Rowland M. *Introduction to Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: the Quantitative Basis of Drug Therapy.* Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
13. Cliquet F., Aubert M., Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods.* 1998; 212(1): 79–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
14. Minke J.M., Bouvet J., Cliquet F., Wasniewski M., Guiot A.L., Lemaître L., et al. Comparison of antibody responses after vaccination with two inactivated rabies vaccines. *Vet. Microbiol.* 2009; 133(3): 283–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.024>
15. Kennedy L.J., Lunt M., Barnes A., McElhinney L., Fooks A.R., Baxter D.N., et al. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine.* 2007; 25(51): 8500–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.015>
16. Meza D.K., Broos A., Becker D.J., Behdena A., Willett B.J., Viana M., et al. Predicting the presence and titre of rabies virus-neutralizing antibodies from low-volume serum samples in low-containment facilities. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021; 68(3): 1564–76. <https://doi.org/10.1111/tbed.13826>
17. Briggs D.J., Smith J.S., Mueller F.L., Schwenke J., Davis R.D., Gordon C.R., et al. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals.* 1998; 26(4): 347–55. <https://doi.org/10.1006/biol.1998.0162>
18. Berndtsson L.T., Nyman A.K., Rivera E., Klingeborn B. Factors associated with the success of rabies vaccination of dogs in Sweden. *Acta Vet. Scand.* 2011; 53(1): 22. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-22>
19. Mansfield K.L., Burr P.D., Snodgrass D.R., Sayers R., Fooks A.R. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. *Vet. Rec.* 2004; 154(14): 423–6. <https://doi.org/10.1136/vr.154.14.423>
20. Nishiura H., Mizumoto K. Epidemiological determinants of successful vaccine development. *Int. J. Med. Sci.* 2013; 10(4): 382–4. <https://doi.org/10.7150/ijms.5689>
21. Nokireki T., Jakava-Viljanen M., Virtala A.M., Sihvonen L. Efficacy of rabies vaccines in dogs and cats and protection in a mouse model against European bat lyssavirus type 2. *Acta. Vet. Scand.* 2017; 59(1): 64. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0332-x>
22. Shimazaki Y., Inoue S., Takahashi C., Gamoh K., Etoh M., Kamiyama T., et al. Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2003; 50(2): 95–8. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00627.x>
23. Nepoklonova I.V., Losich M.A., Zaykova O.N., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Comparative analysis of formation of anti-rabies immune response in pets [Srvanitel'nyy analiz faktorov formirovaniya antirabicheskogo immuniteta u melkikh domashnikh zhivotnykh]. *Veterinariya.* 2017; (4): 26–34. (in Russian)
24. Moore M.C., Davis R.D., Kang Q., Vahl C.I., Wallace R.M., Hanlon C.A., et al. Comparison of anamnestic responses to rabies vaccination in dogs and cats with current and out-of-date vaccination status. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2015; 246(2): 205–11. <https://doi.org/10.2460/javma.246.2.205>
25. Hirayama N., Raharjo Jusa E., Aeny Rochman Noor M., Sakaki K., Ogata M. Immune state of dogs injected with rabies vaccines in the west Java, Indonesia. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1990; 52(5): 1099–101. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.52.1099>
26. Jakel V., König M., Cussler K., Hanschmann K., Thiel H.J. Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies. *Dev. Biol. (Basel).* 2008; 131: 431–7.
27. Olugasa B.O., Aiyedun J.O., Emikpe B.O. Prevalence of antibody against rabies among confined, free-roaming and stray dogs in a transit city of Nigeria. *Vet. Ital.* 2011; 47(4): 453–60.
28. Burr P. Serological testing – an alternative to boosters? *Vet. Microbiol.* 2006; 117(1): 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.008>
29. Orlova S.T., Sidorchuk A.A. A new point of view on vaccine-induced immunity in dogs and cats. Part 2. A review of experimental data on the duration of immunity of canine vaccines [Novyy vzglyad na postvaksinal'nyy immunitet u sobak i koshek. Chast' 2. Analiz dannykh, poluchennykh v eksperimentakh po opredeleniyu dlitel'nosti immuniteta u sobak]. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye.* 2016; (1): 18–22. (in Russian)
30. Lakshmanan N., Gore T.C., Duncan K.L., Coyne M.J., Lum M.A., Sterner F.J. Three-year rabies duration of immunity in dogs following vaccination with a core combination vaccine against canine distemper virus, canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and rabies virus. *Vet. Ther.* 2006; 7(3): 223–31.
31. Ottiger H.P., Neimeier-Förster M., Stärk K.D., Duchow K., Bruckner L. Serological responses of adult dogs to revaccination against distemper, parvovirus and rabies. *Vet. Rec.* 2006; 159(1): 7–12. <https://doi.org/10.1136/vr.159.1.7>
32. Mauti S., Traoré A., Hattendorf J., Schelling E., Wasniewski M., Schereffer J.L., et al. Factors associated with dog rabies immunisation status in Bamako, Mali. *Acta Trop.* 2017; 165: 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.016>
33. Moore G.E., HogenEsch H. Adverse vaccinal events in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2010; 40(3): 393–407. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.02.002>
34. Valli J.L. Suspected adverse reactions to vaccination in Canadian dogs and cats. *Can. Vet. J.* 2015; 56(10): 1090–2.
35. Guidelines for the vaccination of dogs and cats. WSAVA; 2016. Available at: <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/WSAVA-Vaccination-Guidelines-2015.pdf> (accessed September 25, 2021).
36. Karaulov A.K., Varkentin A.V., Petrova O.N., Semenova N.A., Batashova D.S., Korennoy F.I. Report of the information and analytical center of the Veterinary Supervision Department of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor) (FSBI «Federal Centre for Animal Health» (FGBI «ARRIAH») on the epizootic situation in the Russian Federation for 2020 [Otchet informatsionno-analiticheskogo tsentra Upravleniya vetnadzora RSKhN (FGBU «VNIIZZh») po epizooticheskoy situatsii v Rossiyskoy Federatsii na 2020 god]. Available at: [https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020\\_all.pdf](https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/rf/2020/iac2020_all.pdf) (accessed September 25, 2021) (in Russian).



## Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*)

Алимбарова Л.М.<sup>1</sup>, Амбросов И.В.<sup>2</sup>, Матело С.К.<sup>2</sup>, Баринский И.Ф.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ООО «ВДС Фарма», 123592, Москва, Россия

**Введение.** Значительный рост заболеваемости различными формами герпесвирусной инфекции (ГВИ) диктует необходимость поиска новых подходов к модификации одного из базовых противовирусных препаратов ацикловира (АЦВ) (Aciclovir; ACV) и его лекарственных форм с целью улучшения их биофармацевтических характеристик и повышения эффективности терапии. Одним из перспективных в данном аспекте является комплексное германийорганическое соединение ацикловира (КГОСА).

**Цель** исследования – изучение противовирусной активности КГОСА в отношении вируса простого герпеса (ВПГ) (герпесвируса человека, ГВЧ) (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) на моделях ГВИ *in vitro* и *in vivo*.

**Материал и методы.** С использованием вирусологического и статистического методов изучена активность КГОСА в лечебной схеме в отношении ВПГ 1 типа (ВПГ-1) (ГВЧ-1) (штамм «Кл»), ВПГ-2 (ГВЧ-2) (штамм «ВН») на моделях ГВИ *in vitro* на культуре клеток Vero и генитального герпеса (ГГ), вызванного ВПГ-2 (штамм «ВН»), у самцов морских свинок (*Canis porcellus*).

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что КГОСА ингибирует репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2 в клетках Vero. На модели ГГ у инфицированных животных препарат также обладает анти-ВПГ-активностью, приводящей к уменьшению выраженности симптоматики, тяжести и продолжительности заболевания, интенсивности и длительности выделения вируса. Наиболее выраженная активность соединения выявлена при применении в виде геля 3% местно 5 раз в день в течение 5 сут на ранних сроках после заражения. Отсроченное использование КГОСА (через 48 ч после инфицирования) также демонстрировало статистически значимую эффективность, сравнимую с таковой коммерческих референс-препаратов, в т.ч. содержащих АЦВ или его пролекарства: ацикловир (крем 5%), АИЛ (ацикловир+интерферон альфа-2b+лидокаин, мазь 3%), пенцикловир (крем 1%). КГОСА значимо снижал выраженность симптомов ГГ, уменьшал период вирусовыделения, а также инфекционную активность возбудителя по сравнению с этими параметрами у животных группы контроля и особой, получавших плацебо. Активность препарата, по-видимому, обусловлена его улучшенными биофармацевтическими характеристиками относительно АЦВ, а также наличием ряда биологических активностей у входящих в его состав компонентов.

**Заключение.** Результаты исследования позволяют рассматривать КГОСА как основу для разработки терапевтических средств для ГВИ, обладающих противовирусной активностью.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса; герпесвирусная инфекция; генитальный герпес; комплексное германийорганическое соединение ацикловира; противовирусная активность; морские свинки

**Для цитирования:** Алимбарова Л.М., Амбросов И.В., Матело С.К., Баринский И.Ф. Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 368-382. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

**Для корреспонденции:** Алимбарова Людмила Михайловна, канд. мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной вирусологии с Российским центром по герпесу ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Участие авторов:** все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

**Финансирование.** Исследование проведено за счёт государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Для исследования субстанция предоставлена ООО «ВДС Фарма» (резидент Биомедицинского кластера Инновационного центра «Сколково»); в состав авторов входят сотрудники фирмы. 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 (Протокол № 2/1 от 04.02.2016).

Поступила 17.08.2021  
Принята в печать 07.10.2021  
Опубликована 31.10.2021

## ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

## Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems

Ludmila M. Alimbarova<sup>1</sup>, Igor' V. Ambrosov<sup>2</sup>, Svetlana K. Matelo<sup>2</sup>, Igor' F. Barinsky<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>«VDS Pharma» LLC, 123592, Moscow, Russia

**Introduction.** A significant increase in the incidence of various forms of herpesvirus infection (HVI) determines the need to search for new approaches to the modification of one of the basic antiviral drugs aciclovir (ACV) and its dosage forms to improve their biopharmaceutical characteristics and increase the effectiveness of therapy. In this aspect, an innovative organic germanium complex with aciclovir (OGCA) is promising.

The **aim** of the study was to assess the antiviral activity of OGCA against the herpes simplex virus (HSV) (human herpes virus, HHV) on the HVI models both *in vitro* and *in vivo*.

**Material and methods.** We studied the activity of OGCA in a therapeutic regimen against HSV-1 (HHV-1) (KI strain), HSV-2 (HHV-2) (VN strain) using virological and statistical research methods in the *in vitro* model of HVI on Vero cell culture and the model of genital herpes (GH) caused by HHV-2 (VN strain) in male guinea pigs (*Canis porcellus*).

**Results and discussion.** It was found OGCA inhibits the replication of HHV-1 and HHV-2 in Vero cells, and has anti-HHV activity in the GH model in male guinea pigs, leading to a decrease in the severity and duration of the disease, the intensity and duration of viral shedding. The most pronounced activity was detected when preparation was applied topically 5 times a day for 5 days at the early stages of infection (3% gel). The delayed use of OGCA (48 hours after infection) also had statistically significant efficacy compared to commercial reference drugs containing aciclovir or its pro-drugs: aciclovir (5% cream), AIL (acyclovir+interferon alfa-2b+lidocaine, 3% ointment), penciclovir (1% cream). OGCA significantly reduced the number of days of the pathogen shedding, as well as its infectivity, compared to animals in the control group and ones receiving placebo. The activity of OGCA, apparently, is due to its improved biopharmaceutical characteristics compared to aciclovir, as well as the presence of a number of biological activities of its constituent components.

**Conclusion.** The results of the study allow us to consider OGCA as the basis for the development of antiviral agents for the treatment of HVI.

**Key words:** herpes simplex virus; herpesvirus infection; genital herpes; organic germanium complex with aciclovir; antiviral activity; guinea pigs

**For citation:** Alimbarova L.M., Ambrosov I.V., Matelo S.K., Barinsky I.F. Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against the herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 368-382 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-76>

**For correspondence:** Ludmila M. Alimbarova, Ph.D. (Med.), Associate Professor, Lead Researcher of the Comparative Virology Laboratory with the Russian Centre for Herpes, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [virology@mail.ru](mailto:virology@mail.ru)

**Information about the authors:**

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

Ambrosov I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7418-8171>

Matelo S.K., <https://orcid.org/0000-0002-1752-042X>

Barinsky I.F., <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

**Contribution:** the authors contributed equally to this article.

**Funding.** The study was funded by the State budget.

**Conflict of interest.** For the study, the substance was presented by «VDS Pharma» LLC (Resident of the Biomedical Cluster of the Skolkovo Innovation Center); the authors include employees of the company. 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 institution (Protocol No. 2/1 dated 04.02.2016).

Received 17 August 2021

Accepted 07 October 2021

Published 31 October 2021

## Введение

Вирусы простого герпеса (ВПГ) (герпесвирусы человека, ГВЧ) 1 и 2 типов широко распространены в человеческой популяции и способны вызывать разные по степени тяжести заболевания (назальный/лабиальный герпес, herpes nasalis/labialis; генитальный герпес (ГГ), herpes genitalis; офтальмогерпес; энцефалит; полиорганные поражения и др.) [1, 2]. По эпидемиологическим оценкам, в мире ВПГ-1 (ГВЧ-1) инфицировано 66,6% населения в возрасте от 0 до 49 лет, или 3,4 млрд человек, и ВПГ-2 (ГВЧ-2) – 13,2% населения в возрасте от 15 до 49 лет, или 491,5 млн человек [3,4].

Среди всех противовирусных средств, используемых в клинической практике, препаратом 1 линии при лечении различных форм герпесвирусной инфекции (ГВИ) является ацикловир (АЦВ) (Aciclovir, ACV; 9-([2-гидроксиэтокси]метил]-гуанин,  $C_8H_{11}N_5O_3$ ) – синтетический аналог пуринового нуклеозида [2, 5]. Механизм действия АЦВ основан на том, что он, конкурентно взаимодействуя с ДНК-полимеразой ВПГ, включается вместо дезоксигуанозина в вирусную ДНК, блокирует её синтез и репликацию вируса [5, 6]. Однако применение АЦВ (пероральное в эпизодическом или супрессивном режимах, парентеральное либо местное) в ряде случаев не приводит к ожидаемому результату [2, 5–8]. Отсутствие эффекта может быть обусловлено рядом факторов, в т.ч. связанных с биофармацевтическими параметрами препарата и его лекарственных форм: низкая всасываемость в желудочно-кишечном тракте в результате гидрофильности и малой пероральной биодоступности (~20%); незначительная растворимость в воде (1,3 мг/мл при 25° С и 2,5 мг/мл – при 37° С); сниженная трансдермальная диффузия при использовании топических форм [2, 5, 7]. На эффективность также могут оказывать влияние индивидуальные характеристики пациента (особенности функционирования органов и систем, прежде всего иммунной [2]) и биологические особенности вируса (способность к латенции, персистенции, формирование штаммов ВПГ, устойчивых к действию АЦВ) [2, 6–8].

Повышение эффективности терапии больных с разными формами ГВИ диктует необходимость поиска новых путей модификации АЦВ и его лекарственных форм с целью улучшения их биофармацевтических характеристик [2, 5, 9]. Так, одним из подходов к решению указанной проблемы в отношении топической терапии является разработка комбинированных пре-

паратов, например содержащих АЦВ и противовоспалительные соединения [9, 10] или интерферон (IFN) [2]. Другим подходом к улучшению биодоступности АЦВ является синтез новых молекул по принципу «me-too drug». Примерами таких производных, полученных химической модификацией АЦВ, служат валацикловир и фамцикловир, которые легче проникают в клетку и превращаются в ней в целевое вещество, подавляющее размножение ВПГ [6, 11]. Валацикловир, представляя собой пролекарство, трансформирующееся в организме в валин (Val, V) и АЦВ, обладает по сравнению с ним лучшей биодоступностью (55%) и более высокой скоростью всасывания в кишечнике. Тем не менее он, так же как и АЦВ, эффективен в больших дозах (до 1000–2000 мг/сут) [2, 6, 11]. Фамцикловир (пролекарство пенцикловира (2-амино-1,9-дигидро-9-[4-гидрокси-3-(гидроксиэтил)бутил]-6Н-пурин-6-он)) характеризуется более высокими показателями биодоступности (до 77%) и эффективности, однако его водная растворимость ограничена быстрым образованием преципитирующих труднорастворимых моногидратов (2–3%) [2, 6, 11].

