

ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

1

Том 68 • 2023

Volume 68 • Issue 1 • 2023

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Журнал «Вопросы вирусологии» знакомит читателей с достижениями российской и мировой вирусологии, помещает статьи, посвящённые изучению вирусов и вирусных болезней человека, животных и растений. Видное место в издании отводится публикации результатов экспериментальных работ по различным вопросам общей и частной вирусологии. В журнале печатаются материалы, способствующие внедрению в практику достижений вирусологической науки по ликвидации и снижению распространённости инфекционных заболеваний, а также их диагностике, профилактике и лечению.

В обзорных статьях обобщаются последние достижения в области вирусологии. Читатель найдет в журнале описание новых методов исследований, методических приёмов, новой аппаратуры и приспособлений.

Журнал рассчитан на вирусологов, эпидемиологов, паразитологов, фармакологов, биохимиков и других специалистов.

The Journal «Problems of virology» is focused on current advances in virology in Russia and the rest of the world. It covers research in virology and viral diseases of humans, animals, and plants. Emphasis is given to the original experimental studies on various aspects of general and special virology. The reviews of recent and historic developments in virology are regularly published.

The journal promotes the implementation of advances in virology aimed at treatment, reduction of the incidence and elimination of infectious diseases and enhancement of diagnostics, prevention, and treatment practices as well. The target audience of the journal are virologists (including medical and veterinary virologists, scientists and practitioners), epidemiologists, parasitologists, pharmacologists, biochemists and specialists in related medical disciplines.

Журнал, входит в рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» (в соответствии с п.5 Правил формирования Перечня (Приказ Минобрнауки России от 12.12.2016 N 1586), как входящий в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus) по специальностям:

1.5.10 Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2 Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22 Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские и биологические науки)

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.crie.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
E-mail: vorpr.virusol@crie.ru

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Выпускающий редактор:
Архипова Елена Михайловна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

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

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

Подписано в печать 28.02.2023.
Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.
Отпечатано в типографии
«Буки Веди», www.bukivedi.com.
E-mail: info@bukivedi.com.

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

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.

1

Том 68 · 2023

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., член-корр. РАН)

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., акад. 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)

Глулов 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)

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

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

Негёсов С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

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

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

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

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

Яшкулов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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.crie.ru;>
<https://www.elibrary.ru;>
<https://www.cyberleninka.ru;>
<https://www.rucont.ru;>
<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

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

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of Editorial Office:
Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.crie.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.crie.ru>).

Signed to the press
on February 28, 2023.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi
Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow,
Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com
© Central Research Institute
for Epidemiology, 2023

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIROLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

1

Volume 68 • 2023

EDITORIAL BOARD

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

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

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

Scientific editor: **Zaberezhny 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. – RAS Full Member, 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 Full 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, 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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гладышева А.А., Гладышева А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б.

Структурные мотивы и трёхмерные модели хеликазы (NS3) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5) многокомпонентного флавиподобного Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae) 7

Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Лебедева В.В., Ларичев В.Ф.

Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro** 18

Николаева Ю.В., Галочкина А.В., Штро А.А., Бернс С.А.

Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. 26

Светлова Е.В., Балацкая Н.В., Саакян С.В., Жаров А.А., Кричевская Г.И., Свирина И.В., Измайлова Н.С., Мякошина Е.Б.

Частота инфицированности опухоли, жидкостных сред глаза и специфический гуморальный иммунитет к герпесвирусам у пациентов с увеальной меланомой 37

Полещук Е.М., Тагакова Д.Н., Сидоров Г.Н., Орлова Т.С., Гордейко Н.С., Кайсаров А.Ж.

Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг.* 45

Рубальская Т.С., Ерохов Д.В., Жердева П.Е., Милихина А.В., Гаджиева А.А., Тихонова Н.Т.

Генотипирование вируса эпидемического паротита (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) как элемент лабораторного подтверждения инфекции 59

Кузнецова А.И., Мунчак Я.М., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Антонова А.А., Ожмегова Е.Н., Пронин А.Ю., Дробышевская Е.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р.

Генетическое разнообразие капсидного белка (p24) у вариантов вируса иммунодефицита первого типа (ВИЧ-1), циркулирующих в Российской Федерации 66

Яшина Л.Н., Иванов Л.И., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Карташов М.Ю.

Хантавирусы (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), циркулирующие среди насекомых на Дальнем Востоке России 79

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

Владимир Игоревич Злобин (к 80-летию со дня рождения) 86

НЕКРОЛОГИ

Святослав Георгиевич Чешик 88

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

Gladysheva A.A., Gladysheva A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B.

Structural Motifs and Spatial Structures of Helicase (NS3) and RNA-dependent RNA-polymerase (NS5) of the Multicomponent Flavi-like Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae). 7

Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Lebedeva V.V., Larichev V.F.

Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro** 18

Nikolaeva Yu.V., Galochkina A.V., Shtro A.A., Berns S.A.

In vitro activity of human recombinant interferon gamma against the SARS-CoV-2 virus. 26

Svetlova E.V., Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Zharov A.A., Krichevskaya G.I., Svirina I.V., Izmailova N.S., Myakoshina E.B.

The incidence of infection in tumor and eye fluid system, and specific humoral immunity to herpes viruses in patients with uveal melanoma. 37

Poleshchuk E.M., Tagakova D.N., Sidorov G.N., Orlova T.S., Gordeiko N.S., Kaiserov A.Zh.

Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021*. 45

Rubalskaya T.S., Erokhov D.V., Zherdeva P.E., Milikhina A.V., Gadzhieva A.A., Tikhonova N.T.

Mumps virus (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) genotyping as a component of laboratory confirmation of infection. 59

Kuznetsova A.I., Munchak I.A., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Antonova A.A., Ozhmegova E.N., Pronin A.Yu., Drobyshevskaya E.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R.

Genetic diversity of capsid protein (p24) in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) variants circulating in the Russian Federation. 66

Yashina L.N., Ivanov L.I., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Kartashov M.Yu.

Shrew-borne hantaviruses (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) in the Far East of Russia. 79

ANNIVERSARY DATES

To the 80th anniversary of Vladimir I. Zlobin 86

OBITUARY

Sviatoslav G. Cheshik 88

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-142>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Структурные мотивы и трёхмерные модели хеликазы (NS3) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5) флавиподобного Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae)

Гладышева А.А.^{1,2}, Гладышева А.В.¹, Терновой В.А.¹, Локтев В.Б.^{1,2}

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия;

²ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» Министерства образования и науки РФ, 630090, г. Новосибирск, Россия

Введение. Kindia tick virus (KITV) – недавно обнаруженный сегментированный неклассифицированный флавиподобный вирус семейства Flaviviridae, переносимый клещами и предположительно патогенный для человека.

Цель работы – поиск структурных мотивов вирусных полипептидов и моделирование пространственной структуры вирусных белков NS3 и NS5 многокомпонентного флавиподобного KITV.

Материалы и методы. Использованы полногеномные последовательности KITV, вирусов Зика, денге, японского энцефалита, Западного Нила и жёлтой лихорадки из базы данных GenBank. Биоинформатический анализ выполнен с помощью пакета программ AlphaFold2, RCSB PDB, UCSF Chimera, NCBI BLAST, MOTIF Search, Protomenal, Unipro UGENE, ESPript.

Результаты. Установлено, что структурные белки VP1–VP3 KITV не имеют аналогов с известными в настоящее время вирусными белками. Получены пространственные модели неструктурных белков NS3 и NS5 KITV, обладающие высоким уровнем топологического сходства с белками вирусов клещевого энцефалита и денге. У NS5 KITV обнаружены характерные для флавивирусов домены метилтрансферазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы. Последний представлен субдоменами пальцев, ладони и большого пальца, а также типичными структурными мотивами A, B, C, D, E, F. Идентифицированы хеликазный домен и основные структурные мотивы I, Ia, II, III, IV, IVa, V, VI в NS3 KITV. Домена протеазы, типичного для NS3 флавивирусов, обнаружено не было. В аминокислотных последовательностях NS3 и NS5 KITV обнаружены высококонсервативные последовательности протяжённостью 3–7 аминокислот, характерные для KITV и флавивирусов. Картировано восемь аминокислотных замен, характерных для KITV/2018/1 и KITV/2018/2, пять из них локализованы в альфа-спиралях, три – в свободных петлях неструктурных белков.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о структурном и функциональном сходстве белков NS3 и NS5 сегментированного флавиподобного KITV с флавивирусами, что подтверждает их возможную эволюционную взаимосвязь и таксономическое единство.

Ключевые слова: *Flaviviridae; сегментированные флавиподобные вирусы; Jingmen tick viruses; Kindia tick virus; трёхмерные модели; вирусные белки; AlphaFold2*

Для цитирования: Гладышева А.А., Гладышева А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б. Структурные мотивы и трёхмерные модели хеликазы (NS3) и РНК-зависимой РНК-полимеразы (NS5) многокомпонентного флавиподобного Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae). *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(1): 7-17. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-142>

Для корреспонденции: Гладышева Анастасия Витальевна, аспирант, младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Участие авторов: Гладышева А.А. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Гладышева А.В. – концепция и дизайн исследования, интерпретация данных, подготовка текста статьи; Терновой В.А. – руководство исследованиями; Локтев В.Б. – руководство исследованиями, участие в подготовке статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355) в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 гг.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.09.2022
Принята в печать 21.11.2022
Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-142>

Structural Motifs and Spatial Structures of Helicase (NS3) and RNA-dependent RNA-polymerase (NS5) of a Flavi-like Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae)

Anastasia A. Gladysheva^{1,2}, Anastasia V. Gladysheva¹, Vladimir A. Ternovoi¹, Valery B. Loktev^{1,2}¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation;²Novosibirsk National Research State University, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

Introduction. Kindia tick virus (KITV) is a novel segmented unclassified flavi-like virus of the Flaviviridae family. This virus is associated with ixodes ticks and is potentially pathogenic to humans.

The main goal of this work was to search for structural motifs of viral polypeptides and to develop a 3D-structure for viral proteins of the flavi-like KITV.

Materials and methods. The complete genome sequences for KITV, Zika, dengue, Japanese encephalitis, West Nile and yellow fever viruses were retrieved from GenBank. Bioinformatics analysis was performed using the different software packages.

Results. Analysis of the KITV structural proteins showed that they have no analogues among currently known viral proteins. Spatial models of NS3 and NS5 KITV proteins have been obtained. These models had a high level of topological similarity to the tick-borne encephalitis and dengue viral proteins. The methyltransferase and RNA-dependent RNA-polymerase domains were found in the NS5 KITV. The latter was represented by fingers, palm and thumb subdomains, and motifs A-F. The helicase domain and its main structural motifs I–VI were identified in NS3 KITV. However, the protease domain typical of NS3 flaviviruses was not detected. The highly conserved amino acid motives were detected in the NS3 and NS5 KITV. Also, eight amino acid substitutions characteristic of KITV/2018/1 and KITV/2018/2 were detected, five of them being localized in alpha-helix and three in loops of nonstructural proteins.

Conclusion. Nonstructural proteins of KITV have structural and functional similarities with unsegmented flaviviruses. This confirms their possible evolutionary and taxonomic relationships.

Keywords: *Flaviviridae; segmented flavi-like viruses; Jingmen tick viruses; Kindia tick virus; spatial models; viral proteins; AlphaFold2*

For citation: Gladysheva A.A., Gladysheva A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Structural Motifs and Spatial Structures of Helicase (NS3) and RNA-dependent RNA-polymerase (NS5) of the Multicomponent Flavi-like Kindia tick virus (unclassified Flaviviridae). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 7-17. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-142>

For correspondence: Anastasia V. Gladysheva, Postgraduate student, Junior Researcher, Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Information about the authors:Gladysheva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9490-1939>Gladysheva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>Ternovoi V.A., <https://orcid.org/0000-0003-1275-171X>Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Contribution: Gladysheva A.A. – conducting of the experiments, collection, analysis, and interpretation of the data, writing original draft of the article; Gladysheva A.V. – concept and design of the study, interpretation of the data, writing and editing original draft of the article; Ternovoi V.A. – supervision; Loktev V.B. – supervision, editing original draft of the article.

Funding. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement No. 075-15-2021-1355 dated October 12, 2021) as a part of the implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Synchrotron and Neutron Research and Research Infrastructure for 2019–2027.

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

Received 15 September 2022
Accepted 21 November 2022
Published 28 February 2023

Введение

Kindia tick virus (KITV) – недавно обнаруженный сегментированный (многокомпонентный) флавиподобный неклассифицированный вирус, обнаруженный в 2017 г. на территории Гвинейской Республики в иксодовых клещах *Rhipicephalus geigy* [1]. Схожий с KITV многокомпонентный флавиподобный вирус был ранее обнаружен в клещах вида *Rhipicephalus microplus* в регионе Jingmen (Цзиньмэнь) китайской провинции Хубей и был назван в соответствии с географическим местом открытия Jingmen tick virus (JMTV) [2]. Другой многокомпонентный Gwaico Culex virus (GCXV) был несколько позднее обнаружен в комарах рода *Culex* в Перу, Панаме и на острове Тринидад в Карибском море [3].

Принципиальное отличие этих неклассифицированных вирусов от флавивирусов состоит в наличии сегментированного одноцепочечного РНК-генома (оцРНК) положительной полярности [4]. Геном вирусов группы JMTV состоит из четырёх сегментов, располагающихся в отдельных вирусных частицах [3]. Размер вирионов для вирусов JMTV варьирует от 30 до 100 нм [4]. Общая длина генома флавиподобных сегментированных вирусов составляет около 11 тыс. нуклеотидов [1], что также характерно и для флавивирусов [5]. Сегменты 1–3 несут по одной протяжённой открытой рамке считывания (ORF) и кодируют белки NS5, VP1 и NS3 соответственно. Сегмент 4 обладает двумя ORF и кодирует белки VP2, VP3 [1]. В то же время GCXV, переносимый комарами, может иметь геном из пяти сегментов. Для JMTV и вируса Alongshan было показано наличие последовательности polyA в 3' UTR [5].

На сегодняшний день сегментированные флавиподобные вирусы обнаружены почти на всех континентах Земли [6]. Некоторые из них способны вызывать заболевание у человека [7]. Клинические проявления у пациентов, инфицированных JMTV, включают лихорадку, головную боль, миалгию, повышение температуры, тошноту, рвоту, зуд и лимфаденопатию. В биохимических показателях крови отмечаются повышение концентрации печёночной аминотрансферазы и незначительное снижение количества лимфоцитов. Продолжительность госпитализации обычно составляет от 14 до 28 дней [7]. Интересно, что геномная РНК многокомпонентных JMTV была обнаружена в крови пациентов с Крымской-Конго геморрагической лихорадкой в Косово и на юге России [8, 9]. Вероятно, JMTV циркулирует в популяции давно, приобрёл способность к адаптации к широкому спектру хозяев, включая клеща и человека, и способен вызывать вирусную микст-инфекцию у человека с клиническими проявлениями, характерными для Крымской-Конго геморрагической лихорадки, из-за чего долгое время оставался без внимания.

О пространственной структуре белков сегментированных флавиподобных вирусов известно крайне мало. Так, в базе PDB (Protein Data Bank) представлена информация только о структуре хеликазного домена белка

NS3 вируса Alongshan [10]. Настоящая работа посвящена поиску и моделированию принципиально значимых районов вирусных белков KITV, обуславливающих их структурно-функциональные особенности. Эта информация является принципиально важной для создания вакцин и противовирусных препаратов, а также развития диагностики инфекций, ассоциированных с новыми сегментированными флавиподобными вирусами.

Цель работы – поиск структурных мотивов вирусных полипептидов и моделирование пространственной структуры вирусных белков NS3 и NS5 многокомпонентного флавиподобного KITV.

Материалы и методы

Вирусные геномные последовательности

Полногеномные последовательности, соответствующие сегментам 1–4 штаммов KITV: KITV/2017/1, KITV/2018/1, KITV/2018/2, были взяты из базы данных GenBank (MK673133–MK673136, MW341206–MW341209, MW341210–MW341213). Для проведения анализа были также дополнительно использованы геномные последовательности вирусов Зика (KX262887), жёлтой лихорадки (MN958078), Западного Нила (KX394382), японского энцефалита (EF623989) и денге (MG599596).

Выравнивание и анализ аминокислотных последовательностей

Поиск близкородственных белков, пространственной структуры которых уже были решены экспериментально, был выполнен с помощью NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) по базе данных PDB с использованием алгоритма blastp (protein-protein BLAST). Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей было выполнено в программе Unipro UGENE («УНИПРО», Россия) с использованием итеративного метода выравнивания Muscle. Данная программа также была применена для поиска и картирования аминокислотных замен и анализа их расположения. Функциональная аннотация вирусных белков была произведена с помощью программ Protomenal¹ и MOTIF Search². Поиск мотивов проводился по базам данных Pfam и NCBI CDD (Conserved Domains Database) (All). Выравнивание аминокислотных последовательностей вирусных белков KITV с последовательностями вирусов Зика, жёлтой лихорадки, Западного Нила, японского энцефалита и денге было визуализировано с помощью программы ESPript 3.0 [11].

Моделирование и анализ пространственных структур вирусных белков

Для моделирования пространственных структур вирусных белков была использована облачная вер-

¹Protomenal: protein functional annotation by deep metric learning. Available at: <https://protomenal.com/>

²MOTIF Search. Available at: <https://www.genome.jp/tools/motif/>

сия программы AlphaFold2 – AlphaFold2_advanced.ipynb [12]. Отбор пространственных моделей для дальнейшего теоретического анализа производился на основе коэффициента достоверности для каждой аминокислоты с учётом прогнозируемой локальной рности расстояний (pLDDT) AlphaFold2.

Попарное выравнивание пространственных структур белка NS5 и хеликазного домена белка NS3 вируса денге, клещевого энцефалита и Alongshan, взятых из базы данных RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) PDB (6KR2, 7OJ4 и 6M40), и полученных моделей пространственных структур вирусных белков исследуемых штаммов производилось с помощью программного обеспечения Pairwise Structure Alignment, предоставленного базой данных RCSB PDB. Данная программа также использовалась для попарного выравнивания полученных моделей пространственных структур исследуемых штаммов. Был выбран тип попарного выравнивания jFATCAT (жесткий) со следующими параметрами:

– отсечка среднеквадратичного стандартного отклонения – 3;

– предельное расстояние выровненных пар фрагментов (AFP) – 5;

– длина фрагмента – 8.

Основываясь на коэффициентах среднеквадратичного отклонения (RMSD) и оценки моделирования шаблона (TM (template modeling) score), полученных при попарном выравнивании, был установлен уровень топологического сходства между структурами.

Визуализация пространственных моделей вирусных белков была выполнена с помощью программы UCSF Chimera [13].

Результаты

Аминокислотные последовательности четырёх сегментов KITV/2018/1 и KITV/2018/2 из базы данных PDB были использованы для поиска близкородственных белков, чьи пространственные структуры уже известны. Для белка NS5 KITV было обнаружено сходство с 31 аминокислотной последовательностью различных вирусных белков. Белок NS5 вируса денге второго серотипа (PDB ID: 6KR2) имел наилучшую идентичность в 26% для KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Для белка NS3 KITV/2018/1 и KITV/2018/2 было обнаружено сходство с 27-й и 19-й аминокислотными последовательностями вирусных белков соответственно, включая NS3 хеликазу вируса Alongshan (PDB ID: 6M40) с коэффициентом идентичности 47%. Коэффициент идентичности с остальными вирусными аминокислотными последовательностями не превышал 16%, например, с NS3 хеликазой вируса клещевого энцефалита (PDB ID: 7OJ4). Интересно, что для структурных белков VP1–VP3 не было обнаружено схожих белков во всех исследованных базах данных.

При моделировании пространственных структур вирусных белков KITV были получены коэффициенты достоверности pLDDT AlphaFold2 для каждой модели (табл. 1). Установлено, что рассчитанные пространственные модели структурных белков VP1–VP3 обладают низкими коэффициентами достоверности, что не позволило проводить их дальнейший анализ. Значение коэффициентов достоверности для белков NS3 и NS5 составило больше 80, что свидетельствовало о высоком уровне достоверности полученных моделей и возможности их использования для дальнейшего анализа.

Установлено, что модели пространственных структур белков NS3 и NS5 обладают высоким уровнем топологического сходства (значения TM-score для всех сравниваемых пар структур превышают 0,5) с пространственными структурами одноимённых белков вирусов клещевого энцефалита и денге, несмотря на то что процент идентичности между аминокислотными последовательностями был менее 30% (табл. 2).

У белка NS5 KITV, как и у всех других представителей рода флавивирусов, обнаружен домен метилтрансферазы (capping_2-OMTase viral, NCBI-CDD c141719) в позициях с 65-й по 267-ю аминокислоту

Таблица 1. Значения pLDDT AlphaFold2 пространственных моделей белков KITV

Table 1. Values of pLDDT AlphaFold2 spatial models of KITV proteins

Название штамма KITV (вирусный белок) Name of strain KITV (viral protein)	Значение pLDDT AlphaFold2 The value of pLDDT AlphaFold2
KITV/2017/1 (NS5)	83,89
KITV/2017/1 (VP1)	50,20
KITV/2017/1 (NS3)	59,86
KITV/2017/1 (хеликазный домен NS3) (helicase domain NS3)	87,21
KITV/2017/1 (VP2)	33,05
KITV/2017/1 (VP3)	40,99
KITV/2018/1 (NS5)	84,55
KITV/2018/1 (VP1)	45,62
KITV/2018/1 (NS3)	54,35
KITV/2018/1 (хеликазный домен NS3) (helicase domain NS3)	87,92
KITV/2018/1 (VP2)	41,49
KITV/2018/1 (VP3)	41,04
KITV/2018/2 (NS5)	84,43
KITV/2018/2 (VP1)	47,28
KITV/2018/2 (NS3)	57,86
KITV/2018/2 (хеликазный домен NS3) (helicase domain NS3)	83,95
KITV/2018/2 (VP2)	41,49
KITV/2018/2 (VP3)	40,39

Примечание. Жирным шрифтом отмечены модели, обладающие высоким коэффициентом достоверности.

Note. Models with a high confidence coefficient are marked in bold.

Таблица 2. Коэффициенты подобия пространственных моделей белков NS3 и NS5 между штаммами KITV, вирусом клещевого энцефалита (PDB ID: 7OJ4 для NS3), вирусом Alongshan (PDB ID: 6M40 для NS3) и вирусом денге (PDB ID: 6KR2 для NS5)

Table 2. Similarity coefficients of spatial models of NS3 and NS5 proteins between KITV strains, tick-borne encephalitis virus (PDB ID: 7OJ4 for NS3), Alongshan virus (PDB ID: 6M40 for NS3) and dengue virus (PDB ID: 6KR2 for NS5)

Белок Protein	Название вируса и (или) вирусного штамма Name of virus and/or viral strain	RMSD	TM-score
NS5	KITV/2017/1 и KITV/2018/1 KITV/2017/1 and KITV/2018/1	13,17	0,62
	KITV/2017/1 и KITV/2018/2 KITV/2017/1 and KITV/2018/2	13,11	0,63
	KITV/2018/1 и KITV/2018/2 KITV/2018/1 and KITV/2018/2	4,49	0,85
	Вирус денге и KITV/2017/1 Dengue virus and KITV/2017/1	4,7	0,65
	Вирус денге и KITV/2018/1 Dengue virus and KITV/2018/1	6,94	0,59
	Вирус денге и KITV/2018/2 Dengue virus and KITV/2018/2	7,53	0,61
	KITV/2017/1 и KITV/2018/1 KITV/2017/1 and KITV/2018/1	0,68	0,99
	KITV/2017/1 и KITV/2018/2 KITV/2017/1 and KITV/2018/2	1,69	0,96
NS3	KITV/2018/1 и KITV/2018/2 KITV/2018/1 and KITV/2018/2	1,78	0,96
	Вирус клещевого энцефалита и KITV/2017/1 Tick-borne encephalitis virus and KITV/2017/1	3,1	0,73
	Вирус клещевого энцефалита и KITV/2018/1 Tick-borne encephalitis virus and KITV/2018/1	3,1	0,73
	Вирус клещевого энцефалита и KITV/2018/2 Tick-borne encephalitis virus and KITV/2018/2	3,02	0,69
	Вирус Alongshan и KITV/2017/1 Virus Alongshan and KITV/2017/1	1,32	0,88
	Вирус Alongshan и KITV/2018/1 Virus Alongshan and KITV/2018/1	1,41	0,87
	Вирус Alongshan и KITV/2018/2 Virus Alongshan and KITV/2018/2	2,18	0,85

и домен РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) (Pfam: pfam00972) в позициях 350–913. В RdRp обнаружены субдомены пальцев, ладони (положения 350–730, Pfam: PF00972) и большого пальца (положения 742–842, Pfam: PF20483). Кроме этого, были обнаружены характерные для флавивирусов структурные мотивы А (575–582), В (641–655), С (691–700), D (725–728), Е (746–751), F (497–524) (рис. 1, 2).

Установлено, что в субдоменах пальцев и большого пальца происходят аминокислотные замены в положениях связывания RdRp с ионами цинка. В первом сайте замены приходятся на позиции 484, 488, 493 и 496: F₄₈₄ → E₄₈₄, H₄₈₈ → L₄₈₈, C₄₉₃ → R₄₉₃ и C₄₉₆ → A₄₉₆. Второй сайт связывания у KITV предположительно состоит из трёх аминокислот вместо четырёх; во втором сайте – H₇₅₀ → R₇₅₀, C₇₆₅ → V₇₆₅, а в позиции 875 происходит делеция, в то время как у флавивирусов в этом положении располагается цистеин. Позиция 752 у флавивирусов вариабельна по аминокислотному составу, а у KITV представлена триптофаном. При этом

аналогично пространственной структуре RdRp флавивирусов первые две аминокислоты первого сайта связывания находятся у KITV в альфа-спирали, а две другие – в свободной петле; второй сайт расположен в бета-листах.

При анализе аминокислотной последовательности полноразмерного белка NS3 KITV установлено, что он не содержит домена сериновой протеазы, что не типично для NS3 флавивирусов. Со стороны С-конца белка NS3 KITV располагается домен хеликазы (NS3-Hel), который состоит из трёх субдоменов (D1–D3) и восьми структурных флавивирусных мотивов (I, Ia, II, III, IV, IVa, V и VI), находящихся в D1 и D2. Субдомен D1 имеет характерный для флавивирусов регион DEXHc_viral_NS3 (DEXH-box helicase domain of NS3 protease-helicase, NCBI-CDD cd17931), располагающийся с 341-й по 493-ю позицию. Хеликазные мотивы располагаются в позициях I – 348–353, Ia – 365–377, II – 433–440, III – 464–478, IV – 515–523, IVa – 544–552, V – 573–582 и VI – 610–623 (рис. 2, 3).

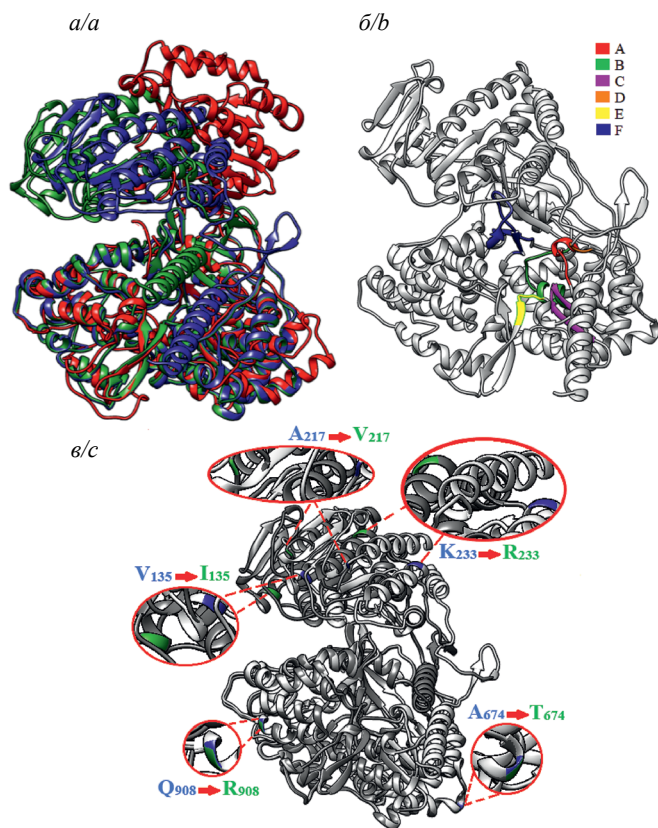


Рис. 1. Модели пространственной организации NS5: *a* – наложение моделей пространственных структур NS5: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный) и вируса денге (красный); *б* – пространственная модель NS5 KITV/2018/1 с консервативными мотивами А–F; *в* – наложение пространственных структур NS5 KITV/2018/1 (белый/синий) и KITV/2018/2 (серый/зелёный), где цветом выделены обнаруженные аминокислотные замены.

Fig. 1. Models of spatial organization NS5: *a* – imposition models of spatial structures NS5: KITV/2018/1 (blue), KITV/2018/2 (green) and dengue virus (red); *b* – spatial model NS5 KITV/2018/1 with conservative motives А–F; *c* – imposition of spatial structures NS5 KITV/2018/1 (white/blue) and KITV/2018/2 (gray/green), where detected amino acid substitutions are highlighted in color.

Кроме того, в NS3 и NS5 KITV были обнаружены непротяжённые высококонсервативные аминокислотные последовательности, характерные для вирусов Зика, жёлтой лихорадки, Западного Нила, японского энцефалита и денге. Большинство высококонсервативных аминокислот находятся в обнаруженных функционально важных мотивах белков NS3 и NS5 KITV (рис. 2).

При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей KITV были обнаружены различные аминокислотные замены, в том числе и те, которые могут влиять на топологию вирусных белков. Для KITV/2018/1 и KITV/2018/2 было обнаружено по две замены в белках VP1 и VP3, пять замен в белке NS5 и четыре – в NS3. В аминокислотных последовательностях KITV/2017/1 и KITV/2018/1 обнаружено 24 замены, а для KITV/2017/1 и KITV/2018/2 – 35 (табл. 3). Обна-

руженные аминокислотные замены в белке NS5 KITV/2018/1 и KITV/2018/2 локализованы в положениях 135 – альфа-спираль 5 (α-5), 217 – петля

Таблица 3. Замены в аминокислотных последовательностях белков KITV

Table 3. Substitutions in amino acid sequences of KITV proteins

Белок Protein	Положение в аминокислот- ной последова- тельности Position in the amino acid sequence	Название штамма KITV Name of strain KITV		
		KITV/2017/1	KITV/2018/1	KITV/2018/2
NS5	135	V	V	I
	217	A	A	V
	233	K	K	R
	277	S	R	R
	610	R	H	H
	674	A	A	T
	747	Y	C	C
	908	Q	Q	R
	76	S	F	F
	89	P	H	H
	103	H	Q	Q
	160	L	F	F
	247	G	V	V
	VP1	368	I	I
380		A	T	T
435		K	E	E
465		S	G	G
604		A	V	V
622		A	A	T
236		A	V	V
247		A	V	V
291		V	I	V
379		A	V	V
NS3	459	N	K	K
	474	S	R	R
	476	S	S	F
	604	R	G	G
	625	K	K	R
VP2	673	E	E	Q
	140	N	S	S
	6	V	D	D
	18	I	M	M
VP3	78	N	N	S
	208	K	K	R
	338	G	V	V
	353	L	F	F

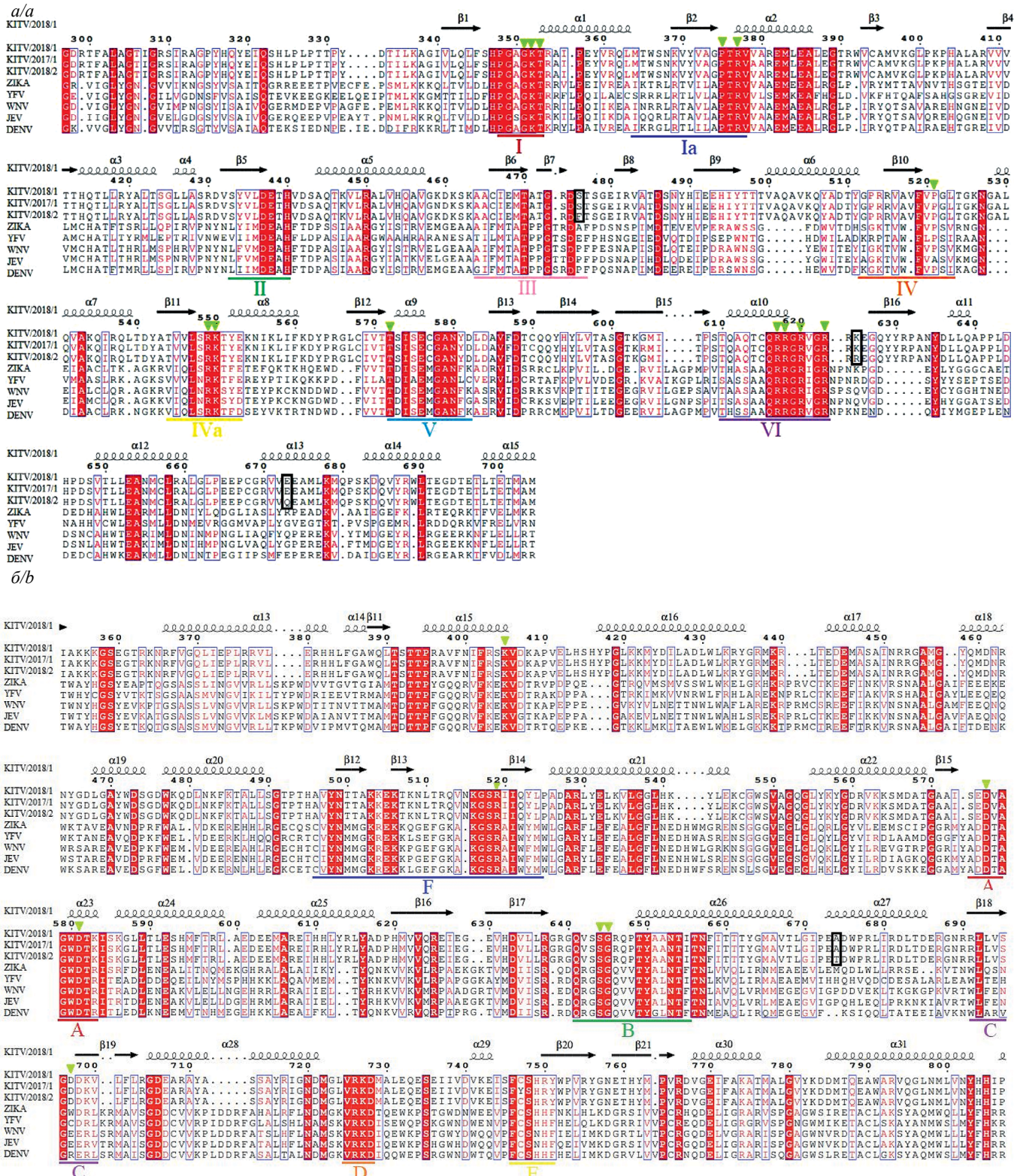


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей NS3 (а) и NS5 (б) KИTV с флавивирусами. Красным цветом выделены высококонсервативные аминокислоты, зелёными стрелочками – высококонсервативные аминокислоты, функции которых известны для флавивирусов. Участки аминокислотных последовательностей, соответствующие обнаруженным мотивам, выделены цветными линиями. Элементы вторичной структуры вирусных белков указаны для штамма KИTV/2018/1.

Fig. 2. Alignment of amino acid sequences NS3 (a) and NS5 (b) KИTV with flaviviruses. Highly conserved amino acids are highlighted in red; highly conserved amino acids, whose functions are known for flaviviruses, are highlighted with green arrows. Sections of amino acid sequences corresponding to detected motifs are highlighted with colored lines. Elements of secondary structure of viral proteins are indicated for the KИTV/2018/1 strain.

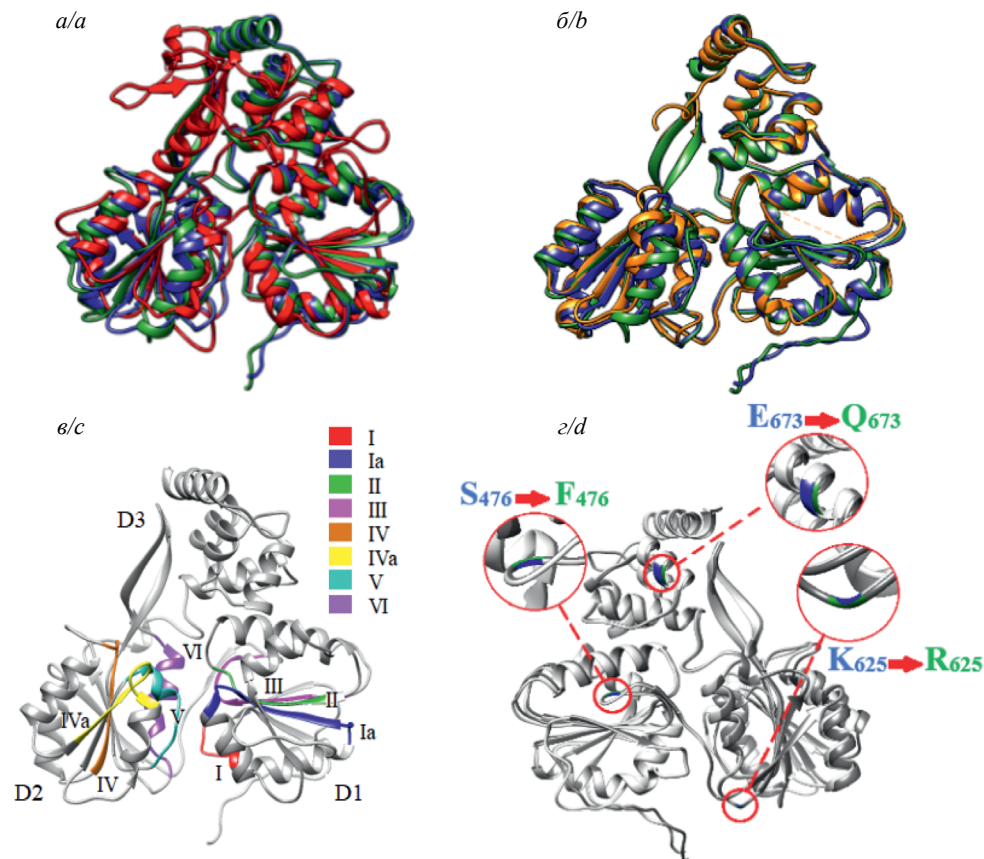


Рис. 3. Модели пространственной организации NS3: *a* – наложение моделей пространственных структур NS3-Hel: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный), вируса клещевого энцефалита (красный); *b* – наложение моделей пространственных структур NS3: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный), вирус Alongshan (оранжевый); *c* – пространственная модель NS3-Hel KITV/2018/1 с консервативными мотивами I–VI; *d* – наложение пространственных структур NS3-Hel KITV/2018/1 (белый/синий) и KITV/2018/2 (серый/зелёный), где цветом выделены обнаруженные аминокислотные замены.

Fig. 3. Models of spatial organization NS3: *a* – Imposition models of spatial structures NS3-Hel: KITV/2018/1 (blue), KITV/2018/2 (green), tick-borne encephalitis virus (red); *b* – imposition models of spatial structure NS3: KITV/2018/1 (blue), KITV/2018/2 (green), Alongshan virus (orange); *c* – spatial model NS3-Hel KITV/2018/1 with conservative motifs I–VI; *d* – imposition of spatial structures NS3-Hel KITV/2018/1 (white/blue) and KITV/2018/2 (gray/green), where detected amino acid substitutions are highlighted in color.