Перспективным в данном аспекте является новое комплексное германийорганическое соединение ацикловира (КГОСА), синтезированное в соответствии с принципом «me-too drug» и состоящее из 2 атомов германия (Ge), координированных 4 остатками лимонной кислоты, молекулы АЦВ и аминокислоты аргинина (Arg, R) [12]. Введение в состав вещества германийорганического соединения обусловлено наличием у последнего противоопухолевой, иммуноадьювантной, противовирусной, анальгезирующей, антиоксидантной, противовоспалительной, регенерирующей активностей, а также способности благоприятно влиять на деятельность различных органов и систем [13]. Известно, что Ge, являясь эссенциальным микроэлементом, необходим для нормального функционирования иммунной системы человека [13, 14]. Установлено, что в составе германийорганических соединений он может оказывать воздействие на CD4+ клетки, НК-клетки, моноциты/макрофаги, В-лимфоциты, опосредованно влиять на выработку ряда цитокинов (интерлейкинов (IL) -3, -4, -13; фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor) альфа (TNF- $\alpha$ ); IFN- $\gamma$ ), а также антител [13, 15].

Цель настоящей работы – изучение противовирусной активности КГОСА в отношении ВПГ на моделях ГВИ *in vitro* и *in vivo*.

## Материал и методы

**Вирусы.** В исследовании использовали вирусы ВПГ-2 (штамм «ВН») и ВПГ-1 (штамм «Кл»), полученные из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Биологическую активность вирусов определяли стандартным методом титрования [16] в клеточной культуре Vero и рассчитывали по методу Рида и Менча [17], выражая в логарифмических единицах ( $\lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл; ТЦИД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая инфекционная доза).

**Культура клеток.** Выделение возбудителей из образцов биологического материала, пассирование и титрование проводили на перевиваемой культуре клеток почек африканских зелёных марьшшек (*Chlorocebus sabaeus*) Vero, полученной из коллекции культур тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». В качестве ростовой и поддерживающей сред использовали среду Игла (ПанЭко, Россия), содержащую 10 и 2% эмбриональной телячьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (ПанЭко) соответственно, а также 2 мМ L-глутамина (Sigma, США) и антибиотики: 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 40 мкг/мл гентамицина (ПанЭко). Клеточную культуру в концентрации  $\sim 1,0 \times 10^5$  кл/мл рассеивали в 96-луночные пластиковые культуральные планшеты (Costar, Великобритания) и культивировали в термостате при температуре  $+37 \pm 0,5$  °С во влажной атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода (CO<sub>2</sub>). Эксперименты проводили на суточных культурах Vero.

**Препараты.** КГОСА ( $\text{Ge}_2[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7]_4[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_3][\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2]$ ) представляет собой комплексное германийорганическое соединение АЦВ (рис. 1). На долю последнего в составе молекулы вещества приходится 15% (в массовом отношении).

КГОСА (Россия) – гель 3% для наружного применения. В качестве плацебо использовали основу геля КГОСА; в качестве референс-препаратов – коммерческие противовирусные препараты в соответствии с инструкциями их производителей: ацикловир (Великобритания) – лиофилизат для приготовления инфузий и крем 5% для наружного применения, в 1 г которого содержится 50 мг ацикловира; Пенцикловир

(Германия) – крем 1% для наружного применения, 1 г которого содержит 10 мг пенцикловира; АИЛ (Россия) – мазь для наружного применения, содержащая ацикловир 3% + IFN $\alpha$ -2b рекомбинантный человеческий 20 000 МЕ/г + лидокаин 1%.

При изучении противовирусной активности *in vitro* 5 мг каждого из исследуемых соединений (КГОСА, АЦВ) растворяли в 1 мл дистиллированной воды (H<sub>2</sub>O) для получения маточных растворов с концентрацией 5 мг/мл. Данные растворы фильтровали через фильтры Swinnox (Merck Millipore, Германия) с размером пор 0,22 мкм, разливали по аликвотам и сохраняли при  $-70$  °С. Непосредственно перед проведением исследований *in vitro* из маточных растворов готовили разведения тестируемых веществ на питательной среде Игла.

**Животные.** Исследования выполняли на самцах морских свинок (*Canis porcellus*) массой 250–350 г. Все особи были получены из питомника лабораторных животных «Столовая» (филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская область, Россия) и содержались на стандартном рационе в условиях вивария. При выполнении лабораторных экспериментов придерживались требований правил Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой в Страсбурге 18 марта 1986 г. и подтверждённой там же 1 июня 2006 г. (ETS N 123), ([https://www.coe.int/t/e/legal\\_affairs/legal\\_cooperation/biological\\_safety\\_and\\_use\\_of\\_animals/laboratory\\_animals/GT123\(2002\)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf](https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf)).

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 № 2/1 от 04.02.2016).

**Дизайн исследования.** Изучение активности препаратов *in vitro* и *in vivo* проводили в соответствии с требованиями Фармакологического государственного комитета МЗ РФ [16].

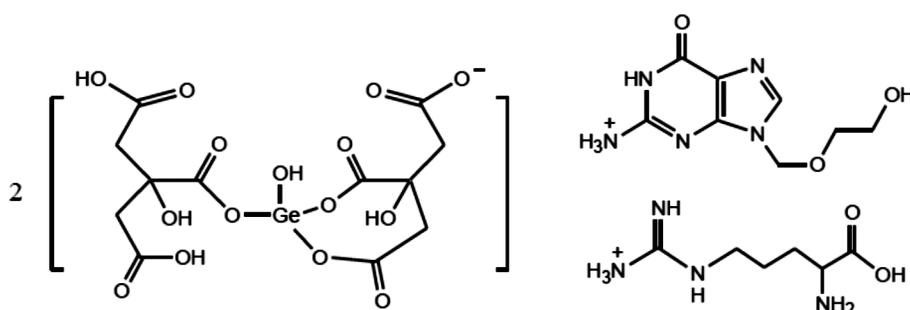


Рис. 1. Структура комплексного германийорганического соединения ацикловира.

Fig. 1. Structure of the organic germanium complex with aciclovir.

Исследование *in vitro* включало 2 схемы: определение цитотоксического действия препаратов в интактной культуре Vero, а также оценку их противовирусной активности.

*Цитотоксическое действие* препаратов оценивали на культуре неинфицированных клеток Vero по влиянию на их морфологию и жизнеспособность по стандартной методике [6, 18], описанной ранее [19]. Количество жизнеспособных клеток определяли методом исключения витального красителя трипанового синего (0,4% раствор). Число жизнеспособных (неокрашенных) и нежизнеспособных (окрашенных голубым цветом) клеток подсчитывали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток в популяции (V) рассчитывали по формуле:

$$V (\text{в } \%) = \frac{N}{N_t} \times 100 \quad (1),$$

где N – число жизнеспособных (неокрашенных) клеток;  $N_t$  – общее число клеток.

Значение  $CC_{50}$  (cytotoxicity concentration) – 50% цитотоксической концентрации препарата, снижающей жизнеспособность обработанных клеток на 50% по сравнению с необработанными, рассчитывали по стандартной методике [20].

*Противовирусную активность препаратов in vitro* оценивали по подавлению цитопатического действия (ЦПД) вируса в культуре клеток, а также их влиянию на репликацию вируса в клеточных культурах в соответствии с методиками, разработанными М. Cotarelo и соавт. [21], J. Kruppenbacher и соавт. [22], как описано нами ранее [19].

Культуру клеток Vero культивировали согласно приведённому выше описанию, после чего среду роста удаляли, клетки отмывали раствором Хенкса и заражали тест-вирусом в дозе 100 ТЦИД<sub>50</sub>. Далее культуры инкубировали в течение 1 ч в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C, супернатант удаляли, клетки повторно отмывали раствором Хенкса, добавляли к ним исследуемые препараты в разных концентрациях в составе поддерживающей среды и инкубировали в термостате при  $+37,0 \pm 0,5$  °C на протяжении 96 ч. Эксперименты сопровождали соответствующими контролями. В качестве позитивного и негативного контроля использовали соответственно инфицированные и неинфицированные клеточные культуры, к которым добавляли поддерживающую среду Игла. Контролем цитотоксичности служили неинфицированные культуры клеток, инкубируемые в присутствии тестируемых препаратов. Учёт результатов осуществляли методом световой микроскопии по общепринятому способу на 4 сут после контакта клеток с инфекционным материалом, после появления выраженного (100%) ЦПД в контрольных пробах (позитивный контроль) [19]. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты выполняли трижды.

Эффективность препарата количественно выражали как  $IC_{50}$  (inhibitory concentration) – 50% ингибирующая концентрация препарата, снижающая на 50% развитие вирусиндуцированного ЦПД.  $IC_{50}$

рассчитывали посредством регрессионного анализа дозозависимых кривых [20]. Селективный индекс (selective index, SI) препарата рассчитывали как отношение 50% цитотоксической концентрации ( $CC_{50}$ ) к 50% ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ).

**Экспериментальная герпесвирусная инфекция у морских свинок.** ГГ у самцов морских свинок моделировали по стандартной методике, также описанной нами ранее [23]. Животных заражали вирусосодержащей жидкостью (ВПГ-2, штамм «ВН» в дозе 100 ТЦИД<sub>50</sub>), которую наносили при помощи пипетки (с последующим втиранием) на предварительно скарифицированную кожу пениса. Скарифицирование производили хирургическим ланцетом после анестезии лидокаином (1%); площадь скарификации составляла 4–7 мм<sup>2</sup>. Противовирусную активность препаратов изучали по терапевтической схеме начиная через 1 или 48 ч после инфицирования. Препараты наносили методом аппликации местно на кожу пениса ежедневно 5 раз в день в течение 5 сут.

В первом эксперименте 20 инфицированных особей методом случайной выборки рандомизировали на 4 группы (по 5 морских свинок в каждой). Инфицированные животные через 3 ч после заражения получали: в первой группе – КГОСА (гель); во второй группе – препарат сравнения АЦВ (крем); в третьей группе – плацебо (основу геля КГОСА). Четвертая группа (позитивный контроль) содержала животных, инфицированных ВПГ-2 в дозе, эквивалентной такой, в опытных группах, и не получавших лечения.

Во втором опыте 30 морских свинок инфицировали ВПГ-2, после чего у них взяли смывы с урогенитальной области на предмет выделения вируса, оценки уровня его репликации и подтверждения специфичности симптомов ГГ. Затем животных рандомизировали методом случайной выборки на 6 групп (по 5 особей в каждой). Инфицированные особи спустя 48 ч после заражения получали: в первой группе – КГОСА (гель), во второй группе – препарат сравнения АЦВ (крем), в третьей – пенцикловир (крем), в четвертой – АЙЛ (мазь); в пятой группе – плацебо (основу геля КГОСА). Шестая группа (позитивный контроль) содержала животных, инфицированных ВПГ-2 в той же дозе, что и в опытных группах, но не получавших лечения. В качестве контроля токсичности использовали интактных морских свинок (седьмая и восьмая группы), которых содержали в тех же условиях, что и животных в вышеупомянутых группах, и обрабатывали гелем КГОСА или его основой (плацебо) по аналогичной схеме. Наблюдение за животными осуществляли в течение 21 сут после заражения, ежедневно оценивая динамику развития и тяжесть ГГ с использованием шкалы баллов поражения в диапазоне от 0 до 4. При этом определяли выраженность специфических поражений (везикулы, пустулы, изъязвления, эрозии, корочки), наличие отёчности, гиперемии, признаков орхита, неврологической симптоматики (менингоэнцефалит, паралич), а также регистрировали изменения в общем состоянии и поведенческих реакциях животных, как описано нами ранее [23].

Эффективность КГОСА и препаратов сравнения оценивали на момент наибольшей выраженности патологического процесса по стандартной методике [16], также описанной нами ранее [23]. Учитывали следующие параметры: интенсивность клинических проявлений (в баллах); индекс лечебного действия (ИЛД); среднюю продолжительность заболевания (СПЗ); показатели инфекционной активности вируса в биоматериалах. Величину ИЛД вычисляли по формуле:

$$\text{ИЛД (в \%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 \quad (2),$$

где А – сумма баллов в контрольной группе, В – сумма баллов в группе животных, леченных препаратом.

При изучении влияния препаратов на уровень накопления вируса у инфицированных животных на 2, 5, 7, 9 и 11 сут после заражения брали смывы с урогенитальной области с использованием 0,5 мл стерильного физиологического фосфатного буфера (ФБР; PBS) с антибиотиками (100 ЕД/мл пенициллина и 80 мкг/мл гентамицина). Далее образцы биоматериала центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеточных элементов и слизи. Супернатант отбирали и до исследования хранили при  $-70 \pm 10,0$  °С. Затем из него готовили серийные 10-кратные разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ) на ФБР, которыми заражали клетки культуры Vero.

На каждое 1 разведение исследуемого материала использовали 4 лунки. Инфекционную активность патогена в биоматериале определяли по общепринятым стандартам на культуре Vero в соответствии с описанным ранее протоколом [19].

**Статистическая обработка данных.** Результаты опытов подвергали статистической обработке общепринятыми для биологических исследований методами [20, 24] с применением пакетов прикладных программ Microsoft Excel 5.0 и STATISTICA 7.0. Полученные данные выражали в виде среднего значения ( $M$ ) и стандартной ошибки ( $S_m$ ) и подвергали тесту на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения для сравнения средних показателей применяли t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении результатов эксперимента обработку данных в дальнейшем осуществляли с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при величине  $p$ -уровня значимости  $< 0,05$ .

### Результаты

Результаты изучения цитотоксического действия КГОСА на перевиваемой линии неинфицированных клеток Vero представлены в табл. 1. По данным световой микроскопии и теста с трипановым синим установлено, что вещество не оказывало цитотоксического действия на неинфицированные клетки. Жизнеспособ-

Таблица 1. Цитотоксическое действие КГОСА на перевиваемую линию неинфицированных клеток Vero

Table 1. Cytotoxic effect of OGCA on the continuous lineage of non-infected Vero cells

Концентрация Concentration	КГОСА OGCA		По данным метода световой микроскопии According to the light microscopy method	По данным метода исключения витального красителя According to the vital dye elimination method	
	Эквивалент концентрации образца по ацикловиру Equivalent of the sample concentration by aciclovir		Цитотоксическое действие Cytotoxic effect on cells	Цитотоксическое действие Cytotoxic effect	Количество живых клеток <sup>1</sup> Number of living cells <sup>1</sup>
мкг/мл µg/ml	мкг/мл µg/ml		%	%	млн mln ( $M \pm S_m$ ) <sup>2</sup>
1000	160		<10,0	8,7	2,01 ± 0,36
500	80		0,0	0,6	2,03 ± 0,32
100	16		0,0	0,6	2,03 ± 0,30
50	8		0,0	0,5	2,01 ± 0,20
10	1,6		0,0	0,2	2,01 ± 0,25
5	0,8		0,0	0,2	2,05 ± 0,30
1	0,16		0,0	0,1	2,04 ± 0,25
0,5	0,08		0,0	0,1	2,01 ± 0,30
0,1	0,016		0,0	0,1	2,0 ± 0,27
среда Игла <sup>3</sup> Eagle's medium <sup>3</sup>	0,0		0,0	0,0	2,05 ± 0,20

**Примечание.** <sup>1</sup> определено методом исключения витального красителя трипанового синего;

<sup>2</sup> средние значения  $\pm S_m$  по результатам 3 независимых опытов;

<sup>3</sup> интактные клетки Vero служили в качестве контроля;

<sup>4</sup> достоверность по отношению к контролю – клеткам Vero, инкубируемым в питательной среде ИГЛА,  $p > 0,05$ .