между α -8 и бета-листом 7 (β -7), 233 – α -9, 674 – α -27, 908 – α -37. Замены $V_{135} \rightarrow I_{135}$, $A_{217} \rightarrow V_{217}$, $K_{233} \rightarrow R_{233}$ не изменяют общую топологию, но приводят к пространственному сдвигу трёхмерных структур белка NS5 KITV/2018/1 и KITV/2018/2 относительно друг друга (рис. 1 *в*). Аминокислотные замены в NS3 для KITV/2018/1 и KITV/2018/2 локализованы в положениях 476 – петля между β -7 и β -8, 625 – петля между α -10 и β -16, 673 – α -13 (рис. 3 *г*).

Обсуждение

Одним из способов получения информации о пространственном устройстве генома, в частности о трёхмерной структуре белков, является моделирование. Программа AlphaFold2 позволяет проводить предсказания пространственных структур белка. В её основе лежит использование глубокого машинного обучения и сверхточных нейронных сетей для предсказания углов и расстояний между атомами в созда-

ваемом программой шаблоне структуры, что позволяет получать трёхмерные модели исследуемого белка с высокой точностью, даже несмотря на низкий уровень гомологии с прототипом, который может быть менее 30% [14].

Полученные модели структурных белков VP1, VP2, VP3 KITV обладали низкими коэффициентами достоверности и были исключены из дальнейшего анализа. Отсутствие известных прототипов для этих белков подчеркивает их уникальность среди структурных белков РНК-содержащих вирусов. Это не позволяет определить возможные функционально важные мотивы этих белков и оценить эволюционные взаимоотношения с другими известными вирусами. Можно только предположить, что эти белки обеспечивают формирование вирусных частиц, рецепторные взаимодействия с чувствительными клетками организма хозяина, защиту геномной РНК и проникновение геномной РНК KITV в клетки беспозвоночных и позвоночных хозяев. Факты преодоления межвидовых

барьеров многокомпонентными флавиподобными вирусами подтверждают высказанные предположения [15]. Вполне очевидно, что VP1, VP2, VP3, являясь структурными белками K1TV, также должны предопределять взаимодействие с иммунной системой организма хозяина. К сожалению, к настоящему моменту отсутствуют прямые данные о формировании иммунного ответа организма на сегментированные флавиподобные вирусы, но фактически глобальный характер распространения этих вирусов может свидетельствовать об их потенциальной способности к уклонению от контроля иммунной системы хозяина.

Выравнивание аминокислотных последовательностей белков NS3 и NS5 K1TV с последовательностями вирусов Зика, жёлтой лихорадки, Западного Нила, японского энцефалита и денге показало крайне низкий уровень гомологии между ними. Уровень идентичности был менее 30%, что, без сомнения, затрудняет структурно-функциональный анализ этих белков. Тем не менее с использованием биоинформационных методов удалось создать пространственные модели белков NS3 и NS5 K1TV и показать, что, несмотря на низкий уровень гомологии K1TV с вирусами клещевого энцефалита и денге, они обладают высоким уровнем топологического сходства с белками флавириусов.

Белок NS3 K1TV имеет характерный для флавириусов С-концевой хеликазный домен, состоящий из трёх субдоменов (D1–D3) и восьми структурных мотивов (I, Ia, II, III, IV, IVa, V и VI), находящихся в D1 и D2, но не имеет N-концевого протеазного домена. Принято считать, что мотивы I, II, III, VI флавириусов принимают непосредственное участие в связывании и гидролизе аденозинтрифосфата. Мотивы Ia, IV, IVa, V ответственны за взаимодействие с РНК, транслокацию и междоменную коммуникацию. Субдомен D3 K1TV обладает ограниченным сходством с субдоменом D3 флавириусов, что объясняется высоким уровнем варибельности этой области у вирусов семейства *Flaviviridae* [10]. Полученные результаты хорошо согласуются с единственной экспериментально полученной структурой С-концевой части белка NS3 сегментированного флавиподобного вируса Alongshan [10]. Отсутствие домена сериновой протеазы NS3, активность которого активируется у флавириусов кофактором NS2B и который отвечает за расщепление вирусного полипротеина в участках между неструктурными белками NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A и NS4B/NS5 [16], может быть обусловлено уникальным строением упакованного в отдельные частицы вирусного генома, который эволюционно сформировался у сегментированных флавиподобных вирусов при отсутствии необходимости расщепления вирусного полипротеина, в отличие от несегментированных флавириусов.

Также в NS3 обнаружены аминокислотные последовательности, консервативные для K1TV и несегментированных флавириусов. Благодаря консервативным аминокислотам G, K, T в мотиве I, а также элементу DEAD-бокса в мотиве II (рис. 2), происхо-

дят координация иона магния внутри кармана связывания аденозинтрифосфата и связывание NTPase у флавириусов. В VI мотиве четыре аминокислоты R (рис. 2) имеют решающее значение для активности NTPase и RTPase. Предполагается, что консервативные аминокислоты P из мотивов Ia и IV (рис. 2) взаимодействуют с рибозной 2'-гидроксильной группой оцРНК, в то время как R из мотива Ia, R и K из мотива IVa и T из мотива V взаимодействуют с фосфатным остатком оцРНК [16].

Созданная модель вирусного белка NS5 K1TV также показала наличие характерных для флавириусов доменов метилтрансферазы и RdRp и шести структурных мотивов RdRp: A, B, C, D, E, F, а также высококонсервативных аминокислотных последовательностей, функции которых описаны для флавириусов (рис. 1, 2). Домен метилтрансферазы у флавириусов обладает двумя ферментативными активностями – метилированием гуанина-N7 и нуклеозида-2'-O, увеличивающими стабильность вновь синтезированной РНК. RdRp необходим для репликации вирусной РНК. Мотивы A и C RdRp флавириусов участвуют в полимеризации нуклеотидов благодаря наличию в них аспарагиновой кислоты. Мотив B RdRp способствует беспрепятственному движению полимеразного комплекса по вирусной РНК благодаря наличию в нём аминокислот серина и глицина [17]. Мотивы E и C RdRp взаимодействуют с остовом РНК-продукта [18]. Основная функция мотива F RdRp, состоящего из трёх бета-листов и соединительных петель [17], заключается в связывании трифосфата NTP [19]. Аргинин в данном мотиве непосредственно участвует в каталитической активности полимеразы, что уже было экспериментально показано для несегментированных флавириусов [20]. Мотив D RdRp важен для осуществления структурных перестроек фермента, а именно закрытия активного сайта RdRp лизином, который располагается перед мотивом F RdRp [17].

В RdRp K1TV и флавириусов были обнаружены аминокислотные замены в положениях, соответствующих сайтам связывания RdRp с ионами цинка, которые характерны для флавириусовой RdRp и необходимы для ее стабилизации на молекуле вирусной РНК [17]. Аминокислотный состав некоторых сайтов был полностью другим, что свидетельствует об отсутствии сайтов связывания с ионами цинка у RdRp K1TV: либо расположение сайтов не совпадает с таковыми у представителей рода флавириусов, либо же у K1TV существует свой собственный механизм стабилизации репликационного комплекса. Это может указывать на различие в механизмах работы репликационного комплекса сегментированных флавиподобных вирусов и классических флавириусов. Не исключено, что большую роль в этом процессе играют 5'- и 3'-нетранслируемые регионы, которыми обладает каждый сегмент геномной РНК K1TV.

Таким образом, для NS3 и NS5 K1TV удалось обнаружить домены, мотивы и консервативные ами-

ноктислотные последовательности, характерные для несегментированных вирусов семейства Flaviviridae. При этом обнаружены отличия: в частности, отсутствует информация о структуре предполагаемых белков капсида VP1–VP3 K1TV, не удалось обнаружить домен сериновой протеазы в белке NS3 K1TV и сайтов связывания RdRp K1TV с ионами цинка. Обнаруженные отличия указывают как на сходство, так и выраженные различия между сегментированными флавиподобными вирусами и несегментированными флавивирусами.

Заключение

В результате проведенного исследования получены данные о пространственном устройстве вирусных белков нового сегментированного флавиподобного вируса K1TV. Обнаружено, что предполагаемые структурные белки VP1–VP3 K1TV не имеют аналогов с известными в настоящее время вирусными белками. Данные моделирования вирусных белков NS3 и NS5 позволили с высокой степенью достоверности установить, что белок NS5 K1TV является РНК-зависимой РНК-полимеразой и дополнительно обладает метилтрансферазной активностью. Белок NS3 K1TV, по всей вероятности, обладает только хеликазной активностью. Удалось получить первые модели пространственных структур белков NS3 и NS5 K1TV. Они имели высокий уровень топологического сходства с белками NS3 и NS5 вирусов денге и клещевого энцефалита при низком уровне схожести аминокислотных последовательностей с этими несегментированными флавивирусами (менее 30%). У NS5 K1TV обнаружены типичные домены, характерные для флавивирусной метилтрансферазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы, а также типичные структурные мотивы А, В, С, D, Е, F. Идентифицированы хеликазный домен и его основные структурные мотивы, характерные для NS3 K1TV. Однако домена сериновой протеазы, типичной для NS3 флавивирусов, обнаружено не было. В аминокислотной последовательности белков NS3 и NS5 K1TV обнаружены высококонсервативные последовательности протяженностью 3–7 аминокислот, характерные для K1TV и несегментированных флавивирусов. Обнаружено восемь аминокислотных замен, пять из них предположительно локализованы в альфа-спиралях и три – в свободных петлях неструктурных белков полногеномных последовательностей K1TV/2018/1 и K1TV/2018/2. При этом полногеномная последовательность K1TV 2017 г. имела 24–35 замен, что говорит о существенной изменчивости K1TV.

Полученные результаты показывают наличие структурного сходства белков NS3 и NS5 сегментированных флавиподобных вирусов и несегментированных флавивирусов при фактически полном отсутствии схожести структурных белков вирионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
2. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
3. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P., Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
4. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
5. Zhang X., Wang N., Wang Z., Liu Q. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence. *Curr. Opin. Virol.* 2020; 40: 11–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.001>
6. Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., Litov A.G., Ivannikova A.Y., Makenov M.T., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses*. 2021; 13(3): 458. <https://doi.org/10.3390/v13030458>
7. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine*. 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
8. Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенова А.О., Зайковская А.В., Волюнкина А.С., Котенев Е.С. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020; 75(2): 192–34. <https://doi.org/10.15690/vramn1192>
9. Emmerich P., Jakupi X., von Pössel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviruses in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
10. Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ*. 2020; 7(Pt. 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/S2052252520003632>
11. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(W1): W320–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
12. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596(7873): 583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
13. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., et al. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004; 25(13): 1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
14. Tunyasuvunakool K., Adler J., Wu Z., Green T., Zielinski M., Židek A., et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*. 2021; 596(7873): 590–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
15. Guo J.J., Lin X.D., Chen Y.M., Hao Z.Y., Wang Z.X., Yu Z.M., et al. Diversity and circulation of Jingmen tick virus in ticks and mammals. *Virus Evol.* 2020; 6(2): veaa051. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa051>
16. Du Pont K.E., McCullagh M., Geiss B.J. Conserved motifs in the flavivirus NS3 RNA helicase enzyme. *Wiley Interdiscip. Rev RNA*. 2022; 13(2): e1688. <https://doi.org/10.1002/wrna.1688>
17. Dubankova A., Boura E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Res.* 2019; 169: 104536. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104536>
18. Duan Y., Zeng M., Jiang B., Zhang W., Wang M., Jia R., et al. Flavivirus RNA-dependent RNA polymerase interacts with genome UTRs and viral proteins to facilitate flavivirus RNA replication. *Viruses*. 2019; 11(10): 929. <https://doi.org/10.3390/v11100929>
19. Lu G., Gong P. A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Res.* 2017; 234: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.020>
20. Potapova U., Feranchuk S., Leonova G., Belikov S. The rearrangement of motif F in the flavivirus RNA-directed RNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018; 108: 990–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.009>

REFERENCES

1. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
2. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
3. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P., Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
4. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
5. Zhang X., Wang N., Wang Z., Liu Q. The discovery of segmented flaviviruses: implications for viral emergence. *Curr. Opin. Virol*. 2020; 40: 11–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.001>
6. Kholodilov I.S., Belova O.A., Morozkin E.S., Litov A.G., Ivannikova A.Y., Makenov M.T., et al. Geographical and tick-dependent distribution of flavi-like Alongshan and Yanggou tick viruses in Russia. *Viruses*. 2021; 13(3): 458. <https://doi.org/10.3390/v13030458>
7. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine*. 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
8. Ternovoy V.A., Gladysheva A.V., Sementsova A.O., Zaykovskaya A.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., et al. Detection of the RNA for new multicomponent virus in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Russia. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2020; 75(2): 192–34. <https://doi.org/10.15690/vramn1192> (in Russian)
9. Emmerich P., Jakupi X., von Pössel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
10. Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ*. 2020; 7(Pt. 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/S2052252520003632>
11. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(W1): W320–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>
12. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596(7873): 583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
13. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., et al. UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem*. 2004; 25(13): 1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
14. Tunyasuvunakool K., Adler J., Wu Z., Green T., Zielinski M., Židek A., et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*. 2021; 596(7873): 590–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
15. Guo J.J., Lin X.D., Chen Y.M., Hao Z.Y., Wang Z.X., Yu Z.M., et al. Diversity and circulation of Jingmen tick virus in ticks and mammals. *Virus Evol*. 2020; 6(2): veaa051. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa051>
16. Du Pont K.E., McCullagh M., Geiss B.J. Conserved motifs in the flavivirus NS3 RNA helicase enzyme. *Wiley Interdiscip. Rev RNA*. 2022; 13(2): e1688. <https://doi.org/10.1002/wrna.1688>
17. Dubankova A., Boura E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses. *Antiviral Res*. 2019; 169: 104536. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104536>
18. Duan Y., Zeng M., Jiang B., Zhang W., Wang M., Jia R., et al. Flavivirus RNA-dependent RNA polymerase interacts with genome UTRs and viral proteins to facilitate flavivirus RNA replication. *Viruses*. 2019; 11(10): 929. <https://doi.org/10.3390/v11100929>
19. Lu G., Gong P. A structural view of the RNA-dependent RNA polymerases from the Flavivirus genus. *Virus Res*. 2017; 234: 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.020>
20. Potapova U., Feranchuk S., Leonova G., Belikov S. The rearrangement of motif F in the flavivirus RNA-directed RNA polymerase. *Int. J. Biol. Macromol*. 2018; 108: 990–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.009>

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

© AUTHORS, 2023



Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro*

Timur M. Garaev¹, Tatyana V. Grebennikova¹, Varvara V. Avdeeva², Varvara V. Lebedeva¹, Victor F. Larichev¹¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;²Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

Introduction. Currently, low molecular-weight compounds are being developed as potential inhibitors of CoVs replication, targeting various stages of the replication cycle, such as major protease inhibitors and nucleoside analogs. Viroporins can be alternative protein targets.

The **aim** of this study is to identify antiviral properties of histidine derivatives with cage substituents in relation to pandemic strain SARS-CoV-2 *in vitro*.

Materials and methods. Combination of histidine with aminoadamantane and boron cluster anion $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ (compounds **I–IV**) was carried out by classical peptide synthesis. Compounds were identified by modern physicochemical methods. Antiviral properties were studied *in vitro* on a monolayer of Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2 (alpha strain) with simultaneous administration of compounds and virus.

Results. Derivatives of amino acid histidine with carbocycles and boron cluster were synthesized and their antiviral activity against SARS-CoV-2 was studied *in vitro*. Histidine derivatives with carbocycles and $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ have the ability to suppress virus replication. The solubility of substances in aqueous media can be increased due to formation of hydrochloride or sodium salt.

Discussion. 2HCl·H-His-Rim (**I**) showed some effect of suppressing replication of SARS-CoV-2 at a viral load of 100 doses and concentration 31.2 µg/ml. This is explained by the weakly basic properties of compound **I**.

Conclusion. The presented synthetic compounds showed moderate antiviral activity against SARS-CoV-2. The obtained compounds can be used as model structures for creating new direct-acting drugs against modern strains of coronaviruses.

Keywords: adamantane derivatives; histidine amino acid; antiviral activity; SARS-CoV-2; boron cluster anions

For citation: Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Lebedeva V.V., Larichev V.F. Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 18-25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

For correspondence: Timur M. Garaev, PhD (Biol.), Lead Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Information about the authors:Garaev T.M., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>Avdeeva V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0655-1052>Lebedeva V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>Larichev V.F., <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Contribution: Garaev T.M. – the idea of using derivatives of boron anion clusters with amino acid residues as antiviral agents, molecular design of future inhibitor structure, analysis and prediction of molecular properties of carbocycles and boron cluster substituted with amino acid residues by *in silico* molecular simulations, synthesis of compounds of histidine residues with carbocyclic fragments, introduction of histidine fragment into the boron cluster by the reaction with substituted derivative $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$, writing the text of the article; Grebennikova T.V. – general management and development of a new class of compounds, problem setting and control of the experiment, agreement of experimental conditions and analysis of results; Avdeeva V.V. – synthesis of initial salts of decahydro-*closo*-decaborate anion, multistage functionalization of boron cluster: introduction of oxonium substituent to form $[B_{10}H_9OC_4H_8]^-$, its nucleophilic opening, hydrolysis of resulting substituted $[B_{10}H_9OC_4H_8CN]^{2-}$ derivative to form *closo*-decaborate anion with COOH group $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$, editing the text of the article, translation to English; Lebedeva V.V. – supervision of the experiment, reconciliation of the conditions of the experiment and the results of the experiment for the synthesis of the target compound, determination of the strategy of the experiment *in vitro*, analysis of the experiment results, editing the text of the article; Larichev V.F. – conception development and *in vitro* experiment: study of specific activity of derivatives against pandemic strain of coronavirus SARS-CoV-2 on tissue culture cells Vero E6.

Funding. The research was funded by the state budget.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Received 2 November 2022

Accepted 13 December 2022

Published 30 January 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*

Гараев Т.М.¹, Гребенникова Т.В.¹, Авдеева В.В.², Лебедева В.В.¹, Ларичев В.Ф.¹¹Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098, г. Москва, Россия;²Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия

Введение. В настоящее время разрабатывается целый ряд низкомолекулярных соединений в качестве потенциальных ингибиторов репликации CoVs, направленных на различные этапы репликационного цикла, такие как ингибиторы основной протеазы и аналоги нуклеозидов. Альтернативной белковой мишенью могут выступать виропорины.

Цель исследования – выявление противовирусных свойств производных гистидина с каркасными заместителями в отношении пандемического штамма коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Материалы и методы. Получение соединения гистидина с аминоадамантаном и декагидро-клозо-декаборатным анионом $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ проведено методами классического пептидного синтеза. Структура соединения подтверждена современными физико-химическими методами. Противовирусные свойства синтетических соединений изучены *in vitro* на монослое клеток Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2 (штамм альфа), при одномоментном внесении соединений и вируса.

Результаты. Синтезированы производные аминокислоты гистидина с карбоциклами и кластерными анионами бора, и исследована их противовирусная активность в отношении коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*. На клеточных культурах показано, что производные гистидина с карбоциклами и кластерным анионом бора $[B_{10}H_{10}]^{2-}$ обладают способностью подавлять репликацию вируса. Также была показана возможность увеличения растворимости субстанции в водных средах за счёт образования хлоргидрата или натриевой соли.

Обсуждение. Соединение $I\ HCl\cdot H\text{-His-Rim}$ проявляло некоторый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при вирусной нагрузке 100 доз и концентрации 31,2 мкг/мл. Наиболее очевидным объяснением противовирусного действия соединения I на угнетение репликации SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro* могут являться слабоосновные свойства, которые проявляет это соединение.

Заключение. Представленные синтетические соединения проявили умеренную противовирусную активность в отношении варианта коронавируса SARS-CoV-2. Полученные соединения могут быть использованы в качестве модельных структур для создания нового препарата прямого действия против современных штаммов коронавируса.

Ключевые слова: производные адамантана; аминокислота гистидин; противовирусная активность; SARS-CoV-2; кластерные анионы бора

Для цитирования: Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Лебедева В.В., Ларичев В.Ф. Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 18-25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

Для корреспонденции: Гараев Тимур Мансурович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, Россия. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Участие авторов: Гараев Т.М. – идея использования производных кластеров аниона бора с аминокислотными остатками в качестве противовирусных средств, молекулярный дизайн структуры будущего ингибитора, анализ и предсказание свойств молекул карбоциклов и борного кластера, замещенных аминокислотными остатками, методами молекулярного моделирования *in silico*, синтез соединений остатка гистидина с карбоциклическими фрагментами, введение гистидинового фрагмента в борный кластер за счёт проведения реакции с замещенным производным $[2-B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$, написание текста статьи; Гребенникова Т.В. – общее руководство и разработка концепции исследования нового класса соединений, постановка задачи и контроль над выполнением эксперимента, согласование условий постановки эксперимента и анализ результатов; Авдеева В.В. – синтез исходных солей декагидро-клозо-декаборатного аниона, проведение многостадийной функционализации борного кластера: введение в кластер оксониевого заместителя с образованием $[B_{10}H_9OC_4H_8]^-$, его нуклеофильное раскрытие, гидролиз полученного замещенного производного $[B_{10}H_9OC_4H_8CN]^{2-}$ с образованием клозо-декаборатного аниона с COOH группой $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$, редактирование текста статьи, перевод на английский язык; Лебедева В.В. – контроль за выполнением эксперимента, согласование условий постановки и результатов эксперимента по синтезу целевого соединения, определение стратегии проведения эксперимента *in vitro*, анализ результатов эксперимента, редактирование текста статьи; Ларичев В.Ф. – разработка концепции и проведение эксперимента *in vitro*: изучение

специфической активности производных в отношении пандемического штамма коронавируса SARS-CoV-2 на клетках культуры ткани Vero E6.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Поступила 02.11.2022

Принята в печать 13.12.2022

Опубликована 30.01.2023

Introduction

Coronaviruses are zoonotic viruses capable of infecting humans and animals. Modern strains of coronaviruses (CoVs) are capable of causing severe and fatal illness in humans. The emergence of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) in 2002 and Middle East Respiratory Syndrome (MERS) in 2012 highlighted the ability of CoVs to cause fatal diseases in humans [1–4].

During the current COVID-19 pandemic [5, 6] caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2, containment measures and vaccination have slowed the spread of the infection, but have not been able to completely prevent the disease among healthcare workers, patients and the entire population of the planet.

In connection with the outbreak of new infectious diseases caused by various pathogenic viruses and the development of resistance to classical antiviral drugs, pharmaceutical companies and numerous research groups are looking for new antiviral agents with unique chemical and physical properties [7, 8]. To date, there is no approved therapeutic agent against any human coronavirus, but a number of antiviral compounds under investigation are currently undergoing clinical trials [9–14]. Creating new antiviral drugs against COVID-19 is challenging and requires significant time and effort to develop and validate.

Currently, a number of low molecular weight compounds are being developed as potential inhibitors of CoVs replication aimed at various stages of the replication cycle [15]. Some compounds, in particular inhibitors of the main CoVs protease, are currently undergoing the final stages of clinical trials and are awaiting approval from the pharmaceutical committee. This class of compounds are peptidomimetics capable of inhibiting the enzyme 3-chymotrypsin-like protease (3CLpro). 3CLpro cleaves the precursor peptide at 11 sites into individual viral proteins of the new CoVs virion [16]. Another class of antiviral compounds is represented by nucleoside analogues that mimic naturally occurring nucleosides to suppress viral RNA-dependent DNA polymerase [17].

An alternative protein target can be small viral proteins capable of forming pores in cell membranes and virus envelopes, viroporins. Viroporin inhibitors can form a new class of antiviral drugs that can act as an independent drug, as in the case of Remantadine against influenza A virus, and possibly as part of complex therapy. SARS-CoV-2 E proteins have a polypeptide length of 76 amino acids and have one α -helical transmembrane domain [18, 19]. Proteins E are capable of forming pentameric structures with the function of ionic conduction [20]. Protein E from CoV appears to be the most likely target

for inhibitor molecules based on adamantyl amino acids. The adamantane carbocyclic cage as a lipophilic agent in this case plays the role of a carrier for an amino acid residue or another physiologically important compound. The adamantane cage is a highly hydrophilic residue, therefore, in some cases, it can be replaced by other carbocycles, such as norbornene or cyclohexane [21].

We have previously shown that dichloride L-histidyl-aminoethyladamantane ($2\text{HCl}\cdot\text{H}\cdot\text{His}\cdot\text{Rim}$) exhibits an antiviral effect against influenza A virus strains resistant to Amantadine and Remantadine. Moreover, this compound was an inhibitor of the function of the M2 ion channel of the influenza A virus [22]. Viroporin M2 is vital for the influenza A virus to infect the cell. This is an ion channel built into the viral envelope that selectively conducts hydrogen ions through itself from the cell into the virus. The virus enters the host cell enclosed in endosomes (membrane structures) as a kind of bubbles. At a certain value of the acidity of the environment, the M2 protein is activated and begins to pump hydrogen ions, lowering the pH inside the viral particle and thereby causing its disintegration to release the genetic material of the virus into the cytoplasm of the host cell.

The influenza A virus M2 protein and the CoV E protein have a similar secondary structure, a comparable amino acid sequence length, and also play an important role in the virus assembly step. This suggests that these two viroporins should be sensitive to homologous synthetic compounds. Thus, there are all prerequisites for achieving the effect of suppressing the function of the channel formed by the E protein of the coronavirus, carbocyclic derivatives of the histidine amino acid residue.

The aim of the study is to identify the antiviral properties of histidine derivatives with cage substituents in relation to the pandemic strain of SARS-CoV-2 coronavirus *in vitro*.

Materials and methods

Synthetic compounds

The compounds under consideration were obtained by the methods of organic and peptide synthesis described by us earlier [21, 23, 24]. **Fig. 1** shows the structures of compounds that exhibited antiviral activity against modern strains of influenza A virus. L-histidyl-aminoethyladamantane dihydrochloride (compound **I**, $2\text{HCl}\cdot\text{H}\cdot\text{His}\cdot\text{Rem}$) [25]; a derivative of the *closo*-decaborate anion with a histidine methyl ester residue as a pendant substituent, separated from the boron cluster by a spacer $-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CO}-$ (compound **II**, $\text{Na}_2[\text{B}_{10}\text{H}_9-\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CO}\cdot\text{His}\cdot\text{OMe}]$) [26, 27]; histidyl-dicyclohexyl

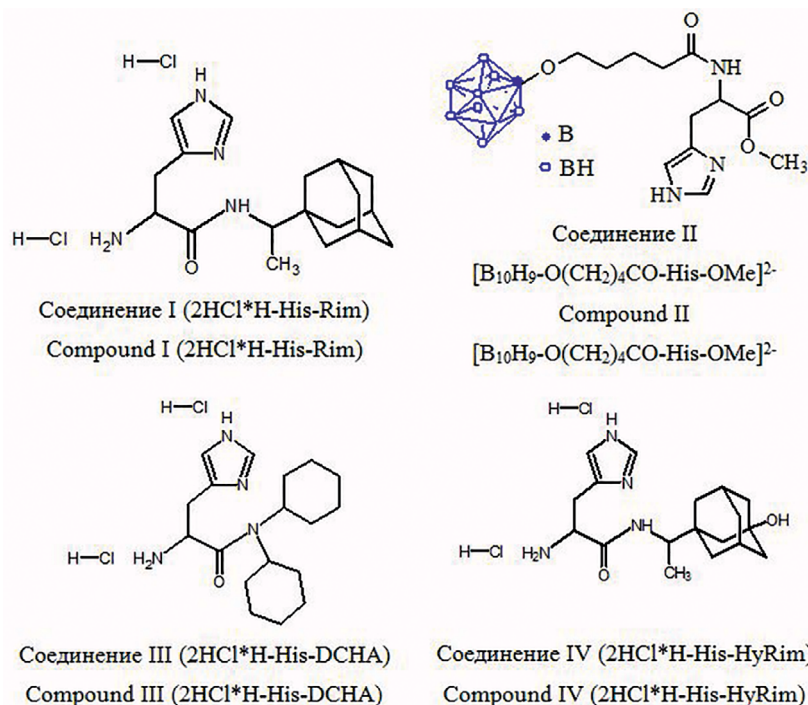


Fig. 1. Synthetic compounds of histidine residue with bulky cage substituents.

Рис. 1. Синтетические соединения остатка гистидина с объёмными каркасными заместителями.

amide dihydrochloride (compound **III**, 2HCl*H-His-DCHA); histidyl-3-hydroxy-aminoethyladamantane dihydrochloride (compound **IV**, 2HCl*H-His-HyRim). Compounds **III** and **IV** are new, but were obtained in a manner similar to that of compound I.

Virus

The studies used a strain of human coronavirus SARS-CoV-2, passage 4, with an infectious activity of 106 TCID₅₀/ml for Vero E6 cells deposited and the State Collection of Viruses of the Russian Federation of the Federal State Budgetary Institution “National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya” of the Ministry of Health of Russian Federation under the number No. 1301/2 GKV.

GISAID: 421275 EPI ISL

Russia/Moscow PMVL-1/2020 GISAID Clade GR

Clade 20B

The SARS-CoV-2 virus was passaged and titrated on a Vero E6 monolayer culture. Infectious titer was determined by the standard titration method and calculated according to the method of Reed and Mench. The culture fluid lysate was poured into aliquots and kept at -70 ± 10 °C until the study.

Cell culture

In the experimental work, we used a continuous cell line of African green monkey (*Chlorocebus aethiops*) kidney cells Vero E6 of the All-Russian Collection of Cell Cultures at the Federal State Budgetary Institution “National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya” of the Ministry of Health of Russian Federation.

Cell cultivation was carried out on DMEM medium. Vero E6 cells were placed at 12,000 cells/well in 96-well culture flat-bottomed plates in a volume of 100 µl of freshly prepared DMEM medium. Cultivated for 24 hours at a temperature of 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂.

Evaluation of the cytotoxic effect of compounds

An experiment to evaluate the cytotoxic effect on cell culture was carried out in the range of 12 concentrations of the drug from 2500.0 to 0.5 µg/ml in steps of two by triturating the initial concentration in the wells of a 96-well plate. After cells were incubated with drugs for 96 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, the state of the cell monolayer was visually assessed by comparing it with cell control (without compounds) according to a four-cross scheme, where four crosses correspond to 100% cell death, two crosses correspond to 50% cytotoxic concentration (CC₅₀). Thus, based on the comparison of the state of the cell monolayer without preparations with cells containing the compounds at the appropriate concentration, the cytotoxic effect of the compounds on the cell monolayer was determined.

Evaluation of the antiviral activity of compounds

The assessment of viral production by cytopathic effect (CPE) was carried out on the basis of cell viability analysis using microscopy in order to visually determine the boundaries of viral cell damage, as well as to control the toxicity of substance doses.

An experiment to assess cell viability in the test for antiviral efficacy was carried out in the concentration range of the drug 2500.0 to 0.5 µg/ml by titrating the initial concentration in the wells of a 96-well plate. The

antiviral activity of the compounds was assessed visually under a microscope 96 h after infection by inhibition of the CPE of the virus in a Vero E6 cell culture.

Results

Compound **I** showed a stable effect of suppressing the replication of the SARS-CoV-2 virus at a very narrow range of non-toxic concentrations of 75.0–30.0- $\mu\text{g/ml}$ and a viral load of 100 doses. The 50% cytotoxic dose was about 70 $\mu\text{g/ml}$, the concentration to achieve a stable antiviral effect was about 31 $\mu\text{g/ml}$ (Table). To reduce toxicity and improve the antiviral properties of compound **I**, the adamantane carbocycle was replaced by two cyclohexane residues in the form of dicyclohexylamine (2HCl*H-His-DCHA, compound **III**). The toxicity of compound **I**, indeed, was reduced several times, CC_{50} was 312 $\mu\text{g/ml}$. However, the antiviral activity of compound **III** is significantly lower than for compound **I** and is about 156 $\mu\text{g/ml}$. At the same time, the antiviral effect of the compound was observed only at the border between toxic and non-toxic concentrations. When the concentration was lowered below 156 $\mu\text{g/ml}$, the antiviral effect of compound **III** disappeared. Moreover, it should be noted that the solubility of compound **III** deteriorated compared to completely water-soluble compound **I**. To dissolve compound **III**, a composition of 10% acetonitrile, 30% of 4% PEG 1150 solution in water, and 60% DMEM medium was used. Another way to increase the affinity of a substance for the target protein to form additional hydrogen bonds with the amino acid residues of the inner pore of the protein E channel was to add a hydroxyl group to the para position in the adamantane carbocycle (compound **IV**).

The antiviral properties of compound **IV**, like compound **III**, were manifested at higher concentrations compared to compound **I**. Moreover, compound **IV** was much less soluble in the aqueous medium than compound **I**. This modification did not lead to an improvement in the antiviral properties of compound **I**. At high active con-

centration of the compound, there are no prospects for obtaining a high chemotherapeutic index (at least in *in vitro* experiments), which is an important factor for a candidate compound. From previous studies comparing the histidine compound with a boron cluster anion (compound **II**) and compound **I** in relation to influenza A virus, it was shown that compound **II** was slightly superior in antiviral properties to compound **I** [23], the 50% inhibitory dose was 3.2 $\mu\text{g/ml}$ versus 7.5 $\mu\text{g/ml}$ for compound **I**. It is important that compound **II** has a high aqueous solubility, like compound **I**, since it is a disodium salt. Tests of the antiviral properties of compound **II** against SARS-CoV-2 showed their presence in the concentration range of 19.5–4.9 $\mu\text{g/ml}$.

Discussion

Compound **I** 2HCl*H-His-Rem showed an antiviral effect against influenza A virus strains resistant to Amantadine and Remantadine. This compound was an inhibitor of the function of the M2 ion channel of the influenza A virus [22]. There were some prerequisites that it would be possible to achieve the effect of suppressing the function of the channel formed by the E protein of the coronavirus. Protein E is poorly represented on the surface of the virion, but it is present in large quantities in infected cells. Protein E is mainly distributed in intracellular membranes between the endoplasmic reticulum (ER) and the cisterns of the Golgi complex. In these places, it is involved in the assembly of the virus and intracellular transport. Compound **I** showed some effect of suppressing SARS-CoV-2 virus replication at a viral load of 100 doses and a concentration of 31.2 $\mu\text{g/ml}$. J.S. Kim et al. [28] in their *in silico* studies with the well-known ion channel blocker amantadine (1-amino-adamantane) hypothesized that amantadine blocks the SARS-CoV-2 ion channel, preventing the release of the viral nucleus into the cell cytoplasm. The BIO-HPC Achilles Blind Docking Server online service was used to perform molecular computer simulation of the docking of compound **I** and the crystallographic structure of the protein channel E. This tool performs an exhaustive series of docking calculations over the entire surface of a protein to find sites with the best affinity for the target protein. After calculating the similarity, this service groups the results according to the spatial overlap of the received positions. The structural model of the ligand (drug) was generated in HyperChem 8.0.8 software (Hypercube). Molecular modeling of the docking of the protein and ligand surfaces on the model of the transmembrane region of viroporin E (PBD: 5X29) resulted in a positive solution, namely, the detection of compound **I** at the channel constriction site surrounded by Phe26 and Ala22 residues (Fig. 2). Compound **I** sterically blocks the channel pore, which is composed of five subunits of protein E, forming a non-covalent interaction with the conjugation ring of phenyl radicals from Phe26 residues. The inhibitor compound is also found between the helices of individual strands. Figure 2 shows five positions of the molecules of compound **I** in the intercoil space, and these solutions are not equivalent for each strand.

Table. Biological properties of histidine derivatives with cage substituents

Таблица. Биологические свойства соединений гистидина с каркасными заместителями

№	Compound Соединение	CC_{50}	IC_{50}	SI
		mkg/ml CC_{50} мкг/мл	mkg/ml IC_{50} мкг/мл	
1	Compound I Соединение I 2HCl*H-His-Rem	78,1	31,2	2,5
2	Compound II Соединение II $\text{Na}_2[\text{B}_{10}\text{H}_9\text{-O}(\text{CH}_2)_4\text{CO-His-OMe}]$	19,5	9,8	2
3	Compound III Соединение III 2HCl*H-His-DCHA,	312,5	156,3	2
4	Compound IV Соединение IV 2HCl*H-His-HyRim	312,5	156,3	2

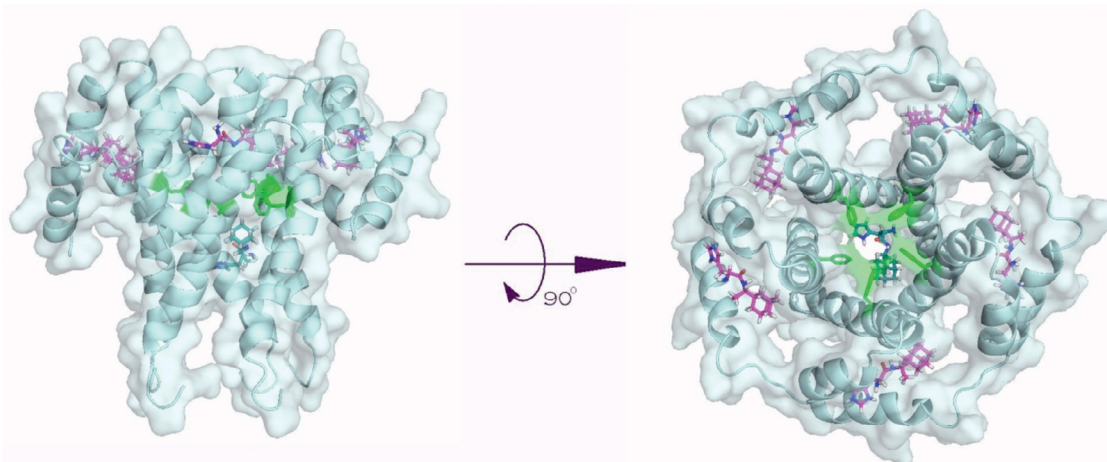


Fig. 2. Complex of compound I with the transmembrane domain of the E protein pentamer (viroporin) of the SARS-CoV-2 coronavirus (PDB: 5×29). Top and side views are shown. The figure shows the positions of the ligand in the channel pore and in the intercoil space of individual subunits. The conjugation of phenyl rings from the Phe26 residues of each chain is shown, which closes and opens the channel for directed transport of monovalent ions.

Рис. 2. Комплекс соединения I с трансмембранным доменом пентамера белка E (виropорином) коронавируса SARS-CoV-2 (PDB: 5×29). Представлены виды сверху и сбоку, показаны положения лиганда в поре канала и межспиральном пространстве отдельных субъединиц, сопряжение фенильных колец от остатков Phe26 каждой цепи, которое закрывает и открывает канал для направленного транспорта одновалентных ионов.