**Note.** <sup>1</sup> was determined by the vital dye trypan blue elimination method;

<sup>2</sup> the average values  $\pm S_m$  according to the results of three independent experiments;

<sup>3</sup> intact Vero cells served as a control;

<sup>4</sup> reliability in relation to the control – Vero cells incubated in the Eagle's minimal essential medium,  $p > 0.05$ .

способность клеток Vero, выращенных на средах, содержащих КГОСА в диапазоне концентраций от 1000 до 0,1 мкг/мл, составила 91,3–99,9% и достоверно не отличалась от таковой для клеточных элементов, инкубируемых в питательной среде Игла без препарата ( $p > 0,05$ ).

Значение  $CC_{50}$  для КГОСА составило  $>1000 \pm 110$  мкг/мл по сравнению с  $>600 \pm 95$  мкг/мл для референс-препарата АЦВ.

В следующей серии экспериментов мы оценивали противовирусную активность КГОСА в отношении ГВИ в культуре Vero. Установлено, что препарат инги-

бирует репликацию как ВПГ-1, так и ВПГ-2. Параметры, характеризующие противовирусную активность исследуемого соединения и референс-препарата ( $CC_{50}$ ,  $IC_{50}$  и  $IC_{90}$ , а также SI), представлены в табл. 2.

**Эффективность противовирусного действия КГОСА на модели генитального герпеса у морских свинок.** Анализ результатов свидетельствует о том, что КГОСА (3% гель) при использовании у морских свинок по лечебной схеме (местно пятикратно в течение 5 сут) обладает активностью в отношении ВПГ-2 штамма «ВН», выраженность которой зависит от сроков применения.

Таблица 2. Цитотоксическая и противовирусная активность КГОСА в отношении ВПГ-1 и ВПГ-2 в культуре клеток Vero

Table 2. Cytotoxic and antiviral activity of OGCA against HSV-1 and HSV-2 in Vero cell culture

Вирус Virus	КГОСА OGCA				Ацикловир Aciclovir			
	$CC_{50}^1$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $CC_{50}^1$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	$IC_{50}^2$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $IC_{50}^2$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	$IC_{90}^3$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $IC_{90}^3$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	SI <sup>4</sup>	$CC_{50}$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $CC_{50}$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	$IC_{50}$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $IC_{50}$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	$IC_{90}$ ( $M \pm S_m$ ), мкг/мл $IC_{90}$ ( $M \pm S_m$ ), µg/ml	SI
ВПГ-1, штамм «КЛ» HSV-1, K1 strain	$>1000 \pm 110^5$	2,6 ± 0,1	8,0 ± 0,3	384,6	$>600 \pm 95$	1,2 ± 0,1	3,2 ± 0,2	500
ВПГ-2, штамм «ВН» HSV-2, VN strain		5,5 ± 0,2 <sup>5</sup>	24,4 ± 0,8	181,2		1,7 ± 0,2	6,3 ± 0,7	352,9

**Примечание.** <sup>1</sup> $CC_{50}$  мкг/мл – 50% цитотоксическая концентрация препарата;

<sup>2</sup> $IC_{50}$  – 50% ингибирующая концентрация препарата;

<sup>3</sup> $IC_{90}$  – 90% ингибирующая концентрация препарата;

<sup>4</sup>SI – селективный индекс;

<sup>5</sup>значения  $M \pm S_m$  по результатам 3 независимых опытов с использованием каждого типа вируса.

**Note.** <sup>1</sup> $CC_{50}$ , 50% cytotoxic concentration of the drug;

<sup>2</sup> $IC_{50}$ , 50% inhibitory concentration of the drug;

<sup>3</sup> $IC_{90}$ , 90% inhibitory concentration of the drug;

<sup>4</sup>SI, selective index;

<sup>5</sup>values of  $M \pm S_m$  according to the results of three independent experiments using each type of virus.

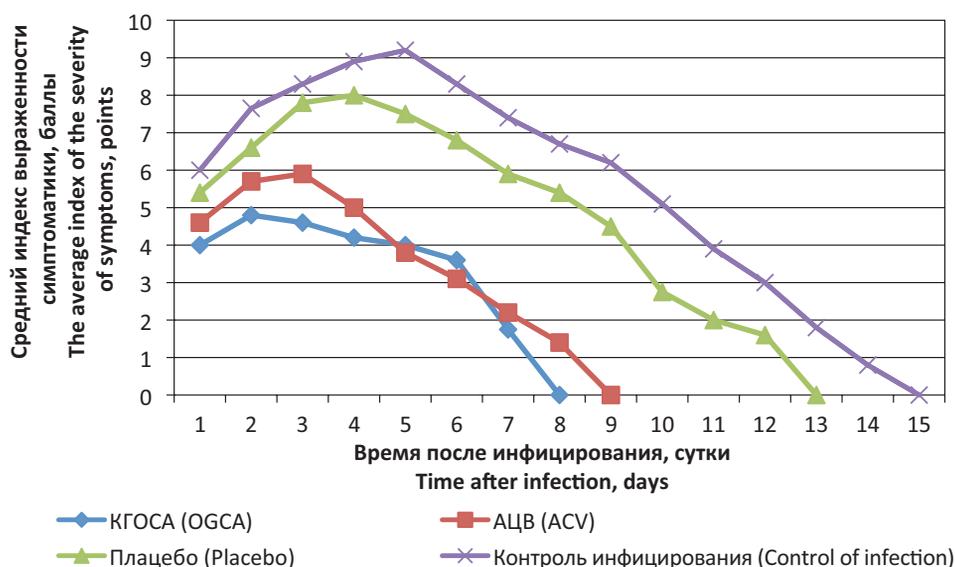


Рис. 2. Влияние КГОСА на течение герпесвирусной инфекции у самцов морских свинок при использовании через 3 ч после инфицирования.

**Примечание.** Здесь и на рис. 3 по оси абсцисс – время после инфицирования, сутки; по оси ординат – средний индекс выраженности, баллы.

**Fig. 2.** The effect of OGCA on the course of herpesvirus infection in male guinea pigs when applied 3 hours after infection.

**Note.** Here and in Fig. 3 the X-axis shows the time after infection (days), Y-axis shows the average index of the severity of symptoms, points.

Наиболее выраженные результаты получены в группе инфицированных животных, получавших КГОСА (3% гель) в ранние сроки – через 3 ч после инфицирования (табл. 3, рис. 2). Применение препарата приводило у них к значимому (приблизительно в 2,3 раза) снижению суммарного индекса выраженности симптоматики (СИВС) по сравнению с особями, не получавшими лечения или получавшими плацебо, а также к достоверному укорочению СПЗ на 6,3 сут в сравнении с группой без лечения ( $p < 0,001$ ) и на 4,5 сут – с группой плацебо ( $p < 0,05$ ).

Несмотря на то что КГОСА обладал более быстрым началом действия относительно ацикловира (уменьшение СИВС наблюдалось уже через 1 сут после начала применения, рис. 2), на 5 сут после инфицирования выраженность симптоматики у животных, получавших исследуемые препараты, достоверно не различалась (20 против 19 баллов у АЦВ,  $p > 0,05$ ).

Эффективность применения КГОСА была сопоставима с таковой для 5% крема АЦВ (ИЛД – 56,5 и 58,7% соответственно,  $p > 0,05$ ).

У животных, получавших КГОСА или АЦВ, зарегистрированы уменьшение частоты и сокращение числа дней выделения вируса, а также снижение уровня его инфекционной активности в сравнении с группами контроля и плацебо. Так, на 5 сут наблюдения на фоне лечения обоими препаратами возбудитель был выделен только у 40% (2/5) животных, в то время как в группах контроля – у 100% (5/5). КГОСА, так же как и АЦВ, эффективно ингибировал репликацию ВПГ-2 у инфицированных особей, о чём свидетельствовало снижение титров вируса в урогенитальных смывах на 1,75–2,0 lg ТЦИД<sub>50</sub> ( $p < 0,001$ ) по сравнению с таковыми в группах без лечения и на 1,25–1,5 lg ТЦИД<sub>50</sub> ( $p < 0,05$ ) – среди получавших плацебо. На 7 сут после заражения происходило дальнейшее снижение титров

**Таблица 3. Противовирусная активность КГОСА (гель 3%) в отношении ВПГ-2 (штамм «ВН») на модели генитального герпеса у морских свинок**

**Tabl. 3. Antiviral activity of OGCA (gel 3%) against HSV-2 (VN strain) on the model of genital herpes in guinea pigs**

Группа животных, $n = 5^1$ Group of animals, $n = 5^1$	Средняя продолжительность заболевания (СПЗ), сут, $(M \pm S_m)^2$ Average duration of the disease (ADD), days $(M \pm S_m)^2$	Суммарный индекс выраженности симптоматики, баллы The total index of the severity of symptoms, points	Средний индекс выраженности симптоматики, баллы, $(M \pm S_m)$ The average index of the severity of symptoms, points	Индекс лечебного действия (ИЛД), % Index of therapeutic effect (ITE)	Титры вируса, $(M \pm S_m)^4$ , lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1 мл Virus titers $(M \pm S_m)^4$ , lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml
Лечебная схема: через 3 ч после заражения ежедневно в течение 5 дней пятикратно Treatment regimen: 3 hours after infection, five times daily for 5 days					
КГОСА OGCA	7,8 ± 1,5*	20,0 <sup>3</sup>	4,0 ± 0,5	56,52*	3,25 ± 0,15*
Ацикловир Aciclovir	9,2 ± 1,75*	19,0 <sup>3</sup>	3,8 ± 1,0	58,69*	3,0 ± 0,2*
Плацебо (основа геля) Placebo (gel base)	12,3 ± 1,4	37,5	7,5 ± 0,25	18,47	4,5 ± 0,16
Контроль инфицирования Infection control	14,1 ± 1,5	46,0	9,2 ± 0,75		5,0 ± 0,11
Лечебная схема: через 48 ч после заражения ежедневно в течение 5 дней пятикратно Treatment regimen: 48 hours after infection, five times daily for 5 days					
КГОСА OGCA	9,8 ± 1,5*	24,0 <sup>3</sup>	4,8 ± 0,56 <sup>3</sup>	47,8*	3,5 ± 0,1*
Ацикловир Aciclovir	10,5 ± 2,0*	28,13 <sup>3</sup>	5,6 ± 0,68 <sup>3</sup>	38,86*	3,4 ± 0,3*
Пенцикловир Penciclovir	9,5 ± 1,52*	27,5 <sup>3</sup>	5,5 ± 1,0 <sup>3</sup>	40,21*	3,0 ± 0,25*
АИЛ Ail	10,3 ± 1,35*	30,0 <sup>3</sup>	6,0 ± 1,0 <sup>3</sup>	34,78*	3,75 ± 0,2*
Плацебо (основа геля) Placebo (gel base)	14,0 ± 1,5	39,5	7,9 ± 0,25	14,1	4,9 ± 0,3
Контроль инфицирования Infection control	15,3 ± 1,25	46,0	9,2 ± 0,75		5,25 ± 0,16

**Примечание.** <sup>1</sup> $n$  – число животных в каждой группе = 5;

<sup>2</sup> $M$  – среднее арифметическое,  $S_m$  – стандартное отклонение;

\*отличие относительно животных группы контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ ,  $U$ -критерий Манна–Уитни);

<sup>3</sup>отличие относительно животных группы контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента);

<sup>4</sup>уровень накопления вируса в смывах с урогенитальной области, взятых на 5 сут после заражения;

ТЦИД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая инфекционная доза.

**Note.** <sup>1</sup> $n$ , the number of animals in each group is 5;

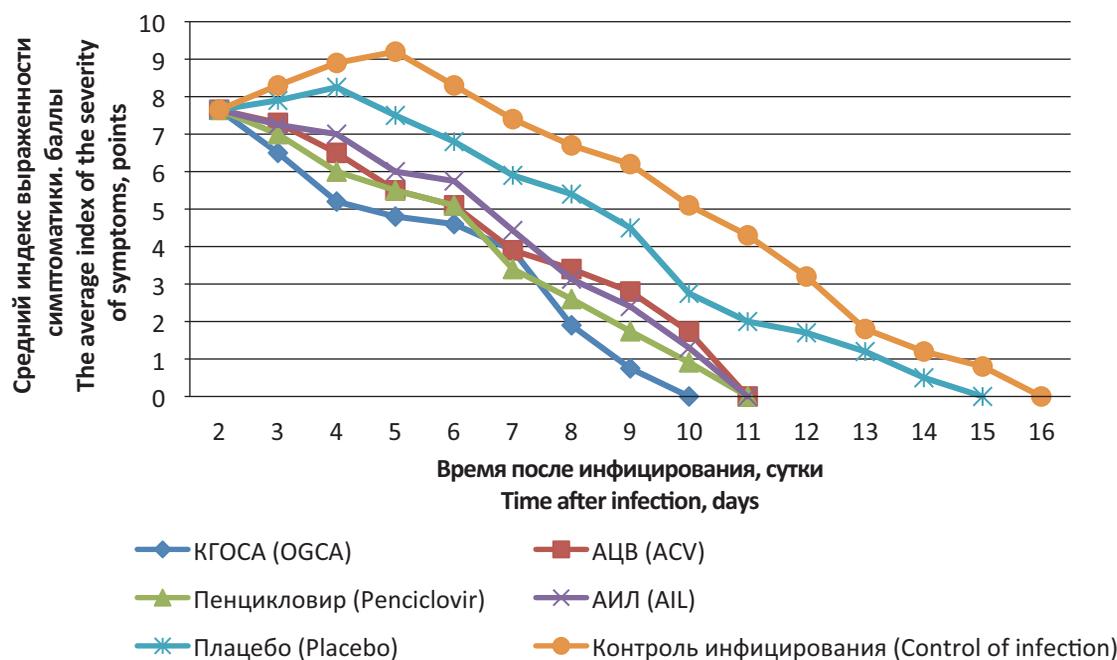
<sup>2</sup> $M$ , the arithmetic mean;  $S_m$  - the standard deviation;

\* – the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ( $p < 0.05$ ,  $U$  – the the Mann–Whitney criterion);

<sup>3</sup>the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ( $p < 0.05$ ,  $t$  – the Student’s criterion);

<sup>4</sup>the level of virus accumulation in flushes from the urogenital region taken on the 5<sup>th</sup> day after infection;

TCID<sub>50</sub>, tissue culture infectious dose.



**Рис. 3.** Влияние КГОСА на течение герпесвирусной инфекции у самцов морских свинок при использовании через 48 ч после инфицирования.

**Fig. 3.** The effect of OGCA on the course of herpesvirus infection in male guinea pigs when applied 48 hours after infection.

вируса во всех группах, в т.ч. у 80% (4/5) контрольных животных и у 60% (3/5) – в группе плацебо до  $3,0 \pm 0,2 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$  и у 20% (1/5) особей, получавших КГОСА или АЦВ, – до  $1,5 \pm 0,1 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$  ( $p < 0,05$  в сравнении с контролем). Позже 7 сут от момента инфицирования вирус не был выделен ни у одного животного, получавшего КГОСА или АЦВ.

Несмотря на то, что применение основы геля КГОСА 5 раз в день на протяжении 5 сут приводило к снижению СПЗ на 1,8 сут и определённому терапевтическому эффекту (ИЛД 18,47 баллов) по сравнению с аналогичными показателями у инфицированных животных, не получавших лечения, его выраженность не достигала статистической значимости ( $p > 0,05$ ). Также не установлено достоверного влияния плацебо на уровень репликации вируса в урогенитальной области ( $p > 0,05$ ). Данный факт свидетельствует о том, что основа геля КГОСА не обладает противовирусной активностью. В то же время её использование приводило к уменьшению выраженности воспалительных изменений у инфицированных животных, что, по-видимому, обусловлено входящими в её рецептуру компонентами.

Лечение с использованием КГОСА, начатое спустя 48 ч после заражения, у животных с выраженными симптомами ГГ (наличие везикул, гиперемии, отёка) воспроизводит клиническую ситуацию, при которой пациент с теми или иными признаками заболевания обращается за медицинской помощью. В условиях данного эксперимента у 30 инфицированных особей перед рандомизацией был проведён анализ смывов с очагов поражения, подтвердивший специфичность симптомов ГГ и позволивший разделить подопытных на равнозначные группы. Результаты отсроченного применения КГОСА

и референс-препаратов у инфицированных животных представлены в **табл. 3** и на **рис. 3**.

На фоне терапии КГОСА у животных с выраженными проявлениями ГГ отмечено замедление прогрессирования симптомов заболевания уже через 1 сут от начала медикаментозного вмешательства (**рис. 3**) по сравнению как с получавшими референс-препараты/плацебо, так и с особями без лечения. На 5 сут после заражения КГОСА превосходил по влиянию на выраженность симптоматики и значению ИЛД все используемые в опыте референс-препараты. Несмотря на то что величина ИЛД в случае КГОСА превышала таковую для препарата АЦВ на 8,94%, а для пенцикловира – на 7,59%, данные различия не были достоверными ( $p > 0,05$ ), в то время как различия по этому параметру с комбинированным препаратом АИЛ на 13,02% оказались статистически значимыми ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что КГОСА по влиянию на СПЗ у инфицированных особей был сопоставим с референс-препаратами. Так, 3% крем АЦВ и мазь АИЛ достоверно снижали СПЗ с  $15,3 \pm 1,25$  сут (без лечения) в среднем до 10,4 сут, а 1% крем Пенцикловир – до  $9,5 \pm 1,5$  сут. Значимых различий между показателями эффективности КГОСА в виде геля для наружного применения и референс-препаратов (АЦВ, пенцикловир) по влиянию на динамику инфекционного процесса и СПЗ не было выявлено. Несмотря на то что применение основы геля КГОСА приводило к определённому терапевтическому воздействию (ИЛД 14,1%) и снижению СПЗ до  $14,0 \pm 1,5$  сут, по выраженности лечебного эффекта оно уступало как КГОСА, так и референс-препаратам.

Для оценки влияния отсроченной терапии КГОСА на частоту и продолжительность выделения ВПГ-2, а также уровень его репликации у инфицированных животных проведено изучение образцов смывов, взятых с очагов поражения, с использованием стандартной методики на культуре клеток Vero. Результаты представлены в **табл. 4** и на **рис. 4**.

Установлено, что через 5 сут после заражения у животных в группах контроля и плацебо частота выделения вируса не изменилась по сравнению со 2-ми сут после заражения и составила 100% (**рис. 4**). В то же время среди подопытных, получавших КГОСА или содержащие АЦВ препараты, этот показатель снизился со 100 до 60%, а у получавших пенцикловир – до 40%. Через 7 сут после инфицирования во всех группах наблюдали дальнейшее снижение частоты выделения вируса, наиболее выраженное у особей, получавших КГОСА или референс-препараты (20% против 80 и 60% у животных в группах контроля или плацебо соответственно,  $p < 0,05$ ).

Способность препарата сокращать период вирусывыделения служит одним из важных факторов контроля за распространением инфекционного агента. Исследование показало, что терапия как КГОСА, так и референс-препаратами приводила к достоверному сокращению (на 2 сут) времени выделения вируса у инфицированных животных по сравнению с не получавшими лечения/получавшими плацебо, у которых вирус обнаруживался в очагах поражения на протяжении 9 сут.

При отсроченном применении КГОСА эффективно ингибировал репликацию ВПГ-2 у инфицированных особей, о чём свидетельствуют данные, представленные в **табл. 4**.

Поскольку ГГ является самолимитирующейся инфекцией, то через 5 сут после заражения частота выделения вируса и его инфекционная активность снизились во всех группах. У животных, получавших КГОСА, значение последнего параметра уменьшилось по сравнению со 2-ми сут после заражения в среднем в 5 раз (с  $4,25$  до  $3,5$  lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл) и было сопоставимо с таковым у референс-препаратов АЦВ и АИЛ. Наиболее существенное снижение инфекционной активности вируса – на  $1,25$  lg ТЦИД<sub>50</sub> – выявлено среди особей, получавших Пенцикловир.

Через 7 сут после заражения инфекционная активность вируса у морских свинок на фоне лечения КГОСА снизилась более чем в 10 раз по сравнению с предыдущим периодом исследования и была сопоставима с определяемой в образцах смывов у инфицированных животных, получавших референс-препараты. Спустя 9 сут возбудитель был выделен из смывов с урогенитальной области только у 40% (2/5) животных в группе контроля и у 20% (1/5) – в группе плацебо с инфекционной активностью, равной в среднем  $1,83 \pm 0,18$  lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл (**табл. 4, рис. 4**). Изучение образцов смывов с очагов поражений, взятых у инфицированных особей позже указанного срока, как и в первом эксперименте, не выявило наличия вируса ни у одного животного во всех группах.

Таким образом, в опытах по изоляции и титрованию вируса из образцов биоматериала у инфицированных животных с ГГ в культуре клеток Vero нами получены данные о наличии у 3% геля КГОСА противовирусной активности в отношении ВПГ-2. Эти результаты сопоставимы с интенсивностью проявлений ГГ у инфицированных моделей.

**Таблица 4. Влияние КГОСА на инфекционную активность ВПГ-2, выделенного из очагов поражения у инфицированных морских свинок\*** (по данным вирусологического метода)

**Table 4. The effect of OGCA on the infectious activity of HSV-2 isolated from lesions in infected guinea pigs\* (using the virological method)**

Группа животных Group of animals	Число животных в группе, n Number of animals in the group, n	Дни после инфицирования Days after infection				
		2	5	7	9	11
		Титры вируса у животных с выделением вируса ( $M \pm S_m$ ), lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1 мл Virus titers in animals with virus shedding ( $M \pm S_m$ ), lg TCID <sub>50</sub> /0,1 ml				
КГОСА гель OGCA gel	5		$3,5 \pm 0,2^3$	$2,25 \pm 0,25^3$	0	0
Ацикловир крем Aciclovir cream	5		$3,4 \pm 0,11^3$	$2,0 \pm 0,4^3$	0	0
Пенцикловир крем Penciclovir cream	5	$4,25 \pm 0,1^1$ (n = 30)	$3,0 \pm 0,4^3$	$1,75 \pm 0,11^3$	0	0
АИЛ мазь Ail ointment	5		$3,75 \pm 0,15^3$	$2,5 \pm 0,2^2$	0	0
Плацебо (основа геля КГОСА) Placebo (OGCA gel base)	5		$4,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$1,65 \pm 0,1$	0
Контроль инфицирования Infection control	5		$5,25 \pm 0,25$	$3,75 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,25$	0

**Примечание.** <sup>1</sup>титры вируса у 30 инфицированных животных перед началом лечения (через 48 часов после заражения);

<sup>2</sup>различие относительно животных группы контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ , U-критерий Манна-Уитни);

<sup>3</sup>различие относительно животных группы контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ , t-критерий Стьюдента);

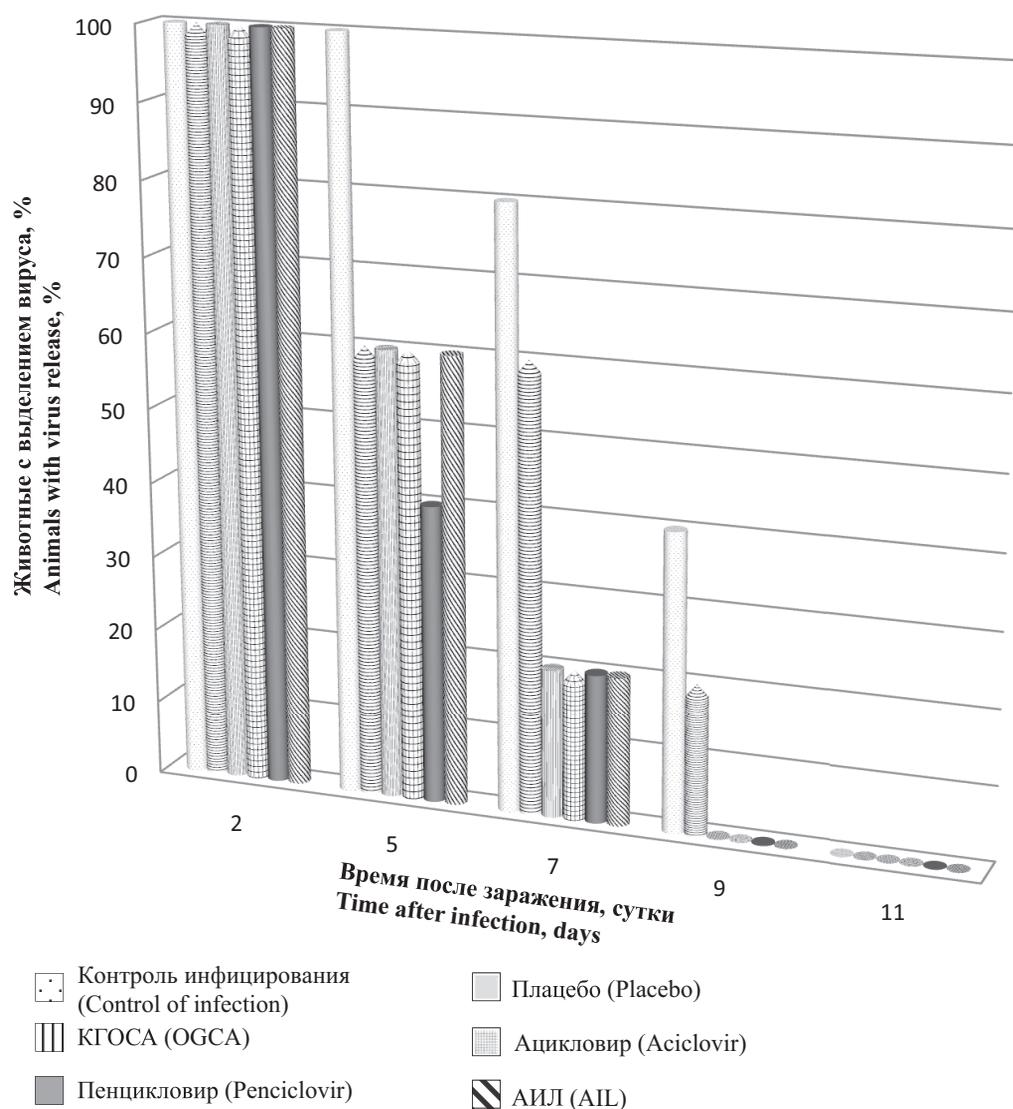
\* – животные с выделением вируса.

**Note.** <sup>1</sup>virus titers in 30 infected animals before starting treatment (48 hours after infection);

<sup>2</sup>the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ( $p < 0.05$ , U – the Mann–Whitney criterion);

<sup>3</sup>the difference compared to the animals in the control group is statistically significant ( $p < 0.05$ , t – the Student's criterion);

\*, animals with virus shedding.



**Рис. 4.** Влияние КГОСА (3% гель) на частоту выделения вируса из очагов поражения у самцов морских свинок, инфицированных ВПГ-2 (по данным вирусологического метода).

**Примечание.** По оси абсцисс – время после заражения, сутки; по оси ординат – доля животных с выделением вируса, %.

**Fig. 4.** The effect of OGCA (3% gel) on the frequency of virus isolation from lesions in male guinea pigs infected with HSV-2 (according to the virological method).

**Note.** X-axis shows the time after infection (days), Y-axis shows the proportion of animals with virus shedding, percentage.

**Контроль токсичности.** Ежедневный осмотр неинфицированных животных, которым наносили на кожу пениса исследуемый гель КГОСА или его основу 5 раз в день в течение 5 сут, показал, что исследуемый препарат и его гелевая основа не обладали раздражающим действием и не оказывали каких-либо видимых побочных эффектов на протяжении всего периода наблюдения. Изменений в поведении и общем состоянии не выявлено ни у одного животного; ни в одном случае не зарегистрировано также наличия покраснения, отёка, зуда, явлений дерматита.

### Обсуждение

В настоящее время основное направление в лечении ГВИ, в том числе и ПГ, подразумевает приме-

нение этиотропных препаратов из группы ациклических нуклеозидов [2, 5, 6]. Одним из наиболее используемых является АЦВ, применяемый в зависимости от клинической формы инфекции и степени её тяжести перорально, парентерально либо местно [2, 5–8]. Хотя АЦВ – эффективное средство терапии ГВИ, его эмпирическое назначение не всегда оказывается успешным [2, 5, 6], так как не исключает рецидивирования заболевания, бессимптомного вирусывыделения, не позволяет провести эрадикацию возбудителя, устранить иммунные нарушения [2] или предотвратить формирование штаммов ВПГ с изменёнными свойствами, устойчивыми к действию препарата [2, 6–8]. Среди значимых причин недостаточной эффективности терапии АЦВ следует отметить

его низкую всасываемость в желудочно-кишечном тракте в результате гидрофильности и невысокой пероральной биодоступности, малую растворимость в воде, сниженную трансдермальную диффузию при использовании топических форм и т.д. [2, 5, 7].

Одним из перспективных подходов к повышению биофармацевтических характеристик АЦВ является синтез его производных по принципу «*me-too drug*», которые легче проникают в клетку и превращаются в ней в целевое вещество, подавляющее размножение ВПГ, а также имеют повышенную биодоступность. Примером таких химически модифицированных пролекарств АЦВ являются валацикловир и фамцикловир [2, 6, 11]. В данной работе нами представлены результаты изучения активности КГОСА (синтезированного в соответствии с указанным принципом) – нового комплексного германий-органического соединения АЦВ.

Из данных литературы известно, что возбудителем ГГ может быть не только ВПГ-2, но и в 30% случаев – ВПГ-1 [3,4], поэтому в настоящем исследовании мы оценивали противовирусную активность КГОСА с использованием нескольких типов ВПГ. Установлено, что вещество *in vitro* эффективно ингибирует вирусную репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2, обладая сравнимой с референс-препаратом АЦВ активностью и не проявляя явной цитотоксичности в концентрации >1000 мкг/мл. Результаты, полученные *in vitro* в отношении ВПГ, в дальнейшем были подтверждены *in vivo* у самцов морских свинок на модели ГГ, вызванного ВПГ-2. Такая модель в настоящее время считается клинически релевантной ситуации у человека, поскольку имитирует различные периоды развития заболевания [16]. Нами показано, что КГОСА (гель 3%) при местном использовании по лечебной схеме обладает достоверной противовирусной активностью в отношении ВПГ-2, выраженность которой зависит от времени его применения. Наиболее значимые результаты получены при его использовании в ранние сроки – через 3 ч после заражения. У инфицированных животных препарат приводил к значимому замедлению прогрессирования симптомов ГГ и снижению СИВС, сокращению продолжительности заболевания по сравнению как с инфицированными особями без лечения, так и с получавшими плацебо (основу геля КГОСА). Установлено также, что КГОСА эффективно снижал репликацию ВПГ, уменьшал частоту и сокращал продолжительность выделения вируса из урогенитальных путей, что согласуется с исходами заболевания у морских свинок, а также может иметь значение для контроля за распространением возбудителя. По эффективности КГОСА оказался сопоставимым с препаратом сравнения АЦВ (крем 5%). Следует отметить, что полученные нами результаты согласуются с данными Е. Керн и соавт. [25], показавших, что у мышей, интравагинально инфицированных ВПГ-2, лечение 1% и 5% АЦВ в виде мази или геля, начатое в ранние сроки (через 3, 6 или 24 ч) после заражения, снижало репликацию вируса, уменьшало тяжесть первичного заболевания и смертность. Описаны положительные эффекты местной терапии ГГ комбинированным препаратом АЦВ в сочетании с IFN

(АИЛ) также при использовании в ранние сроки после инфицирования [2]. Кроме того, у пациентов с этой локализацией герпетического поражения эффективность терапии намного выше, если она начата в первые 24–48 ч от появления начальных признаков заболевания [2].