Another explanation for the antiviral effect of compound **I** on the inhibition of SARS-CoV-2 replication in an in vitro experiment may be the weakly basic properties that compound **I** exhibits. It is known that an increase in the pH of the endosomal content prevents the unpacking of viral particles. The open amino group and the imidazole group act as a weak base, while the carbocycle is able to migrate across membranes as a hydrophobic agent. In this case, the mechanism of action of compound **I** is rather similar to the action of the drug hydroxychloroquine sulfate, which was used to treat patients in the first months of the COVID-19 pandemic [29]. It is important to note that as a result of molecular modeling for compound **III** on the same viroporin E model, a positive solution was obtained, namely, the detection of the molecule at the constriction site of the pumping mechanism (Phe26). However, the experiments carried out in vitro for compounds **I** and **III** do not confirm the equivalent effect of these compounds on virus replication. Most likely, the antiviral effect is achieved only due to the weakly basic properties of the histidine residue and, therefore, is manifested only in high concentrations of compounds in the well of the plate.

The cytotoxic effect of compound **II** was higher than for compound **I**; on the other hand, the effective concentration was lower. Complete suppression of CPE of the virus by compound **II** was observed at a concentration of 9.8 µg/ml versus 31.2 µg/ml for compound **I**. The mechanism of action of compound **II** has not been established. It can be assumed that the detected antiviral properties of compound **II** are probably associated with the steric features of the molecule, which make it possible to block the function of viroporin. SARS-CoV viroporin E is known to have ion channel activity for monovalent cations with a 10-fold preference for sodium ions com-

pared to potassium ions [30]. Being inside the pore of the channel, the anion of compound **II** has the ability to capture positively charged ions into the coordination sphere, which disrupts the function of viroporin aimed at creating favorable homeostasis, maturation, and intracellular transport of viral proteins.

Conclusions

The presented synthetic compounds showed moderate antiviral activity against the SARS-CoV-2 variant of the coronavirus. The resulting compounds can be used as model structures for creating a new direct-acting drug against modern coronavirus strains. Protein E of the coronavirus appears to be the most likely target for inhibitor molecules based on adamantyl amino acids. Potentially, these results can be applied to other viroporins of RNA viruses, such as Vpu from human immunodeficiency virus type 1, p7 from hepatitis C virus, E5 from human papillomavirus and bovine diarrhea virus (BVDV), NSP-4 from rotavirus and other viruses. ion channels.

REFERENCES

1. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
2. McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H., Chanock R.M. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am. J. Epidemiol.* 1970; 91(6): 585–92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121171>
3. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
4. Walsh E.E., Shin J.H., Falsey A.R. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(10): 1634–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit393>

5. Yao N., Wang S.N., Lian J.Q., Sun Y.T., Zhang G.F., Kang W.Z., et al. Clinical characteristics and influencing factors of patients with novel coronavirus pneumonia combined with liver injury in Shaanxi region. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(3): 234–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501113-20200226-00070> (in Chinese)
6. Hu L.L., Wang W.J., Zhu Q.J., Yang L. Novel coronavirus pneumonia related liver injury: etiological analysis and treatment strategy. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(2): 97–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.001> (in Chinese)
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346–53. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
8. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
9. Brown A.J., Won J.J., Graham R.L., Dinno K.H. 3rd, Sims A.C., Feng J.Y., et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res*. 2019; 169: 104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>
10. de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., et al. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(12): 6771–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>
11. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., et al. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med*. 2017; 9(396): eaal3653. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653>
12. de Wilde A.H., Jochmans D., Posthuma C.C., Zevenhoven-Dobbe J.C., van Nieuwkoop S., Bestebroer T.M., et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014; 58(8): 4875–84. <https://doi.org/10.1128/aac.03011-14>
13. Choy K.T., Wong A.Y., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antivir. Res*. 2020; 178: 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>
14. Sanders J.M., Monogue M.L., Jodlowski T.Z., Cutrell J.B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*. 2020; 323(18): 1824–36. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>
15. Mestres J. The target landscape of N4-hydroxycytidine based on its chemical neighborhood. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.016485v1>
16. Zhu J., Zhang H., Lin Q., Lyu J., Lu L., Chen H., et al. Progress on SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Inspiration from SARS-CoV 3CLpro Peptidomimetics and Small-Molecule Anti-Inflammatory Compounds. *Drug Des. Devel. Ther*. 2022; 16: 1067–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S359009>
17. Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., et al. β -d-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. *J. Infect. Dis*. 2021; 224(3): 415–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
18. Parthasarathy K., Lu H., Surya W., Vararattanavech A., Peruvshin K., Torres A. Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified beta-barrel construct. *Protein Expr. Purif*. 2012; 85(1): 133–41. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.07.005>
19. Li Y., Surya W., Claudine S., Torres J. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. *J. Biol. Chem*. 2014; 289(18): 12535–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.560094>
20. Cao Y., Yang R., Lee I., Zhang W., Sun J., Wang W., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Sci*. 2020; 30(6): 1114–30. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
21. Shibnev V.A., Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Botikov A.G., Mishin D.V. Peptide carbocyclic derivatives as inhibitors of the viroporin function of RNA-containing viruses. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153> (in Russian)
22. Garaev T.M., Odnorovov A.I., Grebennikova T.V., Finogenova M.P., Sadykova G.K., Prilipov A.G., et al. Studying the effect of amino acid substitutions in the M2 ion channel of the influenza virus on the antiviral activity of the aminoadamantane derivative in vitro and in silico. *Adv. Pharm. Bull*. 2021; 11(4): 700–11. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
23. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Breslav N.V., Burtseva E.I., Grebennikova T.V., Zhdanov A.P., et al. New type of RNA virus replication inhibitor based on decahydro-closo-decaborate anion containing amino acid ester pendant group. *J. Biol. Inorg. Chem*. 2022; 27(4-5): 421–9. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01937-4>
24. Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Odnorovov A.I. Assessment of the antiviral activity of 2HC1* H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1)(Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273> (in Russian)
25. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. Derivatives of 1-(1-adamantyl)ethylamine and their antiviral activity. Patent RF 2461544 C1; 2011. (in Russian)
26. Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Malinina E.A., Kuznetsov N.T., Zhizhin K.Yu., et al. Amino acid derivative of decahydro-closo-decaborate anion and its antiviral activity against influenza A virus. Patent RF 2749006 C1; 2020. (in Russian)
27. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Malinina E.A., Zhizhin K.Yu., Kuznetsov N.T. Peptide carbocyclic derivatives as inhibitors of the viroporin function of RNA-containing viruses. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2017; 43(5): 517–525. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
28. Abreu G.E.A., Aguilar M.E.H., Covarrubias D.H., Durán F.R. Amantadine as a drug to mitigate the effects of COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020; 140: 109755. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109755>
29. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis*. 2020; 71(15): 732–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>
30. Wilson L., McKinlay C., Gage P., Ewart G. SARS Coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*. 2004; 330(1): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.033>

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med*. 2003; 348(20): 1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
2. McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H., Chanock R.M. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am. J. Epidemiol*. 1970; 91(6): 585–92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121171>
3. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 48(8): 2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
4. Walsh E.E., Shin J.H., Falso A.R. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *J. Infect. Dis*. 2013; 208(10): 1634–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit393>
5. Yao N., Wang S.N., Lian J.Q., Sun Y.T., Zhang G.F., Kang W.Z., et al. Clinical characteristics and influencing factors of patients with novel coronavirus pneumonia combined with liver injury in Shaanxi region. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(3): 234–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501113-20200226-00070> (in Chinese)
6. Hu L.L., Wang W.J., Zhu Q.J., Yang L. Novel coronavirus pneumonia related liver injury: etiological analysis and treatment strategy. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(2): 97–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.001> (in Chinese)
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346–53. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
8. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
9. Brown A.J., Won J.J., Graham R.L., Dinno K.H. 3rd, Sims A.C., Feng J.Y., et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly diver-

- gent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2019; 169: 104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>
10. de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., et al. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(12): 6771–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>
 11. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., et al. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(396): eaal3653. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653>
 12. de Wilde A.H., Jochmans D., Posthuma C.C., Zevenhoven-Dobbe J.C., van Nieuwkoop S., Bestebroer T.M., et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4875–84. <https://doi.org/10.1128/aac.03011-14>
 13. Choy K.T., Wong A.Y., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antiviral Res.* 2020; 178: 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>
 14. Sanders J.M., Monogue M.L., Jodlowski T.Z., Cutrell J.B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA.* 2020; 323(18): 1824–36. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>
 15. Mestres J. The target landscape of N4-hydroxycytidine based on its chemical neighborhood. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.016485v1>
 16. Zhu J., Zhang H., Lin Q., Lyu J., Lu L., Chen H., et al. Progress on SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Inspiration from SARS-CoV 3CLpro Peptidomimetics and Small-Molecule Anti-Inflammatory Compounds. *Drug Des. Devel. Ther.* 2022; 16: 1067–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S359009>
 17. Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., et al. β -d-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(3): 415–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
 18. Parthasarathy K., Lu H., Surya W., Vararattanavech A., Pervushin K., Torres A. Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified beta-barrel construct. *Protein Expr. Purif.* 2012; 85(1): 133–41. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.07.005>
 19. Li Y., Surya W., Claudine S., Torres J. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(18): 12535–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.560094>
 20. Cao Y., Yang R., Lee I., Zhang W., Sun J., Wang W., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Sci.* 2020; 30(6): 1114–30. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
 21. Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Мишин Д.В. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropоринoв РНК-сoдержaщих вирусoв. *Биoорганичeская химия.* 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
 22. Garaev T.M., Odnovorov A.I., Grebennikova T.V., Finogonova M.P., Sadykova G.K., Prilipov A.G., et al. Studying the effect of amino acid substitutions in the M2 ion channel of the influenza virus on the antiviral activity of the aminoadamantane derivative in vitro and in silico. *Adv. Pharm. Bull.* 2021; 11(4): 700–11. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
 23. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Breslav N.V., Burtseva E.I., Grebennikova T.V., Zhdanov A.P., et al. New type of RNA virus replication inhibitor based on decahydro-closo-decaborate anion containing amino acid ester pendant group. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2022; 27(4-5): 421–9. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01937-4>
 24. Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Оdnовoрoв A.И. Oцeнкa прoтивoвируснoй активнoсти сoединeния 2HCl*H-His-Rim в сравнeнии с прoтивогриппoзным прeпарaтoм «Арбидoл» в oтнoшeнии высoкoвиpулeнтнoгo штaммa вирусa гриппa A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). *Вoпрoсы вирусoлoгии.* 2019; 64(6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>
 25. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Производные 1-(1-адамантил)этиламина и их противовирусная активность. Патент РФ RU 2461544 C1; 2011.
 26. Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Малинина Е.А., Кузнецов Н.Т., Жижин К.Ю. и др. Аминокислотное производное декагидро-клозо-декаборатного аниона и его противовирусная активность в отношении вируса гриппа А. Патент РФ RU 2749006 C1; 2020.
 27. Авдеева В.В., Гараев Т.М., Малинина Е.А., Жижин К.Ю., Кузнецов Н.Т. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropоринoв РНК-сoдержaщих вирусoв. *Биoорганичeская химия.* 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
 28. Abreu G.E.A., Aguilar M.E.H., Covarrubias D.H., Durán F.R. Amantadine as a drug to mitigate the effects of COVID-19. *Med Hypotheses.* 2020; 140: 109755. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109755>
 29. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 732–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>
 30. Wilson L., McKinlay C., Gage P., Ewart G. SARS Coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology.* 2004; 330(1): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.033>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2

Николаева Ю.В.¹, Галочкина А.В.¹, Штро А.А.¹, Бернс С.А.²¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородиной» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия;²ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России, 101990, г. Москва, Россия

Введение. Разработка лекарственных препаратов против SARS-CoV-2 по-прежнему имеет решающее значение для снижения заболеваемости и смертности.

Цель настоящего исследования – изучение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 препаратами интерферона гамма *in vitro*.

Материалы и методы. Исследована активность рекомбинантного интерферона гамма человеческого для внутримышечного и подкожного введения 500 000 МЕ и для интраназального введения 100 000 МЕ в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Методологический подход данного исследования основан на явлении снижения количества образованных бляшек под действием потенциального противовирусного препарата.

Результаты. Выявлена противовирусная активность рекомбинантного интерферона гамма как при профилактической, так и терапевтической схеме применения. Наименьшее количество бляшек наблюдалось при профилактической схеме внесения тестируемого объекта в концентрациях 1000 и 333 МЕ/мл. Полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) при профилактической схеме составила 24 МЕ/мл.

Обсуждение. Профилактическая схема применения тестируемого объекта оказалась более эффективной, чем терапевтическая, что, вероятно, объясняется запуском экспрессии различных интерферон-стимулируемых генов, воздействующих в большей степени на этап входа вируса в клетку и его репродукцию.

Заключение. Дальнейшее изучение влияния препаратов на основе рекомбинантного интерферона гамма на репродукцию вируса SARS-CoV-2 с целью клинического применения для профилактики и лечения является крайне актуальным.

Ключевые слова: интерферон гамма; COVID-19; коронавирусная инфекция; вирус SARS-CoV-2; *in vitro*; профилактическая схема; терапевтическая схема

Для цитирования: Николаева Ю.В., Галочкина А.В., Штро А.А., Бернс С.А. Активность интерферона гамма человеческого рекомбинантного *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 26-36. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

Для корреспонденции: Бернс Светлана Александровна, д.м.н., профессор, руководитель отдела изучения патогенетических аспектов старения, профессор кафедры терапии и общей врачебной практики ФГБУ «НМИЦ терапии и профилактической медицины» Минздрава России, 101990, г. Москва, Россия. E-mail: svberns@yandex.ru

Участие авторов: Николаева Ю.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание и редактирование текста; Галочкина А.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание и редактирование текста; Штро А.А. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, утверждение окончательного варианта статьи; Бернс С.А. – редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке ООО «НПП «Фармаклон».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.11.2022

Принята в печать 31.01.2023

Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

In vitro activity of human recombinant interferon gamma against SARS-CoV-2 virus

Yulia V. Nikolaeva¹, Anastasia V. Galochkina¹, Anna A. Shtro¹, Svetlana A. Berns²¹Smorodintsev research Institute of Influenza WHO National Influenza Centre of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;²National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia

Introduction. The development of drugs against SARS-CoV-2 continues to be crucial for reducing the spread of infection and associated mortality.

The aim of the work is to study the neutralization of the SARS-CoV-2 virus with interferon gamma preparations *in vitro*.

Materials and methods. The activity of recombinant human interferon gamma for intramuscular and subcutaneous administration of 500,000 IU and for intranasal administration of 100,000 IU against the SARS-CoV-2 virus *in vitro* was studied. The methodological approach of this study is based on the phenomenon of a decrease in the number of plaques formed under the action of a potential antiviral drug.

Results. The antiviral activity of recombinant interferon gamma has been experimentally confirmed, both in preventive and therapeutic application schemes. The smallest number of plaques was observed with the preventive scheme of application of the tested object at concentrations of 1000 and 333 IU/ml. The semi-maximal effective concentration (EC₅₀) with the prophylactic regimen was 24 IU/ml.

Discussion. The preventive scheme of application of the tested object turned out to be more effective than therapeutic one, which is probably explained by the launch of the expression of various interferon-stimulated genes that affect to a greater extent the steps of virus entry into the cell and its reproduction.

Conclusion. Further study of the effect of drugs based on recombinant interferon gamma on the reproduction of the SARS-CoV-2 virus for clinical use for prevention and treatment is highly relevant.

Keywords: *interferon gamma; COVID-19; coronavirus infection; SARS-CoV-2 virus; in vitro; preventive scheme; therapeutic scheme*

For citation: Nikolaeva Yu.V., Galochkina A.V., Shtro A.A., Berns S.A. *In vitro* activity of human recombinant interferon gamma against the SARS-CoV-2 virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 26-36 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-150>

For correspondence: Svetlana A. Berns, Dr Sci. (Med.), Professor, Head of the Department for the Study of Pathogenetic Aspects of Aging, Professor of the Department of Therapy and General Medical Practice, National Medical Research Center for Therapy and Preventive Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation, 101990, Moscow, Russia. E-mail: svberns@yandex.ru

Information about authors:Nikolaeva Yu.V., <http://orcid.org/0000-0001-6396-3144>Galochkina A.V., <http://orcid.org/0000-0002-3208-8006>Shtro A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2295-1881>Berns S.A., <http://orcid.org/0000-0003-1002-1895>

Contribution: Nikolaeva Yu.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing and editing the text; Galochkina A.V. – the concept and design of the study, the collection and processing of material, writing and editing the text; Shtro A.A. – concept and design of the study, collection and processing of material, approval of the final version of the article; Berns S.A. – editing the text, approval of the final version of the article.

Financing. The study was supported by Scientific and Production Enterprise "PHARMAKLON" LLC.

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

Received 29 November 2022

Accepted 31 January 2023

Published 28 February 2023

Введение

Распространение новой коронавирусной инфекции (COVID-19), достигшее, согласно определению Всемирной организации здравоохранения, уровня пандемии, вошло в историю как чрезвычайная ситуация мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всех странах [1, 2].

Поиск новых лекарственных средств для проведения терапии нового заболевания является долгим и дорогостоящим процессом с высокой частотой выбывания потенциальных препаратов [3–5]. Поэтому в текущей ситуации, когда по объективным причинам практически нет возможности за короткое время разработать эффективный и безопасный этиотропный противовирусный препарат, мишенью которого

являлись бы компоненты актуального штамма вируса SARS-CoV-2, необходимо использовать препараты, воздействующие на клеточные мишени и опосредованно, через внутриклеточные эффекторные молекулы врожденного иммунитета, ингибирующие различные этапы жизненного цикла вируса, защищенные от развития вирусной устойчивости и уже многократно доказавшие свою безопасность и эффективность на штаммах острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), в том числе на штаммах коронавируса [6].

Особое внимание должно быть уделено интерферонам (IFN) и их индукторам [7, 8]. Показано, что атипичная пневмония, вызванная SARS-CoV-2, способна нарушать IFN-опосредованный сигнальный путь [9].

На сегодняшний день, по данным всемирного реестра клинических исследований ClinicalTrials.gov, зарегистрировано 357 клинических исследований, проводимых в США и других странах при государственной и частной поддержке, по изучению влияния IFN на заболеваемость и течение инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2 [10], причём более половины из них посвящены применению при данной нозологии экзогенных рекомбинантных лекарственных препаратов на основе IFN. Таким образом, интерес к этой группе фармакологических препаратов в контексте их использования при COVID-19 не ослабевает, появляются новые доказательства возможности использования IFN, в том числе IFN гамма (IFN- γ) для подавления репродукции вируса SARS-CoV-2 и лечения COVID-19 [11–13].

IFN- γ , являясь важнейшим регуляторным белком иммунной системы, в активной форме представляет собой гомодимер с антипараллельной ориентацией субъединиц [14]. У человека ген IFN- γ находится на хромосоме 12q15 [15]. Обычно в организме человека продуцируется активированными Т-лимфоцитами и натуральными киллерами.

Один из основных механизмов активации внутриклеточного противовирусного иммунитета под действием IFN- γ связан с сигнальным путём JAK-STAT (Janus Kinases – Signal Transducer and Activator of Transcription), который, наряду с активацией внутриклеточного противовирусного иммунитета, регулирует действие множества цитокинов, IFN, факторов роста [16]. Не связанный с лигандом, рецептор IFN- γ состоит из двух субъединиц, представляющих собой неассоциированные друг с другом цепи – IFNGR1 (Interferon Gamma Receptor) и IFNGR2, которые через свои внутриклеточные домены конститутивно связаны со своими неактивированными янус-тирозинкиназами – JAK1 и JAK2 соответственно [16]. При взаимодействии с IFN- γ происходит димеризация цепей IFNGR1, вызывающая образование полного рецепторного комплекса IFNGR, в котором цепи IFNGR1 и IFNGR2 каждой из двух субъединиц тесно ассоциированы друг с другом таким образом, что их киназы JAK1 и JAK2 взаимодействуют в пространстве между собой и активируют друг друга путём фосфорилирования. Активированные тирозинкиназы JAK1 фосфорилируют

цепь IFNGR1 в каждой субъединице рецепторного комплекса с образованием двух рядом расположенных участков связывания STAT1 (сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции) [17]. В результате этого к рецепторному комплексу присоединяются два фактора STAT1, образуется их гомодимер, который, фосфорилируясь тирозинкиназой JAK2, отсоединяется от рецепторного комплекса IFNGR и транслоцируется в ядро клетки [16, 18]. Молекулы STAT1 в ядре связываются с IFN- γ активируемым сайтом (GAS) промоторных областей IFN-стимулируемых генов [19, 20], стимулируя их экспрессию, необходимую для ингибирования цикла репродукции вируса.

Кроме противовирусного действия, IFN- γ также является цитокином с противовоспалительными свойствами [21–23], блокирующим синтез трансформирующего фактора роста бета (TGF- β), ответственного за развитие фиброза лёгких, что является крайне актуальным свойством при цитокиновом шторме и дыхательной недостаточности вследствие инфекции COVID-19.

Таким образом, изучение влияния препаратов IFN- γ на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекцию COVID-19, является крайне актуальным.

В настоящем исследовании было проведено экспериментальное изучение противовирусной *in vitro* активности препаратов человеческого рекомбинантного IFN- γ в отношении коронавируса SARS-CoV-2. Действующее вещество представляет собой рекомбинантный IFN- γ человека, состоящий из 144 аминокислотных остатков, лишённый первых трёх аминокислотных остатков Cys-Тур-Сус, заменённых на Met [17, 24]. Молекулярная масса такого IFN- γ составляет 16,9 кДа. Он получен микробиологическим синтезом в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* и очищен колоночной хроматографией. Противовирусную активность тестируемых объектов исследовали путём оценки влияния разведений препаратов на ингибирование бляшкообразования в монослое клеток Vero после заражения вирусом SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3×10 БОЕ) при двух различных схемах применения объектов исследования – профилактической (за сутки до заражения клеток) и лечебной (через 2 ч после внесения вируса к клеткам).

Целью настоящего исследования являлось изучение нейтрализации вируса SARS-CoV-2 препаратами IFN- γ *in vitro*.

Материалы и методы

Исследовательский центр. Исследование выполнено на базе испытательной площадки ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, имеющей необходимый опыт и допуск к работе с вирусами II класса опасности в боксе биологической безопасности 3-го класса защиты в условиях BSL-3 на территории вирусологического лабораторного комплекса ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Манипуляции с биоматериалом выполнялись в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) испытательной площадки. Данное исследование регламентировалось требова-

ниями нормативных документов Российской Федерации и Евразийского экономического союза [25–27], утверждённого плана исследования, СОП и рабочими инструкциями.

Исследуемый препарат. Для проведения пилотного исследования использовался IFN- γ человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения 500 000 МЕ. Полученные в ходе пилотного исследования данные были использованы для выбора концентраций IFN- γ человеческого рекомбинантного для основного эксперимента.

Международное непатентованное наименование: IFN- γ человеческий рекомбинантный.

Фармакотерапевтическая группа: иммуномодулирующее средство.

Лекарственная форма: лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения во флаконе по 100 000 МЕ на 1 флакон.

Состав на 1 мл: действующее вещество – IFN- γ человеческий рекомбинантный – 100 000 ЕД; вспомогательное вещество – маннит 14,5 мг.

Исследуемые концентрации. Концентрации (разведения) объекта исследования при профилактической схеме применения составляли 1000, 333, 111, 37 и 12,3 МЕ/мл, а при лечебной схеме – 10 000, 3330, 1110, 370 и 123 МЕ/мл. Данные концентрации тестируемого объекта получали в ходе последовательных трёхкратных разведений растворов с концентрациями 10 000 МЕ/мл (разведение 1-леч, использованного при лечебной схеме) и 1000 МЕ/мл (разведение 1-пр, использованного при профилактической схеме), начиная с разведения 1 : 3 (разведение 2) до разведения 1 : 81 (разведение 5) на питательной среде DMEM с L-глутамином, глюкозой 4,5 г/л (25 мМ), 0,02 г/л левофлоксацина.

Приготовление растворов

Раствор рекомбинантного IFN- γ для пилотного исследования

Для приготовления стокового раствора содержимое флакона (лиофилизат, содержащий 500 000 МЕ IFN- γ) растворяли в 2 мл питательной среды DMEM, после чего полученный раствор из флакона одноканальным дозатором переменного объёма BIONIT Proline переносили в пробирку, содержащую 8 мл питательной среды DMEM. Полученный стоковый раствор IFN- γ с концентрацией 50 000 МЕ/мл (разведение 1) использовали для приготовления последующих десятикратных разведений тестируемого объекта (разведения 2, 3, 4, 5 с концентрацией 5000, 500, 50, 5 МЕ/мл). Десятикратные разведения готовили на питательной среде DMEM, которая в экспериментах выступала в роли носителя, а также контрольного вещества в контроле вирусного заражения.

Раствор рекомбинантного IFN- γ для основного исследования

Растворы тестируемого объекта с концентрациями 10 000 МЕ/мл (для использования при лечебной схеме) и 1000 МЕ/мл (для использования при профи-

лактической схеме) готовили из стокового раствора тестируемого объекта с концентрацией 100 000 МЕ/мл путём десятикратных разбавлений. Стоковый раствор тестируемого объекта с концентрацией 100 000 МЕ/мл получали при растворении содержимого флакона IFN- γ человеческого рекомбинантного, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ в 1 мл питательной среды DMEM.

Коронавирус SARS-CoV-2. В исследовании использовали штамм бета-коронавируса hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 (GISAID ID EPI_ISL_415710.1), депонированный в исследовательскую коллекцию вирусов ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», прошедший трехкратное пассирование в культуре клеток Vero. Титрование вируса на культуре клеток Vero перед постановкой пилотного и основного экспериментов проводили в 6-луночных культуральных планшетах. Сток вируса SARSCoV-2, хранящийся при -25°C в холодильнике для экспериментов, разводили до титра 100 TCID₅₀, что соответствует значению 3×10 БОЕ.

Культура клеток и среды. В качестве тест-системы использовали перевиваемую линию клеток эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero (ATCC CRL-1586). В качестве носителя (контрольного вещества) для приготовления конечных концентраций использовалась питательная среда DMEM жидкая. Всего для каждой схемы (лечебной и профилактической) применения в основном эксперименте было использовано по три 6-луночных планшета с конфлюэнтным монослоем клеток Vero. Для проведения экспериментальной работы клетки рассеивали в 6-луночные планшеты в посевной дозе 9×10^5 клеток на лунку, после чего инкубировали в течение 72 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂ до формирования монослоя полной конфлюэнтности примерно через 24–72 ч. Эксперименты проводили только после формирования клеточного монослоя полной конфлюэнтности. Характеристика экспериментальных групп (лунок 6-луночных планшетов в основном эксперименте) представлена в табл. 1.

Оценка противовирусной активности. Из образца вирусосодержащей суспензии готовили серию 10-кратных последовательных разведений, каждое разведение наносили на клеточный монослой и инкубировали в течение 2 ч при температуре 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂. Далее вирусосодержащую жидкость из лунок культуральных планшетов удаляли при помощи одноканального дозатора переменного объёма BIONIT Proline, после чего наносили полужидкую покровную среду с 0,9% агаром, планшеты инкубировали в течение 4 дней во влажной атмосфере 5% CO₂. По окончании срока инкубации клетки фиксировали и окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового в 10% растворе формальдегида, после чего в каждой лунке с помощью инвертированного микроскопа визуально подсчитывали количество образовавшихся бляшек (наименьшее тестируемое количество вируса, приводящее к образо-

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп основного исследования при воздействии на клетки тестируемым препаратом интерферон гамма в профилактической и лечебной схемах применения

Table 1. Characteristics of the experimental groups of the main study when cells were exposed to the test drug interferon gamma in the preventive and therapeutic schemes of application

Схема применения Application scheme	Обозначение разведения (группы) Dilution designation (group)	Количество лунок 6-луночных планшетов с клетками Number of wells for 6-well cell plates	Объект исследования Object of study	Концентрация тестируемого объекта в лунках, МЕ/мл Test object concentration in wells, IU/ml
Профилактическая Preventive	Разведение 1-пр Dilution 1-pr	3	Интерферон гамма Interferon gamma	1000
	Разведение 2-пр Dilution 2-pr	3		333
	Разведение 3-пр Dilution 3-pr	3		111
	Разведение 4-пр Dilution 4-pr	3		37
	Разведение 5-пр Dilution 5-pr	3		12,3
	Контроль вирусного заражения Virus infection control	3	Носитель (контрольное вещество) Carrier (control substance)	0
Лечебная Therapeutic	Разведение 1-леч Dilution 1-ther	3	Интерферон гамма Interferon gamma	10 000
	Разведение 2-леч Dilution 2-ther	3		3330
	Разведение 3-леч Dilution 3-ther	3		1110
	Разведение 4-леч Dilution 4-ther	3		370
	Разведение 5-леч Dilution 5-ther	3		123
	Контроль вирусного заражения Virus infection control	3	Носитель (контрольное вещество) Carrier (control substance)	0

ванию одной бляшки (зоны лизиса), принимали за инфекционную единицу (бляшкообразующую единицу – БОЕ)). Титр вируса (Т), исходя из количества подсчитанных бляшек (зон лизиса клеток), известного объёма внесённого вируса и разведения вируса, рассчитывали по формуле (1):

$$T = \frac{N_{\text{бляшек}} \times Dil}{V}, \quad (1)$$

где $N_{\text{бляшек}}$ – количество бляшек, Dil – разведение вирусосодержащего материала, V – объём заражающей дозы вирусного инокулята.

На основании полученных данных для каждой концентрации тестируемого объекта рассчитывали долю содержания вируса в лунках планшета ($C_{\%}$) по формуле (2) и долю ингибирования вирусной активности по формуле (3), а также EC_{50} – дозировку, вызывающую снижение титра вируса на 50%.

$$C_{\%} = \frac{T_{np}}{T_{кв}} \times 100\%, \quad (2)$$

где $C_{\%}$ – доля содержания вируса в лунке планшета, содержащей тестируемый объект; T_{np} – титр вируса в лунке, содержащей тестируемый объект в соответ-

ствующей концентрации; $T_{кв}$ – титр вируса в лунке контроля вирусного заражения (0 МЕ/мл).

$$C_{\text{inhibition}\%} = \left(1 - \frac{T_{np}}{T_{кв}}\right) \times 100\%, \quad (3)$$

где $C_{\text{inhibition}\%}$ – доля ингибирования вирусной активности в лунке планшета, содержащей тестируемый объект; T_{np} – титр вируса в лунке, содержащей тестируемый объект в соответствующей концентрации; $T_{кв}$ – титр вируса в лунке контроля вирусного заражения (0 МЕ/мл).

Анализ и представление данных. Для визуализации полученных результатов данные по титрам вируса в каждом образце были прологарифмированы (log). Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные подчинялись закону нормального распределения, для них были рассчитаны средние значения (M), соответствующие им стандартные отклонения (SD).

При сравнении титров вируса между клетками в лунках, подвергшихся воздействию исследуемых препаратов, с лунками отрицательного контроля (со-

держащими клетки, необработанные препаратами) использовали однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим попарным сравнением данных с помощью критерия Даннета. Различия были определены при уровне значимости $p < 0,05$.

Также в ходе анализа данных основного эксперимента на основании полученных вирусных титров для каждой концентрации объекта исследования была вычислена доля ингибирования образования вирусных бляшек (зон лизиса клеток), построена зависимость доли ингибирования образования вирусных бляшек от концентрации тестируемого объекта и вычислена его эффективная концентрации на уровне 50% (EC_{50}). Статистический анализ был выполнен с помощью программного обеспечения Prism 9.1.1 (GraphPad Software, США). Различия были определены при уровне значимости $p < 0,05$.

План испытания. Целью пилотного исследования являлся поиск широты и степени биологического действия IFN- γ , содержащегося в тестируемых объектах, в данной модельной системе, поэтому на первом этапе был протестирован широкий диапазон концентраций (десятикратных разведений) IFN- γ – 50 000, 5000, 500, 50 и 5 МЕ/мл.

В основном эксперименте оценивали противовирусную активность тестируемого объекта, содержащего рекомбинантный IFN- γ – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального вве-

дения 100 000 МЕ, в более узком диапазоне концентраций, выбранном на основании данных пилотного эксперимента и позволяющем более точно оценить и произвести расчёт EC_{50} (полумаксимальной эффективной концентрации для тестируемого объекта).

Результаты

При профилактической схеме внесения IFN- γ – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ в концентрациях 1000, 333, 111 МЕ/мл количество образовавшихся бляшек (титр вируса SARS-CoV-2) статистически значимо отличалось от значений титра вируса в лунках отрицательного контроля (контроля вирусного заражения), что свидетельствует о наличии противовирусной активности тестируемого объекта при данных концентрациях (однофакторный ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, при $p < 0,05$). Для иллюстрации полученных результатов по ингибированию вирус-индуцированного бляшкообразования при профилактической и терапевтической схемах применения тестируемого объекта на **рис. 1** и **2** приведены изображения лунок планшетов, содержащих вирусные колонии – бляшки.

Наименьшее количество бляшек наблюдалось при профилактической схеме внесения тестируемого объекта в концентрациях 1000 и 333 МЕ/мл.

В **табл. 2** представлены результаты оценки противовирусной активности препарата рекомбинантного

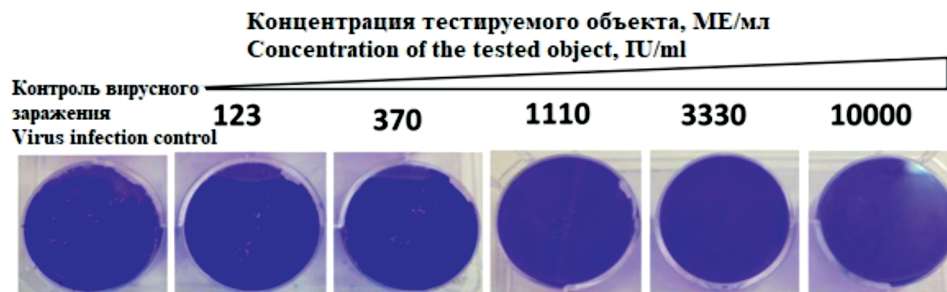


Рис. 1. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при лечебной схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

Fig. 1. The results of the analysis of the antiviral activity of the test object: Human recombinant gamma interferon, lyophilisate for the preparation of a solution for intranasal administration 100,000 IU against SARS-CoV-2 in the therapeutic scheme for plaque inhibition.

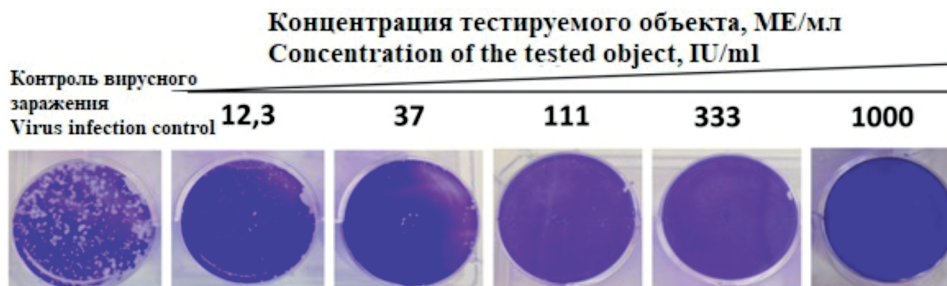


Рис. 2. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при профилактической схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

Fig. 2. The results of the analysis of the antiviral activity of the test object: Human recombinant gamma interferon, lyophilisate for the preparation of a solution for intranasal administration of 100,000 IU against SARS-CoV-2 in the prophylactic scheme for the inhibition of plaque formation.

Таблица 2. Результаты основного исследования противовирусной активности тестируемых препаратов интерферона гамма при профилактической и лечебной схемах введения в отношении вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero
Table 2. The results of the main study of the antiviral activity of the tested preparations of interferon gamma in the prophylactic and therapeutic schemes of application against the SARS-CoV-2 virus on Vero cell culture

Тестируемый объект Object under test	Схема применения Application scheme	Концентрация, МЕ/мл Concentration, IU/ml	Титр вируса, БОЕ/мл Virus titer, PFU/ml				Содержание вируса, % Virus content, %			
			1-й повтор 1 st repeat	2-й повтор 2 nd repeat	3-й повтор 3 rd repeat	среднее значение (n = 3), M ± SD mean value (n = 3), M ± SD	1-й повтор 1 st repeat	2-й повтор 2 nd repeat	3-й повтор 3 rd repeat	среднее значение (n = 3), M ± SD mean value (n = 3), M ± SD
		1000	0	0	0	0	0	0	0	0
Интерферон гамма Interferon gamma	Профилактическая Preventive	333	0	0,06 × 10 ⁶	0,12 × 10 ⁶	0,06 ± 0,06 × 10 ^{6*}	0,00	1,90	3,80	1,90 ± 1,90
		111	3,8 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁵	4,9 × 10 ⁵	4,4 ± 0,6 × 10 ^{5*}	11,45	14,24	15,51	13,73 ± 2,08
		37	1,24 × 10 ⁶	9,4 × 10 ⁵	1,2 × 10 ⁶	1,13 ± 0,16 × 10 ^{6*}	37,35	29,75	37,97	35,02 ± 4,58
		12,3	2,52 × 10 ⁶	1,96 × 10 ⁶	2,08 × 10 ⁶	2,19 ± 0,29 × 10 ^{6*}	75,90	62,03	65,82	67,92 ± 7,17
		0	3,32 × 10 ⁶	3,16 × 10 ⁶	3,16 × 10 ⁶	3,21 ± 0,09 × 10 ^{6*}	100	100	100	100
		10 000	0	0	0	0	0	0	0	
Интерферон гамма Interferon gamma	Лечебная Therapeutic	3330	0	1,5 × 10 ⁵	1,6 × 10 ⁵	1,0 ± 0,9 × 10 ^{5*}	0	2,78	3,51	3,56 ± 0,81
		1110	4,6 × 10 ⁵	7,6 × 10 ⁵	2,2 × 10 ⁶	1,14 ± 0,93 × 10 ^{6*}	20,18	14,07	48,25	27,50 ± 18,2
		370	1,6 × 10 ⁶	2,2 × 10 ⁶	2,36 × 10 ⁶	2,05 ± 0,40 × 10 ^{6*}	70,18	40,74	51,75	54,22 ± 14,9
		123	1,81 × 10 ⁶	1,92 × 10 ⁶	2,08 × 10 ⁶	1,94 ± 0,14 × 10 ^{6*}	79,39	35,56	45,61	60,83 ± 22,7
		0	2,28 × 10 ⁶	5,4 × 10 ⁶	4,56 × 10 ⁶	4,08 ± 1,61 × 10 ^{6*}	100	100	100	100

Примечание. *ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, отличия титров вируса статистически значимы в сравнении со значениями отрицательного контроля (титр вируса при концентрации препарата 0 МЕ/мл) при $p < 0,05$.

Note. *ANOVA, Dunnett's *post hoc* test, differences in virus titers are statistically significant in comparison with the values of the negative control (viral titer at a drug concentration of 0 IU/ml) at $p < 0.05$.

IFN-γ – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ при профилактической и лечебной схемах внесения.

Для тестируемого объекта IFN-γ человеческого рекомбинантного – лиофилизата для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ путём аппроксимации графика зависимости процента ингибирования бляшкообразования от концентрации¹ тестируемого объекта с помощью пятипараметрического уравнения (рис. 3) рассчитывали полумаксимальную эффективную концентрацию EC₅₀, которая при профилактической схеме составила 24 МЕ/мл.

При лечебной схеме применения IFN-γ человеческого рекомбинантный – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ также обладал противовирусной активностью, значения титров вируса SARS-CoV-2 во всех концентрациях тестируемого объекта статистически значимо отличались от значений в лунках отрицательного контроля (однофакторный ANOVA, *post hoc* критерий Даннета, при $p < 0,05$), что свидетельствует о высокой эффективности исследуемого препарата в отношении ингибирования бляшкообразования в данной тест-системе. Полумаксимальная эффективная концентра-

ция тестируемого объекта (EC₅₀) при лечебной схеме применения составляла приблизительно 234 МЕ/мл (рис. 4).