Лечение с использованием КГОСА, начатое через 48 ч после заражения, у животных с выраженными симптомами ГГ воспроизводило клиническую ситуацию, когда пациент с теми или иными проявлениями заболевания обращается за медицинской помощью. При отсроченном применении (через 48 ч после заражения) препарат подавлял симптомы ГГ и ингибировал репликацию ВПГ-2 у морских свинок так же эффективно, как и препараты сравнения, содержащие АЦВ (АЦВ крем, АИЛ мазь), или пролекарство пенцикловира (Пенцикловир крем). На фоне терапии КГОСА выявлены снижение уровня инфекционной активности вируса, уменьшение частоты и сокращение продолжительности его выделения, что, в свою очередь, подтверждает наличие у препарата противовирусной активности в отношении ВПГ-2.

Что же касается эффективности отсроченного лечения АЦВ, то, по данным Е. Керн и соавт. [25] у мышей, интравагинально инфицированных ВПГ-2, применение 5% АЦВ в виде мази или геля спустя 48–72 ч после заражения приводило к значительному снижению вирусной нагрузки, уменьшению тяжести заболевания, но не влияло на исход ГГ в плане показателей смертности. В то же время в другой работе [26] показана выраженная активность 5% ацикловира монофосфата, 5% крема АЦВ и в меньшей степени 1% крема пенцикловира в отношении ВПГ-1 при орофациальной инфекции у мышей и АЦВ-чувствительного/АЦВ-резистентного ВПГ-2 у инфицированных морских свинок, когда лечение было начато через 24, 48 или 72 ч после заражения.

Как известно, у инфицированных ВПГ людей возможно спонтанное выделение вируса независимо от наличия активной симптоматики; таким образом, вероятность передачи возбудителя является важной проблемой для пациентов с ГГ и их партнёров, в особенности в дискордантных парах [2]. Хотя АЦВ уменьшает репликацию вируса в половых путях, он не способен полностью прекратить его выделение даже на фоне проведения супрессивной терапии [2]. Ранее В.Л. Андроновой и соавт. [27] на модели ВПГ-1-генитальной инфекции у морских свинок показано, что титры вируса в урогенитальных смывах не изменялись после лечения мазью АЦВ или мазью фосфит ациклогуанозина [27]. В настоящем исследовании мы установили, что КГОСА значимо уменьшал инфекционную активность ВПГ-2 и частоту его выделения.

Несмотря на то что в последние годы ведётся активный поиск новых лекарственных средств для лечения ГВИ, интерес к совершенствованию методик и схем применения АЦВ (в частности, топической формы), а также создание его новых модификаций и фармакологических форм не теряют своей актуальности. Мишенью для АЦВ (при местном применении) служит базальный эпидермис. Тем не менее традиционная топиче-

ская терапия препаратом имеет низкую эффективность, обусловленную отсутствием проникновения достаточного его количества в целевой участок кожи. Известно, что количество АЦВ, попадающее после применения 5% крема в базальный слой эпидермиса, составляет всего 30–50% от концентрации, достижимой приёмом внутрь [2]. Одной из причин снижения трансдермальной диффузии АЦВ является охарактеризованная ранее его низкая растворимость в воде. В настоящее время наряду с получением различных модификаций АЦВ проводятся исследования по созданию его новых топических форм (микро-, нанонизированных и т.д.), способных повысить биодоступность вещества, обеспечить его адекватную концентрацию в целевом участке кожи для эффективного подавления репликации ВПГ [29]. На основе указанной технологии разработаны комбинированные препараты, в частности содержащие АЦВ и противовоспалительные соединения – гидрокортизон (крем) [9], кетоконазол (крем, гель, бальзам для губ) [10] либо АЦВ и IFN (мазь) [2], которые применяются в основном для лечения herpes labialis. Ведутся работы по созданию трансмукозальных лекарственных форм АЦВ (гель, крем, бальзам для губ), способных обеспечить проникновение достаточного количества препарата в целевой участок кожи [10]. Рядом исследователей продемонстрировано преимущество использования гелевой основы для разработки топической формы АЦВ в связи с её наибольшей (по сравнению с кремом или бальзамом) проницаемостью через слизистую оболочку [10, 27].

В исследовании К. Rajroot [28] предлагается новый подход к повышению пенетрации АЦВ путём синтеза наноэмульсионной органогелевой системы (органогеля на основе сложных эфиров сорбита, нагруженного молекулами АЦВ), которая в эксперименте показала высокую гелеобразующую способность и эффективность по отношению к ВПГ. В креме Пенцикловир улучшение пенетрации активного вещества достигнуто введением в рецептуру пропиленгликоля и цетмакрогола 1000, которые облегчают проникновение пенцикловира через кожу, стабилизируют компоненты препарата и пролонгируют их действие в инфицированной клетке на протяжении >12 ч [2, 11]. Поэтому при местном нанесении лекарственное средство быстро диффундирует через верхние слои кожи. Пенцикловир быстро переходит в пенцикловира трифосфат, обладающий фармакологической активностью и блокирующий репликацию ВПГ [2, 11]. Данные, полученные в нашей работе относительно активности крема Пенцикловир в отношении ВПГ-2 при использовании через 48 ч после заражения у морских свинок, объясняются именно этим феноменом.

В геле КГОСА проблема повышения биодоступности и проникновения активного вещества решена несколько иначе, чем в приведённых выше случаях. Гель представляет собой пространственно-структурированную водную систему, содержащую 3% комплексного германийорганического соединения АЦВ. Введение в молекулу германийорганического комплекса позволило снизить концентрацию исходного вещества (АЦВ) и из-

менить биофармацевтические характеристики препарата. В частности, достигнуто увеличение растворимости КГОСА в воде (>25% против 0,13% у АЦВ) во всём физиологическом диапазоне pH (в отличие от низкой растворимости АЦВ при pH 4,4–4,5 и 6,8), а также в биорелевантных средах. Вспомогательные вещества, входящие в рецептуру геля (пропиленгликоль, ксилитол, гидроксипропилцеллюлоза, натрия альгинат, полисорбат, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) и др.), обеспечивают ускорение пенетрации КГОСА через верхние слои кожи, стабильность специфической активности и надлежащую микробиологическую чистоту препарата. Включение в состав геля пропиленгликоля позволило ускорить проникновение молекул активного вещества вглубь кожи. Пропиленгликоль представляет собой двухатомный спирт; он нетоксичен, используется как гигроскопическое вещество (увлажнитель), растворитель, стабилизатор и консервант, обладает бактерицидными свойствами, что позволяет минимизировать количественный состав ингредиентов основы. Гелевая основа (не обладающая способностью ингибировать репликацию ВПГ) способствует ускорению пенетрации КГОСА в средние слои эпидермиса, потенцирует лечебное действие вещества, а также снижает выраженность экссудативно-воспалительных проявлений ГГ. Благодаря составляющим гелевой основы КГОСА при нанесении на кожу образует защитную прозрачную микроплёнку, создающую воздухопроницаемую микросреду для ускоренной регенерации повреждённых тканей, а также способствует уменьшению жжения, зуда, выраженности отёчности и других симптомов.

### Заключение

Результаты исследования показывают, что комплексное германийорганическое соединение АЦВ ингибирует репликацию ВПГ-1 и ВПГ-2 в клетках культуры Vero и обладает анти-ВПГ-2-активностью на модели ГГ у морских свинок, приводящей к снижению выраженности симптоматики, тяжести и продолжительности заболевания, снижению инфекционной активности вируса и продолжительности его выделения. Полученные данные позволяют рассматривать КГОСА в качестве основы для разработки средств для лечения ГВИ, обладающих противовирусной активностью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. *Herpes Simplex Viruses*. In: Knipe D.M., Howley P.M., Cohen J.I., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1823–97.
2. Исаков В.А., ред. *Герпесвирусные инфекции человека: руководство для врачей*. СПб.: СпецЛит; 2013.
3. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident Herpes Simplex Virus type 1 infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(10): e0140765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
4. James C, Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M.E., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes Simplex Virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ*. 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
5. Whitley R., Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present and future. *F1000Res*. 2018; 7: 1726. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16157.1>

6. James S.H., Prichard M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* 2014; 8: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.003>
7. Piret J., Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2016; 29(6): 654–62. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
8. Burrel S., Aime C., Hermet L., Ait-Arkoub Z., Agut H., Boutolleau D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 365–72. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.012>
9. Vere Hodge R.A., Field H.J. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00001-9>
10. Viljoen J.M., Botes D., Steenekamp J.H. Formulation and evaluation of selected transmucosal dosage forms containing a double fixed-dose of acyclovir and ketoconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018; 111: 503–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.033>
11. Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 18: 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
12. Исаев А.Д., Манашеров Т.О., Амбросов И.В., Матело С.К. Комплексные соединения германия с производными азотистых оснований пуринового ряда, способы их получения и содержащие их лекарственные средства. Патент РФ RU2487878C1; 2013.
13. Комаров Б.А., Зеленков В.Н., Погорельская Л.В., Албулов А.И. Элемент германий и биологическая активность его соединений. В кн.: *Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты*. М.; 2016: 169–78.
14. Sekhon B.S. Metalloid compounds as drugs. *Res. Pharm. Sci.* 2013; 8(3): 145–58.
15. Cho J.M., Chae J., Jeong S.R., Moon M.J., Shin D.Y., Lee J.H. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *PLoS One.* 2020; 19: 15(10): e0240358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240358>
16. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлёва М.В., Лепяхин В.К., и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I*. М.: Гриф и К; 2012.
17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene.* 1938; 27: 493–7.
18. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2003; 17(1): 41–7. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
19. Алимбарова Л.М., Керимов Т.З., Борзенко С.А. Изучение противовирусной активности жидких сред для хранения роговицы в отношении вируса простого герпеса *in vitro*. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(4): 228–36. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236>
20. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. *Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований*. СПб.: ВМедА; 2002.
21. Cotarello M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cerenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the in vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705–8. <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
22. Kruppenbacher J.P., Klass R., Eggers H.J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time. *Antiviral Res.* 1994; 23(1): 11–22. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90029-9)
23. Novoselova E.A., Alimbarova L.M., Monakhova N.S., Lepioshkin A.Yu., Ekins S., Makarov V.A. In vivo activity of pyrimidine-dispirotriperazine in the male guinea pig model of genital herpes. *J. Virol. Antivir. Res.* 2020; 9(1). [https://doi.org/10.37532/jva.2020.9\(1\).193](https://doi.org/10.37532/jva.2020.9(1).193)
24. Пшеничников В.А., Семёнов Б.Ф., Зезеров Е.Г. *Стандартизация методов вирусологических исследований*. М.: Медицина; 1974.
25. Kern E.R., Richards J.T., Overall J.C., Glasgow L.A. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. I. Topical therapy of type 2 and type 1 infections of mice. *Antiviral Res.* 1983; 3(4): 253–67. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(83\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(83)90004-9)
26. Kern E.R., Palmer J., Szczech G., Painter G., Hostetler K.Y. Efficacy of topical acyclovir monophosphate, acyclovir, or penciclovir in orofacial HSV-1 infections of mice and genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2000; 19(1-2): 501–13. <https://doi.org/10.1080/15257770008033024>
27. Андропова В.Л., Ясько В.М., Куханова М.К., Галегов Г.А., Скоблов Ю.С., Кочетков С.Н. Антигерпесвирусная эффективность фосфита ациклогуанозина, преодолевающего барьер резистентности к ацикловиру. *Acta Naturae.* 2016; 8(1): 81–8.
28. Rajpoot K. Acyclovir-loaded sorbitan esters-based organogel: development and rheological characterization. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017; 45(3): 551–9. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1161639>
29. Rodrigues L.N.C., Zanluchi J.M., Grebogi I.H. Percutaneous absorption enhancers: Mechanisms and potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2007; 50(6): 949–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000700006>

## REFERENCES

1. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. *Herpes Simplex Viruses*. In: Knipe D.M., Howley P.M., Cohen J.I., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., eds. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1823–97.
2. Isakov V.A., ed. *Human Herpesvirus Infections: A Guide for Physicians [Gerpesvirusnye infektsii cheloveka: rukovodstvo dlya vrachey]*. St. Petersburg: SpetsLit; 2013. (in Russian)
3. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident Herpes Simplex Virus type 1 infections in 2012. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140765>
4. James C, Harfouche M., Welton N.J., Turner K.M.E., Abu-Raddad L.J., Gottlieb S.L., et al. Herpes Simplex Virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull. World Health Organ.* 2020; 98(5): 315–29. <https://doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
5. Whitley R., Baines J. Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present and future. *F1000Res.* 2018; 7: 1726. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16157.1>
6. James S.H., Prichard M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. *Curr. Opin. Virol.* 2014; 8: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.06.003>
7. Piret J., Boivin G. Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2016; 29(6): 654–62. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
8. Burrel S., Aime C., Hermet L., Ait-Arkoub Z., Agut H., Boutolleau D. Surveillance of herpes simplex virus resistance to antivirals: a 4-year survey. *Antiviral Res.* 2013; 100(2): 365–72. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.012>
9. Vere Hodge R.A., Field H.J. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 1–38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00001-9>
10. Viljoen J.M., Botes D., Steenekamp J.H. Formulation and evaluation of selected transmucosal dosage forms containing a double fixed-dose of acyclovir and ketoconazole. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018; 111: 503–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.10.033>
11. Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options. *Curr. Opin. Virol.* 2016; 18: 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.01.013>
12. Isaev A.D., Manasherov T.O., Ambrosov I.V., Matelo S.K. Complex compounds of germanium with derivatives of nitrogenous bases of the purine series, methods of their preparation and medicines containing them. Patent RF RU2487878C1; 2013. (in Russian)
13. Komarov B.A., Zelenkov V.N., Pogorel'skaya L.V., Albulov A.I. The element germanium and the biological activity of its compounds. In: *Unconventional Natural Resources, Innovative Technologies and Products [Element germaniy i biologicheskaya aktivnost' ego soedineniy. V kn.: Netraditsionnye prirodnye resursy, innovatsionnye tekhnologii i produkty]*. Moscow; 2016: 169–78. (in Russian)
14. Sekhon B.S. Metalloid compounds as drugs. *Res. Pharm. Sci.* 2013; 8(3): 145–58.
15. Cho J.M., Chae J., Jeong S.R., Moon M.J., Shin D.Y., Lee J.H. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind,

- placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *PLoS One*. 2020; 19; 15(10): e0240358. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240358>
16. Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'ev A.N., Verstakova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., et al. *Guidelines for Conducting Preclinical Research of Medicines. Part 1 [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' I]*. Moscow: Grif i K; 2012. (in Russian)
  17. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50% endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
  18. Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2003; 17(1): 41–7. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(02\)00127-3](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(02)00127-3)
  19. Alimbarova L.M., Kerimov T.Z., Borzenok S.A. Study of the antiviral activity of the liquid corneal storage medium in relation to the herpes simplex virus *in vitro* [Zuchenie protivovirusnoy aktivnosti zhidkikh sred dlya khraneniya rogovitsy v otnoshenii virusa prostogo gerpesa *in vitro*]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 228–36. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-228-236> (in Russian)
  20. Yunkerov V.I., Grigor'ev S.G. *Mathematical and Statistical Processing of Medical Research Data [Matematiko-statisticheskaya obrabotka dannykh meditsinskikh issledovaniy]*. St. Petersburg: VMedA; 2002. (in Russian)
  21. Cotarelo M., Catalán P., Sánchez-Carrillo C., Menasalvas A., Cercenado E., Tenorio A., et al. Cytopathic effect inhibition assay for determining the *in vitro* susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1999; 44(5): 705–8. <http://doi.org/10.1093/jac/44.5.705>
  22. Kruppenbacher J.P., Klass R., Eggers H.J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time. *Antiviral Res.* 1994; 23(1): 11–22. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)90029-9)
  23. Novoselova E.A., Alimbarova L.M., Monakhova N.S., Lepioshkin A.Yu., Ekins S., Makarov V.A. In vivo activity of pyrimidine-dispirotriperazinium in the male guinea pig model of genital herpes. *J. Virol. Antivir. Res.* 2020; 9(1). [https://doi.org/10.37532/jva.2020.9\(1\).193](https://doi.org/10.37532/jva.2020.9(1).193)
  24. Pshenichnikov V.A., Semenov B.F., Zezerov E.G. *Standardization of Methods of Virological Research [Standartizatsiya metodov virusologicheskikh issledovaniy]*. Moscow: Meditsina; 1974. (in Russian)
  25. Kern E.R., Richards J.T., Overall J.C., Glasgow L.A. Acyclovir treatment of experimental genital herpes simplex virus infections. I. Topical therapy of type 2 and type 1 infections of mice. *Antiviral Res.* 1983; 3(4): 253–67. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(83\)90004-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(83)90004-9)
  26. Kern E.R., Palmer J., Szczech G., Painter G., Hostetler K.Y. Efficacy of topical acyclovir monophosphate, acyclovir, or penciclovir in orofacial HSV-1 infections of mice and genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2000; 19(1-2): 501–13. <https://doi.org/10.1080/15257770008033024>
  27. Andronova V.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Galegov G.A., Skoblov Y.S., Kochetkov S.N. Study of Antiherpetic Efficiency of Phosphite of Acycloguanosine Ableto Over come the Barrier of Resistance to Acyclovir. *Acta Naturae*. 2016; 8(1): 74–81.
  28. Rajpoot K. Acyclovir-loaded sorbitan esters-based organogel: development and rheological characterization. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2017; 45(3): 551–9. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1161639>
  29. Rodrigues L.N.C., Zanluchi J.M., Grebogi I.H. Percutaneous absorption enhancers: Mechanisms and potential. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2007; 50(6): 949–61. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000700006>

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



## Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*)

Новиков Д.В.<sup>1</sup>, Мелентьев Д.А.<sup>1,2</sup>, Мохонов В.В.<sup>1</sup>, Кашников А.Ю.<sup>1</sup>, Новикова Н.А.<sup>1</sup>,  
Лапин В.А.<sup>1,2</sup>, Мохонова Е.В.<sup>1</sup>, Новиков В.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 603950, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** Энтеровирусная (неполио) инфекция имеет широкое распространение во всём мире, регистрируется в форме спорадической заболеваемости и масштабных вспышек и может быть причиной такого тяжёлого поражения, как серозный менингит. Эпидемиологические исследования показали, что на территории Российской Федерации у больных энтеровирусным менингитом наиболее часто выявляется вариант энтеровируса (ЭВ) (*Picornaviridae: Enterovirus*) Echovirus 30 (E30). Однако вакцины для профилактики заболевания, вызванного этим возбудителем, до настоящего времени не разработаны. Одним из перспективных современных направлений в плане создания вакцинных препаратов является использование вирусоподобных частиц (ВпЧ), в т.ч. химерных – содержащих биологические структуры вирусов, принадлежащих к различным видам. **Цель** настоящей работы – получение ВпЧ норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих на своей поверхности белок VP1 E30.

**Материал и методы.** В работе использовали нуклеотидные последовательности генов белков VP1 норовируса генотипа GII.4 и VP1 вируса E30 генотипа h, циркулирующих на территории России. На их основе сконструирован белок S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, в котором оболочечный (S) и шарнирный (hinge) регионы VP1 норовируса слиты в одну молекулу с полноразмерным VP1 E30. Данный белок экспрессировали в *E. coli*, очищали методом аффинной хроматографии, после чего характеризовали с использованием электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга. ВпЧ визуализировали методом электронной микроскопии.

**Результаты.** Белок S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> экспрессировался в *E. coli* в нерастворимой форме. Подбор условий для получения его растворимой формы показал, что использование высоких концентраций сахарозы существенно повышает эффективность ренатурации. При сравнении электрофоретической подвижности денатурированного и неденатурированного препаратов S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> установлено, что большинство мономеров образуют соединения со значительной молекулярной массой. С помощью электронной микроскопии показано, что ренатурированный белок S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> самопроизвольно формирует *in vitro* полые ВпЧ диаметром ~50 нм.

**Заключение.** Показана возможность получения *in vitro* химерных ВпЧ норовируса, содержащих на своей поверхности белок VP1 циркулирующего на территории РФ варианта E30. Полученные частицы в дальнейшем могут быть использованы в разработке вакцинных препаратов для профилактики серозного менингита и других заболеваний, вызванных данным ЭВ.

**Ключевые слова:** вирусоподобные частицы; белок VP1 норовируса; белок VP1 энтеровируса Echovirus 30; химерные белки; вакцины

**Для цитирования:** Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Мохонова Е.В., Новиков В.В. Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(5): 383-389. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

**Для корреспонденции:** Новиков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: [novikov.dv75@mail.ru](mailto:novikov.dv75@mail.ru)

**Участие авторов:** Новиков Д.В. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи; Мелентьев Д.А. – проведение экспериментальных работ; Мохонов В.В. – проведение экспериментальных работ; Кашников А.Ю. – проведение экспериментальных работ; Новикова Н.А. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи; Лапин В.А. – проведение экспериментальных работ; Мохонова Е.В. – проведение экспериментальных работ; Новиков В.В. – проведение экспериментальных работ, написание текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

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

Поступила 27.08.2021  
Принята в печать 07.10.2021  
Опубликована 31.10.2021

## ORIGINAL ARTICLE

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

## Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*)

Dmitry V. Novikov<sup>1</sup>, Dmitriy A. Melentev<sup>1,2</sup>, Vladislav V. Mokhonov<sup>1</sup>, Alexander Yu. Kashnikov<sup>1</sup>, Nadezhda A. Novikova<sup>1</sup>, Vladislav A. Lapin<sup>1,2</sup>, Ekaterina V. Mokhonova<sup>1</sup>, Viktor V. Novikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

<sup>2</sup>FSAEI HE «National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod» of the Ministry of Education and Science of Russia, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

**Introduction.** Enterovirus (nonpolio) infection is widespread all over the world, registered as sporadic cases and large-scale outbreaks and can cause severe lesions such as serous meningitis. Epidemiological studies have shown that enterovirus (*Picornaviridae: Enterovirus*) variant Echovirus 30 (E30) is the most frequently detected variant in patients with enterovirus meningitis in the Russian Federation. However, no vaccines to prevent the disease caused by this pathogen have been developed so far. One of the promising modern trends in terms of creating vaccine preparations is the use of virus-like particles (VLPs), including chimeric ones containing the biological structures of viruses belonging to different species.

The aim of this work was to obtain norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) VLPs displaying enterovirus Echovirus E30 full-length VP1 on the surface.

**Material and methods.** The nucleotide sequences of VP1 protein of norovirus genotype GII.4 and VP1 E30 of genotype h circulating in Russia were used. The S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> protein was constructed, in which the shell (S) and the hinge regions of the norovirus VP1 are fused into one molecule with the full-length VP1 of the E30 virus. The protein was expressed in *E. coli*, purified using affinity chromatography, and characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and immunoblotting. VLPs were visualized by electron microscopy.

**Results.** The S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> protein expressed in *E. coli* as insoluble form, so the conditions for S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> solubilisation were defined. Sucrose has been shown to significantly increase the efficiency of renaturation. Electrophoretic mobility comparison of denatured and non-denatured S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> demonstrated that most monomers form high molecular weight compounds. Electron microscopy showed that renatured S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> spontaneously forms empty virus-like particles about 50 nm in diameter.

**Conclusion.** Chimeric protein S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> self-assemble into VLPs displaying the VP1 protein of E30 variant that is highly prevalent in Russia. Further immunological research is necessary to characterize VLPs potential for development of the vaccine for enteroviral meningitis prevention.

**Key words:** virus-like particles; norovirus VP1 protein; Echovirus 30 VP1 protein; chimeric proteins; vaccines

**For citation:** Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V. Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(5): 383-389 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>

**For correspondence:** Dmitry V. Novikov, Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Lead Researcher of the Immunochemistry Laboratory, FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: [novikov.dv75@mail.ru](mailto:novikov.dv75@mail.ru)

**Information about the authors:**

Novikov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Melentev D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2441-6874>

Mokhonov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8542-5723>

Kashnikov A.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

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

Lapin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-5905-5722>

Mokhonova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-9742-7646>

Novikov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

**Contribution:** Novikov D.V. – performing the experiments, writing of the text; Melentev D.A. – performing the experiments; Mokhonov V.V. – performing the experiments; Kashnikov A.Yu. – performing the experiments; Novikova N.A. – performing the experiments, writing of the text; Lapin V.A. – performing the experiments; Mokhonova E.V. – performing the experiments; V.V. Novikov – performing the experiments, writing of the text.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

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

Received 27 August 2021  
Accepted 07 October 2021  
Published 31 October 2021

## Введение

Энтеровирусы (ЭВ) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*, порядок *Picornavirales*) – многочисленная группа безоболочечных РНК-содержащих вирусов, циркуляция которых показана во всём мире [1]. Неполиомиелитные ЭВ способны вызывать различные по клинической картине и степени тяжести заболевания преимущественно у детей первых лет жизни. Энтеровирусная инфекция может проявляться в форме экзантемы полости рта и конечностей (hand, foot and mouth disease, HFMD), герпангины, менингита, менингоэнцефалита, энцефалита, полинейропатии, вялого паралича, миокардита и др. Тяжесть течения болезни варьирует от умеренного ухудшения самочувствия с субфебрильным повышением температуры тела до мультисистемных проявлений с поражением сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Часто ЭВ имеют эпидемическое распространение, охватывающее большие группы детского населения [2].

На основе генетических характеристик и антигенных свойств ЭВ разделены на 4 вида (А–D), среди которых наиболее распространены вирусы, относящиеся к видам *Enterovirus A* (ЭВ-А) и *Enterovirus B* (ЭВ-В) [3]. Из них ЭВ-А (*Enterovirus A71*; *Coxsackievirus A6*, *A10*, *A16* и др.) наиболее часто вызывают HFMD у детей младшего возраста. Подавляющее большинство заболевших полностью выздоравливают через 7–10 сут. Однако в некоторых случаях развиваются выраженные осложнения, вызванные поражением центральной нервной системы; описаны единичные летальные исходы. Представители вида ЭВ-В (*Coxsackievirus B3*, *B5*; *Echovirus 25*, *30*) чаще связаны с такими серьёзными заболеваниями, как миокардит, асептический менингит, энцефалит и гепатит, нередко приводящими к инвалидности или смерти [4]. В этой группе особо выделяются вирусы ЕСНО (*англ.* enteric cytopathic human orphan viruses, букв. – кишечные цитопатогенные человеческие орфанные вирусы), поскольку они являются причиной асептического менингита и энцефалита не только у детей, но и у взрослых [5].

ЭВ регистрируются повсеместно, однако в странах Юго-Восточной Азии наибольшее эпидемическое значение имеют ЭВ-А, а в государствах, расположенных на территориях Европы и Северной Америки, – ЭВ-В [6, 7]. Эпидемиологические исследования распространённости ЭВ на территории Российской Федерации показали, что в последнее время у детей и взрослых, больных энтеровирусным менингитом, наиболее часто выявляется *Echovirus 30* (E30) [8].

В мировой практике с целью профилактики энтеровирусной инфекции разрабатываются вакцины главным образом для предотвращения экзантемных поражений, вызванных *Enterovirus A71*, *Coxsackievirus A6*, *A10*, *A16*. В отношении ЭВ-В подобные разработ-

ки направлены на *Coxsackievirus B3*, являющийся основной причиной миокардита [9]. В то же время в мире и в России часто регистрируются эпидемические подъёмы заболеваемости, обусловленные вариантом E30 [10], однако вакцина для профилактики вызываемых им заболеваний отсутствует.

Ранее была предложена универсальная платформа на основе белка VP1 норовируса (*Caliciviridae*; *Norovirus*) для презентации вирусных антигенов (АГ). Такой подход позволяет получать вирусоподобные частицы (ВпЧ), на поверхности которых представлены различные АГ, пригодные для использования в составе вакцинных препаратов. Показано, что полученные в *E. coli* белки, состоящие из аминокислотной последовательности S-домена VP1, слитого в одну молекулу с фрагментами аналогичных последовательностей VP8 ротавируса (*Reoviridae*; *Sedoreovirinae*: *Rotavirus*), гемагглютинина вируса гриппа А (*Orthomyxoviridae*: *Influenza A virus*) (H7N9) или капсидного белка вируса гепатита Е (*Hepeviridae*; *Hepevirus*: *Hepatitis E virus*), способны формировать ВпЧ, имеющие на своей поверхности добавленные пептиды. Иммунизация лабораторных животных химерными структурами, созданными согласно данному принципу, приводила к продукции нейтрализующих антител в высоких титрах [11, 12]. Цель настоящей работы – получение ВпЧ норовируса, содержащих на поверхности белок VP1 E30.

## Материал и методы

**Конструирование слитого белка.** В работе использовали нуклеотидные последовательности генов белков VP1 норовируса генотипа GI.4 (GenBank No. MZ958411) и VP1 E30 генотипа h (GenBank No. KP090772), штаммов, циркулирующих на территории РФ. Конструирование слитого гена проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей с использованием пакета программ Lasergene (Dnastar, Inc., США). Оптимизацию кодонов осуществляли на основе информации, представленной в базе данных Codon usage database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). ДНК синтезировали в ООО «Люмипроб РУС» (Россия) и клонировали в составе плазмиды pET22b (Novagen, США).

**Экспрессия и очистка рекомбинантного белка.** Для экспрессии рекомбинантного белка использовали штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Novagen, США), клетки которой трансформировали плазмидой, кодирующей рекомбинантный белок, с применением мультипоратора Eppendorf (Германия). *E. coli* выращивали при 37 °С в среде LB (lysogeny broth) (1% триптон, 2% дрожжевой экстракт, 0,9% NaCl и 100 мкг/мл ампициллина) до оптической плотности 0,7. Экспрессию индуцировали добавлени-

ем изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до концентрации 0,5 мМ, после чего культуру инкубировали на протяжении 6 ч при 30 °С. Клетки осаждали низкоскоростным центрифугированием, однократно отмывали в 0,9% NaCl и лизировали с использованием реагента BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США) согласно рекомендациям производителя. Лизат разделяли центрифугированием при 12 000 g в течение 15 мин на растворимую и осадочную белковые фракции. Последнюю с целью очистки рекомбинантного белка растворяли в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl, 6 М гуанидина гидрохлорида, 150 мМ NaCl (pH 7,5), и затем выполняли аффинную хроматографию с использованием сорбента IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, Швеция) согласно рекомендациям производителя для денатурирующих условий. Ренатурацию белка осуществляли методом диализа против 3000 объёмов буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl и 20%, 10% или 5% сахарозы (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>).

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка в растворе определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, США) при длине волны 280 нм. Эффективность ренатурации белка оценивали путём сравнения концентрации растворимого белка до и после диализа. Значение концентрации до диализа принимали за 100%.

**Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг.** Все этапы экспрессии и очистки рекомбинантного белка контролировали методом электрофореза белков в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Денатурацию белков проводили в течение 5 мин при 100 °С в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 6,8), 100 мМ дитиотреитола, 2% ДСН и 4 М мочевины. При исследовании олигомерного состояния белки наносили на гель в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl (pH 6,8), 2% ДСН и 20% глицерина. Результаты визуализировали окрашиванием геля с помощью красителя Coomassie brilliant blue R-250 (Imperial Chemical Industries PLC, Великобритания). Использовали маркер молекулярных масс Thermo Scientific PageRuler Unstained Protein Ladder (10 to 200 kDa) (ThermoFisher Scientific). Интенсивность окрашивания белковых полос оценивали при помощи компьютерной программы C-DiGit (LI-COR, США). Для проведения иммуноблоттинга белки переносили из геля на мембрану из поливинилиденфторида (ПВДФ; PVDF) (ThermoFisher Scientific) посредством системы влажного переноса (Bio-Rad, США). Контроль переноса и определения молекулярной массы осуществляли с использованием маркера PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific), представляющего собой смесь 9 белков (от 10 до 250 кДа), окрашенных синим, оранжевым и зелёным. Мембрану блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BCA; BSA) в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS) и инкубировали с антителами anti-His-HRP:GG1-6F4.3.2 (Miltenyi Biotec, США). После этого мембрану окрашивали в растворе субстрата SuperSignal West

Dura Extended Duration Substrate kit (ThermoFisher Scientific) и измеряли хемилюминесценцию при помощи сканера C-DiGit Blot Scanner (LI-COR), также в соответствии с рекомендациями производителей.