Обсуждение

Согласно полученным результатам, рекомбинантный IFN-γ – лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ продемонстрировал наличие противовирусной активности в исследуемых концентрациях при использовании в обеих схемах применения (профилактическая и терапевтическая).

По результатам эксперимента профилактическая схема применения тестируемого объекта была более эффективной, чем лечебная, что, вероятно, объясняется перестройкой внутренних механизмов клетки под действием IFN-γ, т.е. запуском экспрессии различных IFN-стимулируемых генов, воздействующих в большей степени на этап входа вируса в клетку и его репродукцию.

Наиболее изученными факторами противовирусной защиты, индуцируемыми IFN, являются протеинкиназа R (PKR), 2',5'-олигоденилатсинтаза (2',5'-OAS) и белок Mx1. В частности, PKR является серинтреониновой киназой, участвующей в контроле над транскрипцией и трансляцией. PKR активируется при связывании РНК. Противовирусная активность PKR связана с её способностью фосфорилировать альфа-субъединицу фактора eIF2α

¹Зависимость доли ингибирования вирусной активности (образования бляшек) от концентрации препарата в МЕ/мл (А), от двоичного логарифма концентрации препарата (В), M ± SD, n = 3 (каждая концентрация в трёх параллелях).

Интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 ME
Interferon gamma human recombinant, lyophilisate for solution for intranasal administration 100,000 IU

Профилактическая схема Prophylactic scheme

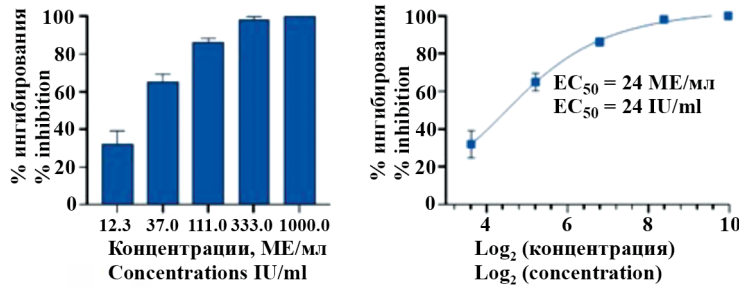


Рис. 3. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в профилактической схеме применения.

Fig. 3. The result of evaluating the effect on plaque formation inhibition upon infection of a cell monolayer with SARS-CoV-2 at a dose of 100 TCID₅₀ (3 × 10 PFU) in a prophylactic regimen.

Интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 ME
Interferon gamma human recombinant, lyophilisate for solution for intranasal administration 100,000 IU

Лечебная схема Therapeutic scheme

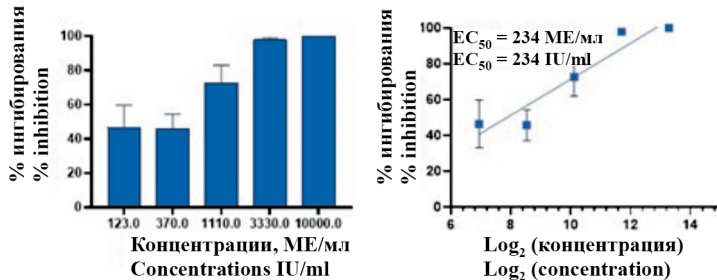


Рис. 4. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в лечебной схеме применения.

Fig. 4. The result of evaluating the effect on plaque formation inhibition when the cell monolayer is infected with SARS-CoV-2 at a dose of 100 TCID₅₀ (3 × 10 PFU) in the therapeutic regimen.

(eukaryotic initiation factor 2 alpha). В результате фосфорилирования формируется неактивный комплекс (eIF2 α -GDP-eIF2 β), способный быстро ингибировать транскрипцию [28]. Таким образом, IFN представляют собой одну из первых линий защиты от вирусных инфекций посредством регуляции сотен IFN-стимулируемых генов, которые индуцируют противовирусное состояние в инфицированных и соседних клетках [29].

Согласно данным доклинических исследований, известно, что предварительная обработка экзогенным IFN блокирует инфекцию SARS-CoV-2 [30–32]. Воздействие IFN ингибирует репликацию вируса и образование инфекционных вирионов *de novo* [31]. Таким образом, исследования *in vitro* часто демонстрируют превосходящую профилактическую эффективность IFN в сравнении с лечебной [30–32].

Проведённые клинические исследования также показывают эффективность применения IFN- γ для профилактики [12, 33] и лечения ОРВИ, в том числе вызванных SARS-CoV-2 (COVID-19) [13, 34].

Интересно, что экспрессия IFN- γ CD4⁺ Т-клетками в тяжёлых случаях COVID-19 снижается почти в 2 раза по сравнению с пациентами с умеренной формой заболевания [35]. Также есть сведения о сни-

жении уровня естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и их способности к продукции IFN- γ у пациентов с COVID-19 [36]. Учитывая воздействие вируса SARS-CoV-2 на иммунную систему, можно сделать вывод, что он в первую очередь поражает Т-лимфоциты, особенно CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, и приводит к снижению выработки IFN, в том числе IFN- γ . В результате наблюдается нарушение клеточного противовирусного иммунитета, заметное с ранних стадий инфекции по уровням цитокиновых белков, а также по нарастанию титра IgG, особенно у тяжёлых пациентов и у пациентов с быстро развивающимся прогрессированием заболевания [37]. Следовательно, можно предположить, что при хорошей активности звена врождённого иммунитета, активированных цитотоксических макрофагах, достаточном уровне IFN, которые обеспечивают приоритетную защиту на начальной стадии иммунного ответа, организм становится устойчивым к инфицированию [38].

Выводы

Согласно полученным результатам, рекомбинантный IFN- γ продемонстрировал наличие противовирусной активности в исследуемых концентрациях при использовании в обеих схемах применения.

В лечебной схеме применения препарат рекомбинантного IFN- γ обладал противовирусной активностью в диапазоне концентраций от 3333 до 10 000 МЕ/мл, при которых наблюдалось максимальное ингибирование бляшкообразования, близкое к 100%. Полу-максимальная эффективная концентрация тестируемого препарата (EC₅₀) при лечебной схеме применения составила приблизительно 234 МЕ/мл.

При профилактической схеме применения препарат рекомбинантного IFN- γ обнаружил ещё более высокую противовирусную активность при концентрациях 111, 333 и 1000 МЕ/мл. Получено значение полу-максимальной эффективной концентрации ингибирования вирус-индуцированного бляшкообразования, равное 24 МЕ/мл.

Таким образом, дальнейшее изучение влияния препаратов на основе рекомбинантного IFN- γ на репродукцию вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекцию COVID-19, с целью клинического применения для профилактики и лечения является крайне актуальным и перспективным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бутова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93>
2. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
3. Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., Wilkins M.R. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>
4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>
5. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–60. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
6. Логинова С.Я., Шукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В. Противовирусная активность препарата Кагоцел *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020; (3-4): 3–6. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-3-6>
7. Сологуб Т.В., Цветков В.В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив*. 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119>
8. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18>
9. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral. Res.* 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
10. ClinicalTrials.gov. IFN | COVID-19. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=>
11. Nguyen L.S., Ait Hamou Z., Gastli N., Chapuis N., Pène F. Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive. Care. Med.* 2021; 47(5): 619–21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>
12. Myasnikov A.L., Berns S.A., Zverev K.V., Lartseva O.A., Talyzin P.A. Efficacy of interferon gamma in the prevention of SARS-CoV-2 infection (COVID-19): Results of a prospective controlled trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8. [https://doi.org/10.21103/Article10\(3\)_OA1](https://doi.org/10.21103/Article10(3)_OA1)
13. Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И. Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжёлого течения. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 47–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
14. Fenimore J., A Young H. Regulation of IFN- γ expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 941: 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_1
15. Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Shows T.B., Law M.L., Goeddel D.V., Gray P.W. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 1983; 157(3): 1020–7. <https://doi.org/10.1084/jem.157.3.1020>
16. Wang W., Xu L., Su J., Peppelenbosch M.P., Pan Q. Transcriptional regulation of antiviral interferon-stimulated genes. *Trends Microbiol.* 2017; 25(7): 573–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
17. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Ингарон® (лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения). ЛС-001330. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1da1813c-550d-44ed-a024-da492e704a4c&t=
18. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* 2020; 8: 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
19. Lin F., Young H.A. Interferon-Gamma. In: Choi S., ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
20. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
21. Flaishon L., Topilski I., Shoseyov D., Hershkovitz R., Fireman E., Levo Y., et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J. Immunol.* 2002; 168(8): 3707–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3707>
22. Mühl H., Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3(9): 1247–55. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(03)00131-0)
23. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(4): 871–3. <https://doi.org/10.1172/jci31860>
24. Государственный реестр лекарственных средств. Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Ингарон® (лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения). ЛС-000924. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ff3b8627-3782-4923-acfe-33d550db611e&t=
25. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012.
26. Решение Совета ЕЭК № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза». Астана; 2016.
27. Решение Совета ЕЭК № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Астана; 2016.
28. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. *Цитокины*. СПб.: Фолиант; 2008.
29. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019; 50(4): 907–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
30. Yin X., Riva L., Pu Y., Martin-Sancho L., Kanamune J., Yamamoto Y., et al. MDA5 Governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell. Rep.* 2021; 34(2): 108628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>
31. Hsin F., Chao T.L., Chan Y. R., Kao H.C., Liu W.D., Wang J.T., et al. Distinct inductions of and responses to type I and Type III in-

- terferons promote infections in two SARS-CoV-2 isolates. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.071357>
32. Rebendenne A., Valadão A.L.C., Tauziet M., Maarifi G., Bonaventure B., McKellar J., et al. SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(8): e02415–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-20>
 33. Талызин П.А., Мясников А.Л., Бернс С.А., Ильина М.А., Комазов А.А., Лынев В.С. и др. Профилактическая эффективность назального интерферон-гамма у взрослых добровольцев при острых респираторных вирусных инфекциях, в том числе при COVID-19. *Иммунология*. 2022; 43(3): 288–300. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-3-288-300>
 34. Мясников А.Л., Бернс С.А., Ершов Ф.И. Опыт клинического применения интерферона гамма в комплексной терапии пациентов с коронавирусной инфекцией COVID-19. *Российский медицинский журнал*. 2020; 26(6): 394–401. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
 35. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(12): 1233–44. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30404-5)
 36. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11: 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
 37. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
 38. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020; 370(6512): 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
- ### REFERENCES
1. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Ya.D., Burova S.V. New coronavirus infection (COVID-19): clinical and epidemiological aspects. *Arkhiv' vnutrenney meditsiny*. 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93> (in Russian)
 2. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
 3. Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., Wilkins M.R. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol Ther.* 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>
 4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing Clinical Trials for the Management of the COVID-19 Pandemic. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>
 5. Xu X., Chen P., Wang J., Feng J., Zhou H., Li X., et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(3): 457–60. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>
 6. Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. Antiviral activity of Kagocel® in vitro against virus SARS-CoV-2. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2020; (3-4): 3–6. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2020-65-3-4-3-6> (in Russian)
 7. Sologub T.V., Tsvetkov V.V. Kagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119> (in Russian)
 8. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Theoretical and applied aspects of the interferon system: to the 60th anniversary of the discovery of interferons. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18> (in Russian)
 9. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>
 10. ClinicalTrials.gov. IFN | COVID-19. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=>
 11. Nguyen L.S., Ait Hamou Z., Gastli N., Chapuis N., Pène F. Potential role for interferon gamma in the treatment of recurrent ventilator-acquired pneumonia in patients with COVID-19: a hypothesis. *Intensive Care Med.* 2021; 47(5): 619–21. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06377-3>
 12. Myasnikov A.L., Berns S.A., Zverev K.V., Lartseva O.A., Talyzin P.A. Efficacy of interferon gamma in the prevention of SARS-CoV-2 infection (COVID-19): Results of a prospective controlled trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8. [https://doi.org/10.21103/Article10\(3\)_OAI](https://doi.org/10.21103/Article10(3)_OAI)
 13. Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 47–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24> (in Russian)
 14. Fenimore J., A Young H. Regulation of IFN- γ expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016; 941: 1–19. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_1
 15. Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Shows T.B., Law M.L., Goeddel D.V., Gray P.W. Human immune interferon gene is located on chromosome 12. *J. Exp. Med.* 1983; 157(3): 1020–7. <https://doi.org/10.1084/jem.157.3.1020>
 16. Wang W., Xu L., Su J., Peppelenbosch M.P., Pan Q. Transcriptional regulation of antiviral interferon-stimulated genes. *Trends Microbiol.* 2017; 25(7): 573–84. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
 17. State Register of Medicines. Instructions for medical use of the drug Ingaron® (lyophilisate for solution for intranasal administration). LS-001330. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1da1813c-550d-44ed-a024-da492e704a4c&t= (in Russian)
 18. Jorgovanovic D., Song M., Wang L., Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark. Res.* 2020; 8: 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
 19. Lin F., Young H.A. Interferon-Gamma. In: Choi S., ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer; 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4>
 20. Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 75(2): 163–89. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
 21. Flaishon L., Topilski I., Shoseyov D., Hershkoviz R., Fireman E., Levo Y., et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J. Immunol.* 2002; 168(8): 3707–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3707>
 22. Mühl H., Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3(9): 1247–55. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(03)00131-0)
 23. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN-gamma in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(4): 871–3. <https://doi.org/10.1172/jci31860>
 24. State Register of Medicines. Instructions for medical use of the drug Ingaron® (lyophilisate for the preparation of a solution for intramuscular and subcutaneous administration). LS-000924. Available at: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ff3b8627-3782-4923-acfe-33d550db611e&t= (in Russian)
 25. Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Drugs. Part One [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya]. Moscow: Griff I K; 2012. (in Russian)
 26. Decision of the EAC Council № 89 «On Approval of the Rules for Conducting Research on Biological Medicinal Products of the Eurasian Economic Union». Astana; 2016. (in Russian)
 27. Decision of the EAC Council № 78 «On the Rules for Registration and Examination of Medicinal Products for Medical Use». Astana; 2016. (in Russian)
 28. Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. *Cytokines [Tsitokiny]*. St. Petersburg: Foliant; 2008. (in Russian)

29. Lazear H.M., Schoggins J.W., Diamond M.S. Shared and distinct functions of type I and type III interferons. *Immunity*. 2019; 50(4): 907–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
30. Yin X., Riva L., Pu Y., Martin-Sancho L., Kanamune J., Yamamoto Y., et al. MDA5 Governs the innate immune response to SARS-CoV-2 in lung epithelial cells. *Cell. Rep.* 2021; 34(2): 108628. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>
31. Hsin F., Chao T.L., Chan Y. R., Kao H.C., Liu W.D., Wang J.T., et al. Distinct inductions of and responses to type I and Type III interferons promote infections in two SARS-CoV-2 isolates. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.30.071357>
32. Rebendenne A., Valadão A.L.C., Tauziet M., Maarifi G., Bonaventure B., McKellar J., et al. SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. *J. Virol.* 2021; 95(8): e02415–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.02415-20>
33. Talyzin P.A., Myasnikov A.L., Berns S.A., Il'ina M.A., Komazov A.A., Lynev V.S., et al. Preventive effectiveness of nasal interferon-gamma among adult volunteers against acute respiratory viral infections, including COVID-19. *Immunologiya*. 2022; 43(3): 288–300. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2022-43-3-288-300> (in Russian)
34. Myasnikov A.L., Berns S.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal*. 2020; 26(6): 394–401. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24> (in Russian)
35. Leisman D.E., Ronner L., Pinotti R., Taylor M.D., Sinha P., Calfee C.S., et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8(12): 1233–44. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30404-5)
36. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 2020; 11: 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>
37. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol. Immunol.* 2020; 17(5): 533–5. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
38. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*. 2020; 370(6512): 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-154>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Частота инфицированности опухоли, жидкостных сред глаза и специфический гуморальный иммунитет к герпесвирусам у пациентов с увеальной меланомой

Светлова Е.В., Балацкая Н.В., Саакян С.В., Жаров А.А., Кричевская Г.И., Свирина И.В., Измайлова Н.С., Мякошина Е.Б.

ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва, Россия

Введение. До настоящего времени исследования, направленные на прямой поиск вирусов группы герпеса (ВГГ) в материале опухоли и средах глаза, не проводились.

Цель работы – установить частоту выявления ДНК ВГГ в биоматериале глаз, крови и провести оценку специфического гуморального иммунитета к возбудителям герпесвирусных инфекций у пациентов с увеальной меланомой (УМ).

Материалы и методы. Обследованы 38 пациентов с опухолями увеального тракта на наличие ДНК Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2), Cytomegalovirus (CMV), Varicella Zoster virus (VZV), virus Epstein–Barr (EBV), Human herpesvirus (HHV) 6 и HHV-8 в материале опухоли, стекловидного тела (СТ), влаги передней камеры (ВПК) и плазмы крови (ПК) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ); пробы сыворотки крови исследованы методом иммуноферментного анализа (ИФА) на IgG-, IgM-антитела к ВГГ.

Результаты. ДНК EBV присутствовала в ткани опухоли в 20,6% случаев, в СТ – 4,2%, в ПК – 2,7%, во ВПК – не обнаружена. IgG-антитела к HSV-1, HSV-2 и CMV обнаружены в 97,3% случаев, VZV – 94,6%, HHV-6 – 32,4%, HHV-8 не выявлены. Реактивация хронической инфекции HSV-1, HSV-2 выявлена у 20 обследуемых (55,6%), CMV – у 14 (38,9%). Маркеры хронического инфицирования EBV обнаружены у всех пациентов, атипичной реактивации – в двух случаях (5,4%).

Заключение. Полученные данные позволяют говорить об участии EBV в развитии опухолей увеального тракта и необходимости дальнейшего углублённого исследования данной проблемы.

Ключевые слова: вирусы группы герпеса; увеальная меланوما; полимеразная цепная реакция; иммуноферментный анализ

Для цитирования: Светлова Е.В., Балацкая Н.В., Саакян С.В., Жаров А.А., Кричевская Г.И., Свирина И.В., Измайлова Н.С., Мякошина Е.Б. Частота инфицированности опухоли, жидкостных сред глаза и специфический гуморальный иммунитет к герпесвирусам у пациентов с увеальной меланомой. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 37-44. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-154>

Для корреспонденции: Светлова Елена Викторовна, врач-вирусолог отдела иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, 105062, г. Москва, Россия. E-mail: qr888@ya.ru

Участие авторов: Светлова Е.В., Балацкая Н.В. – концепция и дизайн исследования; Светлова Е.В., Жаров А.А., Кричевская Г.И., Свирина И.В. – сбор и обработка материала; Светлова Е.В. – статистическая обработка данных; Светлова Е.В., Балацкая Н.В. – написание текста; Саакян С.В., Измайлова Н.С., Мякошина Е.Б. – редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ (протокол № 62 от 15.12.2022).

Поступила 20.12.2022

Принята в печать 13.02.2023

Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-154>

The incidence of infection in tumor and eye fluid system, and specific humoral immunity to herpes viruses in patients with uveal melanoma

Elena V. Svetlova, Natalia V. Balatskaya, Svetlana V. Saakyan, Andrey A. Zharov, Galina I. Krichevskaya, Irina V. Svirina, Natalia S. Izmailova, Elena B. Myakoshina

Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases, 105062, Moscow, Russia

Introduction. Studies aimed at a direct research of human herpes viruses (HHVs) in the tumor material and eye media have not been carried out so far.

Research goal – to establish the frequency of detection HHVs DNA in the biomaterial of the eye and blood and to assess the specific humoral immunity to the causative agents of herpes virus infections in patients with uveal melanoma.

Materials and methods. 38 patients with the uveal tract tumor were examined for the presence of DNA of HHV types 1 and 2 (HSV-1, 2), Cytomegalovirus (CMV), Varicella Zoster virus (VZV), Epstein–Barr virus (EBV) and herpes viruses 6 and 8 types (HHV-6, HHV-8) in tumor tissue, vitreous body, aqueous humour and blood plasma by real-time polymerase chain reaction; blood serum was studied by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgM antibodies to HHVs.

Results. EBV DNA was present in tumor tissue in 20.6% of cases, in vitreous body in 4.2%, in blood plasma in 2.7%, and was not found in aqueous humor. Ig G antibodies to HSV-1, 2 and CMV were detected in 97.3% of cases, VZV – 94.6%, HHV-6 – 32.4%, antibodies to HHV-8 were not detected. 20 patients (55.6%) had reactivation of chronic HSV-1, 2 infection, and 14 (38.9%) patients had reactivation of CMV infection. Markers of chronic EBV infection were found in all patients, its atypical reactivation was observed in 2 cases (5.4%).

Conclusion. Our findings suggest the possible participation of EBV in the oncogenesis of the uveal tract and emphasize the need for further in-depth study of this problem.

Keywords: *herpes group viruses; uveal melanoma; polymerase chain reaction; enzyme-linked immunosorbent assay*

For citation: Svetlova E.V., Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Zharov A.A., Krichevskaya G.I., Svirina I.V., Izmailova N.S., Myakoshina E.B. The incidence of infection in tumor and eye fluid system, and specific humoral immunity to herpes viruses in patients with uveal melanoma. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 37-44 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-154>

For correspondence: Elena V. Svetlova, Virologist, Department of Immunology and Virology, Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases, 105062, Moscow, Russia. E-mail: qr888@ya.ru

Information about authors:

Svetlova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-8920-2458>

Balatskaya N.V., <https://orcid.org/0000-0001-8007-6643>

Saakyan S.V., <https://orcid.org/0000-0001-8591-428X>

Zharov A.A., <https://orcid.org/0000-0003-1103-6570>

Krichevskaya G.I., <https://orcid.org/0000-0001-7052-3294>

Svirina I.V., <https://orcid.org/0000-0001-7830-1880>

Izmailova N.S., <https://orcid.org/0000-0002-4713-5661>

Myakoshina E.B., <https://orcid.org/0000-0002-2087-7155>

Contribution: Svetlova E.V., Balatskaya N.V. – study concept and design; Svetlova E.V., Zharov A.A., Krichevskaya G.I., Svirina I.V. – collection and processing of material; Svetlova E.V. – statistical data processing; Svetlova E.V., Balatskaya N.V. – writing text; Sahakyan S.V., Izmailova N.S., Myakoshina E.B. – editing.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients or their legal representatives. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Helmholtz Scientific Medical Research Center for Ophthalmic Diseases (protocol number 62 dated Dec 15, 2022).

Received 20 December 2022

Accepted 13 February 2023

Published 28 February 2023

Введение

Вирусы группы герпеса (ВГГ) – ДНК-содержащие вирусы, способные к длительной бессимптомной персистенции в клетках с помощью особого механизма латентной инфекции. Мигрируя в региональные

ганглии чувствительных нервов, а также проникая в Т- и В-лимфоциты периферической крови, ВГГ способны длительное время сохраняться в клетках, встраиваться в геном и синтезировать собственные белки, используя ферменты клетки-хозяина. Накопле-

ны данные, что ВГГ способствуют росту и прогрессированию целого ряда опухолей различного гистогенеза и локализации. Так, высокие уровни антител к вирусам Herpes simplex virus (HSV-1, HSV-2), а также к Cytomegalovirus (CMV) обнаружены у людей с раком предстательной и молочной желез [1–4]. Human herpesvirus (HHV) 6 выступает кофактором развития рака шейки матки и назофарингеальных карцином, а HHV-8 известен как ключевой фактор развития ряда лимфопролиферативных заболеваний, саркомы Капоши, аденокарциномы (АК) предстательной железы и плоскоклеточной карциномы гортани [5–8]. Лидирующие позиции среди онкогенных герпесвирусов занимает вирус Epstein–Barr (EBV), роль которого в развитии лимфом Беркитта, Ходжкина, НК-/Т-клеточной лимфомы назального типа, а также рака носоглотки и желудка убедительно доказана многочисленными исследованиями [9, 10].

Первые работы, посвященные изучению роли ВГГ в развитии глазной онкопатологии, появились в 1980-е гг. В последние два десятилетия интерес к этой проблеме, судя по имеющимся публикациям в научной литературе, значительно возрос. В литературе описаны клинические случаи опухолей конъюнктивы, ассоциированных с EBV, а также первичных витреоретинальных неходжкинских лимфом, где при анализе внутренних сред глаза был обнаружен EBV [11–13].

Уvealная меланома (УМ) является наиболее злокачественной и часто встречающейся внутриглазной опухолью, заболеваемость которой в Российской Федерации достигает 6–8 случаев на 1 млн взрослого трудоспособного населения [14]. Около 90% УМ локализуется в хориоиде, 6% – в цилиарном теле, 4% – в радужке [15]. Несмотря на первичное лечение с применением энуклеации глаза или лучевой терапии, почти у 50% пациентов с УМ развивается метастатическая болезнь [16]. Витальный прогноз с момента диагностики метастатического заболевания является неблагоприятным, при этом общая выживаемость составляет от 6 до 13 мес [17].

Впервые предположения о возможной ассоциации ВГГ с развитием УМ были сделаны В.Е. Damato и соавт., изучившими влияние EBV на трансформацию В-клеток периферической крови пациентов [18]. Случай обнаружения геномов CMV и EBV в сочетании с *Chlamydia trachomatis* в опухолевом материале пациента с УМ описан в работе С.В. Саакян и соавт. [19].

Т. Valyi-Nagy и соавт. в исследовании представили убедительные доказательства стимуляции роста опухолевых клеток HHV-1 в культуре УМ [20], однако механизмы, способствующие росту и прогрессии опухоли со стороны герпесвирусов, не расшифрованы.

Известно, что эффективность лечения злокачественных новообразований, прогноз заболевания в значительной степени зависят от состояния иммунной системы пациента [21]. Было показано, что как хроническое течение, так и реактивация хронической герпесвирусной инфекции у пациентов с УМ сопровождаются неадекватными сдвигами в составе эф-

факторных субпопуляций лимфоцитов врожденного и адаптивного иммунного ответа, отражающими ослабление резистентности организма, и могут способствовать срыву в системе противоопухолевой защиты и усилению злокачественного роста [22]. Однако до настоящего времени исследования, направленные на прямой поиск ВГГ в материале опухоли и средах глаза в комплексе с оценкой специфического гуморального противовирусного иммунитета при УМ, которые позволили бы выявить взаимосвязи вирусов с опухолевым ростом, в клинике не проводились.

Комплексный подход в изучении патогенеза глазных злокачественных новообразований представляется перспективным не только в теоретическом, но и в практическом аспекте, так как будет способствовать персонификации плана лечения и врачебной тактики ведения офтальмоонкологических больных.

Цель работы – установить частоту выявления ДНК ВГГ в материале опухолей, внутренних сред глаза, крови и провести оценку специфического гуморального иммунитета к возбудителям герпесвирусных инфекций у пациентов с УМ.

Материалы и методы

Обследованы 38 пациентов (27 женщин и 11 мужчин в возрасте от 14 до 83 лет) с опухолями увеального тракта.

Диагноз ставился на основании данных стандартных и специализированных офтальмологических методов исследования. Средний уровень проминенции опухоли (по данным эхографии) составил $7,0 \pm 4,0$ мм, а диаметр основания – $13,7 \pm 4,1$ мм. Всем пациентам проведена энуклеация поражённого глаза с последующим патогистологическим исследованием.

У 33 пациентов диагностирована УМ (97,1%), в одном случае морфология опухоли соответствовала АК пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). Сильно выраженную пигментацию имели 79,4% опухолей, в 14,7% случаев пигмент в опухоли отсутствовал, и достаточно редко пигментация имела слабовыраженный характер (5,9%). Данные по гистологическому типу УМ и ее локализации представлены в **табл. 1**.

Биоматериал (ткань опухоли, стекловидное тело (СТ), влага передней камеры (ВПК)) забирался после энуклеации; забор крови проводился в утреннее время в пробирки фирмы Zhejiang Gongdong Medical Technology Co., Ltd. (ЭДТА К3, активатор свертывания), подготовка проб плазмы крови (ПК) и сыворотки крови (СК) выполнялась по стандартным методикам.

Образцы помещались в пробирки типа Эппендорф и замораживались в камере глубокой заморозки при температуре -70 °С.

Определение генома HSV-1, HSV-2, CMV, Varicella Zoster virus (VZV), EBV, HHV-6, HHV-8 в материале опухоли ($n = 34$), СТ ($n = 24$), ВПК ($n = 21$) и ПК ($n = 37$) проводилось методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) (термоциклер CFX96, Bio-Rad Laboratories, Inc., США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Специфический гуморальный ответ к ВГГ оценивали по нали-

Таблица 1. Результаты патогистологического исследования пациентов с увеальной меланомой, *n* (%)Table 1. Clinical and histopathological features of uveal melanoma (UM), *n* (%)

Гистологический тип меланомы Melanoma cell type	Локализация увеальной меланомы, число случаев (%) Anatomical location of lesions, number of cases (%)		
	хориоидальная choroidal lesion	цилиохориоидальная ciliochoroidal lesion	иридоцилиарная iridociliary lesion
Веретенноклеточная Spindle cell type	13 (39,4)	5 (15,2)	1 (3)
Смешанноклеточная Mixed cell type	7 (21,2)	5 (15,2)	0 (0)
Эпителиоидноклеточная Epithelioid cell type	1 (3)	0 (0)	1 (3)
Всего In total	21	10	2

Таблица 2. Частота выявления генома герпесвирусов в материале опухоли

Table 2. The frequency of detection of the herpesvirus genome in the tumor material

Количество образцов опухолей с обнаруженным возбудителем Number of tumor samples with detected pathogen indicator	Вид вируса Type of virus							Всего In total
	HSV-1	HSV-2	VZV	EBV	CMV	HHV-6	HHV-8	
<i>n</i>	–	–	–	7	–	1	–	7
%	–	–	–	20,6	–	2,9	–	20,6

анию IgG-, IgM-антител в СК (*n* = 37) методом иммуноферментного анализа (ИФА) (автоматический иммуноферментный анализатор LAZURITE, Duplex Technologies Inc., США). Для постановки ПЦР-РВ и ИФА использовали коммерческие тест-системы ЗАО «Вектор-Бест», Россия. На основании результатов серологического исследования определяли стадию и активность инфекционного процесса – первичную, хроническую или реактивацию хронической инфекции. Оценку активности EBV проводили по данным комплексного серологического тестирования, включающего антитела к EA-IgG, EBNA-IgG, VCA-IgM, VCA-IgG, VCA-IgG-авидность. Для HSV-1, HSV-2 и CMV определяли титр IgG-антител к предранним белкам с помощью диагностических наборов АО БТК «Биосервис» (Россия). У 19 пациентов было проведено параллельное исследование ткани опухоли, СТ, ВПК, ПК на наличие ДНК вирусов, а также СК с целью выявления маркеров активной и хронической ВГГ. Статистическая обработка проводилась с использованием стандартных пакетов прикладных программ Microsoft Excel, BioStat 5.0. При сравнении использовался критерий χ^2 .

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов или их законных представителей. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ГБ им. Гельмгольца» МЗ РФ (протокол № 62 от 15.12.2022).

Результаты

Хроническая инфицированность HSV-1, HSV-2 и CMV (IgG-антитела) выявлена в подавляющем

большинстве случаев (97,3% больных), маркеры хронической VZV-инфекции обнаружены в 94,6% тест-проб СК, HHV-6 – в 32,4% (12 из 37 проб), при этом IgG-антитела к HHV-8 не были выявлены ни у одного из обследуемых пациентов, что, вероятно, обусловлено эндемическими особенностями распространения вируса в популяции [23]. Маркеры первичной инфекции (IgM-антител) к ВГГ у обследуемых пациентов отсутствовали. Реактивация хронической инфекции HSV-1, HSV-2 (антитела к предранним белкам вирусов) выявлена в 55,6% случаев (20 пациентов), CMV – более чем у 1/3 больных (38,9%).

Маркеры поздней паст-инфекции EBV (хроническое инфицирование) обнаружены у всех пациентов; в одном случае (2,7%) определялись только антитела IgG к капсидному антигену VCA, свидетельствующие об иммуносупрессии. Маркеры атипичной реактивации EBV (EA-IgG, EBNA-IgG, VCA-IgG-антитела) были выявлены у двух больных (5,4%).

Инфицированность опухолей по результатам молекулярно-биологического исследования составила 20,6%: во всех положительных пробах материала опухоли больных с УМ был обнаружен только геном EBV, и в одном случае (у пациента с АК ПЭС) выявлено сочетанное инфицирование материала опухоли EBV и HHV-6 (табл. 2).

При исследовании внутриглазных сред ДНК EBV выявлена в образце СТ (4,2%) у пациента с EBV-положительным материалом опухоли. В пробах ВПК генетический материал ВГГ не обнаружен (табл. 3).

Результаты ПЦР-исследования ПК показали в одном случае (2,7%) наличие ДНК EBV, однако при этом серологических маркеров активной инфекции или

Таблица 3. Результаты ПЦР-исследования ткани опухоли, стекловидного тела, влаги передней камеры и плазмы крови пациентов с разными гистологическими типами опухоли

Table 3. Results of PCR study of tumor tissue (TT), vitreous body (VB), aqueous humor (AH) and blood plasma (BP) of patients with different histological types of tumor

№	Пациент, возраст, лет Patient ID and age (years)	Тип опухоли Tumor Cell type	ДНК возбудителей Pathogen DNA			
			ТО	СТ	ВПК	ПК
1	П., 72	ЦС Cilio.Mix.	EBV	–	–	Отр. Neg.
2	Р., 64	ЦС Cilio.Mix.	EBV	–	–	Отр. Neg.
3	Ч., 46	ХС Chor.Mix.	EBV	Отр. Neg.	Отр. Neg.	Отр. Neg.
4	С., 26	ХВ Chor.Sp.	EBV	Отр. Neg.	Отр. Neg.	Отр. Neg.
5	К., 68	ХС Chor.Mix.	EBV	EBV	Отр. Neg.	Отр. Neg.
6	Р., 30	ХВ Chor.Sp.	EBV	Отр. Neg.	Отр. Neg.	Отр. Neg.
7	Р., 14	АК А	EBV, HHV-6	Отр. Neg.	Отр. Neg.	Отр. Neg.

Примечание. ТО – ткань опухоли; СТ – стекловидное тело; ВПК – влага передней камеры; ПК – плазма крови; ЦС – цилиохориоидальная опухоль смешанноклеточного строения; ХС – опухоль хориоидеи смешанноклеточного строения; ХВ – опухоль хориоидеи веретенноклеточного строения; АК – аденокарцинома; Отр. – отрицательный результат исследования; прочерк (–) – исследование не проводилось.

Note. Cilio.Mix. – mixed cell type ciliochoroidal tumor; Chor.Mix. – mixed cell type choroid tumor; Chor.Sp. – choroidal spindle cell type tumor; A – adenocarcinoma; Neg. – negative; “–” – not tested.

Таблица 4. Частота обнаружения серологических маркеров хронической и реактивации хронической герпесвирусной инфекции у пациентов в зависимости от инфицированности опухоли, %

Table 4. The frequency of detection of serological markers of chronic EBV infection and its reactivation in patients depending on infection in tumor tissue, %

IgG-антитела IgG antibodies	Ткань опухоли ДНК EBV положительная (n = 7) EBV DNA positive tumor tissue (total 7), %	Ткань опухоли ДНК EBV отрицательная (n = 27) EBV DNA negative tumor tissue (total 27), %
HSV-1, HSV-2, CMV, EBV	100	92,6
HSV-1, HSV-2, CMV ранние (маркеры реактивации) HSV-1, HSV-2, CMV early (reactivation markers)	71,4	59,3
EBV (атипичная реактивация) EBV (atypical reactivation)	0	7,4
VZV	85,7	92,6
HHV-6	42,9	25,9

реактивации вируса обнаружено не было. ДНК VZV была обнаружена в крови одного пациента (2,7%) без выявления IgM-антител.

При сравнительном анализе показателей специфического гуморального противовирусного ответа в зависимости от инфицированности опухоли обнаружено, что серологические маркеры реактивации хронической инфекции HSV-1, HSV-2 и CMV у пациентов с ДНК-EBV-положительной опухолью определялись чаще по сравнению с таковыми у больных с ДНК-отрицательной тканью опухоли, однако в силу малочисленности клинической выборки не было получено статистически значимых различий (табл. 4).

Подавляющее число EBV-положительных образцов УМ, по данным патогистологического исследования, имело смешанноклеточное строение (66,6%) с преобладанием эпителиоидных клеток (от 60 до 80% опухоли, представленной в гистологических срезах), остальные опухоли имели веретенноклеточное строение. 71,4% опухолей (включая АК ПЭС) отличались сильно выраженной пигментацией, 28,6% – слабо выраженной пигментацией; беспигментных опухолей среди образцов, в которых выявлена ДНК EBV, не обнаружено.

Обсуждение

Злокачественная трансформация является сложным процессом, который зависит от ряда внешних и вну-

тренних факторов. К настоящему времени накоплены убедительные данные о том, что важную роль в возникновении, росте и прогрессировании опухолей играют онкогенные вирусы, инвазия которых в клетку прямо или косвенно изменяет механизмы регуляции пролиферации.

Наряду с этим в последние десятилетия количество инфекционных агентов, обладающих малигнизующим потенциалом и индуцирующих злокачественную трансформацию клеток, увеличилось. Так, например, РНК-содержащие вирусы – Т-лимфотропный вирус человека и вирус гепатита С – являются причиной развития Т-клеточного лейкоза и цирроза печени [24]. ДНК-содержащие вирусы – вирус папилломы человека (ВПЧ) – вызывают рак шейки матки, а вирус гепатита В способствует развитию гепатоцеллюлярной карциномы [25]. Вслед за этим появился термин «микробные и вирус-ассоциированные опухоли», применяемый в случае выявления в опухолевой ткани возбудителей инфекции [26].

По результатам нашего исследования частота инфицированности опухолей увеального тракта составила 20,6% с присутствием во всех положительных пробах материала опухоли больных с УМ только генома EBV, что позволяет думать о его возможной роли в развитии или поддержании роста злокачественных новообразований. За последние годы изучения EBV выяснилось, что вирус, персистируя в долгоживущих клетках памяти, через экспрессию собственных генов латентности (EBNA, BART, LMP и др.) подавляет противоопухолевые внутриклеточные механизмы (p53, p63, p73) и приводит к иммортализации и злокачественной трансформации лимфоцитов [27]. Показано, что уровень экспрессии 44 видов некодирующих молекул микроРНК EBV в тканях опухоли в несколько раз превышает экспрессию вирусных генов. МикроРНК EBV, напрямую воздействуя на некодирующие области матричной РНК клетки, подавляют продукцию белка p53 – регулятора процессов клеточного деления и апоптоза [28]. Всё больше появляется данных о том, что литическая фаза жизни EBV, которая сопровождается экспрессией активаторов транскрипции (BZLF1 и BRLF1) и синтезом вирусных белков, необходимых для репликации его ДНК, способствует внутриклеточному онкогенезу наряду с непродуктивной латентной инфекцией [29].

В одном случае – в материале опухоли большого с гистологически подтверждённой АК ПЭС – нами выявлено сочетание ДНК EBV и HHV-6, что согласуется с данными литературы: подобные примеры сочетанной инфекции в клетках АК лёгких приведены в работе J.J. Gómez-Román и соавт. [30]. Показано, что HHV-6 играет ко-стимулирующую роль в развитии ряда гинекологических заболеваний и онкопатогенезе лор-органов. Имеются публикации с описанием возможных механизмов малигнизации с участием HHV-6: экспрессия его трансформирующего гена *ORF-1* была выявлена в опухолевой ткани, где он специфически связывал и подавлял синтез антионкогенного белка p53 [31]. Молекулярно-биологическое исследование

внутриглазных жидкостных сред выявило геном EBV только в одном случае – в материале СТ пациента с EBV-положительной опухолью. Нельзя полностью исключить проникновение ДНК вируса во внутренние среды глаза в процессе распада опухоли (при патогистологическом исследовании в описанном случае выявлены зоны некроза, составляющие более 50% объёма опухоли). С другой стороны, возможен и прямой путь занесения этого вируса в СТ – миелиодными клетками из системного кровотока, которые дифференцируются на месте в гиалоциты – основные клетки, принимающие участие в обеспечении иммунологической привилегии и модуляции иммунного ответа в среднем отделе глаза [32]. Известно, что EBV, поражая клетки ретикулоэндотелиальной системы, оказывает влияние на формирование специфического гуморального ответа, препятствуя образованию дендритных клеток. EBV угнетает процессы аутофагии, снижает количество активных форм кислорода и препятствует митохондриальному биогенезу в дифференцирующихся моноцитах, вызывая дефицит энергии [33]. Активаторы транскрипции вируса (BZLF1 и BRLF1) способствуют секреции интерлейкина (IL) 6 – цитокина, который является координатором иммунных функций, дифференцировки гемопоэтических клеток и стимуляции воспаления, а также блокирует апоптоз в клетках и обеспечивает их выживание в условиях стресса. Вместе с этим IL-6 способствует сохранению клеток, склонных к неопластическому росту, защищая их от воздействия системы естественной гибели клетки и химиотерапевтических препаратов [34, 35]. Кроме того, EBV, поражающий как эпителиальные, так и лимфоидные клетки, способствует продукции IL-10, увеличивая их выживаемость, и VEGF (васкулоэндотелиальные факторы роста) – фактора ангиогенеза, усиливая метаболизм и рост опухоли за счёт неоваскуляризации [36].

Заключение

Механизмы участия ВГГ в малигнизации и форсировании неопластического роста, в том числе интраокулярной локализации, до настоящего времени остаются нерасшифрованными.

Результаты нашего исследования позволяют говорить о ВГГ- и в частности о EBV-опосредованном развитии опухолей увеального тракта, изменении иммунологической реактивности пациентов с УМ (что представляется важным как в теоретическом, так и в практическом аспекте) и о необходимости дальнейших исследований с целью углублённого изучения роли герпесвирусов в патогенезе заболевания, разработки персонифицированных подходов к профилактике и лечению офтальмоонкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mrázová V., Golais F., Buda A. Possible role of human herpes viruses belonging to the subfamily alphaherpesvirinae in the development of some cancers. *Spring*. 2018; 31(3): 178–83. <https://doi.org/10.14735/amko2018178>
2. Mofrad M.G., Sadigh Z.A., Ainechi S., Faghihloo E. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients. *Virology*. 2021; 18(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01498-z>

3. Harkins L.E., Matlaf L.A., Soroceanu L., Klemm K., Britt W.J., Wang W. et al. Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae*. 2010; 1(1): 8. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-1-8>
4. Sanford E.J., Geder L., Laychock A., Rohner T.J. Jr., Rapp F. Evidence for the association of cytomegalovirus with carcinoma of the prostate. *J. Urol*. 1977; 118(5): 789–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)58194-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)58194-x)
5. Amirian E.S., Adler-Storthz K., Scheurer M.E. Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Lett*. 2013; 336(1): 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.023>
6. Weiss R.A., Whitby D., Talbot S., Kellam P., Boshoff C. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr*. 1998; (23): 51–4. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024173>
7. Mygatt G.J., Singhal A., Sukumar G., Dalgard C.L., Kaleeba J.A.R. Oncogenic herpesvirus HHV-8 promotes androgen-independent prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2013; 73(18): 5695–708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4196>
8. Güvenç M.G., Midilli K., Ozdoğan A., İnci E., Tahamiler R., Enver O. Detection of HHV-8 and HPV in laryngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx*. 2008; 35(3): 357–62. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2007.08.006>
9. Murray P.G., Young L.S. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2019; 134(7): 591–6. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000568>
10. Kim D.H., Chang M.S., Yoon C.J., Middeldorp J.M., Martinez O.M., Byeon S.J., et al. Epstein-Barr virus BARTF1-induced NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7(50): 82213–27. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10511>
11. Vaivanijkul J., Boonsiri K. Conjunctival tumor caused by Epstein-Barr virus-related infectious mononucleosis: Case report and review of literature. *Orbit*. 2017; 36(2): 91–4. <https://doi.org/10.1080/01676830.2017.1279659>
12. Ban Y., Okamoto M., Ogata N. Case of primary intraocular lymphoproliferative disorder caused by Epstein-Barr virus. *BMC Ophthalmol*. 2020; 20(1): 306. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01583-x>
13. Mitra R.A., Pulido J.S., Hanson G.A., Kajdacsy-Balla A., Brummitt C.F. Primary ocular Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in a patient with AIDS: a clinicopathologic report. *Retina*. 1999; 19(1): 45–50. <https://doi.org/10.1097/00006982-199901000-00007>
14. Бровкина А.Ф. *Офтальмоонкология*. М.: Медицина; 2002.
15. Shields J.A. *Diagnosis and Management of Intraocular Tumors*. St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1983.
16. Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*. 2011; 118(9): 1881–5. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.01.040>
17. Саакян С.В., Амирян А.Г., Цыганков А.Ю., Скларова Н.В., Залетаев Д.В. Клинические, патоморфологические и молекулярно-генетические особенности увеальной меланомы с высоким риском метастазирования. *Российский офтальмологический журнал*. 2015; 8(2): 47–52.
18. Damato V.E., Campbell A.M., McGuire B.J., Lee W.R., Foulds W.S. B-lymphocytes from melanoma patients and normal individuals react with melanoma cells but also with irrelevant antigens. *Br J. Cancer*. 1988; 58(2): 182–5. <https://doi.org/10.1038/bjc.1988.188>
19. Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Кричевская Г.И., Слепова О.С., Пантелеева О.Г., Андришин А.Е. и др. Обследование больных увеальной меланомой на наличие герпесвирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(6): 284–7. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287>
20. Valyi-Nagy T., Fredericks B., Ravindra A., Hopkins J., Shukla D., Valyi-Nagy K. Herpes simplex virus 1 infection promotes the growth of a subpopulation of tumor cells in three-dimensional uveal melanoma cultures. *J. Virol*. 2018; 92(19): e00700-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00700-18>
21. Кадагидзе З.Г., Чергкова А.И., Заботина Т.Н., Короткова О.В., Славина Е.Г., Борунова А.А. Новые возможности регуляции противоопухолевого иммунного ответа. *Злокачественные опухоли*. 2015; (1): 26–34.
22. Балацкая Н.В., Саакян С.В., Мякошина Е.Б., Куликова И.Г., Кричевская Г.И. Особенности эффекторных субпопуляций лимфоцитов у пациентов с увеальной меланомой при активации и хроническом течении герпесвирусной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(6): 1123–30. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-FOE-1596>
23. Rohner E., Wyss N., Trelle S., Mbulaiteye S.M., Egger M., Novak U., et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. *Syst. Rev*. 2014; 3: 11. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-3-11>
24. Yaghobi R., Kazemi M.J., Geramizadeh B., Hosseini S.A.M., Moayedi J. Significance of occult hepatitis C virus infection in liver transplant patients with cryptogenic cirrhosis. *Exp. Clin. Transplant*. 2020; 18(2): 206–9. <https://doi.org/10.6002/ect.2017.0332>
25. Rizzo G.E.M., Cabibbo G., Craxi A. Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Viruses*. 2022; 14(5): 986. <https://doi.org/10.3390/v14050986>
26. Кононов А.В. Воспаление как основа Helicobacter pylori-ассоциированных болезней. *Архив патологии*. 2006; 68(5): 3–10.
27. Chatterjee K., Das P., Chattopadhyay N.R., Mal S., Choudhuri T. The interplay between Epstein-Bar virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon*. 2019; 5(11): e02624. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02624>
28. Zheng X., Wang J., Wei L., Peng Q., Gao Y., Fu Y., et al. Epstein-Barr virus MicroRNA miR-BART5-3p inhibits p53 expression. *J. Virol*. 2018; 92(23): e01022-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01022-18>
29. Ma S.D., Hegde S., Young K.H., Sullivan R., Rajesh D., Zhou Y., et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J. Virol*. 2011; 85(1): 165–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01512-10>
30. Gómez-Román J.J., Martínez M.N., Fernández S.L., Val-Bernal J.F. Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. *Mod. Pathol*. 2009; 22(4): 530–7. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.7>
31. Doniger J., Muralidhar S., Rosenthal L.J. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev*. 1999; 12(3): 367–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.367>
32. Qiao H., Hisatomi T., Sonoda K.H., Kura S., Sassa Y., Kinoshita S., et al. The characterisation of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *Br. J. Ophthalmol*. 2005; 89(4): 513–7. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.050658>
33. Montani M.S.G., Santarelli R., Granato M., Gonnella R., Torrisi M.R., Faggioni A., et al. EBV reduces autophagy, intracellular ROS and mitochondria to impair monocyte survival and differentiation. *Autophagy*. 2019; 15(4): 652–67. <https://doi.org/10.1080/1548627.2018.1536530>
34. Hodge D.R., Hurt E.M., Farrar W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur. J. Cancer*. 2005; 41(16): 2502–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.016>
35. Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley M.L., Delecluse H.J., et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol*. 2005; 79(22): 13984–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13984-13992.2005>
36. Jones R.J., Seaman W.T., Feng W.H., Barlow E., Dickerson S., Delecluse H.J., et al. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int. J. Cancer*. 2007; 121(6): 1274–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.22839>

REFERENCES

1. Mrázová V., Golais F., Búda A. Possible role of human herpes viruses belonging to the subfamily alphaherpesvirinae in the development of some cancers. *Spring*. 2018; 31(3): 178–83. <https://doi.org/10.14735/amko2018178>
2. Mofrad M.G., Sadigh Z.A., Ainechi S., Faghiloo E. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients. *Virol. J*. 2021; 18(1): 25. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01498-z>
3. Harkins L.E., Matlaf L.A., Soroceanu L., Klemm K., Britt W.J., Wang W. et al. Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium. *Herpesviridae*. 2010; 1(1): 8. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-1-8>
4. Sanford E.J., Geder L., Laychock A., Rohner T.J. Jr., Rapp F. Evidence for the association of cytomegalovirus with carcinoma of the prostate. *J. Urol*. 1977; 118(5): 789–92. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(17\)58194-x](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(17)58194-x)

5. Amirian E.S., Adler-Storzh K., Scheurer M.E. Associations between human herpesvirus-6, human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Lett.* 2013; 336(1): 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.04.023>
6. Weiss R.A., Whitby D., Talbot S., Kellam P., Boshoff C. Human herpesvirus type 8 and Kaposi's sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1998; (23): 51–4. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a024173>
7. Mygatt G.J., Singhal A., Sukumar G., Dalgard C.L., Kaleeba J.A.R. Oncogenic herpesvirus HHV-8 promotes androgen-independent prostate cancer growth. *Cancer Res.* 2013; 73(18): 5695–708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4196>
8. Güvenç M.G., Midilli K., Ozdoğan A., İnci E., Tahamiler R., Enver O. Detection of HHV-8 and HPV in laryngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2008; 35(3): 357–62. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2007.08.006>
9. Murray P.G., Young L.S. An etiological role for the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2019; 134(7): 591–6. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000568>
10. Kim D.H., Chang M.S., Yoon C.J., Middeldorp J.M., Martinez O.M., Byeon S.J., et al. Epstein-Barr virus BARTF1-induced NFκB/miR-146a/SMAD4 alterations in stomach cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7(50): 82213–27. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10511>
11. Vaivanjikul J., Boonsiri K. Conjunctival tumor caused by Epstein-Barr virus-related infectious mononucleosis: Case report and review of literature. *Orbit.* 2017; 36(2): 91–4. <https://doi.org/10.1080/01676830.2017.1279659>
12. Ban Y., Okamoto M., Ogata N. Case of primary intraocular lymphoproliferative disorder caused by Epstein-Barr virus. *BMC Ophthalmol.* 2020; 20(1): 306. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01583-x>
13. Mitra R.A., Pulido J.S., Hanson G.A., Kajdacsy-Balla A., Brummitt C.F. Primary ocular Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in a patient with AIDS: a clinicopathologic report. *Retina.* 1999; 19(1): 45–50. <https://doi.org/10.1097/00006982-199901000-00007>
14. Brovkina A.F. *Ophthalmocology.* Moscow: Meditsina; 2002. (in Russian)
15. Shields J.A. *Diagnosis and Management of Intraocular Tumors.* St. Louis: The C.V. Mosby Company; 1983.
16. Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology.* 2011; 118(9): 1881–5. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2011.01.040>
17. Saakyan S.V., Amiryana A.G., Tsygankov A.Yu., Sklyarova N.V., Zaletaev D.V. Clinical, pathomorphological and molecular genetic aspects of uveal melanoma with high metastatic risk. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal.* 2015; 8(2): 47–52. (in Russian)
18. Damato B.E., Campbell A.M., McGuire B.J., Lee W.R., Foulds W.S. B-lymphocytes from melanoma patients and normal individuals react with melanoma cells but also with irrelevant antigens. *Br J. Cancer.* 1988; 58(2): 182–5. <https://doi.org/10.1038/bjc.1988.188>
19. Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Krichevskaya G.I., Slepova O.S., Panteleeva O.G., Andryushin A.E., et al. Testing patients with uveal melanoma for herpesvirus infections. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(6): 284–7. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-6-284-287> (in Russian)
20. Valyi-Nagy T., Fredericks B., Ravindra A., Hopkins J., Shukla D., Valyi-Nagy K. Herpes simplex virus 1 infection promotes the growth of a subpopulation of tumor cells in three-dimensional uveal melanoma cultures. *J. Virol.* 2018; 92(19): e00700-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00700-18>
21. Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolotina T.N., Korotkova O.V., Slavina E.G., Borunova A.A. New possibilities of regulation of the antitumor immune response. *Zlokachestvennye opukholi.* 2015; (1): 26–34. (in Russian)
22. Balatskaya N.V., Saakyan S.V., Myakoshina E.B., Kulikova I.G., Krichevskaya G.I. Features of effector lymphocyte subsets in patients with uveal melanoma in recurrent and chronic herpesvirus infection. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(6): 1123–30. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-FOE-1596> (in Russian)
23. Rohner E., Wyss N., Trelle S., Mbulaiteye S.M., Egger M., Novak U., et al. HHV-8 seroprevalence: a global view. *Syst. Rev.* 2014; 3: 11. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-3-11>
24. Yaghoobi R., Kazemi M.J., Geramizadeh B., Hosseini S.A.M., Moayedi J. Significance of occult hepatitis C virus infection in liver transplant patients with cryptogenic cirrhosis. *Exp. Clin. Transplant.* 2020; 18(2): 206–9. <https://doi.org/10.6002/ect.2017.0332>
25. Rizzo G.E.M., Cabibbo G., Craxi A. Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Viruses.* 2022; 14(5): 986. <https://doi.org/10.3390/v14050986>
26. Kononov A.V. Inflammation as the basis of Helicobacter pylori-associated diseases. *Arkhiv patologii.* 2006; 68(5): 3–10. (in Russian)
27. Chatterjee K., Das P., Chattopadhyay N.R., Mal S., Choudhuri T. The interplay between Epstein-Barr virus (EBV) with the p53 and its homologs during EBV associated malignancies. *Heliyon.* 2019; 5(11): e02624. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02624>
28. Zheng X., Wang J., Wei L., Peng Q., Gao Y., Fu Y., et al. Epstein-Barr virus MicroRNA miR-BART5-3p inhibits p53 expression. *J. Virol.* 2018; 92(23): e01022-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01022-18>
29. Ma S.D., Hegde S., Young K.H., Sullivan R., Rajesh D., Zhou Y., et al. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J. Virol.* 2011; 85(1): 165–77. <https://doi.org/10.1128/JVI.01512-10>
30. Gómez-Román J.J., Martínez M.N., Fernández S.L., Val-Bernal J.F. Epstein-Barr virus-associated adenocarcinomas and squamous-cell lung carcinomas. *Mod. Pathol.* 2009; 22(4): 530–7. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.7>
31. Doniger J., Muralidhar S., Rosenthal L.J. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12(3): 367–82. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.367>
32. Qiao H., Hisatomi T., Sonoda K.H., Kura S., Sassa Y., Kinoshita S., et al. The characterisation of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *Br. J. Ophthalmol.* 2005; 89(4): 513–7. <https://doi.org/10.1136/bjo.2004.050658>
33. Montani M.S.G., Santarelli R., Granato M., Gonnella R., Torrisi M.R., Faggioni A., et al. EBV reduces autophagy, intracellular ROS and mitochondria to impair monocyte survival and differentiation. *Autophagy.* 2019; 15(4): 652–67. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1536530>
34. Hodge D.R., Hurt E.M., Farrar W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur. J. Cancer.* 2005; 41(16): 2502–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.08.016>
35. Hong G.K., Kumar P., Wang L., Damania B., Gulley M.L., Delecluse H.J., et al. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 2005; 79(22): 13984–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.22.13984-13992.2005>
36. Jones R.J., Seaman W.T., Feng W.H., Barlow E., Dickerson S., Delecluse H.J., et al. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int. J. Cancer.* 2007; 121(6): 1274–81. <https://doi.org/10.1002/ijc.22839>

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

© AUTHORS, 2023



Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021

Elena M. Poleshchuk¹, Daria N. Tagakova^{1,2}, Gennady N. Sidorov^{1,3}, Tatyana S. Orlova⁴, Natalia S. Gordeiko⁵, Abdukakhor Zh. Kaisarov⁶

¹Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

²Omsk State Medical University, 644099, Omsk, Russia;

³Omsk State Pedagogical University, 644099, Omsk, Russia;

⁴Blagoveshchensk City Clinical Hospital, 675000, Blagoveshchensk, Russia;

⁵Primorye Antiplaque Station, 692512, Ussuriysk, Russia

⁶Medical and sanitary unit No. 100, 692880, Fokino, Russia

Introduction. On the territory of Russia four species of lyssaviruses (genus *Lyssavirus*) were identified, three of them caused human deaths.

The aim of work: to characterize fatal cases in humans after contacts with bats in the Far East in 2018–2021 and to perform typing of isolated pathogens.

Materials and methods. Lyssavirus infection was confirmed in samples of sectional material from people who died in the Amur Region in 2019, in the Primorsky Krai in 2019 and 2021. Diagnostics was performed by fluorescent antibody test (FAT) and RT-PCR using diagnostic kits of domestic production. Viruses were isolated in a bioassay. The nucleoprotein sequences were analyzed after 1st passage. The analysis of phylogenetic relationships and the construction of a dendrogram were performed using the MEGA7 software.

Results. The viruses that caused the fatal cases in humans in the Amur Region and Primorsky Krai share more than 90% identity to *Lyssavirus irkut* detected in Russia and China. Together they form a separate monophyletic cluster with 100% bootstrap support.

Conclusion. On the territory of Russia, monitoring of bat populations for infection with lyssaviruses is relevant. The material of people who died from encephalomyelitis of unknown etiology within 10–15 days from the onset of the disease must be examined for lyssavirus infection. It is necessary to develop PCR assays that employ genus-specific primers. The use of molecular biological methods is promising for improving the diagnosis of rabies and epidemiological surveillance, as well as increasing the efficiency of the system of biological safety of the population of the Russian Federation.

Keywords: *Russia; rabies lyssavirus; Lyssavirus irkut; lyssavirus encephalitis; cheiroptera*

For citation: Poleshchuk E.M., Tagakova D.N., Sidorov G.N., Orlova T.S., Gordeiko N.S., Kaisarov A.Zh. Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1):45–58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

For correspondence: Elena M. Poleshchuk, Ph.D. (Biol.), Head of Laboratory, Leading Researcher Laboratory of Ecology and Epidemiology of the Rabies, Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia. E-mail: e-poleschuk@yandex.ru

Information about the authors:

Poleshchuk E.M., <https://orcid.org/0000-0002-8217-5159>

Tagakova D.N., <https://orcid.org/0000-0001-9890-1031>

Sidorov G.N., <https://orcid.org/0000-0002-8344-7726>

Orlova T.S., <https://orcid.org/0000-0003-3074-0168>

Gordeiko N.S., <https://orcid.org/0000-0003-2209-2762>

Kaisarov A.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-8411-3971>

Contribution: Poleshchuk E.M. – research concept and design; analysis and interpretation of data; writing of the text; Poleshchuk E.M., Tagakova D.N. – collection and processing of the material, performing of the laboratory research; Sidorov G.N. – editing of the article; Orlova T.S. – collection of material, work on the sections of the article; Gordeiko N.S. – collection of material, work on the sections of the article; Kaisarov A.Zh. – collection of material, work on the sections of the article.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The study was conducted with the informed consent of legal representatives of patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections (protocol without number dated Jan 27, 2021).

Received 23 December 2022

Accepted 20 February 2023

Published 28 February 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг.

Полещук Е.М.¹, Тагакова Д.Н.^{1,2}, Сидоров Г.Н.^{1,3}, Орлова Т.С.⁴, Гордейко Н.С.⁵, Кайсаров А.Ж.⁶

¹ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, Россия;

²ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, 644099, г. Омск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет» Минпросвещения России, 644099, г. Омск, Россия;

⁴ГАУЗ АО «Благовещенская городская клиническая больница», 675000, г. Благовещенск, Россия;

⁵ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, 692512, г. Уссурийск, Россия;

⁶ФГБУЗ «Медико-санитарная часть № 100» Федерального медико-биологического агентства России, 692880, г. Фокино, Россия

Введение. На территории России были выявлены четыре вида лиссавирусов (род *Lyssavirus*), представители трёх из них являлись причиной гибели людей.

Цель – охарактеризовать случаи гибели людей после контактов с рукокрылыми на территории Дальнего Востока в 2018–2021 гг. и типировать выделенные патогены.

Материалы и методы. Лиссавирусную инфекцию подтверждали в образцах секционного материала от людей, погибших в Амурской области в 2019 г. и в Приморском крае в 2019 и 2021 гг. Диагностику проводили методом флуоресцирующих антител, Real-time ПЦР, используя диагностикумы отечественного производства. Вирусы выделены в биопробе. Последовательности нуклеопротеина анализировали на уровне 1-го пассажа. Анализ филогенетических отношений и построение дендрограмм выполняли в программе MEGA7.

Результаты. Было установлено, что вирусы, вызвавшие гибель людей в Амурской области и Приморском крае, более чем на 90% идентичны лиссавирусам Иркут (вид *Lyssavirus irkut*), выявленным на территории России и Китая, и образуют с ними отдельный монофилетический кластер со 100%-й бутстреп-поддержкой.

Заключение. На территории России актуален мониторинг популяций летучих мышей на заражённость лиссавирусами. Секционный материал людей, погибших от энцефаломиелимита неустановленной этиологии в пределах 10–15 дней от начала болезни, необходимо исследовать на лиссавирусную инфекцию. Требуется разработка ПЦР-тест-систем, включающих родоспецифичные праймеры. Применение молекулярно-биологических методов является перспективным в плане развития диагностики бешенства для совершенствования эпидемиологического надзора и повышения эффективности системы биологической защиты населения Российской Федерации.

Ключевые слова: Россия; лиссавирус бешенства; лиссавирус Иркут; лиссавирусный энцефалит; рукокрылые

Для цитирования: Полещук Е.М., Тагакова Д.Н., Сидоров Г.Н., Орлова Т.С., Гордейко Н.С., Кайсаров А.Ж. Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг. Вопросы вирусологии. 2023; 68(1): 45-58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

Для корреспонденции: Полещук Елена Михайловна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии и эпидемиологии бешенства «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск, Россия. E-mail: e-poleschuk@yandex.ru

Участие авторов: Полещук Е.М. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста; Полещук Е.М., Тагакова Д.Н. – сбор и обработка материала, лабораторное исследование; Сидоров Г.Н. – редактирование; Орлова Т.С. – сбор материала, работа над разделами статьи; Гордейко Н.С. – сбор материала, работа над разделами статьи; Кайсаров А.Ж. – сбор материала, работа над разделами статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 2010, July 23). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (протокол б/н от 27.01.2021).

Поступила 23.12.2022

Принята в печать 20.02.2023

Опубликована 28.02.2023

Introduction

Lyssaviruses are widespread neurotropic RNA viruses that infect warm-blooded animals and humans, causing fatal encephalitis or rabies (also known as hydrophobia, lyssavirus encephalitis). In humans, infection causes acute encephalitis, usually resulting in death within 10–15 days after the onset of clinical symptoms of the disease. The worldwide distribution of lyssaviruses that are highly pathogenic for humans and mammals, their almost absolute lethality, and absence of treatment for developed disease place lyssaviruses at the top of the agenda for human and animal health [1, 2].

Lyssaviruses belong to the genus *Lyssavirus*, the family Rhabdoviridae and the order Mononegavirales, which currently includes 17 species recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses [3]:

- *Lyssavirus rabies* (rabies virus, RABV);
- *Lyssavirus lagos* (Lagos bat virus, LBV);
- *Lyssavirus mokola* (Mokola virus, MOKV);
- *Lyssavirus duvenhage* (Duvenhage virus, DUVV);
- *Lyssavirus hamburg* (European bat 1 lyssavirus, EBLV-1);
- *Lyssavirus helsinki* (European bat 2 lyssavirus, EBLV-2);
- *Lyssavirus australis* (Australian bat lyssavirus, ABLV);
- *Lyssavirus irkut* (Irkut virus, IRKV);
- *Lyssavirus caucasicus* (West Caucasian bat virus, WCBV);
- *Lyssavirus khujand* (Khujand virus, KHUV);
- *Lyssavirus aravan* (Aravan virus, ARAV);
- *Lyssavirus shimoni* (Shimoni bat virus, SHIBV);
- *Lyssavirus bokeloh* (Bokeloh bat lyssavirus, BBLV);
- *Lyssavirus ikoma* (Ikoma lyssavirus, IKOV);
- *Lyssavirus lleida* (Lleida bat lyssavirus, LLEBV);
- *Lyssavirus gannoruwa* (Gannoruwa bat lyssavirus, GBLV);
- *Lyssavirus formosa* (Taiwan bat lyssavirus, TBLV).

One more virus, the Kotalahti bat lyssavirus (KBLV), remains a tentative species until its species status is confirmed [3]. By 2023, 15 of 17 confirmed species had been isolated from chiropters. *Lyssavirus mokola* and *Lyssavirus ikoma* are the only two lyssaviruses that have not been found among bat species so far [4–7].

Chiropters are a major reservoir of lyssaviruses. Their diversity and global distribution contribute to the biological diversity of pathogens, being highly favorable to the emergence of new species of viruses. Over the last 20 years, 8 new species have been discovered in Europe, Asia, and Africa. Human deaths were reported from 7 species: RABV – about 60,000 deaths a year, resulting from infection from terrestrial mammals, and 2–3 cases a year, resulting from infection from bats in North America; EBLV-1 – 2 cases; EBLV-2 – 2 cases, ABLV – 3 cases, DUVV – 3 cases, IRKV – 1 case, MOKV – 2 cases [8–13].

The rabies lyssavirus (*Lyssavirus rabies*) is the most widespread species, being well represented both geo-

graphically and by the species diversity of infected mammals supporting the virus circulation. It circulates in populations of terrestrial mammals, mainly among carnivorous mammals (the order Carnivora) worldwide and in populations of chiropters (the order Chiroptera) in North and South America. *Lyssavirus rabies* is responsible for most of the deaths of humans and animals. Other species of lyssaviruses occur only outside America; they seem to have a limited geographical distribution and a narrower range of hosts. In Europe, including the European part of Russia, 5 species of lyssaviruses have been identified in addition to the rabies lyssavirus; 6 species in Africa, 1 species in Australia, and 5 species have been identified in Asia, including the territory of Russia [7, 11, 12, 14].

The rabies lyssavirus circulates in natural foci across Russia [15, 16], primarily in populations of wild canines (the family Canidae) – foxes, corsac foxes, racoon dogs, wolves, arctic foxes [17–21].

In Russia, two novel lyssaviruses have been discovered among chiropters. The Irkut lyssavirus (*Lyssavirus irkut*) was isolated from a greater tube-nosed bat (*Murina leucogaster*) in the Irkutsk Region in 2002 and the West Caucasian bat lyssavirus (*Lyssavirus caucasicus*) was isolated from a common bent-wing bat (*Miniopterus schreibersii*) in the Krasnodar Territory [22, 23].

Most of the hydrophobia cases reported in the country from 1534 to 2018 were caused by infection through contacts with wild and domestic carnivores (the dog, cat, wolf, fox, racoon dog, etc.) [24]. The molecular and genetic typing of the viruses isolated from the individuals who died after the contacts with the above animals showed that they belonged to the *Lyssavirus rabies* species [15, 25, 26].

Two documented cases of human death, which were associated with bats, were an exception. The first case was reported in the Belgorod Region in 1985. The European bat lyssavirus type 1, presently known as the Hamburg lyssavirus (*Lyssavirus hamburg*), was isolated from a deceased 11-year-old girl [3]. The rabies-related Yuli virus was isolated by professor M.A. Selimov [27] and studied under the supervision of doctor of medical sciences S.V. Gribencha at the Ivanovsky Institute of Virology. The second case was reported in 2007; the Ozernoe lyssavirus, an analog of the Irkut virus, was isolated from a deceased 20-year-old girl in the Primorsky Territory [28].

Another two human deaths caused by bites of chiropters have been reported in Russia. In both cases, the species of lyssaviruses were not identified; the death from lyssavirus infection was diagnosed using clinical and epidemiological data. The first and the earliest reported case of human death occurred in Voroshilovgrad (presently Lugansk, the Lugansk People's Republic of the Russian Federation) in 1977, when a bat bit a 15-year-old girl [29]. The second case was reported in Molodogvardeisk (the Lugansk People's Republic of the Russian Federation) in 2002: A bat bit a 34-year-old man [30].

Thus, out of 4 species of lyssaviruses detected in Russia – *Lyssavirus rabies*, *Lyssavirus hamburg*, *Lyssavirus irkut*, *Lyssavirus caucasicus* – representatives of the first three species caused human deaths. The last three species

were isolated from bats: *Lyssavirus hamburg* was found only in Europe, *Lyssavirus irkut* – in Russia and China, *Lyssavirus caucasicus* – in Russia and Africa [12, 31, 32]. During 1977–2007, four human deaths following bites of chiropters were reported.

In 2018–2021, in the Far East Region of Russia, three new cases of human lyssavirus infection after contacts with bats were reported. These cases are discussed in this article.

The **purpose** of the study was to describe the cases associated with human deaths after contacts with chiropters in the Far East in 2018–2021 and to classify isolated pathogens.

Materials and methods

Lyssavirus infection was confirmed using autopsy samples from patients who died in the Amur Region (Blagoveshchensk) in June 2019, in the Primorsky Territory in September 2019 (Fokino) and in August 2021 (Zavetnoe village). Based on the clinical and epidemiological data, the first two cases were diagnosed with encephalitis of unknown origin (meningoencephalitis of unclear etiology, unspecified viral encephalitis); the last case was diagnosed with acute encephalitis of lyssavirus etiology, severe disease.

The specific rabies virus antigen was detected by the fluorescent antibody test [33] using polyclonal anti-rabies immunoglobulin labeled with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC-immunoglobulin) manufactured by the Federal Center for Animal Health (FCAH).

Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019, and Rus(Primorsky)9220H_2021 viruses were isolated by bioassay using white outbred mice weighing 8–12 g, which were inoculated intracerebrally with 0.03 ml of a 10% Hanks solution-based brain suspension from the deceased patients [34]. The specific death of mice from rhabdovirus was confirmed by detection of its antigen by the fluorescent antibody test performed on impressions of animal brain. The infective activity of the viruses in the native material as well as at the 2nd and 4th passages was measured through intracerebral inoculation of 0.03 ml of brain suspension from the deceased patients in 10-fold dilution in Hanks solution from 10⁻¹ to 10⁻⁷. The virus titer was calculated using the Reed-Muench method [35]. The authors confirm the compliance with the institutional and national standards for using laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Editors (IAVE, July 23, 2010). The studies were approved by the Ethics Committee of the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections of Rospotrebnadzor (protocol without number dated Jan 27, 2021).

The real-time RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) was performed to detect the rabies virus RNA using reagent kits from Syntol (Moscow) and Fractal Bio (St. Petersburg) and the Rotor-Gene 6000 thermocycler.

The viral RNA was extracted from the brain of the mice that died during the 1st passage, using the TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies, United States) in accordance with the manufacturer's instructions. The

synthesis of cDNA (complementary) in RT-PCR was performed using random hexanucleotide primers included in the Reverta-L reverse transcription kit (InterLabService, Moscow).

Overlapping fragments were amplified to identify the primary nucleotide sequence of the nucleoprotein gene fragment [36]. To obtain PCR-fragments of isolated Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019, Rus(Primorsky)9220H_2021 viruses, we used pairs of primers described earlier by Heaton et al. [37] for the gene encoding nucleoprotein: JW12-JW6 (DPL), JW6 (M), JW6 (E), and then f1 and r1 described by Liu et al. [38]. The amplification was performed using the Axygen MaxyGene II thermal cycler (Axygen Scientific Inc., United States).

The presence of the PCR product of the required length was detected using electrophoresis in 1.5% agarose gel (1x TAE (tris-acetate buffer)) with ethidium bromide. The purification of PCR products and their concentration were performed using Agencourt AMPure XP paramagnetic beads (Beckman Coulter Life Sciences, United States) in accordance with the manufacturer's recommendations.

The purified PCR product was sequenced using the above pairs of primers and the BigDye™ Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit, followed by the analysis of the reaction products using the SeqStudio genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., United States).

The structure of the resulting chromatograms was analyzed with the help of the Chromas 2.6.6.0 software (Technelysium Pty Ltd, Australia). The obtained fragments of the virus genome were aligned in BioEdit 7.0.5.3 (Informer Technologies, Inc., United States). The length of the obtained products of amplification of nucleoprotein lyssavirus gene fragments was 1258 nt (the genome position – 71-1328 in relation to Reference Sequence NC_001542.1).

The search for homologous nucleotide sequences was performed using the BLASTN 2.12.0+ program in the NCBI database¹.

The analysis of phylogenetic relationships of the obtained nucleoprotein sequences and construction of dendrograms were performed by the neighbor-joining method with MEGA7 software [39], using deposited sequences of *N* gene fragments from the GenBank database ($n = 51$).

The statistical analysis of the results was performed by standard methods using Microsoft Office Excel 2016.

Results

Russia is characterized by the existence of natural foci of rabies, in which the virus circulation is supported by wild carnivores represented primarily by the *Canidae* family [18, 21]. However, since 2019 the situation that is not typical of Russia has been observed: over three years,

¹Standard Nucleotide BLAST. Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch.

three cases of human death caused by bites of chiropters have been reported – all of them occurred in the Far East.

The first victim of chiropters was a 36-year-old man. In May 2019, he was in his country house in Blagoveshchensk in the Amur Region. When he was putting on a work mitten, he was bitten twice in his ring finger by a chiropter hiding in the mitten. The bite caused minor bleeding. The injured man cleaned out the wound by himself and did not seek any medical care. The disease started developing on the 21st day after the bite. A coma developed on the 10th day of the disease. Death occurred on the 15th day of the disease.

The second victim was a retired man of 73 years old. He was attacked by a bat in Fokino in the Primorsky Territory at the end of August in 2019. The man was working in his garage. The chiropter attacked him and bit him in his neck. He did not go to see the doctor. The incubation period was around 15 days. Death occurred on the 2nd day of the disease.

The third victim was a 35-year-old man. Being at the river in Zavetnoe village in the Chuguev District of the Primorsky Territory in the middle of June 2021, he was bitten by a bat in his upper lip. He cleaned out the wound by himself, seeking no medical care. He became ill on the 52nd day after the bite. A coma developed on the 5th day of the disease. On the 8th day, he died.

In all the victims, the disease developed as meningoencephalitis complicated with hyperthermic syndrome (up to 39–40, 39, and 37.2°C, respectively), intoxication, seizure syndrome, speech disorder, impaired consciousness, pronounced cardiovascular insufficiency, respiratory failure, and brain disorder. Cerebral edema was observed in all the cases. In the first case, there were pulmonary edema and bilateral pneumonia; in the third case – pronounced generalized myoclonia, opsoclonus, myoclonic eyelid retraction, bulbar syndrome, tetraparesis, thrombosis of central retinal veins of both eyes, keratoconjunctivitis. In the first case, the patient was checked for surrogate alcohol poisoning and pneumonia; in the third case – for ischemic stroke.

The characteristics of lyssavirus infection in patients bitten by bats in the Far East Region are summarized in **Table 1**. The species of chiropters that caused infection in the above cases were not identified.

The autopsy material from the deceased was delivered to the Reference Center for Rabies Monitoring at the Omsk Research Institute of Natural Focal Infections of Rospotrebnadzor, following Rospotrebnadzor Order No. 1116 of 1/12/2017. It should be noted that thanks to the vigilance of healthcare workers and the operation of the Reference Center, these cases attracted attention of researchers who were able to identify the etiology of infection.

The material was tested using the real-time PCR reaction and the reagent kit from Syntol (Moscow) for detection of rabies virus RNA. The kit was licensed for medical application. The test system is designed for detection of specific RNA of the rabies lyssavirus (the species *Lyssavirus rabies* – classical rabies virus) by two channels – Yellow and Orange. The recorded increase of the signal in one of the channels is indicative of the presence of specific RNA genome fragments of the above pathogen in the tested sample.

The autopsy material from the patients who died after being bitten by chiropters was tested along with positive samples from wild carnivorous animals.

In samples from all the deceased patients, the positive signal indicating the presence of the rabies pathogen in the autopsy material was received by the yellow channel (**Fig. 1 a, b, c**). The presence of pathogens in samples from terrestrial wild carnivores were traditionally recorded as positive by the orange channel (**Fig. 1 d**).

The test kit from Fractal Bio, which is designed for veterinary purposes and adapted for detection of the classical rabies lyssavirus, did not detect the specific lyssavirus RNA in samples from humans, while all the samples from carnivores were tested positive.

Using the available data proving the circulation of the classical rabies lyssavirus in populations of terrestrial

Table 1. Features of cases of lyssavirus infection in victims of bat bites in the Far East region in 2019 and 2021

Таблица 1. Особенности случаев лиссавирусной инфекции у пострадавших после укусов летучими мышами в Дальневосточном регионе в 2019 и 2021 гг.

Date of contact with source of infection Дата контакта с источником инфекции	Sex, age Пол, возраст	Region Регион	Incubation period Инкубационный период	Clinical period Клинический период	Timely appeal for medical help Своевременное обращение за медицинской помощью
Mid May 2019 Середина мая 2019 г.	Male, 36 years Мужчина, 36 лет	Амурская область, Благовещенск Amur region Blagoveshchensk	21 days 21 дней	15 days 15 дней	Did not apply Не обращался
End of August 2019 Конец августа 2019 г.	Male, 73 years Мужчина, 73 года	Primorsky Krai Fokino Приморский край, ГО ЗАТО Фокино	About 15 days Около 15 дней	2 days 2 дня	Did not apply Не обращался
Mid June 2021 Середина июня 2021 г.	Male, 35 years Мужчина, 35 лет	Primorsky Krai, Chuguevsky District, Zavetnoe village Приморский край, Чугуевский район, с. Заветное	52 days 52 дня	8 days 8 дней	Did not apply Не обращался

carnivores, we assumed that the agent of lyssavirus infection, which was detected by the test kit from Syntol, could belong to the species different from the classical lyssavirus and that the pathogens could belong to the same phylogroup I as the classical lyssavirus.