**Электронная микроскопия.** В экспериментах использовали трансмиссионную электронную микроскопию. На электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой плёнкой, нанесли 5 мкл раствора белка в концентрации 100 мкг/мл, отмывали водой от несвязавшихся компонентов и окрашивали водным раствором 2% уранилацетата (pH 4,5). Образцы просматривали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония).

### Результаты

На основе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих белки VP1 норовируса генотипа GI.4 и VP1 вируса E30 генотипа h, создана генетическая конструкция S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, состоящая из слитых в одну молекулу последовательностей, кодирующих оболочечный (S) и шарнирный (hinge) регионы VP1 норовируса, полноразмерный белок VP1 E30 и последовательности, кодирующей 6 молекул гистидина (His, H). Структурная организация слитого белка S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> схематически показана на **рис. 1**. Для более эффективного образования ВпЧ триплеты, кодирующие аминокислоты в позициях 57, 58 и 136 S-региона VP1 норовируса, заменены на нуклеотиды, кодирующие цистеин (Cys, C), как предложено ранее [11]. Нуклеотидная последовательность оптимизирована для экспрессии в *E. coli* и помещена под контроль регуляторных элементов бактериофага T7 в составе плазмиды pET22b.

Результаты экспрессии белка S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> в *E. coli* представлены на **рис. 2**. После индукции в *E. coli* нарабатывался дополнительный белок (**рис. 2, а**). Методом иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител против последовательности из 6 молекул гистидина подтверждена экспрессия S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> (**рис. 2, б**). При сравнении набора белков *E. coli* в растворимой и осадочной фракциях установлено, что S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> присутствовал в нерастворимой форме (**рис. 2, в**). В связи с этим осадочную белковую фракцию растворяли в буфере, содержащем 6 М гуанидина гидрохлорида, и выделяли S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>, содержащий гистидиновый «хвост», методом аффинной хроматографии. Электрофоретическая подвижность очищенного искомого белка совпадала с расчётной (**рис. 2, г**).

Для ренатурации белка S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> использовали предложенный ранее метод стабилизации ВпЧ норовируса. J. Kissmann и соавт. показали, что высокие концентрации различных сахаров оказывают стабилизирующий эффект на вторичную и третичную структуру мономеров ВпЧ этого вируса [13]. В нашем исследовании наблюдался сходный эффект высоких концентраций сахаров по отношению к белку S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub>. Диализ против содержащего 20% сахарозы буферного раствора позволил ренатурировать до 97% количества S<sub>N</sub>-VP1<sub>E30</sub> (**рис. 3**).

Ренатурированный в 20% сахарозе препарат исследовали на способность мономеров  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> к образованию межмолекулярных связей. Сравнение электрофоретической подвижности денатурированного и неденатурированного препаратов исследуемого белка показало, что большинство мономерных структур образуют соединения со значительной молекулярной массой, детектируемые в начале геля (рис. 4, а). Способность мономеров  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> формировать ВпЧ изучали методом электронной микроскопии, при проведении которой в препарате белка обнаружены сферические ВпЧ размером ~50 нм. Данные частицы были окрашены изнутри (рис. 4, б),

что характерно для полых образований. Полученные результаты свидетельствуют о способности химерной белковой структуры, состоящей из S-фрагмента VP1 норовируса и полноразмерного белка VP1 энтеровируса E30, к самосборке.

### Обсуждение

Несмотря на широкое распространение вируса E30 и его доказанную связь с возникновением энтеровирусного менингита и других заболеваний, данный вирус является одним из наименее изученных представителей ЭВ. Основные представления о строении их вириона и жизненном цикле получены на примере

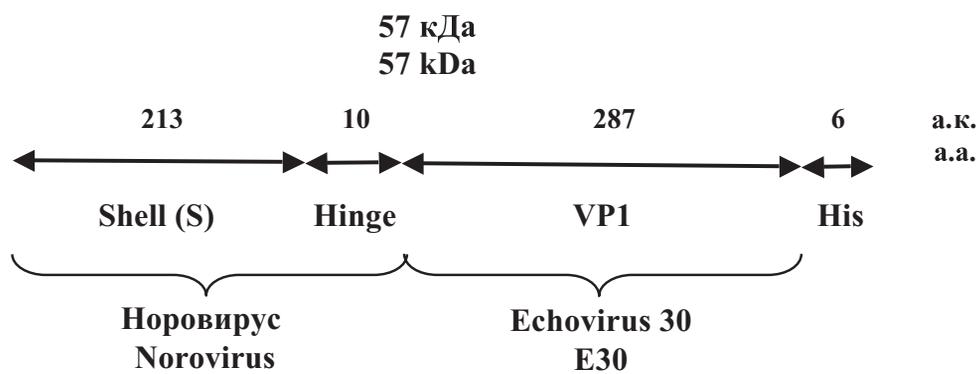


Рис. 1. Схема организации слитого белка  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub>.

Shell (S) – аминокислотный домен белка VP1 норовируса; Hinge – шарнирный регион VP1 норовируса; VP1 – полноразмерный белок VP1 вируса E30; His – последовательность из 6 гистидинов.

Fig. 1. Scheme of the fusion protein.

Shell (S), norovirus VP1 amino-terminal domain; Hinge, norovirus VP1 hinge region; VP1, E30 virus full-length VP1 protein; His, sequence of six six histidines.

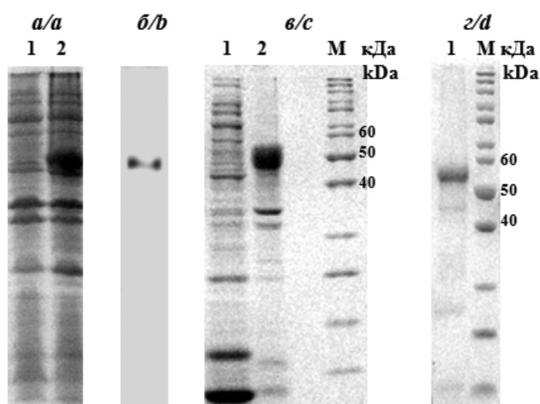


Рис. 2. Экспрессия белка  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> в *E. coli*.

а) – сравнение белков *E. coli* до (1) и через 6 ч после (2) индукции экспрессии; б) – подтверждение экспрессии белка  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> иммуноблоттингом; в) – состав белков *E. coli* в растворимой (1) и нерастворимой (2) фракциях; г) – электрофоретическая подвижность очищенного  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> (1); М – маркеры молекулярной массы.

Fig. 2. Expression of  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> protein in *E. coli*.

а), comparison of *E. coli* proteins before (1) and 6 hours after induction of expression (2); б), confirmation of  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> protein expression by immunoblotting; в), *E. coli* protein composition in soluble (1) and insoluble (2) fractions; г), electrophoretic mobility of purified  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> (1); М, molecular weight markers.

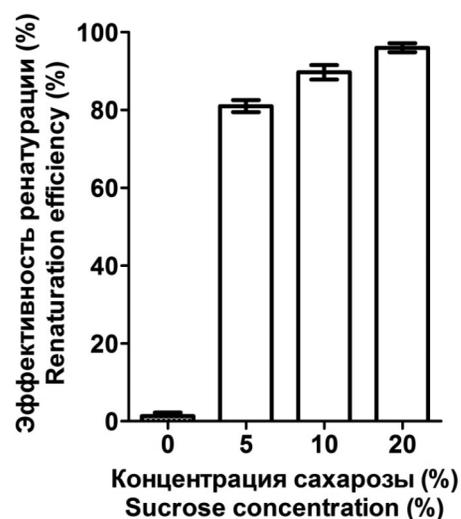
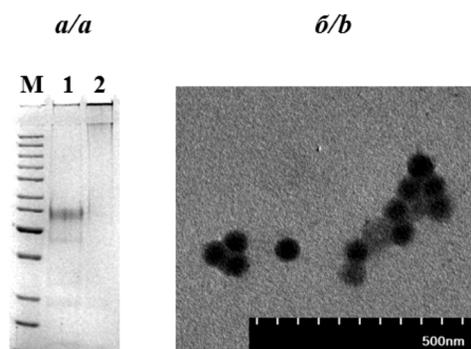


Рис. 3. Зависимость эффективности ренатурации белка  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> от концентрации сахарозы.

Fig. 3. The efficiency of  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> protein renaturation depending on the sucrose concentration.



**Рис. 4.** Самосборка белка  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub>.

a) – сравнение электрофоретической подвижности денатурированного (1) и неденатурированного (2)  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub>; б) – вирусоподобные частицы, образованные белком  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub>; электронная микрофотография, увеличение  $\times 12\,000$ .

**Fig. 4.** Self-assembly of the  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> protein.

a), comparison of the electrophoretic mobility of denatured (1) and non-denatured (2)  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub>; b), virus-like particles formed by the  $S_N$ -VP1<sub>E30</sub> protein; electron microphotograph, 12,000 $\times$  magnification.

Enterovirus A71, Coxsackievirus A16 и A6. К настоящему времени известно, что основной капсидный белок VP1 этих вирусов формирует поверхностные структуры вириона, отвечающие за распознавание рецептора на клетке. На поверхности VP1 ЭВ обнаружены как конформационные, так и линейные нейтрализующие эпитопы, что делает данный белок основным кандидатом для разработки типоспецифических вакцин [14].

Поскольку основной группой риска заболеваний, вызванных ЭВ, являются дети младшего возраста, разработка безопасных вакцинных препаратов на основе пептидов, содержащих нейтрализующие эпитопные последовательности, считается привлекательным и многообещающим подходом. Однако по сравнению с вакцинами на основе убитых или аттенуированных вирусов небольшие синтетические пептиды обладают слабой иммуногенностью [15]. В то же время ВпЧ имеют морфологию вириона и являются оптимальными системами доставки, обеспечивающими презентацию нейтрализующих эпитопов иммунной системе. Обладая способностью эффективно взаимодействовать с антигенпрезентирующими клетками, указанные частицы максимизируют иммуногенный потенциал и защитные свойства антител [16].

На сегодняшний день разработано множество подходов использования ВпЧ в качестве векторов для презентации АГ [12, 17, 18]. Нами сконструированы химерные ВпЧ, построенные на основе белка капсида норовируса. Выбор данной модели связан со способностью норовирусных ВпЧ вызывать сильный иммунный ответ на слизистой оболочке, что даёт перспективу для разработки эффективной мукозальной вакцины [19]. Путём генетических манипуляций в белке VP1 норовируса представленный на поверхности вириона Р-домен (англ. protruding – выступающий) заменён на полноразмерный VP1 вируса E30. Поскольку поверхностные белки вириона ЭВ не гли-

козируются, экспрессия рекомбинантного белка осуществлялась в клетках *E. coli*. Полученный слитый белок использован для сборки ВпЧ *in vitro*.

Стратегия получения подобных частиц ЭВ *in vivo* в клетках насекомых (*Insecta*) или дрожжей (*Ascomycota*, *Basidiomycota*) для последующего использования в качестве АГ в составе вакцин описана для Enterovirus A71, вируса Coxsackievirus A16 и Enterovirus D68 [20, 21]. При использовании такого подхода капсидные белки собираются в ВпЧ внутри клеток-хозяев. Это приводит к инкапсулированию внутрь ВпЧ ассоциированных с клеткой-хозяином загрязнений, потенциально способных вызвать нежелательный иммунный ответ, в т.ч. аллергические реакции [22]. В нашей работе показана возможность самосборки *in vitro* химерных ВпЧ, презентующих на своей поверхности VP1 E30. Для сборки используется очищенный белок, что препятствует встраиванию в частицу нежелательных примесей. Кроме этого, методология сборки *in vitro* предоставляет возможность смешивать в составе частицы различные белки, что в перспективе позволит получать ВпЧ, содержащие АГ от разных генотипов E30 либо смесь белков ЭВ разных типов в одной частице. Апробированная в данной работе методика создания химерных ВпЧ на основе платформы из капсидного белка норовируса открывает возможности разработки поливалентной энтеровирусной вакцины, а также быстрой замены АГ в случае появления новых эпидемических вариантов ЭВ.

#### Заключение

В настоящей работе получены ВпЧ, состоящие из химерной рекомбинантной белковой структуры, включающей слитые с полноразмерным белком VP1 энтеровируса E30 S-домен и шарнирную часть белка VP1 норовируса. Поскольку поверхностные белки вириона ЭВ не гликозируются, для наработки рекомбинантного белка применена одна из самых простых и недорогих систем экспрессии – *E. coli*. Использование способности химерного белка к самосборке в условиях *in vitro* открывает перспективы формирования ВпЧ, содержащих АГ от разных генотипов вируса E30 или смесь белков ЭВ разных типов. Последующее изучение свойств сконструированных химерных ВпЧ позволит оценить их потенциал в качестве возможного прототипа вакцины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*. 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
2. Mao Q., Wang Y., Bian L., Xu M., Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg. Microbes Infect.* 2016; 5(7): e75. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.73>
3. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
4. Xu W., Liu C., Yan L., Li J., Wang L., Qi Y., et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications. *Virol. J.* 2012; 9: 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-8>
5. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpaa R., Hukkanen V., Marttila R.J., Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in