The specific rabies virus antigen was detected in brain impressions prepared with autopsy material from the deceased, using the immunofluorescence test with polyclonal anti-rabies immunoglobulin from FCAH (Fig. 2). The specific fluorescence intensity in two samples (Fig. 2 a, c) was graded as 4 (clearly visible yellow-green fluorescence) and in one sample (Fig. 2 b) – as 2 points.

The viruses named Rus(Amur) 8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019, and Rus(Primorsky)9220H_2021 were isolated during the bioassay with white outbred mice infected intracerebrally. The incubation period for the Rus(Amur) 8947H_2019 isolate was 10–13 days (on average 11.5 ± 0.3), for Rus(Primorsky) 8949H_2019 – 7–10 days (on average 8.6 ± 0.7), for Rus(Primorsky) 9220H_2021 – 6–8 days (on average 7.1 ± 0.1) (Table 2).

All the animals infected with primary material became ill, presenting clinical signs, mostly paralysis and paresis. Other signs included lethargy, weakness, convulsive seizures, decreased activity and mobility. The death of animals occurred within a day. The death of mice from lyssavirus infection was confirmed by detection of a specific antigen in the impressions prepared using the brain of the animals that died or were euthanized when the clinical signs reached the highest level.

The isolated viruses were passaged using white outbred mice weighing 8–12 g. At the 3rd passage, the incubation period for Rus(Amur)8947H_2019 and Rus(Primorsky)8949H_2019 pathogens reduced to 5 days, and for Rus(Primorsky) 9220H_2021 – to 4–5 days. The titer of the Rus(Amur)8947H_2019 virus that was 4.4 lg LD50_{0.03} in the primary material reached 4.7 lg LD50_{0.03} at the 4th passage. For the Rus(Primorsky)8949H_2019 virus, the infective activity was 4.6 lg LD50_{0.03} in the primary material and 5.6 lg LD50_{0.03} at the 6th passage. The titer of the Rus(Primorsky) 9220H_2021 virus in the pri-

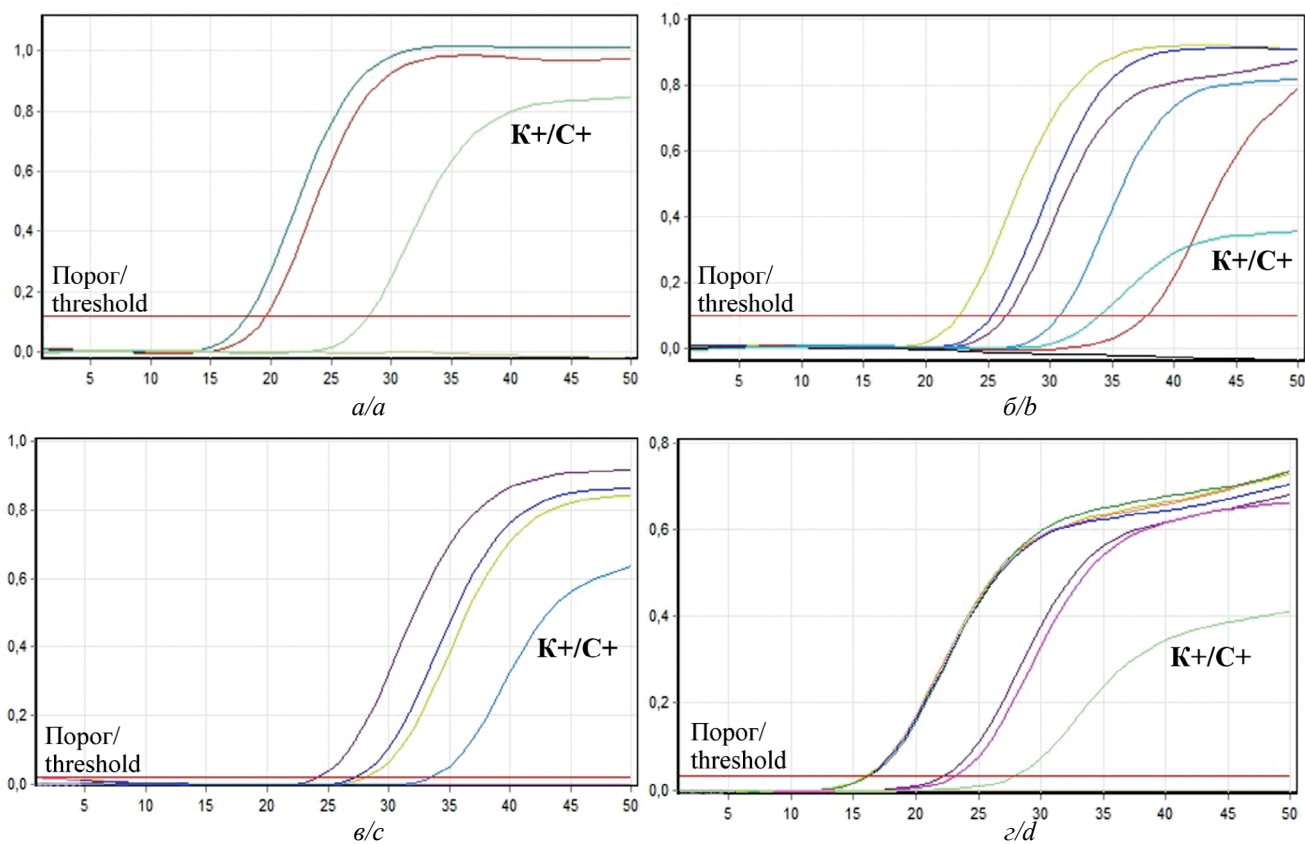


Fig. 1. Results of testing of samples from people who died after being bitten by bats and material of wild carnivores in the Real-time PCR reaction with a set of reagents for the detection of rabies virus RNA from Syntol LLC using specific detection channels: Yellow: *a* – human, Amurskaya region, 2019; *b* – human, Primorsky Krai, 2019; *c* – human, Primorsky Krai, 2021 and Orange: *d* – samples of wild carnivores, Amur Region, 2019. In illustrations *a, b, c, d* curves are to positive reactions for biomaterial samples. C+ – positive reaction control. The X-axis indicates normal fluorescence. The Y-axis indicates the number of cycles.

Рис. 1. Результаты диагностики образцов от людей, погибших после укусов рукокрылыми, и материала от диких хищников в ПЦР Real-time с набором реагентов для выявления РНК вируса бешенства от ООО «Синтол» по каналам детекции специфики: Yellow: *a* – человек, Амурская область, 2019 г.; *b* – человек, Приморский край, 2019 г.; *в* – человек, Приморский край, 2021 г. и Orange: *г* – хищные млекопитающие, Амурская область, 2019 г. Кривые на иллюстрациях *a, б, в, г* соответствуют положительным реакциям для образцов биоматериала. К+ – положительный контроль реакции. По оси X указана нормальная флюоресценция. По оси Y указано ко-во циклов.

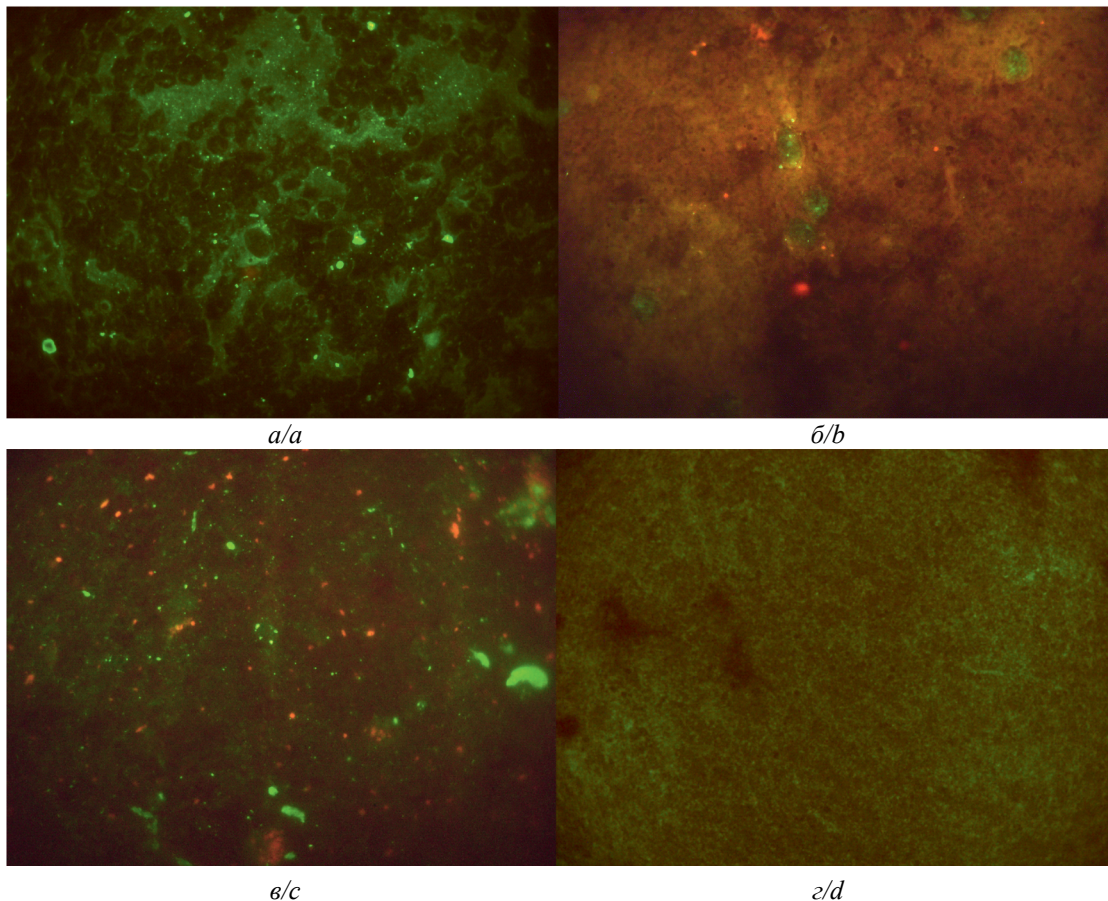


Fig. 2. Specific immunofluorescence of rabies lyssavirus antigen in brain imprints obtained during MFA using polyclonal Ig (FGBI “Federal Centre for Animal Health”). The prints were made from primary material (brain): *a* – human, Amur Region, 2019; *b* – human, Primorsky Territory, 2019; *c* – human, Primorsky Territory, 2021; *d* – healthy white mice. Olympus CX41 microscope, $\times 10$ eyepiece, $\times 100$ objective, DP 72 documentation system, oil immersion.

Рис. 2. Специфическая иммунофлуоресценция антигена лиссавирусов бешенства в отпечатках головного мозга, полученная методом флуоресцирующих антител с использованием поликлонального Ig (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Отпечатки сделаны с первичного материала (головной мозг): *a* – человек, Амурская область, 2019 г.; *b* – человек, Приморский край, 2019 г.; *в* – человек, Приморский край, 2021 г.; *г* – здоровые белые мыши. Микроскоп Olympus CX41, окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$, система документирования DP 72, масляная иммерсия.

mary material was 4.3 lg LD_{50,0.03} and 5.4 lg LD_{50,0.03} at the 4th passage (Table 2).

Amplification and sequencing of Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019 and Rus(Primorsky)9220H_2021 isolates yielded the fragments of nucleoprotein gene sequences, the length of which was 1258 nt (accession numbers in GenBank: OQ377548 – OQ377550).

Using the BLASTN 2.12.0+ program, we have found that sequences of Rus(Amur)_8947H_2019, Rus(Primorsky)_8949H_2019, and Rus(Primorsky)_9220H_2021 viruses were identical to those of Irkut lyssaviruses: the Ozerne virus isolated from the individual who died in the Primorsky Territory in 2007 had 98.17–99.68% identity; the IRKV-THChina12 virus isolated in 2012 from a bat in China (Tonghua, Jilin province) had 98.17–98.97% identity; the FX17 virus isolated in 2017 from a dog in China (Fuxin) had 98.01–98.81% identity; the Irkut virus isolated from a bat in Irkutsk in 2002 had 92.75–93.15% identity (Table 3).

The similarity with the Hamburg lyssavirus (EBLV-1, isolate 13424, Spain, 1989) was 79.08–79.28% and with classical rabies lyssaviruses – 76.75–77.64% (Table 3).

It has been found that the viruses responsible for human deaths in the Amur Region and the Primorsky Territory form a distinct monophyletic cluster with lyssaviruses belonging to the Irkut species with 100% bootstrap support (Fig. 3).

Discussion

The described three deceased patients did not demonstrate any typical clinical picture of rabies (hydrophobia, aerophobia, photophobia), which would be indicative of the lyssavirus etiology of encephalitis. Considering the increasing severity of the disease and based on the clinical and epidemiological data, one patient was diagnosed with unspecified viral encephalitis, while for two other cases, the epidemiological anamnesis served as the basis for diagnosing encephalitis of lyssavirus etiology.

Table 2. Characteristics of the isolated lyssaviruses that caused the death of people after being bitten by bats

Таблица 2. Характеристика выделенных лиссавирусов, вызвавших гибель людей после укусов рукокрылыми

Characteristics Характеристика	Rus(Amur)8947H_2019	Rus(Primorsky)8949H_2019	Rus(Primorsky) 9220H_2021
Incubation period at 1 infection Инкубационный период при 1 заражении	10–13 days (mean 11.5) 10–13 дней (в среднем 11,5)	7–10 days (mean 8.6) 7–10 дней (в среднем 8,6)	6–8 days (mean 7.1) 6–8 дней (в среднем 7,1)
Incubation period at passage 3 Инкубационный период на 3-м пассаже	5 days 5 дней	5 дней 5 days	4–5 дней 4–5 days
Incubation period at passage 5 Инкубационный период на 5-м пассаже	4–5 days 4–5 дней	4–5 дней 4–5 days	4–6 дней 4–6 days
Virus titer in primary material Титр вируса в первичном материале	4,4 lg LD50 _{0,03}	4,6 lg LD50 _{0,03}	4,3 lg LD50 _{0,03}
Virus titer at the level Титр вируса на уровне	4-го пассажа passage 4 4,7 lg LD50 _{0,03}	6-го пассажа passage 6 5,6 lg LD50 _{0,03}	4-го пассажа passage 4 5,4 lg LD50 _{0,03}

Table 3. Search for nucleotide identity of obtained sequences using BLASTN 2.12.0+

Таблица 3. Поиск идентичности нуклеотидов полученных сиквентов с помощью BLASTN 2.12.0+

Viruses Вирусы	Identity of nucleoprotein genome fragments (1258 n.p., position 71-1328 relative to RefSeq NC_001542.1), % Доля идентичности фрагментов генома нуклеопротеина (1258 н.о., позиция 71-1328 относительно RefSeq NC_001542.1), %		
	Rus(Amur)_8947H_2019	Rus(Primorsky)_8949H_2019	Rus(Primorsky)_9220H_2021
Irkut lyssaviruses (IRKV) Лиссавирусы Иркут (IRKV)			
1 Ozernoe, 2007	98,17	99,68	99,13
2 THChina12, 2012	98,17	98,89	98,97
3 FX17, 2017	98,01	98,73	98,81
4 Irkut (NCBI RefSeq), 2002	93,15	92,83	92,75
<i>Lyssavirus hamburg</i> (EBLV-1, isolate 13424, Spain, 1989) (EBLV-1, изолят 13424, Испания, 1989 г.)	79,16	79,08	79,28
Лиссавирусы бешенства (RABV)	77,24–76,75	77,64–77,24	77,53–77,04

The fatal case with distinct clinical manifestations was reported in Zavitsinsk in the Amur Region in 2020. A 45-year-old woman died after being bitten by a dog. The case was not laboratory confirmed as the material was collected improperly. However, pronounced hydrophobia, aerophobia, photophobia, hyperthermia, hypersalivation, aggressiveness, the fact of a dog bite made it possible to conclude that the woman's death was caused by rabies based on the clinical and epidemiological data.

Note that a contact with chiropters may not be noticed by an individual; therefore, the epidemiological anamnesis will not have any data regarding this contact. The infection caused by lyssaviruses that are different from classical rabies can develop without typical clinical signs. There are reports mentioning atypical symptoms of human rabies caused by chiropter bites (The World Health Organization, 2018), thus making it difficult to diagnose the disease. Therefore, if a patient's death is caused by acute encephalomyelitis of unknown etiology within 10–15 days from the onset of the disease, the autopsy material must be tested for lyssavirus infection. In the Sanitary Rules and Regu-

lations SanPiN 3.3686-21, in the Sanitary and Epidemiological Requirements for Prevention of Infectious Diseases (section XXII), we updated the rules for rabies prevention and emphasized the significance of the above tests.

The south of the Far East is known as a natural focal region [40] where rabies lyssaviruses circulate in populations of foxes and racoon dogs. From time to time, wolves become involved in the epizootic process. During different periods of epizootic outbreaks, 40–60% cases of rabies are reported among domestic dogs [20, 21].

Over the last 20 years, in the Far East a total of 11 human deaths caused by encephalitis of lyssavirus etiology have been reported. In 3 cases, the sources of the rabies lyssavirus were domestic dogs and in 4 cases – wild carnivores (a fox – 3 cases, a wolf – 1 case) [20]. Chiropters were the source of the Irkut lyssavirus in other 4 cases [28], including the cases described in this article.

The Irkut lyssavirus was first isolated from a greater tube-nosed bat (*Murina leucogaster*) in Irkutsk in 2002 [23]. In 2007, a human death caused by the above lyssavirus was reported in Ozernoe village in the Primorsky Territory [28] (Fig. 4).

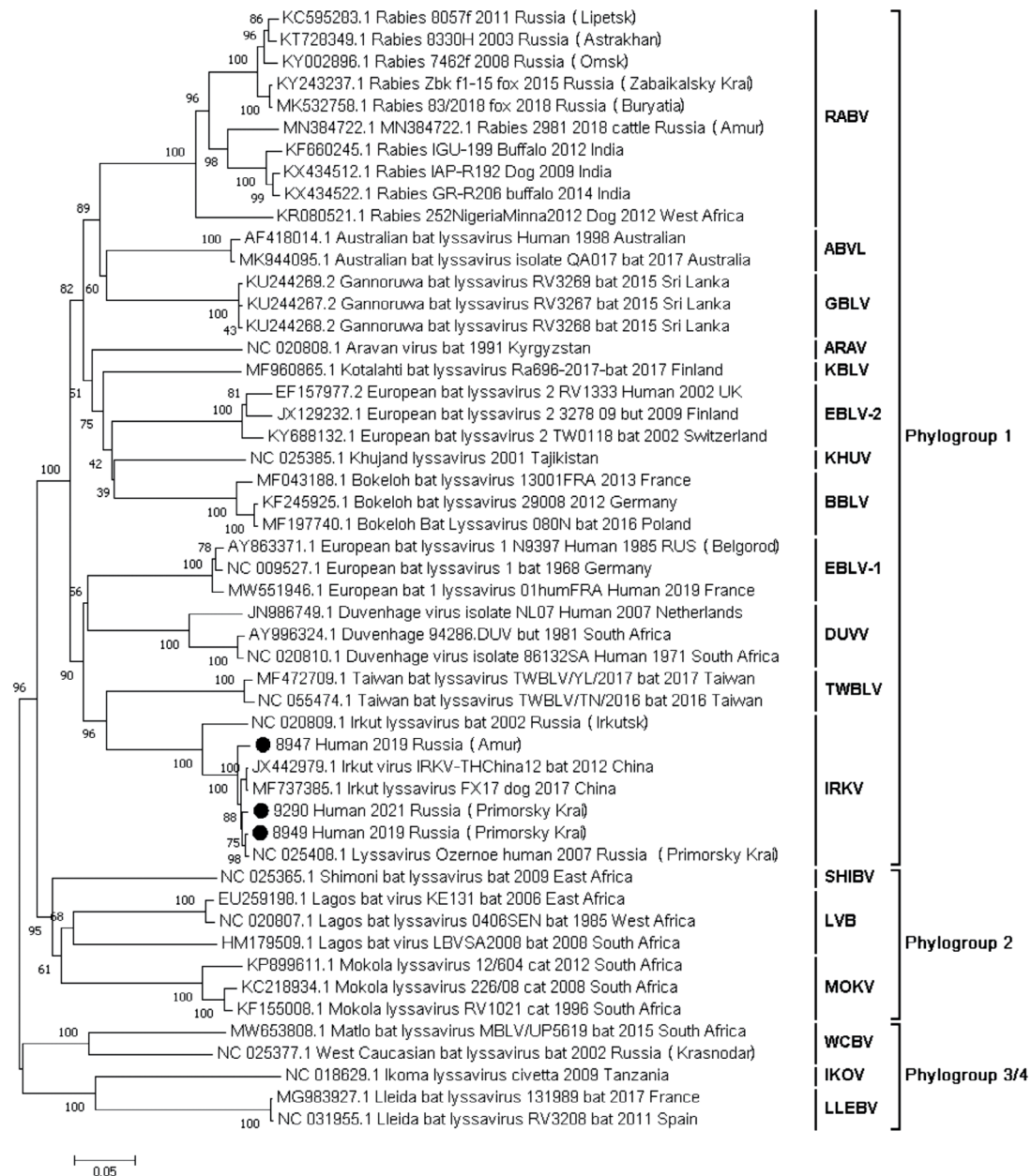


Fig. 3. Phylogenetic dendrogram obtained by the Neighbor-Joining method for 51 isolates of lyssaviruses of known species based on the alignment of the nucleoprotein gene sequences (*N*, 1258 bp). The nodes indicate the percentage of duplicate trees (bootstrap support, %) in which associated taxa are grouped together in the bootstrap test (1000 repetitions). The values of the bootstrap support indicators reflect the stability of the topology of the dendrogram and are significant at values > 70%. The analysis was performed in MEGA7 software.

Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, полученная методом Neighbor-Joining для 51-го изолята лиссавирусов известных видов на основании выравнивания последовательностей гена нуклеопротеина (*N*, 1258 н.о.). В узлах указана доля дублирующих деревьев (бутстреп-поддержка, %), в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе, в бутстреп-тесте (1000 повторов). Значения показателей бутстреп-поддержки отражают устойчивость топологии дендрограммы и достоверны при значениях > 70%. Анализ выполнен в MEGA7.

The above virus has been detected not only in Russia. In 2012, the Irkut lyssavirus was isolated from a greater tube-nosed bat in Jilin province (Jilin) in the center of Northeast China [38]. The repeated discovery of the pathogen in the same species of chiropters can be indicative of its species specificity. A few years later, in 2017, in the Fuxin County in China, the Irkut virus was isolated from a dead domestic dog that had bitten a human [41]. It was the

first evidence of possible transmission of the Irkut bat virus to terrestrial carnivores and from them – to humans.

The identity analysis with the BLASTN program and the phylogenetic analysis have demonstrated that the obtained sequences of the Rus(Amur)_8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019, and Rus(Primorsky)_9220H_2021 viruses isolated in 2019 and 2021 are clustered with IRKV lyssaviruses and are identical to repre-

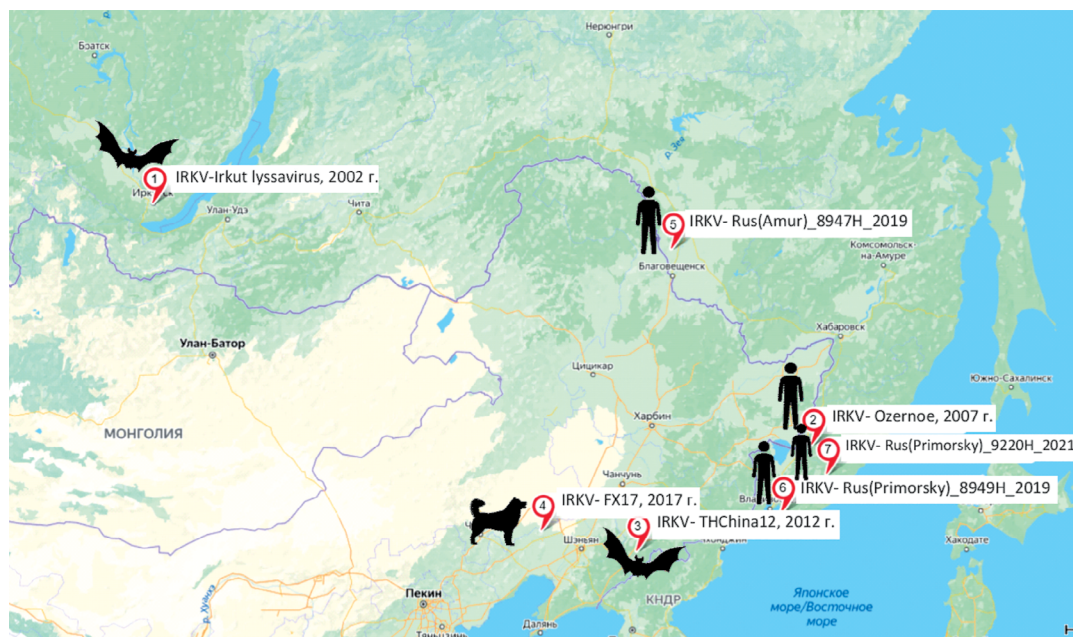


Fig. 4. Cases of detection of Irkut lyssavirus (IRKV) in chronological order: 2002 – Russia, Irkutsk, Bat; 2007 – Russia, Primorsky Krai, Yakovlevsky district, Ozernoye village, human; 2012 – China, Jilin province, Bat; 2017 – China, Fuxin County, domestic dog; 2019 – Russia, Amur Region, Blagoveshchensk, human; 2019 – Russia, Primorsky Territory, Fokino, human; 2021 – Russia, Primorsky Krai, Chuguevsky district, Zavetnoe village, human.

Рис. 4. Случаи выявления лиссавируса Иркут (IRKV) в хронологическом порядке: 2002 – Россия, Иркутск, большой трубнонос; 2007 – Россия, Приморский край, Яковлевский район, с. Озёрное, человек; 2012 – Китай, провинция Гирин, большой трубнонос; 2017 – Китай, округ Фусинь, домашняя собака; 2019 – Россия, Благовещенск, Амурская область, человек; 2019 – Россия, Приморский край, ГО ЗАТО Фокино, человек; 2021 – Россия, Приморский край, Чугуевский район, с. Заветное, человек.

representatives of the species by more than 90%. It is known that the identity threshold for *N* gene nucleotide sequences, which is responsible for delineation of all lyssaviruses into species, is 82% [42]. The similarity with other species (EBLV-1 and RABV) ranged from 79.28 to 76.75%, thus demonstrating that the detected viruses belonged to the IRKV species.

The analysis of phylogenetic relationships, which was performed with the MEGA7 software for sequences of the *N* gene fragment in all the known species of lyssaviruses from GenBank (1258 nt, $n = 51$), showed that the viruses that caused human deaths in the Amur Region and the Primorsky Territory form a distinct monophyletic cluster with Irkut lyssaviruses with 100% bootstrap support (**Fig. 3**).

All the IRKV viruses, though they were found in relatively distant geographical locations, are closely related (**Fig. 3, 4**). There were at least three human deaths caused by rabies transmitted by bats in Northeast China: in the Tonghua County in the 1990s and in 2002, and in the city of Longjing in 2010. These cases were diagnosed only clinically, without laboratory confirmation. The species of chiropters responsible for the human deaths were not identified. Reports about incidents of bat attacking humans were rare [38]. Earlier, in Asia, a few non-characterized cases of lyssavirus infection in chiropters were reported [11]. In 1967, in Thailand, lyssavirus antigens were detected in two Malayan short-nosed fruit bats (*Cynopterus brachyotis*) using the fluorescent antibody

test [43]. In 1978, the lyssavirus was detected in the grey-headed flying fox (*Pteropus poliocephalus*) in India [44]. These data imply the possibility of wider distribution of the Irkut lyssavirus. It can have wide distribution across the geographic range of the greater tube-nosed bat, including Siberia and the Far East. Other species of chiropters can be involved in the circulation of the pathogen.

At this stage, we have shown the benefits of using molecular and genetic methods for detection of representatives of the genus *Lyssavirus*, which do not belong to the classical rabies lyssavirus; we have pointed out the significance of their application for interpreting human fatal cases associated with encephalitis of unclear etiology and assessed diagnostic capabilities of PCR test-systems from Russian manufacturers. The successful detection of non-classical rabies lyssaviruses using a Russian diagnostic kit was an exceptional example, as all the available Russian PCR test-systems are designed specifically for detection of the classical rabies lyssavirus.

For example, the PCR test-system from Syntol, which was used for diagnosis, was designed for detection of the specific RNA of the classical rabies lyssavirus by detection of two genome regions: the region encoding the nucleoprotein (*N*) gene and the region encoding the gene of RNA-dependent RNA polymerase (*L*). In this assay, all classical rabies viruses were detected by the channel identifying nucleoprotein fragments. The specific fragments of lyssavirus RNA from the patients who died following bat bites were identified only by

the *L* gene detection channel, while the nucleoprotein region was not detected by this test system. Therefore, we assumed that the Syntol test system detected another lyssavirus, which did not belong to the classical rabies lyssavirus and possibly belonged to phylogroup I (see below). At the same time, another assay designed for detection of the nucleoprotein region of the classical rabies virus common in Russia did not detect the above viruses and demonstrated the absence of its ability to identify the above pathogen.

During the virological study, viruses were isolated using the white outbred mouse bioassay; their specificity was confirmed by the fluorescent antibody test with polyclonal anti-rabies immunoglobulin. The test was successful, as the *N* gene is highly conserved; it induces formation of cross-reacting and complement fixing antibodies, while lyssaviruses of different species demonstrate broad antigenic cross-activity at the level of detection of the *N* protein antigen [3]. Therefore, standard diagnostic techniques designed for detection of the nucleoprotein (for example, the fluorescent antibody test), through reaction with the polyclonal anti-rabies immunoglobulin, can be used for detection of all lyssaviruses without species differentiation, using the same diagnostic kits.

Based on genetic distances and serological cross-activity, lyssaviruses are divided at least into three phylogroups. Phylogroup I is comprised of RABV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, ARAV, KHUV, IRKV, BBLV, GBLV, TWBLV, KBLV. Phylogroup 2 includes LBV, MOKV, SHIBV. The other species – WCBV, IKOV, and LLEBV – cannot be included in any of these phylogroups. Each phylogroup is characterized by relative conservation of glycoprotein antigens inducing the production of virus-neutralizing antibodies responsible for antiviral immunity (the identity of amino acids in the ectodomain is >74%). Cross-neutralization between lyssaviruses belonging to different phylogroups is absent (the identity of amino acids in the ectodomain is <62%). As a result, commercially available vaccines and immunoglobulins against rabies, which are based on strains of the classical virus, generally induce immune protection against lyssaviruses of phylogroup I rather than other lyssaviruses [7].

The Irkut lyssavirus belongs to phylogroup I [7]; therefore, the existing anti-rabies products should provide protection against it. However, the experimental findings of American and Chinese studies have shown that commercial biopharmaceuticals against rabies do not provide 100% protection against the infection caused by IRKV, which would be as reliable as the protection against infection with the classical rabies lyssavirus [45–47].

Conclusion

1. During 1977–2021, seven human deaths from bat bites were reported in Russia: two deaths were reported in the Lugansk People's Republic, Lugansk (Voroshilovgrad) and Molodogvardeisk; one death – in the Belgorod Region, Belgorod; one death – in the Amur Region, Blagoveshchensk; three deaths – in the Primorsky Territory, Ozernoe village, Fokino, Zavetnoe village.

2. Out of four species of lyssaviruses circulating in Russia – *Lyssavirus rabies*, *Lyssavirus hamburg*, *Lyssavirus irkut*, *Lyssavirus caucasicus* – representatives of the first three species caused human deaths; the last three species were isolated from bats.

3. The reported human deaths caused by lyssavirus infection in the south of the Far East Region imply that the role of chiropters in epidemiology of this infection was underestimated in Russia and suggest the possibility of under-diagnosis of lyssavirus infection after contacts with these animals.

4. In Russia, bat populations must be monitored for infection with lyssaviruses, taking into consideration that the Irkut lyssavirus has been detected in the greater tubenosed bat in Russia and China, thus implying the possible species specificity of the pathogen.

5. The epidemiological and public health authorities must be aware of the possibility of chiropters to transmit lyssaviruses. With a high species diversity of bats and rapid emergence of new species of lyssaviruses, none of the Russian regions can be considered free of these pathogens.

6. Considering the difficulty of clinical diagnostics of the etiology of encephalitis caused by lyssaviruses that are different from the classical rabies lyssavirus, the autopsy material from the patients who died from encephalomyelitis of unknown etiology must be tested for the presence of the lyssavirus pathogen within 10–15 days from the onset of the disease.

7. The Russian commercial diagnostic kits for the fluorescent antibody test are efficient for detection of the Irkut lyssavirus antigen. The Russian PCR-based test-system from Syntol can be used for detection of the Irkut lyssavirus, but there is need for diagnostic kits that employ genus-specific primers. Molecular and biological methods offer good prospects for improvement of rabies diagnosis and further improvement of epidemiological surveillance and effectiveness of the system of biological protection of the population in Russia.

8. The fact that the identified pathogens belong to the Irkut virus implies that the Russian vaccines available on the market provide effective protection against this pathogen. Nevertheless, the evaluation of the existing immunobiological products in terms of their effect on the Irkut virus and the development of new products remain priority tasks.

9. Summarized data on detection of the Irkut lyssavirus and the proven facts of its transmission to dog populations increase the urgency of vaccination of domestic animals to prevent any risk of their infection with this pathogen.

10. There is an urgent need for improvement of rabies awareness and educational campaigns to prevent contacts of the population with rabid animals, including bats, as well as for better encouragement of timely seeking medical attention if bitten by animals. The injuries caused by chiropters must be reported and documented.

REFERENCES

1. Gribencha S.V., L'vov D.K. Rabies. In: L'vov D.K., ed. *Virology Manual [Rukovodstvo po virusologii]*. Moscow: MIA; 2013: 811–6. (in Russian)

2. Botvinkin A.D. Rabies. In: Briko N.I., Onishchenko G.G., Pokrovskiy V.I., eds. *Guide to the Epidemiology of Infectious Diseases. Volume 2 [Rukovodstvo po epidemiologii infektsionnykh bolezney. Tom 2]*. Moscow: MIA; 2019: 199–223. (in Russian)
3. Virus Taxonomy. The ICTV Report on Virus Classification and Taxonomy. Subfamily: Alpharhabdovirinae. Genus: Lyssavirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus
4. Nokireki T., Tammiranta N., Kokkonen U.M., Kantala T., Gadd T. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65(3): 593–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12833596>
5. Marston D.A., Horton D.L., Ngeleja C., Hampson K., McElhinney L.M., Banyard A.C., et al. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(4): 664–7. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111553>
6. Coertse J., Markotter W., le Roux K., Stewart D., Sabeta C.T., Nel L.H. New isolations of the rabies-related Mokola virus from South Africa. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0948-0>
7. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva; 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>
8. Banyard A.C., Hayman D., Johnson N., McElhinney L., Fooks A.R. Bats and lyssaviruses. *Adv. Virus. Res.* 2011; 79: 239–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>
9. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses.* 2014; 6(8): 2974–90. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
10. Rupprecht C., Kuzmin I., Meslin F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Res.* 2017; 6: 184. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>
11. Markotter W., Coertse J. Bat lyssaviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2): 385–400. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2809>
12. Shipley R., Wright E., Selden D., Wu G., Aegerter J., Fooks A.R., et al. Bats and viruses: emergence of novel lyssaviruses and association of bats with viral zoonoses in the EU. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2019; 4(1): 31. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010031>
13. Regnault B., Evrard B., Plu I., Dacheux L., Troadec E., Cozette P., et al. First Case of Lethal Encephalitis in Western Europe Due to European Bat Lyssavirus Type 1. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(3): 461–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab443>
14. Fooks A.R., Cliquet F., Finke S., Freuling C., Hemachudha T., Mani R.S., et al. Rabies. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3: 17091. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
15. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith S.S., Orciari L.A., Hughes G.J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wildlife Dis.* 2004; 40(4): 617–31. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
16. Deviatkin A.A., Lukashov A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
17. Sidorov G.N. Aspects of the historical development of natural foci of rabies in Europe and North Asia. *Veterinarnaya patologiya.* 2002; (1): 21–5. (in Russian)
18. Sidorov G.N., Sidorova D.G., Poleshchuk E.M. Rabies of wild mammals in Russia in the late 20th – early 21st centuries. *Zoologicheskii zhurnal.* 2010; 89(1): 26–36. (in Russian)
19. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. A summary of the data about antigenic and genetic diversity of rabies virus circulating in the terrestrial mammals in Russia. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(3): 9–16. (in Russian)
20. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Nashatyreva D.N., Gradoboeva E.A., Paskina N.D., Popova I.V. *Rabies in the Russian Federation: INFORMATIONAL and Analytical Bulletin [Beshenstvo v Rossiyskoy Federatsii: Informatsionno-analiticheskii byulleten']*. Omsk; 2019. (in Russian)
21. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N. Comparative analysis of features of epizootiological and epidemic situation and risk of rabies infection in the Russian Federation in early XXI century. *Problemy osobopasnykh infektsiy.* 2020; (4): 16–25. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-16-25> (in Russian)
22. Poleshchuk E.M., Kuz'min I.V., Gazaryan S.V., Botvinkin A.D. West Caucasian lyssavirus of bats: lack of vaccine protection. *Plecotus et al.* 2003; (6): 67–71. (in Russian)
23. Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623–5. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
24. Sidorov G.N., Poleshchuk E.M., Sidorova D.G. Changes in the role of mammals in human hydrophobia infection in Russia for a historically graspable period of the 16th to 21st centuries. *Zoologicheskii zhurnal.* 2019; 98(4): 437–52. <https://doi.org/10.1134/S0044513419040159> (in Russian)
25. Botvinkin A.D., Kuzmin I.V., McElhinney L.M., Johnson N., Fooks A.R. The diversity of rabies virus in Russia demonstrated by anti-nucleocapsid monoclonal antibody application and limited gene sequencing. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 125: 79–90.
26. Gradoboeva E.A., Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Shtrek S.V. To the problem of the application of molecular genetic methods in the diagnosis and epidemiological investigation of human rabies cases. *Dal'nevostochnyy zhurnal infeksionnoy patologii.* 2019; (37): 37–8. (in Russian)
27. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33(6): 542–6.
28. Leonova G.N., Somova L.M., Belikov S.I., Kondratov I.G., Plekhova N.G., Krylova N.V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: Tkachev S.E., ed. *Encephalitis. Croatia: In Tech;* 2012: 231–50. <https://doi.org/10.5772/52869>
29. Shcherbak Yu.N. Virology researches on the rabies problem in the Ukrainian SSR. In: *Viruses and Viral Diseases [Virusy i virusnye zabollevaniya]*. Kiev: Zdorov'e; 1984: 11–6. (in Russian)
30. Botvinkin A.D., Selnikova O.P., Antonova L.A., Moiseeva A.B., Nesterenko E.Yu. Human rabies case caused from a bat bite in Ukraine. *Rabies Bulletin Europe.* 2005; 29(3): 5–7.
31. Coertse J., Grobler C.S., Sabeta C.T., Seamark E., Kearney T., Paweska J.T., et al. Lyssaviruses in insectivorous bats, South Africa, 2003–2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3056–60. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203592>
32. Grobler C.S., Coertse J., Markotter W. Complete genome sequence of Matlo bat lyssavirus. *Microbiol. Resour. Announc.* 2021; 10(20): e0024121. <https://doi.org/10.1128/MRA.00241-21>
33. Dean D.J., Abelseth M.K., Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: WHO; 1996: 88–93.
34. Koprowski H. The mouse inoculation test. Laboratory techniques in rabies. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: WHO; 1996: 80–6.
35. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: WHO; 1996. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38286>
36. Tordo N., Sacramento D., Bourhy H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies.* Geneva: WHO; 1996: 157–74.
37. Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2762-2766.1997>
38. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut virus from a Murina leucogaster bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(3): e2097. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002097>
39. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
40. Botvinkin A.D., Sidorov G.N. Natural foci of rabies in the RSFSR and adjacent territories. In: *Materials of the 5th Joint Congress of Hygienists, Epidemiologists, Microbiologists, Parasitologists and Infectious Disease Specialists of Kazakhstan [Materialy 5 ob'edinenennogo s'ezda gigienistov, epidemiologov, mikrobiologov, parazitologov i infeksionistov Kazakhstana]*. Alma-Ata; 1991: 95–8. (in Russian)
41. Chen T., Miao F.M., Liu Y., Zhang S.F., Zhang F., Li N., et al. Possible transmission of Irkut virus from dogs to humans. *Biomed. Environ. Sci.* 2018; 31(2): 146–8. <https://doi.org/10.3967/bes2018.017>
42. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian

- bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 2005; 111(1): 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.008>
43. Smith P.C., Lawhaswasdi K., Vick W.E., Stanton J.S. Isolation of rabies virus from fruit bats in Thailand. *Nature.* 1967; 216(5113): 384. <https://doi.org/10.1038/216384a0>
44. Pal S.R., Arora B., Chhuttani P.N., Broor S., Choudhury S., Joshi R.M., et al. Rabies virus infection of a flying fox bat, *Pteropus poliocephalus* in Chandigarh, Northern India. *Trop. Geogr. Med.* 1980; 32(3): 2657.
45. Hanlon C.A., Kuzmin I.V., Blanton J.D., Weldon W.C., Manangan J.S., Rupprecht C.E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* 2005; 111(1): 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.009>
46. Liu Y., Li N., Zhang S., Zhang F., Lian H., Wang Y., et al. Analysis of the complete genome of the first Irkut virus isolate from China: comparison across the Lyssavirus genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013; 69(3): 687–93. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.008>
47. Liu Y., Chen Q., Zhang F., Zhang S., Li N., Lian H., et al. Evaluation of rabies biologics against Irkut virus isolated in China. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3499–504. <https://doi.org/10.1128/JCM.01565-13>
- ### ЛИТЕРАТУРА
1. Грибенча С.В., Львов Д.К. Бешенство. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии*. М.: МИА; 2013: 811–6.
2. Ботвинкин А.Д. Бешенство. В кн.: Брико Н.И., Онищенко Г.Г., Покровский В.И., ред. *Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. Том 2*. М.: МИА; 2019: 199–223.
3. Virus Taxonomy. The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature. Subfamily: Alpharhabdovirinae. Genus: Lyssavirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/rhabdoviridae/795/genus-lyssavirus
4. Nokireki T., Tammiranta N., Kokkonen U.M., Kantala T., Gadd T. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018; 65(3): 593–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12833596>
5. Marston D.A., Horton D.L., Ngeleja C., Hampson K., McElhinney L.M., Banyard A.C., et al. Ikoma lyssavirus, highly divergent novel lyssavirus in an African civet. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(4): 664–7. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111553>
6. Coertse J., Markotter W., le Roux K., Stewart D., Sabeta C.T., Nel L.H. New isolations of the rabies-related Mokola virus from South Africa. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0948-0>
7. WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva; 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>
8. Banyard A.C., Hayman D., Johnson N., McElhinney L., Fooks A.R. Bats and lyssaviruses. *Adv. Virus. Res.* 2011; 79: 239–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387040-7.00012-3>
9. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses.* 2014; 6(8): 2974–90. <https://doi.org/10.3390/v6082974>
10. Rupprecht C., Kuzmin I., Meslin F. Lyssaviruses and rabies: current conundrums, concerns, contradictions and controversies. *F1000Res.* 2017; 6: 184. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10416.1>
11. Markotter W., Coertse J. Bat lyssaviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2): 385–400. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2809>
12. Shipley R., Wright E., Selden D., Wu G., Aegerter J., Fooks A.R., et al. Bats and viruses: emergence of novel lyssaviruses and association of bats with viral zoonoses in the EU. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2019; 4(1): 31. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010031>
13. Regnault B., Evrard B., Plu I., Dacheux L., Troadec E., Cozette P., et al. First Case of Lethal Encephalitis in Western Europe Due to European Bat Lyssavirus Type 1. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(3): 461–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab443>
14. Fooks A.R., Cliquet F., Finke S., Freuling C., Hemachudha T., Mani R.S., et al. Rabies. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3: 17091. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
15. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith S.S., Orciari L.A., Hughes G.J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wildlife Dis.* 2004; 40(4): 617–31. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
16. Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleshchuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
17. Сидоров Г.Н. Аспекты исторического развития природных очагов бешенства в Европе и Северной Азии. *Ветеринарная патология.* 2002; (1): 21–5.
18. Сидоров Г.Н., Сидорова Д.Г., Полещук Е.М. Бешенство диких млекопитающих на территории России в конце 20 – начале 21 веков. *Зоологический журнал.* 2010; 89(1): 26–36.
19. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии.* 2013; 58(3): 9–16.
20. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Нашатырева Д.Н., Градобоева Е.А., Пакскина Н.Д., Попова И.В. *Бешенство в Российской Федерации: Информационно-аналитический бюллетень*. Омск; 2019.
21. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н. Анализ особенностей эпизотологического-эпидемиологической ситуации и риск заражения бешенством в Российской Федерации в начале XXI века. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; (4): 16–25. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-4-16-25>
22. Полещук Е.М., Кузьмин И.В., Газарян С.В., Ботвинкин А.Д. Западно-кавказский лиссавирус рукокрылых: отсутствие вакциновой защиты. *Plecotus et al.* 2003; (6): 67–71.
23. Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623–5. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
24. Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Сидорова Д.Г. Изменение роли млекопитающих в заражении людей бешенством в России за исторически обозримый период в 16–21 веках. *Зоологический журнал.* 2019; 98(4): 437–52. <https://doi.org/10.1134/S0044513419040159>
25. Botvinkin A.D., Kuzmin I.V., McElhinney L.M., Johnson N., Fooks A.R. The diversity of rabies virus in Russia demonstrated by anti-nucleocapsid monoclonal antibody application and limited gene sequencing. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 125: 79–90.
26. Градобоева Е.А., Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Штрек С.В. К вопросу применения молекулярно-генетических методов в диагностике и эпидемиологическом расследовании случаев бешенства у людей. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии.* 2019; (37): 37–8.
27. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33(6): 542–6.
28. Leonova G.N., Somova L.M., Belikov S.I., Kondratov I.G., Plekhova N.G., Krylova N.V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: Tkachev S.E., ed. *Encephalitis. Croatia*. In Tech; 2012: 231–50. <https://doi.org/10.5772/52869>
29. Щербак Ю.Н. Вирусологические исследования по проблеме бешенства в Украинской ССР. В кн.: *Вирусы и вирусные заболевания*. Киев: Здоровье; 1984: 11–6.
30. Botvinkin A.D., Selnikova O.P., Antonova L.A., Moiseeva A.B., Nesterenko E.Yu. Human rabies case caused from a bat bite in Ukraine. *Rabies Bulletin Europe.* 2005; 29(3): 5–7.
31. Coertse J., Grobler C.S., Sabeta C.T., Seamark E., Kearney T., Paweska J.T., et al. Lyssaviruses in insectivorous bats, South Africa, 2003–2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3056–60. <https://doi.org/10.3201/eid2612.203592>
32. Grobler C.S., Coertse J., Markotter W. Complete genome sequence of Matlo bat lyssavirus. *Microbiol. Resour. Announc.* 2021; 10(20): e0024121. <https://doi.org/10.1128/MRA.00241-21>
33. Dean D.J., Ableseth M.K., Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: WHO; 1996: 88–93.
34. Koprowski H. The mouse inoculation test. Laboratory techniques in rabies. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: WHO; 1996: 80–6.
35. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: WHO; 1996. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38286>
36. Tordo N., Sacramento D., Bourhy H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies

- of rabies. In: Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H., eds. *Laboratory Techniques in Rabies*. Geneva: WHO; 1996: 157–74.
37. Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762–6. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2762-2766.1997>
 38. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut virus from a *Murina leucogaster* bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(3): e2097. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002097>
 39. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 40. Ботвинкин А.Д., Сидоров Г.Н. Природные очаги бешенства в РСФСР и на сопредельных территориях. В кн.: *Материалы 5 объединенного съезда гигиенистов, эпидемиологов, микробиологов, паразитологов и инфекционистов Казахстана*. Алма-Ата; 1991: 95–8.
 41. Chen T., Miao F.M., Liu Y., Zhang S.F., Zhang F., Li N., et al. Possible transmission of Irkut virus from dogs to humans. *Biomed. Environ. Sci.* 2018; 31(2): 146–8. <https://doi.org/10.3967/bes2018.017>
 42. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 2005; 111(1): 28–43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.008>
 43. Smith P.C., Lawhaswasdi K., Vick W.E., Stanton J.S. Isolation of rabies virus from fruit bats in Thailand. *Nature.* 1967; 216(5113): 384. <https://doi.org/10.1038/216384a0>
 44. Pal S.R., Arora B., Chhuttani P.N., Broor S., Choudhury S., Joshi R.M., et al. Rabies virus infection of a flying fox bat, *Pteropus poliocephalus* in Chandigarh, Northern India. *Trop. Geogr. Med.* 1980; 32(3): 2657.
 45. Hanlon C.A., Kuzmin I.V., Blanton J.D., Weldon W.C., Manangan J.S., Rupprecht C.E. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. *Virus Res.* 2005; 111(1): 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.009>
 46. Liu Y., Li N., Zhang S., Zhang F., Lian H., Wang Y., et al. Analysis of the complete genome of the first Irkut virus isolate from China: comparison across the Lyssavirus genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2013; 69(3): 687–93. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.07.008>
 47. Liu Y., Chen Q., Zhang F., Zhang S., Li N., Lian H., et al. Evaluation of rabies biologics against Irkut virus isolated in China. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3499–504. <https://doi.org/10.1128/JCM.01565-13>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-157>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Генотипирование вируса эпидемического паротита (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) как элемент лабораторного подтверждения инфекции

Рубальская Т.С.¹, Ерохов Д.В.¹, Жердева П.Е.¹, Милихина А.В.², Гаджиева А.А.², Тихонова Н.Т.¹

¹ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Дагестан», 367009, г. Махачкала, Россия

Введение. Эпидемический паротит (ЭП) – вирусное заболевание, имеющее высокую социальную значимость. Национальная программа «Элиминация кори и краснухи, достижение устойчивой спорадической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021–2025 гг.)» ставит цель постепенной интеграции надзора за ЭП в существующую систему надзора за корью и краснухой. Одним из ключевых компонентов надзора является лабораторное подтверждение случаев ЭП. В настоящее время существует два подхода к лабораторной верификации ЭП – серологический и молекулярно-генетический.

Цель работы – молекулярно-генетическая характеристика вирусов ЭП (ВЭП), циркулировавших в Российской Федерации в 2022 г.

Материалы и методы. Для исследования были взяты образцы соскоба с внутренней поверхности щеки у 11 больных ЭП. Вирусная РНК была выделена напрямую из образцов и использована в качестве матрицы для ОТ-ПЦР. Было проведено секвенирование ПЦР-продуктов по методу Сенгера, проведён филогенетический анализ в программе MEGA-X.

Результаты. У всех обследованных выявлен ВЭП, принадлежащий генотипу G. Филогенетический анализ показал наличие двух генотипов вируса – G-1 и G-2, существенно отличающихся от вирусов, циркулировавших в других странах.

Заключение. Выявление двух генетических групп ВЭП на ограниченной территории позволяет предполагать высокое генетическое разнообразие патогена.

Ключевые слова: вирус эпидемического паротита; генотип; секвенирование; филогенетический анализ.

Для цитирования: Рубальская Т.С., Ерохов Д.В., Жердева П.Е., Милихина А.В., Гаджиева А.А., Тихонова Н.Т. Генотипирование вируса эпидемического паротита (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) как элемент лабораторного подтверждения инфекции. 2023; 68(1): 59-65. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-157>

Для корреспонденции: Рубальская Татьяна Сергеевна, руководитель лаборатории прикладной иммунохимии, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия. E-mail: rubalskaia@gabrlich.ru

Участие авторов: Рубальская Т.С. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ерохов Д.В. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных; Жердева П.Е. – проведение экспериментов; Милихина А.В. – сбор материала для исследования; Гаджиева А.А. – сбор и анализ эпидемиологических данных; Тихонова Н.Т. – общее руководство, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Протокол № 56 от 10 февраля 2022 г.).

Поступила 01.01.2023

Принята в печать 20.02.2023

Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-157>

Mumps virus (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) genotyping as a component of laboratory confirmation of infection

Tatiana S. Rubalskaia¹, Denis V. Erokhov¹, Polina E. Zherdeva¹, Alina V. Milikhina², Aishat A. Gadzhieva², Nina T. Tikhonova¹

¹Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 125212, Moscow, Russia;

²Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Dagestan, 367009, Makhachkala, Russia

Introduction. Mumps is a viral infection of high social significance. National program «Elimination of measles and rubella and achievement of a stable sporadic incidence of epidemic mumps in the Russian Federation (2021–2025)» sets the aim of gradual integration of mumps surveillance into the existing measles and rubella surveillance system. One of the key components of surveillance system is a laboratory confirmation of mumps cases. There are two approaches for laboratory confirmation of mumps cases, based on serological or molecular genetic methods. The aim of the work is molecular genetic characteristic of the mumps viruses (MuVs) circulated in the Russian Federation in 2022.

Materials and methods. Samples of swabs from the inner surface of the cheek of 11 patients with mumps were collected for the study. Viral RNA was isolated directly from the samples. The isolated RNA was used as a matrix for RT-PCR. PCR products were sequenced using the Sanger method, and phylogenetic analysis was performed using the MEGA-X software.

Results. The MuV genotype G was detected in all samples. Phylogenetic analysis showed the presence of two virus genetic groups G-1 and G-2 that were significantly different from the viruses circulating in other countries.

Conclusion. The identification of two MuV genetic groups in a limited area suggests a high genetic diversity of the pathogen.

Keywords: *mumps virus; genotype; sequencing; phylogenetic analysis.*

For citation: Rubalskaia T.S., Erokhov D.V., Zherdeva P.E., Milikhina A.V., Gadzhieva A.A., Tikhonova N.T. Mumps virus (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*) genotyping as a component of laboratory confirmation of infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 59–65 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-157>

For correspondence: Rubalskaia T.S., Head of the Laboratory of Applied Immunochemistry, Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 125212, Moscow, Russia. E-mail: rubalskaia@gabrich.ru

Information about the authors:

Rubalskaia T.S., <https://orcid.org/0000-0003-0838-7353>

Erokhov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7163-7840>

Zherdeva P.E., <https://orcid.org/0000-0002-7635-4353>

Milikhina A.V., <https://orcid.org/0000-0002-4831-2922>

Gadzhieva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-1919-6483>

Tikhonova N.T., <https://orcid.org/0000-0002-8762-4355>

Contribution: Rubalskaia T.S. – the study concept and design, experiments conducting, data analysis and interpretation, text preparing; Erokhov D.V. – experiments conducting, data analysis and interpretation; Zherdeva P.E. – experiments conducting; Milikhina A.V. – samples collecting; Gadzhieva A.A. – epidemiological data collecting and analysis; Tikhonova N.T. – overall leadership, final article approval for publication.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Protocol No56 dated February 10 2022)

Received 01 January 2023

Accepted 20 February 2023

Published 28 February 2023

Введение

Эпидемический паротит (ЭП), вызываемый одним вирусом (ВЭП), является заболеванием, управляемым средствами специфической вакцинопрофилактики. Внедрение в практику здравоохранения

отечественной трёхвалентной вакцины для профилактики кори, краснухи и ЭП явилось одной из предпосылок для принятия в 2021 г. национальной программы «Элиминация кори и краснухи, дости-

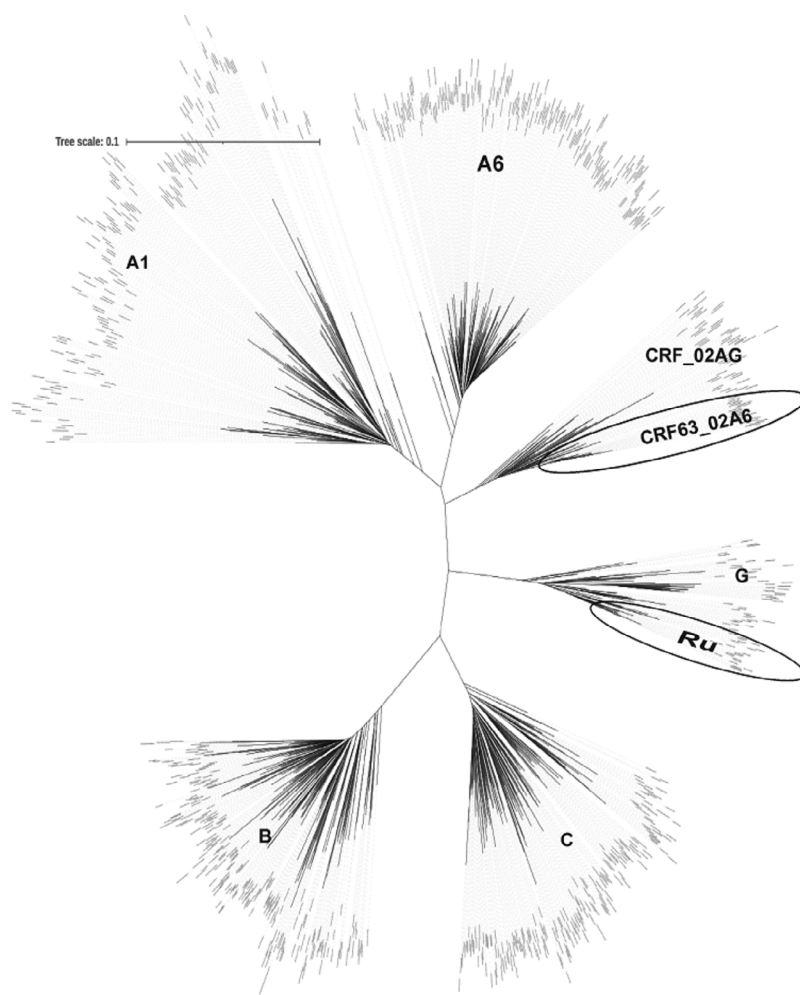


Рис. 3. Результаты филогенетического анализа фрагмента гена *gag*, кодирующего белок p24, методом максимального правдоподобия: A1 – кластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 суб-субтипа A1; A6 – кластер, преимущественно сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 суб-субтипа A6; CRF_02AG+CRF63_02A6 – кластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 рекомбинантных форм CRF_02AG и CRF63_02A6; CRF63_02A6 – подкластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF63_02A6; G – кластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 субтипа G; Ru – подкластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 субтипа C; B – кластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 субтипа B.

Fig. 3. Maximum-likelihood phylogeny of the fragment of gene *gag* encoding the p24 protein; A1 – the cluster formed by the nucleotide sequences of sub-subtype A1 HIV-1; A6 – the cluster mainly formed by the nucleotide sequences of sub-subtype A6 HIV-1; CRF_02AG + CRF63_02A6 – the cluster formed by the nucleotide sequences of HIV-1 recombinant forms – CRF_02AG and CRF63_02A6; CRF63_02A6 – the subcluster formed by nucleotide sequences of HIV-1 CRF63_02A6 recombinant form; G – the cluster formed by the nucleotide sequences of subtype G HIV-1; Ru – the subcluster formed by the nucleotide sequences of HIV-1 obtained from Russia; C – the cluster formed by the nucleotide sequences of subtype G HIV-1 subtype C; B – the cluster formed by the nucleotide sequences of subtype B HIV-1.

нительно только у суб-субтипа A6 полностью консервативными были 52 позиции АК, а только у субтипа B – 23, при этом было выявлено 29 мутаций со статистически значимыми различиями в частоте встречаемости в 24 позициях АК (табл. 3).

Сравнение профилей естественных полиморфизмов суб-субтипов A6 и A1 показало, что 93 из 231 позиции АК в белке p24 у обоих вариантов вируса были полностью консервативны. Дополнительно только у суб-субтипа A6 полностью консервативными были 39 позиции АК, а только у суб-субтипа A1 – 19, при этом было выявлено 29 мутаций со статистически значимыми различиями в частоте встречаемости в 25 позициях АК (табл. 4).

Анализ мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, в последовательностях, загруженных из базы данных Los Alamos, выявил 4 случая наличия мутаций лекарственной устойчивости T107S, из них три последовательности принадлежали субтипу G и одна – рекомбинантной форме CRF03_06B. Кроме этого, две последовательности содержали альтернативные замены в значимой T107 позиции АК: замена T107V была обнаружена в последовательности рекомбинантной формы CRF02_AG и замена T107A – в последовательности вируса субтипа G.

Таблица 2. Аминокислотные позиции в белке p24, в которых аминокислоты в консенсусных последовательностях вариантов ВИЧ 1, циркулирующих в России, отличались от аминокислот в референс-последовательности HXB2 (K03455), и аминокислоты в соответствующих позициях консенсусной последовательности субтипа В*

Table 2. Amino acid positions in p24, in which the amino acids of the consensus sequences of HIV-1 variants circulating in Russia differed from the amino acids in reference sequence HXB2 (K03455), and the amino acids in the corresponding positions of the consensus sequence of subtype B*

Регион	HXB2	A6	CRF63_02A6	CRF03_A6B	CRF02_AG	G	B
β-шпилька β-hairpin	I6	I6A	I6A	I6A	I6A	I6A	I6L
	V11	V11T	V11T	V11I	–	–	–
	A14	A14S	A14S	A14S	A14S	–	–
	I15	I15M	I15M	I15M	I15M	–	–
H1	V27	V27I	V27I	V27I	V27I	–	–
H2	S41	–	S41T	–	–	–	–
H3	T54	T54M	T54M	T54M	T54M	–	–
	T58	T58I	T58I	T58I	T58I	–	–
H4	E71	E71D	E71D	E71D	E71D	E71D	–
	T72	–	–	–	–	T72A	–
	V83	V83L	V83T	V83L	–	V83L	V83L
СурА-связывающая петля СурА binding loop	V86	V86A	–	V86A	–	V86P	–
	H87	H87Q	–	H87Q	–	H87Q	–
	I91	I91F	I91N	I91F	–	–	–
	A92	A92P	A92P	A92P	A92P	–	–
H6	G116	–	–	–	–	G116T	–
	N120	N120S	–	N120S	N120S	N120S	–
H7	E128	E128D	–	E128D	–	–	–
	I135	–	I135V	–	I135V	–	–
	L136	–	–	–	–	L136M	–
IDR	T148	T148V	T148V	T148V	T148V	T148V	–
MHR	R154	–	R154K	–	–	R154K/R	–
	Y169	Y169F	Y169F	Y169F	Y169F	Y169F	–
	S178	S178T	S178T	S178T	S178T	S178T	–
H9	E180	E180D	–	E180D	–	–	–
	N183	–	–	–	–	N183G	–
	E187	–	–	–	–	E187D	–
H10	T200	–	T200S	–	T200S	–	–
	K203	K203R	K203R	K203R	K203R	K203R	–
	A208	A208G	A208G	A208G	A208G	A208G	–
	G225	–	–	–	–	G225S	–

Примечание. *Прочерк – аминокислота соответствует аминокислоте в референс-последовательности HXB2 (K03455).

Note. *Dash means that the amino acid corresponds to amino acid in the reference sequence HXB2 (K03455).

При исследовании клинических образцов, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов, субтип-специфичность вирусов, указанная в табл. 1, подтверждалась анализом полученных нуклеотидных последовательностей области гена *gag*, кодирующей белок p24, с применением программы COMET-1 [49] и онлайн программы определения рекомбинантных форм RIP (RIP 3.0 submission form (lanl.gov)). Мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 к ленакапавиру в клинических образцах обнаружено не было.

Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank под регистрационными номерами OP726083 – OP726112.

Обсуждение

В экономически развитых странах Европы, США и Австралии, где генотипирование ВИЧ широко используется в рутинной практике, а в последнее время активно применяются и методы полногеномного секвенирования, наиболее распространён субтип В,

Таблица 3. Частота встречаемости мутаций (единичных замен) в белке p24 вариантов ВИЧ-1 суб-субтипов А6 и субтипа В, %
Table 3. Frequency of mutations (single substitutions) in p24 variants of sub-subtype A6 and subtype B HIV-1, %

Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency		Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency		Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency	
	A6	B		A6	B		A6	B
I6A	99,5	0	T54M	95,5	0	T148V	88,5	20,1
I6L	0	76	T58I	96	0	R154K	17	28,4
V11T	38	0	E71D	99	2,2	Y169F	100	0
V11I	20	0,4	V83L	75	86,5	S178T	98	11,8
A14S	82	0,9	V86A	81,5	6,1	E180D	67	30,6
A14P	7	29,3	H87Q	100	24,9	K203R	89	0,4
I15M	64	2,6	I91F	82	0	P207S	26,5	0
I15L	6,5	27,9	I91V	1,5	24,5	A208G	97	21
V27I	100	28,8	A92P	97,5	6,1	G225S	13	22,7
S41T	31	18,3	N120S	80,5	24,5	–	–	–

Примечание. Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2. Жирным шрифтом выделены позиции, в которых замены у суб-субтипа А6 встречались более чем в 80%, при этом у субтипа В обнаружены не были.

Note. Mutations were defined as substitutions in the indicated positions in comparison with the reference strain HXB2. The positions in which substitutions in the A6 subtype were found in more than 80%, while absent in the subtype B, are shown in bold.

Таблица 4. Частота встречаемости мутаций (единичных замен) в белке p24 вариантов суб-субтипов А6 и А1 ВИЧ-1, %
Table 4. Frequency of mutations (single substitutions) in p24 variants sub-subtypes A6 and A1 HIV-1, %

Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency		Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency		Мутация Mutation	Частота встречаемости Frequency	
	A6	A1		A6	A1		A6	A1
V11T	38	5	V83L	75	88,3	T148V	88,5	95,6
V11I	20	61,7	V86A	81,5	6,7	R154K	17	91,1
A14S	82	30,6	H87Q	100	25	S178T	98	85,6
A14N	0	26,1	I91F	82	2,2	E180D	67	26,1
I15M	64	7,8	A92P	97,5	81,1	N183G	0	66,1
I15L	6,5	71,1	L111P	0	76,7	T200S	8	80
V27I	100	94,4	I115L	0	21,7	K203R	89	79,4
A31G	5	26,1	N120S	80,5	48,9	P207T	2	36,7
S41T	31	3,9	N120G	5,5	39,4	G225S	13	26,7
T54M	95,5	83,3	E128D	77,5	89,4	–	–	–

Примечание. Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2. Жирным шрифтом выделены позиции, в которых замены у суб-субтипа А6 встречались в 4 и более раза чаще.

Note. Mutations were defined as substitutions in the indicated positions in comparison with the reference strain HXB2. The positions in which substitutions in the A6 subtype were found ≥ 4 times more often are shown in bold.

поэтому именно он в настоящее время является наиболее широко изученным вариантом [6, 7]. Молекулярная эпидемиология ВИЧ-инфекции в России имеет уникальный характер, однако генотипирование ВИЧ-1 на настоящий момент не является обязательным [4] и проводится, как правило, только по гену *pol*, который кодирует основные белки-мишени антиретровирусной терапии. Полногеномное секвенирование в небольших масштабах могут себе позволить лишь единичные лаборатории в рамках выполнения научных проектов. Таким образом, фрагменты генома за пределами гена *pol* у вариантов ВИЧ, циркулирующих в России, остаются малоизученными. Вместе с тем в мире активно

продолжается разработка новых антиретровирусных препаратов [33, 50, 51] и терапевтических вакцин [36, 37, 52, 53], нацеленных на альтернативные белки-мишени ВИЧ, в том числе на капсидный белок p24 [33, 36, 37]. Эта работа была посвящена изучению особенностей капсидного белка p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории России.

В результате филогенетического анализа было сформировано 6 кластеров – A1, A6, CRF02_AG + CRF63_02A6, G, B и C (**рис. 1**), что свидетельствует о существующей гетерогенности фрагмента гена *gag*, кодирующего белок p24, между различными вариантами ВИЧ-1 и о наличии отличий у вариантов ВИЧ-1,

циркулирующих в России (суб-субтипа А6, рекомбинантных форм CRF63_02A6, CRF_03AB, CRF02_AG и субтипа G), от наиболее изученного субтипа В.

Последовательности рекомбинантной формы CRF_03AB сгруппировались с последовательностями субтипа А6, так как CRF_03AB является продуктом рекомбинации суб-субтипа А6 и субтипа В и в области гена *gag* CRF_03AB соответствует суб-субтипу А6 [54].

Из 22 последовательностей рекомбинантной формы CRF63_02A6 20 сформировали общий кластер с последовательностями CRF02_AG, так как CRF63_02A6 являются продуктом рекомбинации CRF02_AG и субтипа А6 [55]. Тем не менее последовательности CRF63_02A6 сформировали отдельный подкластер в кластере CRF02_AG+CRF63_02A6, что свидетельствует о наличии некоторых особенностей в области гена *gag*, кодирующей белок р24, отличающих CRF63_02A6 от CRF02_AG.

В кластере G 24 из 25 последовательностей, полученных от пациентов из России, сформировали кладу. Дополнительный анализ данных литературы показал, что эти последовательности были получены от пациентов, инфицированных во время нозокомиальной вспышки в 1988–1990 гг. на юге России [14, 56].

В консенсусных последовательностях вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории РФ, были обнаружены замены АК в 31-й позиции относительно референсной последовательности HXB2 и консенсусной последовательности субтипа В (табл. 2). При этом замены были выявлены практически во всех участках р24, за исключением Н5, Н8 и Н11, что согласуется с данными о том, что наиболее консервативными структурами в группе М ВИЧ-1 являются области Н5 и Н8 [34]. Наибольшее число замен обнаружено в области СурА-связывающей петли, тогда как в регионе МНР были найдены замены только в двух сайтах – 154 и 169. В целом консенсусные последовательности белка р24 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории РФ, содержали как общие замены, так и отличия, количество и качество которых менялись в зависимости от варианта вируса, при этом каждый вариант вируса имел уникальный профиль замен.

При сравнении профилей полиморфизмов суб-субтипа А6 и субтипа В, суб-субтипов А6 и А1 были определены достоверные статистически значимые отличия, которые свидетельствуют о наличии индивидуальных особенностей в профиле полиморфизма суб-субтипа А6 и генетическом разнообразии белка р24 внутри субтипа А.

Отдельно следует отметить три мутации (V86A, H87Q, I91F), которые у суб-субтипа А6 выявлялись более чем в 80% случаев, и в 4 и более раза чаще, чем у субтипа В и суб-субтипа А1 (табл. 3 и 4), вследствие чего их можно обозначить в качестве характеристических замен для суб-субтипа А6. Мутации V86A, H87Q, I91F располагаются в области СурА-связывающей петли, которая отвечает за взаимодействие р24 с клеточным белком циклофилином А, предотвращающим ограничение репликации ВИЧ-1 путём блокировки клеточного фактора TRIM5α [34, 57]. При этом ранее

было показано, что замена H87Q снижает эффективность связывания р24 с циклофилином А [41].

Также дополнительно необходимо выделить замену в 92-м положении – A92P, которая встречалась у суб-субтипов А6 и А1 в 97,5 и 81,1% случаев соответственно, в то время как у субтипа В – лишь в 6,1% случаев. Ранее было показано, что замена A92E влияет на репликацию вируса [41]. Хотя данных о значимости мутации A92P пока нет, эту замену следует отметить для дальнейшего изучения.

При исследовании наличия мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у вариантов ВИЧ, циркулирующих в России, в последовательностях, загруженных из базы данных Los Alamos, в одной из 7 последовательностей рекомбинантной формы CRF03_A6B и в трёх из 25 последовательностей субтипа G была обнаружена мутация T107S. Последовательности ВИЧ-1 субтипа G, согласно приложенным к ним описаниям, были получены от разных пациентов, хотя и инфицированных в результате одной нозокомиальной вспышки [56]. Наличие единичной мутации T107S не приводит к развитию лекарственной устойчивости к ленакапавиру, необходимо сочетание с мутацией Q67H [44], однако неизвестно, может ли под воздействием ленакапавира наличие T107S ускорить возникновение мутации Q67H. Кроме того, обращает на себя внимание выявление T107S у CRF03_AB в одной из 7 последовательностей (14,3%), а у субтипа G – в трёх из 25 (12%). Небольшая выборка последовательностей не позволяет определить частоту встречаемости T107S у этих вариантов ВИЧ-1, тем не менее полученный результат может способствовать дальнейшему исследованию распространённости мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у рекомбинантной формы CRF03_A6B и вариантов ВИЧ-1 субтипа G, циркулирующих на территории РФ.

В клинических образцах, полученных от пациентов, мутации лекарственной устойчивости к ленакапавиру обнаружены не были. В целом результаты анализа свидетельствуют о низкой вероятности предсуществования мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, что согласуется с общемировыми данными [34, 46].