- an adult population. *Neurology*. 2006; 66(1): 75–80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000191407.81333.00>
6. Chang L.Y., Lin H.Y., Gau S.S., Lu C.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7>
  7. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., Nix W.A., Oberste M.S., Gerber S.I. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009–2013. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2015; 64(34): 940–3. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6434a3>
  8. Голицына Л.Н., Зверев В.В., Селиванова С.Г., Пономарёва Н.В., Кашников А.Ю., Созонов Д.В., и др. Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг. *Здоровье населения и среда обитания*. 2019; (8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38>
  9. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From monovalent to multivalent vaccines, the exploration for potential preventive strategies against hand, foot, and mouth disease (HFMD). *Viol. Sin.* 2021; 36(2): 167–75. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00294-3>
  10. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M.C., Gomez R.M., et al. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019; 531: 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
  11. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776>
  12. Tan M., Huang P., Xia M., Fang P.A., Zhong W., McNeal M., et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J. Virol.* 2011; 85(2): 753–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01835-10>
  13. Kissmann J., Ausar S.F., Foubert T.R., Brock J., Switzer M.H., Detzi E.J., et al. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(10): 4208–18. <https://doi.org/10.1002/jps.21315>
  14. Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: Structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
  15. Dudek N.L., Perlmutter P., Aguilar M.I., Croft N.P., Purcell A.W. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(28): 3149–57. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>
  16. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*. 2018; 6(3): 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030037>
  17. Anggraeni M.R., Connors N.K., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Middelberg A.P. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle. *Vaccine*. 2013; 31(40): 4428–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.087>
  18. Rivera-Hernandez T., Hartas J., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Good M., et al. Self-adjuvanting modular virus-like particles for mucosal vaccination against group A streptococcus (GAS). *Vaccine*. 2013; 31(15): 1950–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.013>
  19. Tacket C.O., Sztejn M.B., Losonsky G.A., Wasserman S.S., Estes M.K. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin. Immunol.* 2003; 108(3): 241–7. [https://doi.org/10.1016/s1521-6616\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s1521-6616(03)00120-7)
  20. Zhao H., Li H.Y., Han J.F., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li X.F., et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against both enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in mice. *Sci. Rep.* 2015; 5: 7878. <https://doi.org/10.1038/srep07878>
  21. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potentially induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
  22. Le D.T., Müller K.M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life (Basel)*. 2021; 11(4): 334. <https://doi.org/10.3390/life11040334>
  1. Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses*. 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
  2. Mao Q., Wang Y., Bian L., Xu M., Liang Z. EV-A71 vaccine licensure: a first step for multivalent enterovirus vaccine to control HFMD and other severe diseases. *Emerg. Microbes Infect.* 2016; 5(7): e75. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.73>
  3. Zell R., Delwart E., Gorbalenya A.E., Hovi T., King A.M.Q., Knowles N.J., et al. ICTV virus taxonomy profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(10): 2421–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000911>
  4. Xu W., Liu C., Yan L., Li J., Wang L., Qi Y., et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications. *Viol. J.* 2012; 9: 8. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-8>
  5. Kupila L., Vuorinen T., Vainionpää R., Hukkanen V., Marttila R.J., Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology*. 2006; 66(1): 75–80. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000191407.81333.00>
  6. Chang L.Y., Lin H.Y., Gau S.S., Lu C.Y., Hsia S.H., Huang Y.C., et al. Enterovirus A71 neurologic complications and long-term sequelae. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26(1): 57. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0552-7>
  7. Abedi G.R., Watson J.T., Pham H., Nix W.A., Oberste M.S., Gerber S.I. Enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2009–2013. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2015; 64(34): 940–3. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6434a3>
  8. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Selivanova S.G., Ponomareva N.V., Kashnikov A.Yu., Sozonov D.V., et al. Etiological structure of enterovirus infection in the Russian Federation in 2017–2018 [Этиологическая структура энтеровирусных инфекций в Российской Федерации в 2017–2018 гг.]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2019; (8): 30–8. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-30-38> (in Russian)
  9. He X., Zhang M., Zhao C., Zheng P., Zhang X., Xu J. From monovalent to multivalent vaccines, the exploration for potential preventive strategies against hand, foot, and mouth disease (HFMD). *Viol. Sin.* 2021; 36(2): 167–75. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00294-3>
  10. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M.C., Gomez R.M., et al. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*. 2019; 531: 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
  11. Xia M., Huang P., Sun C., Han L., Vago F.S., Li K., et al. Bioengineered norovirus S60 nanoparticles as a multifunctional vaccine platform. *ACS Nano*. 2018; 12(11): 10665–82. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02776>
  12. Tan M., Huang P., Xia M., Fang P.A., Zhong W., McNeal M., et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J. Virol.* 2011; 85(2): 753–64. <https://doi.org/10.1128/JVI.01835-10>
  13. Kissmann J., Ausar S.F., Foubert T.R., Brock J., Switzer M.H., Detzi E.J., et al. Physical stabilization of Norwalk virus-like particles. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(10): 4208–18. <https://doi.org/10.1002/jps.21315>
  14. Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: Structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
  15. Dudek N.L., Perlmutter P., Aguilar M.I., Croft N.P., Purcell A.W. Epitope discovery and their use in peptide based vaccines. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16(28): 3149–57. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>
  16. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*. 2018; 6(3): 37. <https://doi.org/10.3390/vaccines6030037>
  17. Anggraeni M.R., Connors N.K., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Middelberg A.P. Sensitivity of immune response quality to influenza helix 190 antigen structure displayed on a modular virus-like particle. *Vaccine*. 2013; 31(40): 4428–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.06.087>
  18. Rivera-Hernandez T., Hartas J., Wu Y., Chuan Y.P., Lua L.H., Good M., et al. Self-adjuvanting modular virus-like particles for mucosal vaccination against group A streptococcus (GAS). *Vaccine*. 2013; 31(15): 1950–5. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.02.013>
  19. Tacket C.O., Sztejn M.B., Losonsky G.A., Wasserman S.S., Estes M.K. Humoral, mucosal, and cellular immune responses to oral Norwalk virus-like particles in volunteers. *Clin. Immunol.* 2003; 108(3): 241–7. [https://doi.org/10.1016/s1521-6616\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/s1521-6616(03)00120-7)
  20. Zhao H., Li H.Y., Han J.F., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li X.F., et al. Novel recombinant chimeric virus-like particle is immunogenic and protective against both enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in mice. *Sci. Rep.* 2015; 5: 7878. <https://doi.org/10.1038/srep07878>
  21. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potentially induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
  22. Le D.T., Müller K.M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life (Basel)*. 2021; 11(4): 334. <https://doi.org/10.3390/life11040334>

## REFERENCES

## ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ



«...Умный и фантастически креативный Феликс Иванович вмстил в себя целый батальон талантов»

*В.Г. Нестеренко,  
заведующий отделом иммунологии  
ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи*

10 декабря 2021 г. исполняется 90 лет со дня рождения и 65 лет научной деятельности академика РАН, доктора медицинских наук, профессора Феликса Ивановича ЕРШОВА.

Ф.И. Ершов – выдающийся отечественный учёный-вирусолог, один из ведущих специалистов в области интерферонологии – междисциплинарного интегративного раздела биологии и медицины, сформировавшегося в конце XX столетия.

В 1956 г. Феликс Ершов с отличием окончил 2-й Московский медицинский институт (2-й МОЛГМИ) (ныне Российский национальный исследовательский медицинский университет, РНИМУ) имени Н.И. Пирогова, после чего продолжил обучение в аспирантуре на кафедре микробиологии. Через 3 года он досрочно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Биологическая характеристика и классификация дизентерийных бактериофагов Ньюкасл» (специальность «вирусология»); научным руководителем соискателя являлся академик АМН СССР В.Д. Тимаков. С 1959 по 1962 г. молодой учёный работал в Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) 2-го МОЛГМИ, а затем перешёл в Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского АМН СССР, где был вначале старшим научным сотрудником, а затем – заведующим лабораторией онтогенеза вирусов и отделом репродукции вирусов. В 1966 г. Ф.И. Ершов защитил докторскую диссертацию «Закономерности репродукции РНК-содержащих вирусов» по специальности «вирусология» (научный консультант – академик РАМН В.М. Жданов). Спустя 4 года ему было присвоено учёное звание профессора.

В 1988 г. Ершов возглавил отдел интерферонов и лабораторию интерфероногенеза в ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. С 2018 г. по настоящее время он – главный научный сотрудник этих подразделений центра.

В 1988 году учёный избран членом-корреспондентом АМН СССР, а спустя десятилетие – действительным членом (академиком) РАМН по специальности «химиотерапия вирусных инфекций» (с 2013 г. академик Российской академии наук). С 1989 г. Ф.И. Ершов является также действительным членом РАЕН.

### Основные направления и итоги исследований Ф.И. Ершова

В ранний период профессиональной деятельности Феликсом Ивановичем Ершовым были разработаны принципы биологической характеристики и классификации дизентерийных и чумных бактериофагов. Эти данные получили отражение в серии статей и 2 работах («Изменчивость микроорганизмов и иммунитет», 1959 г.; «Бактериофагия», 1961 г.). В дальнейшем предложенные принципы стали использоваться для дифференцировки вирусов бактерий различных таксономических групп. К этому же времени относятся изучение цитохимической структуры L-форм бактерий и люминесцентно-микроскопические исследования инфицированных клеток культур тканей.

Главным объектом научных интересов Ф.И. Ершова были и остаются вирусы животных. Им и его сотруд-

никами получены приоритетные данные о главных закономерностях структурной организации, репродукции, морфогенеза альфа-вирусов и цитопатологии вирусных инфекций; проведены фундаментальные исследования молекулярной биологии арбовирусов, определены физико-химические параметры и особенности биосинтеза их макромолекул. В частности, установлена возможность синтеза вирусных РНК и белков на субклеточных структурах, а также обнаружена способность гибридных инфекционных вирусных РНК к репликации в изолированных митохондриях. Впервые зарегистрировано формирование инфекционных рибонуклеопротеидных комплексов, получивших название псевдовирусов (в 1969 г. это явление зарегистрировано как открытие в Государственном реестре изобретений и открытий СССР). Естественным завершением проведённого комплекса исследований стали монография В.М. Жданова и Ф.И. Ершова «Молекулярные основы биологии арбовирусов» (1973 г.) и «Атлас вирусной цитопатологии» (совместно с А.Ф. Быковским, 1975 г.).

Параллельно с этим учёный продолжал экспериментальную разработку проблемы интерферонов, начатую им одним из первых в стране ещё в 1962 г. – всего через 5 лет после их открытия. Главные изыскания были посвящены особенностям индукции, синтеза и действия этих веществ, получению и трансляции информационных РНК молекул интерферонов и антивирусных белков. Результаты обогатили биологическую и медицинскую науку важными данными о системе интерферона и показали её важнейшую роль в естественной (врождённой) резистентности организма.

Наиболее значимый вклад Ф.И. Ершов и представители созданной им школы внесли в разработку проблемы веществ – индукторов интерферонов. Впервые предложена оригинальная классификация индукторов, экспериментально доказан широкий спектр их противовирусных и иммуностимулирующих эффектов. Впервые разработаны методы супериндукции интерферона, а также принципы скрининга и оценки его индукторов, которые легли в основу создания ряда новых отечественных профилактических и лечебных препаратов. Среди них – хорошо известные Амиксин, Ларифан, Кагоцел, Ридостин, Циклоферон и ряд других. В настоящее время многие из этих средств нашли широкое клиническое применение при вирусных гепатитах, герпетических поражениях, энцефалитах, гриппе, острых респираторных вирусных инфекциях и других заболеваниях.

Ф.И. Ершов является разработчиком противовирусного соединения нового поколения под коммерческим названием Фортепен, которое в настоящее время проходит регистрацию в Минздраве РФ. Оно создано на основе препарата Фоспренил, применяемого для лечения коронавирусных инфекций у животных, вырабатывается по оригинальной, не имеющей аналогов в мире технологии, и является противовирусным средством широкого спектра действия, которое может использоваться для лечения ряда социально

значимых, широко распространённых, в том числе возвращающихся и вновь возникающих (emerging and re-emerging) вирусных инфекций. Фортепен, как показано в последнее время, обладает также выраженным противовоспалительным эффектом и действует как корректор иммунометаболических нарушений. Имеются основания рассматривать препарат в качестве одного из терапевтических кандидатов при новой коронавирусной инфекции COVID-19. В издательстве Nova Science Publishers, Inc. (Нью-Йорк, США) в 2018 г. вышла книга, соавтором которой является Ф.И. Ершов, под названием «Isoprenoids: Polyprenols and Polyprenyl Phosphates as Physiologically Important Metabolic Regulators» («Изопреноиды: полипренолы и полипренилфосфаты как физиологически важные регуляторы метаболизма»), где описывается эта новая группа лекарственных веществ.

В 1983 г. Феликсом Ивановичем Ершовым и его школой разработан комплекс методов определения интерферонового статуса, что позволило научно обосновать показания и контролировать эффективность клинического использования интерферонов и их индукторов. Окончательно сформулирован вывод о перспективности комбинированного применения индукторов интерферона с химиопрепаратами, вакцинами и иммуномодуляторами. Информативность определения интерферонового статуса подтверждена при различных онкологических, аллергических и вирусных заболеваниях, а также при обследовании спортсменов и космонавтов. Полученные данные обобщены в серии научных публикаций, сборников статей и монографий: «Индукторы интерферона» (1978 г.), «Интерферон и его индукторы» (1980 г.), «Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций» (1988 г.), «Система интерферона в норме и патологии» (1995 г.), «Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)» (2005 г.), «Интерферону – 50 лет» (2007 г.), «Интерферон-гамма: новый цитокин в клинической практике» (2007 г.), «Интерферон – 2011» (2012 г.) и других.

Академиком Ершовым опубликовано свыше 700 научных статей в отечественных и зарубежных журналах, 35 монографий. Помимо упомянутых выше, это «Методологические проблемы вирусологии» (1975 г.), «Методологические основы прогресса современной вирусологии» (1981 г.) (обе – совместно с академиками В.М. Ждановым и Д.К. Львовым); «Противовирусные средства» (1993), «Антивирусные препараты» (1998, 2006 гг.) и др. Помимо этого, Ф.И. Ершовым написаны разделы в известных руководствах по вирусологии и иммунологии, вышедших на русском и английском языках: «Progress in Medical Virology» (1977 г.), «Общая и частная вирусология» (1982 г.), «Virology reviews» (1987, 1989 гг.), «Advances in medicine and biology» (2017 г.), «Иммунотерапия: руководство для врачей» (2011, 2018 гг.).

Большое внимание Феликс Иванович уделяет научно-популяризаторской и просветительской деятельности. Совместно с В.М. Ждановым он опубли-



ковал ряд научно-популярных книг («Занимательная микробиология», «Укрощение строптивых», «Тайны третьего царства»), переведённых на французский, итальянский и японский языки, а также ряд статей в газетах и журналах, в которых широкому кругу читателей в доступной форме разъясняются проблемы современной вирусологии и существующие методы борьбы с инфекционными заболеваниями.

Особой популярностью пользуются книги Ф. И. Ершова, написанные им в последнее десятилетие и раскрывающие его незаурядный литературный талант. Это, в частности, «Белое и чёрное» (2011 г.), «Увиденное и услышанное» (2015 г.) и другие; в них автор делится воспоминаниями о разных периодах своей долгой и насыщенной событиями жизни. В 2020 г. вышла книга «История вирусологии от Д.И. Ивановского до наших дней», в популярной форме рассказывавшая об открытии вирусов, становлении и развитии вирусологии как науки, о главных вирусных инфекциях и борьбе с ними.

Весьма актуальной для многих стала недавно увидевшая свет «Хронология пандемии COVID-19», посвящённая возникновению и распространению новой коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2.

Учёному принадлежит более 50 авторских свидетельств на изобретения и патентов. За 65 лет научной и преподавательской деятельности под руководством и при участии Ф.И. Ершова в качестве научного консультанта подготовлены 21 докторская и 52 кандидатских диссертационных работ.

Феликс Иванович Ершов состоит членом Всероссийских обществ микробиологов и вирусологов, Международного комитета Российского отделения Международной ассоциации исследователей интерферона и цитокинов (ISICR, ныне ICIR), длительное время стоял во главе специализированной комиссии по противовирусным препаратам Фармакологического коми-

тета Российской Федерации (ФК РФ). На протяжении многих лет Ф.И. Ершов входит в состав редколлегии журналов «Acta Virologica», «Materia Medica», «Вопросы вирусологии», «Новые лекарства» и других.

Разносторонняя научная и организаторская деятельность Ф.И. Ершова получила широкое признание и достойную оценку. В 1984 г. за комплекс исследований «Разработка и внедрение в практику комплекса средств и методов лечения и профилактики герпесвирусных заболеваний» он был удостоен премии Совета Министров СССР. Ещё одна почётная награда, премия Правительства РФ, присуждалась учёному дважды – в 2000 и 2009 гг.: за циклы исследований «Разработка технологии получения субстанции интерферона альфа 2b человеческого рекомбинантного, готовых лекарственных средств на его основе и внедрение их в медицинскую практику» и «Разработка, организация промышленного производства и внедрение в практику здравоохранения Российской Федерации, стран СНГ и Юго-Восточной Азии российского оригинального лекарственного препарата Цитофлавин». Ф.И. Ершов является также обладателем профессиональных премий имени академиков Н.Ф. Гамалеи и В.Д. Тимакова; он награждён орденом «Знак Почёта», медалями СССР и РФ.

Высокой профессиональной компетентностью, научной и гражданской позицией, требовательностью и доброжелательностью академик Ершов снискал уважение и глубокую признательность всех, кто работал и продолжает работать с ним.

Сотрудники Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, друзья, коллеги и ученики сердечно поздравляют Феликса Ивановича Ершова с юбилеем и искренне желают ему новых успехов, здоровья, неиссякаемого оптимизма, долгих и счастливых лет жизни!

*Редколлегия журнала «Вопросы вирусологии»*