Заключение

В результате проведённого исследования обозначены особенности белка р24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории России. Для наиболее широко распространённого в России суб-субтипа А6 определены характеристические замены и обозначены достоверные отличия естественных полиморфизмов от наиболее близкого ему суб-субтипа А1 и наиболее хорошо изученного субтипа В. Полученные данные смогут быть учтены при разработке антиретровирусных препаратов и терапевтических вакцин на основе белка р24 в будущем. Показано, что предсуществование мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у всех вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории РФ, маловероятно. Прогноз применения ленакапавира в будущем в России в целом благоприятный.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. *Lancet HIV*. 2017; 4(8): e349–56. [https://doi.org/10.1016/s2352-3018\(17\)30066-8](https://doi.org/10.1016/s2352-3018(17)30066-8)
2. Ryom L., Cotter A., De Miguel R., Béguelin C., Podlekareva D., Arribas J.R., et al. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines for treatment of people living with HIV version 10.0. *HIV Med*. 2020; 21(10): 617–24. <https://doi.org/10.1111/hiv.12878>
3. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services. Available at: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv>
4. Министерство здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. ВИЧ-инфекция у взрослых; 2020. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/79_1
5. Cilento M.E., Kirby K.A., Sarafianos S.G. Avoiding drug resistance in HIV reverse transcriptase. *Chem. Rev*. 2021; 121(6): 3271–96. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00967>
6. Hemelaar J., Elangovan R., Yun J., Dickson-Tetteh L., Fleminger I., Kirtley S., et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis*. 2019; 19(2): 143–55. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30647-9)
7. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2019; 14(3): 153–60. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000534>
8. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
9. Wainberg M.A., Brenner B.G. The impact of HIV genetic polymorphisms and subtype differences on the occurrence of resistance to antiretroviral drugs. *Mol. Biol. Int*. 2012; 2012: 256982. <https://doi.org/10.1155/2012/256982>
10. Udeze A.O., Olaleye D.O., Odaibo G.N. Polymorphisms and drug resistance analysis of HIV-1 isolates from patients on first line antiretroviral therapy (ART) in South-eastern Nigeria. *PLoS One*. 2020; 15(4): e0231031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231031>
11. Sun Z., Ouyang J., Zhao B., An M., Wang L., Ding H., et al. Natural polymorphisms in HIV-1 CRF01_AE strain and profile of acquired drug resistance mutations in a long-term combination treatment cohort in northeastern China. *BMC Infect. Dis*. 2020; 20(1): 178. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4808-3>
12. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017; (11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49>
13. Lebedev A., Lebedeva N., Moskaleychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
14. Murzakova A., Kireev D., Baryshev P., Lopatukhin A., Serova E., Shemshura A., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype G in the Russian Federation. *Viruses*. 2019; 11(4): 348. <https://doi.org/10.3390/v11040348>
15. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol*. 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
16. Ожмегова Е.Н., Антонова А.А., Лебедев А.В., Мельникова Т.Н., Крылова Т.В., Казачек А.В. и др. Генетический профиль ВИЧ-1 в Вологодской области: доминирование CRF03_AB и быстрое распространение URFs. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2020; 12(2): 79–88. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-2-79-88>
17. Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumaev D., Vasilyev A., et al. HIV-1 genetic variants in the Russian Far East. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(8): 742–52. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0194>
18. Maksimenko L.V., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Astakhova E.M., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., et al. Genetic diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: Area with high levels of HIV-1 recombination in Russia. *Biomed. Res. Int*. 2020; 2020: 9057541. <https://doi.org/10.1155/2020/9057541>
19. Туманов А.С., Казеннова Е.В., Громов К.Б., Ломакина Е.А., Зогула Е.Ю., Берснев П.Г. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ ВИЧ-инфекции в Сахалинской области. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2017; 9(3): 113–20. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-3-113-120>
20. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., et al. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2015; 31(4): 456–60. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0375>
21. Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernández-García A., Vega Y., Karpenko L.I., et al. Short communication: Molecular epidemiology, phylogeny, and phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(9): 912–9. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0075>
22. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0196>
23. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена pol варианта ВИЧ 1 IDU А. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(4): 44–51.
24. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D.A.M.C., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses*. 2020; 12(8): 838. <https://doi.org/10.3390/v12080838>
25. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Прогноз эффективности применения препарата Бевиримат в России. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 37–41.
26. Васильев А.В., Ахмеров К.Р., Саламов Г.Г., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ полиморфизма области генома ВИЧ-1, кодирующей белок слияния. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(4): 9–13.
27. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ распространенности мутаций лекарственной устойчивости к препаратам – антагонистам корцептора CCR5 среди вариантов ВИЧ-1 в России. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3): 32–7.
28. Громов К.Б., Киреев Д.Е., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae), циркулирующих в странах бывшего СССР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>
29. Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В. и др. Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 452–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>
30. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Asachop E.L., Oliveira M., McCallum M., Schader S.M., et al. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase and their interactions with the M184I mutation on defining patterns of resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors rilpivirine and etravirine. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013; 57(7): 3100–9. <https://doi.org/10.1128/aac.00348-13>
31. Maldonado J.O., Mansky L.M. The HIV-1 Reverse transcriptase A62V mutation influences replication fidelity and viral fitness in the context of multi-drug-resistant mutations. *Viruses*. 2018; 10(7): 376. <https://doi.org/10.3390/v10070376>
32. Garrido C., Villacian J., Zahonero N., Pattery T., Garcia F., Gutierrez F., et al. Broad phenotypic cross-resistance to elvitegravir in HIV-infected patients failing on raltegravir-containing regimens. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012; 56(6): 2873–8. <https://doi.org/10.1128/aac.06170-11>
33. McFadden W.M., Snyder A.A., Kirby K.A., Tedbury P.R., Raj M., Wang Z., et al. Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core. *Retrovirology*. 2021; 18(1): 41. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00583-z>
34. Troyano-Hernández P., Reinoso R., Holguín Á. HIV capsid protein genetic diversity across HIV-1 variants and impact on new capsid-inhibitor lenacapavir. *Front. Microbiol*. 2022; 13: 854974. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854974>
35. Gray E.R., Bain R., Varsaneux O., Peeling R.W., Stevens M.M., McKendry R.A. p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis. *AIDS*. 2018; 32(15): 2089–102. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000001982>
36. Larjani M.S., Sadat S.M., Bolhassani A., Khodaie A., Pouriaeyevali M.H., Ramezani A. HIV-1 p24-nef DNA vaccine plus protein boost expands T-Cell responses in BALB/c. *Curr. Drug Deliv*. 2021; 18(7): 1014–21. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210101113601>
37. Sadat Larjani M., Ramezani A., Mashhadi Abolghasem Shirazi M., Bolhassani A., Pouriaeyevali M.H., Shahbazi S., et al. Evaluation of transduced dendritic cells expressing HIV-1 p24-Nef antigens in HIV-specific cytotoxic T cells induction as a therapeutic candidate vaccine. *Viruses Res*. 2021; 298: 198403. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198403>
38. Novikova M., Zhang Y., Freed E.O., Peng K. Multiple roles of HIV-1 capsid during the virus replication cycle. *Virol. Sin*. 2019; 34(2): 119–34. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00095-3>

39. Rihn S.J., Wilson S.J., Loman N.J., Alim M., Bakker S.E., Bhella D., et al. Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog.* 2013; 9(6): e1003461. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003461>
40. Braaten D., Luban J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J.* 2001; 20(6): 1300–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1300>
41. Saito A., Yamashita M. HIV-1 capsid variability: viral exploitation and evasion of capsid-binding molecules. *Retrovirology.* 2021; 18(1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00577-x>
42. Dvory-Sobol H., Shaik N., Callebaut C., Rhee M.S. Lenacapavir: a first-in-class HIV-1 capsid inhibitor. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2022; 17(1): 15–21. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000713>
43. Gilead. Pipeline Gilead – 2022. Available at: <https://www.gilead.com/science-and-medicine/pipeline>
44. Link J.O., Rhee M.S., Tse W.C., Zheng J., Somoza J.R., Rowe W., et al. Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature.* 2020; 584(7822): 614–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2443-1>
45. Yant S.R., Mulato A., Hansen D., Thielen A., Schroeder S.D. In vitro resistance profile of GS-6207, a first-in-class picomolar HIV capsid inhibitor in clinical development as a novel long-acting antiretroviral agent. In: *Tenth IAS Conference on HIV Science.* Mexico City; 2019.
46. Marcelin A.G., Charpentier C., Jary A., Perrier M., Margot N., Callebaut C., et al. Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naïve and -experienced patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020; 75(6): 1588–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa060>
47. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
48. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.* 1988; 16(3): 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
49. Struck D., Lawyer G., Ternes A.M., Schmit J.C., Bercoff D.P. COM-ET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic. Acids Res.* 2014; 42(18): e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku739>
50. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong in vivo inhibition of HIV-1 replication by nullbasic, a Tat mutant. *mBio.* 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01769-19>
51. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
52. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-Year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
53. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cART interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology.* 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>
54. Liitsola K., Holm K., Bobkov A., Pokrovsky V., Smolskaya T., Leinikki P., et al. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000; 16(11): 1047–53. <https://doi.org/10.1089/08892220050075309>
55. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0196>
56. Knops E., Däumer M., Awerkiew S., Kartashev V., Schülter E., Kutsev S., et al. Evolution of protease inhibitor resistance in the gag and pol genes of HIV subtype G isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(7): 1472–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq129>
57. Selyutina A., Persaud M., Simons L.M., Bulnes-Ramos A., Buffone C., Martinez-Lopez A., et al. Cyclophilin A prevents HIV-1 restriction in lymphocytes by blocking human TRIM5 α binding to the viral core. *Cell Rep.* 2020; 30(11): 3766–77.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.100>
2. Ryom L., Cotter A., De Miguel R., Béguelin C., Podlekareva D., Arribas J.R., et al. 2019 update of the European AIDS Clinical Society Guidelines for treatment of people living with HIV version 10.0. *HIV Med.* 2020; 21(10): 617–24. <https://doi.org/10.1111/hiv.12878>
3. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Department of Health and Human Services. Available at: <https://clinicalinfo.hiv.gov/en/guidelines/adult-and-adolescent-arv>
4. Ministry of Health of the Russian Federation. Clinical recommendations. HIV infection in adults; 2020. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/79_1 (in Russian)
5. Cileto M.E., Kirby K.A., Sarafianos S.G. Avoiding drug resistance in HIV reverse transcriptase. *Chem. Rev.* 2021; 121(6): 3271–96. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00967>
6. Hemelaar J., Elangovan R., Yun J., Dickson-Tetteh L., Fleminger I., Kirtley S., et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(2): 143–55. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30647-9)
7. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2019; 14(3): 153–60. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000534>
8. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
9. Wainberg M.A., Brenner B.G. The impact of HIV genetic polymorphisms and subtype differences on the occurrence of resistance to antiretroviral drugs. *Mol. Biol. Int.* 2012; 2012: 256982. <https://doi.org/10.1155/2012/256982>
10. Udeze A.O., Olaleye D.O., Odaibo G.N. Polymorphisms and drug resistance analysis of HIV-1 isolates from patients on first line antiretroviral therapy (ART) in South-eastern Nigeria. *PLoS One.* 2020; 15(4): e0231031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231031>
11. Sun Z., Ouyang J., Zhao B., An M., Wang L., Ding H., et al. Natural polymorphisms in HIV-1 CRF01_AE strain and profile of acquired drug resistance mutations in a long-term combination treatment cohort in northeastern China. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 178. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4808-3>
12. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Terapevticheskiiy arkhiv.* 2017; (11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> (in Russian)
13. Lebedev A., Lebedeva N., Moskaleychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow region, Russia: Phylogenetics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
14. Murzakova A., Kireev D., Baryshev P., Lopatukhin A., Serova E., Shemshura A., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype G in the Russian Federation. *Viruses.* 2019; 11(4): 348. <https://doi.org/10.3390/v11040348>
15. Bobkov A.F., Kazennova E.V., Selimova L.M., Khanina T.A., Ryabov G.S., Bobkova M.R., et al. Temporal trends in the HIV-1 epidemic in Russia: predominance of subtype A. *J. Med. Virol.* 2004; 74(2): 191–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20177>
16. Ozhmegova E.N., Antonova A.A., Lebedev A.V., Mel'nikova T.N., Krylova T.V., Kazachek A.V., et al. Genetic profile of HIV-1 in the Volgoda region: domination of CRF03_AB and rapid distribution of URF5. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2020; 12(2): 79–88. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-2-79-88> (in Russian)
17. Kazennova E., Laga V., Lapovok I., Glushchenko N., Neshumayev D., Vasilyev A., et al. HIV-1 genetic variants in the Russian Far East. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2014; 30(8): 742–52. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0194>
18. Maksimenko L.V., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Astakhova E.M., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., et al. Genetic diversity of HIV-1 in Krasnoyarsk Krai: Area with high levels of HIV-1 recombination in Russia. *Biomed. Res. Int.* 2020; 2020: 9057541. <https://doi.org/10.1155/2020/9057541>
19. Tumanov A.S., Kazennova E.V., Gromov K.B., Lomakina E.A., Zozulya E.Yu., Bersenev P.G., et al. The molecular epidemiological analysis of HIV infection in Sakhalin region, Russia. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2017; 9(3): 113–20. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2017-9-3-113-120> (in Russian)
20. Gashnikova N.M., Bogachev V.V., Baryshev P.B., Totmenin A.V., Gashnikova M.P., Kazachinskaya A.G., et al. A rapid expansion of HIV-1 CRF63_02A1 among newly diagnosed HIV-infected individuals in the Tomsk Region, Russia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2015; 31(4): 456–60. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0375>
21. Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernández-García A., Vega Y., Karpenko L.I., et al. Short communica-

REFERENCES

1. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Survival of HIV-positive patients starting antiretroviral therapy between 1996 and 2013: a collaborative analysis of cohort studies. *Lancet HIV.* 2017; 4(8): e349–56. [https://doi.org/10.1016/s2352-3018\(17\)30066-8](https://doi.org/10.1016/s2352-3018(17)30066-8)

- tion: Molecular epidemiology, phylogeny, and phylodynamics of CRF63_02A1, a recently originated HIV-1 circulating recombinant form spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(9): 912–9. <https://doi.org/10.1089/aid.2014.0075>
22. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0196>
23. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant pol gene. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(4): 44–51. (in Russian)
24. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D.A.M.C., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses*. 2020; 12(8): 838. <https://doi.org/10.3390/v12080838>
25. Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. The forecast of the effectiveness of the drug Bevirimat in Russia. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 37–41. (in Russian)
26. Vasil'ev A.V., Akhmerov K.R., Salamov G.G., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Analysis of the polymorphism of the genome region of HIV-1 encoding the fusion protein. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(4): 9–13. (in Russian)
27. Vasil'ev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Analysis of the prevalence of drug resistance mutations to drugs belonging to the class of CCR5 co-receptor antagonists among HIV-1 variants in Russia. *Voprosy virusologii*. 2011; (3): 32–7. (in Russian)
28. Gromov K.B., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Analysis of HIV-1 (human immunodeficiency VIRUS-1, lentivirus, orthoretrovirinae, retroviridae) NEF protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290> (in Russian)
29. Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., et al. Analysis of tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 SUB-SUBTYPE A6 (retroviridae: orthoretrovirinae: lentivirus: human immunodeficiency VIRUS-1). *Voprosy virusologii*. 2021; 66(6): 452–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83> (in Russian)
30. Xu H.T., Colby-Germinario S.P., Asahchop E.L., Oliveira M., McCallum M., Schader S.M., et al. Effect of mutations at position E138 in HIV-1 reverse transcriptase and their interactions with the M184I mutation on defining patterns of resistance to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors rilpivirine and etravirine. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013; 57(7): 3100–9. <https://doi.org/10.1128/aac.00348-13>
31. Maldonado J.O., Mansky L.M. The HIV-1 Reverse transcriptase A62V mutation influences replication fidelity and viral fitness in the context of multi-drug-resistant mutations. *Viruses*. 2018; 10(7): 376. <https://doi.org/10.3390/v10070376>
32. Garrido C., Villacian J., Zahonero N., Pattery T., Garcia F., Gutierrez F., et al. Broad phenotypic cross-resistance to elvitegravir in HIV-infected patients failing on raltegravir-containing regimens. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012; 56(6): 2873–8. <https://doi.org/10.1128/aac.06170-11>
33. McFadden W.M., Snyder A.A., Kirby K.A., Tedbury P.R., Raj M., Wang Z., et al. Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core. *Retrovirology*. 2021; 18(1): 41. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00583-z>
34. Troyano-Hernández P., Reinoso R., Holguín Á. HIV capsid protein genetic diversity across HIV-1 variants and impact on new capsid-inhibitor lenacapavir. *Front. Microbiol*. 2022; 13: 854974. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854974>
35. Gray E.R., Bain R., Varsaneux O., Peeling R.W., Stevens M.M., McKendry R.A. p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis. *AIDS*. 2018; 32(15): 2089–102. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000001982>
36. Larijani M.S., Sadat S.M., Bolhassani A., Khodaie A., Pouriayevali M.H., Ramezani A. HIV-1 p24-nef DNA vaccine plus protein boost expands T-Cell responses in BALB/c. *Curr. Drug Deliv*. 2021; 18(7): 1014–21. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210101113601>
37. Sadat Larijani M., Ramezani A., Mashhadi Abolghasem Shirazi M., Bolhassani A., Pouriayevali M.H., Shahbazi S., et al. Evaluation of transduced dendritic cells expressing HIV-1 p24-Nef antigens in HIV-specific cytotoxic T cells induction as a therapeutic candidate vaccine. *Viruses*. 2021; 298: 198403. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198403>
38. Novikova M., Zhang Y., Freed E.O., Peng K. Multiple roles of HIV-1 capsid during the virus replication cycle. *Virol. Sin*. 2019; 34(2): 119–34. <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00095-3>
39. Rihn S.J., Wilson S.J., Loman N.J., Alim M., Bakker S.E., Bhella D., et al. Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog*. 2013; 9(6): e1003461. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003461>
40. Braaten D., Luban J. Cyclophilin A regulates HIV-1 infectivity, as demonstrated by gene targeting in human T cells. *EMBO J*. 2001; 20(6): 1300–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.6.1300>
41. Saito A., Yamashita M. HIV-1 capsid variability: viral exploitation and evasion of capsid-binding molecules. *Retrovirology*. 2021; 18(1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00577-x>
42. Dvory-Sobol H., Shaik N., Callebaut C., Rhee M.S. Lenacapavir: a first-in-class HIV-1 capsid inhibitor. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2022; 17(1): 15–21. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000713>
43. Gilead. Pipeline Gilead – 2022. Available at: <https://www.gilead.com/science-and-medicine/pipeline>
44. Link J.O., Rhee M.S., Tse W.C., Zheng J., Somoza J.R., Rowe W., et al. Clinical targeting of HIV capsid protein with a long-acting small molecule. *Nature*. 2020; 584(7822): 614–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2443-1>
45. Yant S.R., Mulato A., Hansen D., Thielen A., Schroeder S.D. In vitro resistance profile of GS-6207, a first-in-class picomolar HIV capsid inhibitor in clinical development as a novel long-acting antiretroviral agent. In: *Tenth IAS Conference on HIV Science*. Mexico City; 2019.
46. Marcelin A.G., Charpentier C., Jary A., Perrier M., Margot N., Callebaut C., et al. Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naïve and -experienced patients. *J. Antimicrob. Chemother*. 2020; 75(6): 1588–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa060>
47. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol*. 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
48. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res*. 1988; 16(3): 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
49. Struck D., Lawyer G., Ternes A.M., Schmit J.C., Bercoff D.P. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic. Acids Res*. 2014; 42(18): e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku739>
50. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong in vivo inhibition of HIV-1 replication by nullbasic, a Tat mutant. *mbio*. 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01769-19>
51. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog*. 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
52. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-Year follow-up study. *Front. Immunol*. 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
53. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cART interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology*. 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>
54. Liitsola K., Holm K., Bobkov A., Pokrovsky V., Smolskaya T., Leinikki P., et al. An AB recombinant and its parental HIV type 1 strains in the area of the former Soviet Union: low requirements for sequence identity in recombination. UNAIDS Virus Isolation Network. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2000; 16(11): 1047–53. <https://doi.org/10.1089/08892220050075309>
55. Baryshev P.B., Bogachev V.V., Gashnikova N.M. HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2014; 30(6): 592–7. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0196>
56. Knops E., Däumer M., Awerkiew S., Kartashev V., Schülter E., Kutsev S., et al. Evolution of protease inhibitor resistance in the gag and pol genes of HIV subtype G isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 2010; 65(7): 1472–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq129>
57. Selyutina A., Persaud M., Simons L.M., Bulnes-Ramos A., Buffone C., Martinez-Lopez A., et al. Cyclophilin A prevents HIV-1 restriction in lymphocytes by blocking human TRIM5a binding to the viral core. *Cell Rep*. 2020; 30(11): 3766–77.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.100>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-165>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Хантавирусы (Hantaviridae: *Orthohantavirus*), циркулирующие среди насекомых на Дальнем Востоке России

Яшина Л.Н.¹, Иванов Л.И.², Компанец Г.Г.³, Здановская Н.И.², Карташов М.Ю.¹¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;²ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора, 680031, г. Хабаровск, Россия;³ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», 690950, г. Владивосток, Россия

Введение. Насекомоядные являются новым природным резервуаром хантавирусов (*Hantaviridae*), широко распространённых по всему миру. Четыре вида хантавирусов, ассоциированных с буроzubками, выявлены в двух регионах Дальнего Востока РФ: два генетических варианта вируса Seewis (SWSV), вирусы Lena River (LENV), Kenkeme (KKMV) и Yakeshi (YKSV).

Цель работы – исследование географического распространения хантавирусов среди буроzubок рода *Sorex* в южной части Дальнего Востока.

Материалы и методы. Образцы лёгочной ткани буроzubок, отловленных в четырёх административных регионах Дальнего Востока, исследовали на присутствие РНК хантавирусов в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Филогенетический анализ полученных последовательностей вирусного генома проводили с использованием программы MEGA-X.

Результаты. Установлена циркуляция хантавирусов в буроzubках рода *Sorex* в Еврейской автономной области, Хабаровском, Приморском краях и в Сахалинской области. На острове Сахалин нами был обнаружен новый генетический вариант вируса YKSV и его новый природный носитель – когтистая буроzubка (*S. ungiuculatus*). Показано, что вариант ARTV-Sc вируса SWSV циркулирует на побережье Хабаровского и Приморского краёв среди *S. caecutiens*. Вирусы KKMV и SWSV (вариант ARTV-St) обнаружены в Еврейской автономной области среди *S. roboratus* и *S. tundrensis* соответственно.

Заключение. Установлено распространение хантавирусов в буроzubках рода *Sorex* на всей исследованной территории Дальнего Востока России. Полученные результаты свидетельствуют о коэволюции хантавирусов SWSV, KKMV и YKSV с их природными носителями в ареалах их обитания.

Ключевые слова: хантавирус; насекомоядные; буроzubка; филогенетический анализ

Для цитирования: Яшина Л.Н., Иванов Л.И., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Карташов М.Ю. Хантавирусы (*Hantaviridae: Orthohantavirus*), циркулирующие среди насекомых на Дальнем Востоке России. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 79-85. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-165>

Для корреспонденции: Яшина Людмила Николаевна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: yashina@vector.nsc.ru

Участие авторов: Яшина Л.Н. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Иванов Л.И. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Карташов М.Ю. – проведение экспериментов.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 2010, July 23). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» (протокол № 1 от 01.04.2011).

Поступила 08.01.2023

Принята в печать 17.02.2023

Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-165>

Shrew-borne hantaviruses (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) in the Far East of Russia

Liudmila N. Yashina¹, Leonid I. Ivanov², Nina I. Zdanovskaya², Galina G. Kompanets³, Mikhail Yu. Kartashov¹¹State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia;²Khabarovsk Antiplague Station of Rospotrebnadzor, 680031, Khabarovsk, Russia;³Far Eastern Federal University, 690950, Vladivostok, Russia

Introduction. Insectivores are newly recognized hantaviral reservoir worldwide. Four distinct shrew-borne hantaviruses (family *Hantaviridae*) have been identified in two regions located in southern and northern part of the Russian Far East, two genetic variants of Seewis virus (SWSV), Lena River virus (LENV), Kenkeme virus (KKMV) and Yakeshi virus (YKSV). Here, we describe geographic distribution of shrew-borne hantaviruses in southern part of the Russian Far East: Jewish Autonomous region, Khabarovsk Krai, Primorsky Krai and Sakhalin region.

Materials and methods. Lung samples from shrews of genus *Sorex*, captured in the four regions of Far Eastern Russia, were examined for hantavirus RNA using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences of viral genome was conducted using MEGA X software.

Results. New genetic variant of YKSV was identified in new reservoir host, long-clawed shrew (*S. ungiuculatus*) from Sakhalin Island. Genetic variant of SWSV, ARTV-Sc, has been found to circulate among *S. caecutiens* on the seacoast of Khabarovsk and Primorsky Krai. KKMV virus and second genetic variant of SWSV, ARTV-St, were found in *S. roboratus* and *S. tundrensis*, respectively from Jewish Autonomous region.

Conclusion. Sorex-borne hantaviruses were found in all studied regions of Far Eastern Russia. Our results demonstrated co-evolution of SWSV, KKMV, and YKSV viruses throughout the geographic distribution of its hosts.

Keywords: *hantavirus; insectivores; shrew; phylogenetic analysis*

For citation: Yashina L.N., Ivanov L.I., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Kartashov M.Yu. Shrew-borne hantaviruses (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) in the Far East of Russia. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 79-85 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-165>

For correspondence: Liudmila N. Yashina, Dr Sci. (Biol.), Leading Researcher of the Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: yashina@vector.nsc.ru

Information about the authors:Yashina L.N., <https://orcid.org/0000-0003-2844-7835>Ivanov L.I., <https://orcid.org/0000-0003-0349-837X>Kompanets G.G., <https://orcid.org/0000-0001-7315-6119>Zdanovskaya N.I., <https://orcid.org/0000-0001-5507-7521>Kartashov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7857-6822>

Contribution: Yashina L.N. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Ivanov L.I. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Kartashov M.Yu. – conducting of the experiments.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 2010, July 23). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Far Eastern Federal University (protocol No. 1 dated Apr 1, 2011).

Received 08 January 2023

Accepted 17 February 2023

Published 28 February 2023

Введение

Хантавирусы, принадлежащие семейству *Hantaviridae* рода *Orthohantavirus*, широко распространены во многих регионах мира и являются возбудителями двух клинических форм заболевания человека – геморрагической лихорадки с почечным синдромом и хантавирусного кардио-лёгочного синдрома, для которых международным сообществом хантавиру-

сологов предлагается использовать новый общий термин – хантавирусное заболевание [1]. Со времён открытия первого хантавируса от полевой мыши грызуны отряда *Rodentia* считались основным природным резервуаром хантавирусов, однако исследования последних лет установили более широкий круг млекопитающих хозяев, включая насекомоядных (отряд *Eulipotyphla*) и рукокрылых (отряд *Chiroptera*) [2].

Активное изучение хантавирусов в новых природных резервуарах, их видового состава, распространения и патогенного потенциала привело к открытию 26 новых хантавирусов среди насекомых и 7 видов среди летучих мышей в географически удалённых районах на трёх континентах [3]. Наиболее важным фактом явилось серологическое доказательство инфицирования людей хантавирусами, циркулирующими среди насекомых и рукокрылых в Азии и Африке [4, 5].

В России исследования проводились на территории азиатской части страны. В Сибири среди насекомых были обнаружены пять хантавирусов: Сивис (SWSV), Алтай (ALTV), Артыбаш (ARTV), Кенкеме (KKMV), Академ (ACDV). Вирус SWSV, первоначально выявленный на территории Европы от обыкновенных бурозубок (*Sorex araneus*), широко распространён на территории Сибири от Омской области до озера Байкал [6]. SWSV был обнаружен в нескольких видах бурозубок рода *Sorex*, включая обыкновенную, тундрную (*S. tundrensis*) и крупнозубую (*S. daphaenodon*). В дополнение к SWSV, относящемуся к роду *Orthohantavirus*, в обыкновенной бурозубке в Республике Алтай и Томской области был открыт ранее неизвестный значительно отличающийся вирус, названный вирусом Алтай (ALTV) [7, 8]. Филогенетический анализ показал, что новый вирус наиболее близок к роду *Mobatvirus*, включающему в основном хантавирусы от летучих мышей, что указывает на межвидовой переход в ходе его эволюции [8]. В популяциях средних бурозубок (*S. caecutiens*) Республики Алтай и Красноярского края был обнаружен вирус Артыбаш (ARTV) [9]. Согласно новой классификации, вирус ARTV отнесён к отдельному генетическому варианту ARTV-Sc вируса SWSV [10]. На территории Алтайского края среди плоскочерепных бурозубок (*S. roboratus*) выявлен вирус Кенкеме (KKMV), впервые найденный в том же виде носителей в Республике Саха [11, 12]. Недавние исследования сибирских кротов (*Talpa altaica*) на территории Западной Сибири установили среди них циркуляцию ранее неизвестного вируса Академ (ACDV) [13].

На Дальнем Востоке России в южной части Хабаровского края и Республике Саха были выявлены и идентифицированы четыре вида хантавирусов. Совместная циркуляция двух значительно различающихся вирусов Лена (LENV) и варианта ARTV-Sc вируса SWSV была обнаружена в популяциях средней бурозубки (*S. caecutiens*) в Хабаровском крае и Республике Саха [7, 14]. На основе получения и анализа полноразмерных геномов выдвинута гипотеза, что хантавирусы ALTV и LENV возникли в ходе эволюции в результате межвидового перехода предкового хантавируса летучих мышей к насекомоядным и его последующего распространения среди бурозубок рода *Sorex* на территории Евразии [8]. Второй генетически различающийся вариант вируса SWSV, ранее называемый ARTV-St, был обнаружен среди *S. tundrensis* на юге Хабаровского края [14]. В Хабаровском крае и Республике Саха среди плоско-

черепных бурозубок установлена циркуляция вируса KKMV, а в Хабаровском крае в таежных бурозубках (*S. isodon*) был найден вирус Yakeshi (YKSV), ранее выявленный в том же носителе на приграничной территории Китая [11, 14, 15].

Целью исследования было дальнейшее изучение циркуляции хантавирусов среди насекомых на территории Дальнего Востока, их видового состава и распространения.

Материалы и методы

Экспедиции по отлову мелких млекопитающих и сбору образцов были проведены в период 2011, 2015–2017 гг. на территории Дальнего Востока России. Отлов мелких млекопитающих и отбор образцов осуществляли в соответствии с протоколом и рекомендациями по безопасной работе согласно МУ 3.1.1029-01 (утв. 06.04.2001 г.). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 2010, July 23). Отобранные ткани лёгких помещали в жидкий азот либо в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN GmbH, Германия) для последующего выделения РНК и её анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для подтверждения таксономической принадлежности бурозубок, определённой экспертами-зоологами, было проведено определение и сравнение с базой данных GenBank фрагмента гена цитохрома b митохондриальной ДНК.

Вирусную кДНК (комплементарную) синтезировали с использованием ОТ Thermo Scientific RevertAid Premium Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, США) и родоспецифического праймера HPS (5'-TAG-TAGTAGACTCC). Продукты двухраундовой амплификации получали с использованием двух серий праймеров по стандартному протоколу с использованием Hot start Taq ДНК-полимеразы производства фирмы «СибЭнзайм» (Новосибирск). Первая серия праймеров и условия проведения реакции были описаны ранее [16], вторая серия праймеров была выбрана авторами и описана в работе L.N. Yashina и соавт. [8].

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA X [17]. Для построения филогенетических деревьев использован метод максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с моделью эволюции GTR + G + I. Вычисления проводили для 1000 итераций.

Результаты

В период 2011 и 2015–2017 гг. в Еврейской автономной области (ЕАО), Приморском и Хабаровском краях, Сахалинской области было отловлено 43 бурозубки (рис. 1, таблица). Все образцы были протестированы методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров для L-сегмента генома. Хантавирусная РНК была выявлена в образцах от 13 бурозубок, отловленных во всех исследованных регионах в 7 из 9 выбранных

точек: окрестностях Биробиджана, Ленинского, Николаевки (ЕАО); Токи и Ландыши (Хабаровский край), Владивостока (Приморский край), Холмска (Сахалинская область) (таблица). РНК-положительный образец с острова Сахалин дополнительно анализировали с использованием праймеров к S-сегменту генома. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в банке данных GenBank под номерами MG888369 – MG888373, MG888375, MG860921, MZ062428 – MZ062433, ON858829. Филогенетический анализ частичной 426-нуклеотидной последовательности гена цитохрома b идентифицировал носителей вируса как *S. tundrensis*, *S. caecutiens*, *S. roboratus* и *S. unguiculatus* (номера в банке данных MG888386, MG888400 – MG888401, ON858826 – ON858828).

Филогенетический анализ, основанный на фрагментах 346 нуклеотидных остатков (н.о.) L-сегмента генома, выявил среди новых РНК-изолятов три вида хантавирусов: варианты вируса SWSV (ARTV-Sc и SWSV-St), KKMV и YKSV (рис. 2). Анализ нуклеотидных последовательностей 6 РНК-изолятов от *S. caecutiens* показал их принадлежность к виру-

су SWSV (ARTV-Sc), ранее выявленному от средних бурозубок в окрестностях Хабаровска и в Республике Саха [7, 14]. Установлено, что новые вирусные последовательности от *S. caecutiens* образуют две генетические подгруппы, отличающиеся по нуклеотидным последовательностям на 8,5–9,8%. РНК-изоляты от средних бурозубок, отловленных на побережье Хабаровского и Приморского краёв, близки к генетическому варианту вируса из окрестностей Хабаровска (Galkino-Sc2712) и отличаются от РНК-изолятов вируса из географически более удалённой Республики Саха (MSB8558) на 12,7–15,0%. РНК-изолят Nikolaevka-Sc667 из ЕАО наиболее близок второй дальневосточной подгруппе, включающей образцы из Большехехцирского заповедника Хабаровского края (Khekhtsir-Sc1126).

Новые нуклеотидные последовательности вируса SWSV, обнаруженные в образцах от *S. tundrensis* (вариант ARTV-St) из ЕАО, группируются с последовательностью от того же вида носителей (Galkino-St2714) из Хабаровска, уровень их различия не превышает 5,6%. Различия РНК-изолятов вируса SWSV

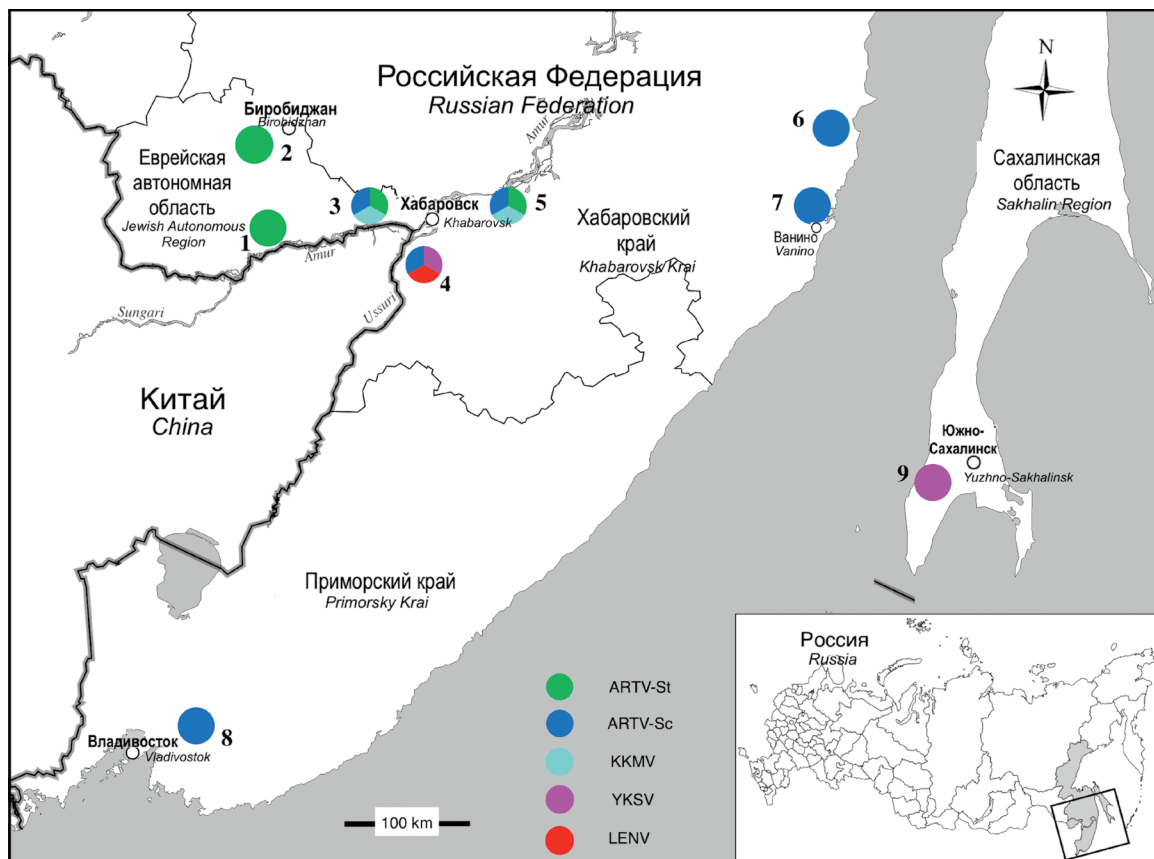


Рис. 1. Расположение точек отлова на территории Дальнего Востока России (включая ранее проведённые исследования), где были выявлены инфицированные хантавирусами бурозубки рода *Sorex*: 1) Ленинское, 2) Биробиджан, 3) Николаевка, 4) Хехцир, 5) Галкино, 6) Ландыши, 7) Токи, 8) окрестности Владивостока, 9) Холмск. Идентифицированные хантавирусы обозначены цветом: SWSV/ARTV-Sc (синий), SWSV/ARTV-St (зеленый), KKMV (сине-зеленый), YKSV (малиновый), LENV (красный).

Fig. 1. The locations of the collection sites in the Far East of Russia (including previous studies), where hantavirus-infected shrews of genus *Sorex* were captured: 1) Leninskoye, 2) Birobidzhan, 3) Nikolaevka, 4) Khekhtsir, 5) Galkino, 6) Lili, 7) Toki, 8) suburbs of Vladivostok City, 9) Holmsk. Detected hantaviruses are designated with following colors: SWSV/ARTV-Sc (dark blue), SWSV/ARTV-St (green), KKMV (blue), YKSV (magenta), LENV (red).

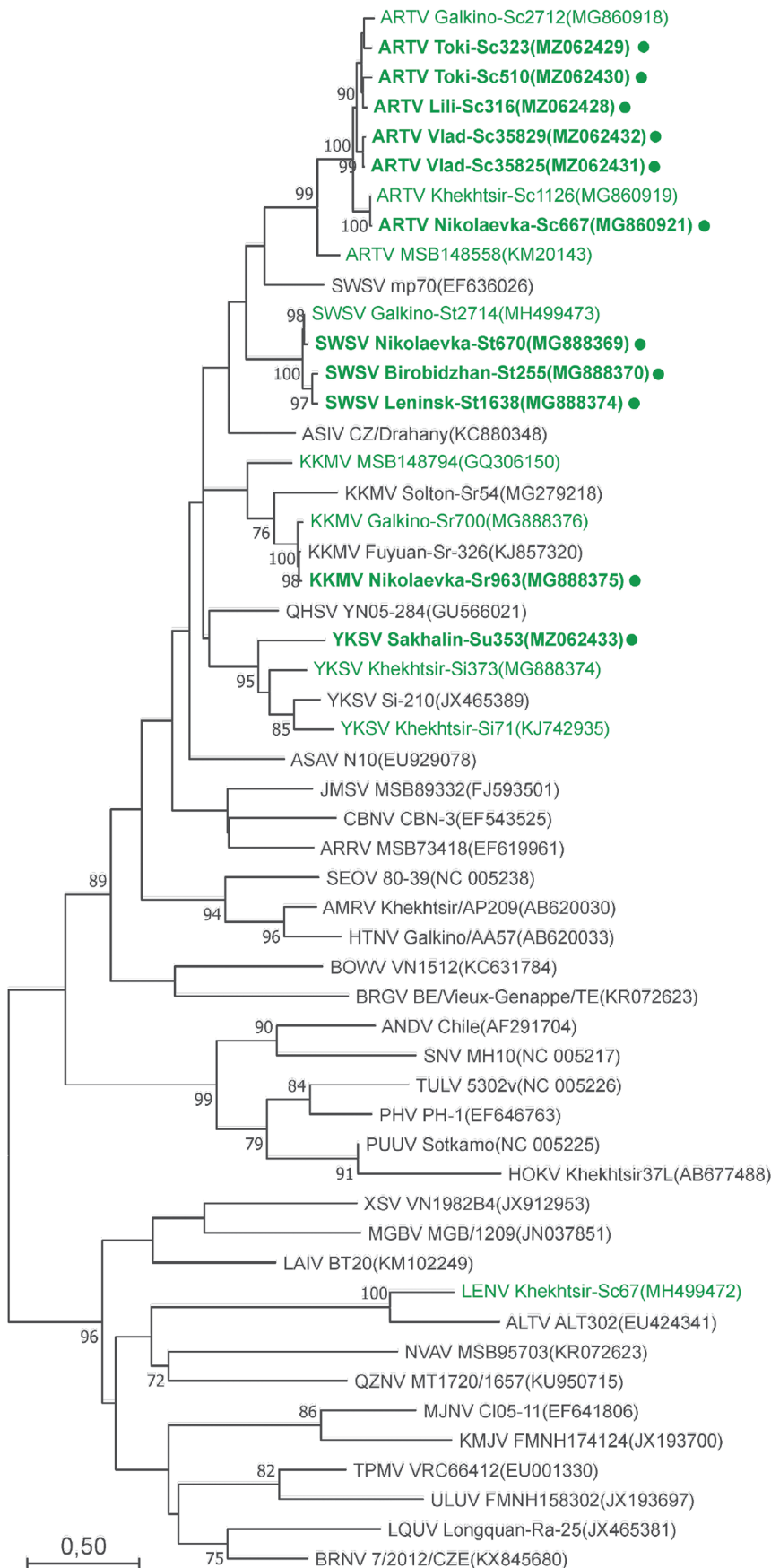


Рис. 2. Филогенетическое дерево, отображающее взаимосвязи российских РНК-изолятов хантавирусов, ассоциированных с бурозубками рода *Sorex* (зелёный шрифт), выявленных на Дальнем Востоке России, и штаммов хантавирусов из других регионов мира от насекомоядных, грызунов и летучих мышей. Деревья построены на основе фрагмента L-сегмента генома методом максимального правдоподобия с использованием модели GTR + I + G, индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов. Жирным шрифтом и кружком выделены исследованные РНК-изоляты хантавирусов.

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Sorex*-borne hantaviruses (colored in green) identified in the Far East of Russia in relationship to strains from insectivores, rodents and bats from other regions of the world. Tree, generated by maximum-likelihood method, was based on the L segment sequences, under the best-fit GTR + I + G model with 1000 bootstrap replicates. Strains from this study are shown in bold lettering and circles.

Таблица. Выявление инфицированных хантавирусами бурозубок рода *Sorex* методом ОТ-ПЦР на Дальнем Востоке России
Table. Prevalence of hantavirus infection as determined by RT-PCR in *Sorex* species in the Russian Far East

Регион Region	Место отлова Trap locality	Вид Species	Год Year	Число положительных/ исследованных РНК Hantavirus Positive/Tested for RNA	Вирус Virus
Еврейская автономная область Jewish Autonomous region	Ленинское Leninskoye	<i>S. tundrensis</i>	2016	2/5	ARTV-St
	Биробиджан Birobidzhan	<i>S. tundrensis</i>	2016	2/5	ARTV-St
	Николаевка Nikolaevka	<i>S. tundrensis</i>	2016	1/2	ARTV-St
		<i>S. caecutiens</i>	2016	1/2	ARTV-Sc
		<i>S. roboratus</i>	2017	1/1	KKMV
	Приамурское Priamurskoye	<i>S. tundrensis</i>	2017	0/2	–
Хабаровский край Khabarovsk Krai	Токи Toki	<i>S. caecutiens</i>	2011	1/4	ARTV-Sc
		<i>S. caecutiens</i>	2017	1/1	ARTV-Sc
	Ванино Vanino	<i>S. caecutiens</i>	2011	0/1	–
		<i>S. daphaenodon</i>	2011	0/1	
		<i>S. unguiculatus</i>	2011	0/1	
		<i>S. caecutiens</i>	2017	0/3	
Ландыши Landyshi	<i>S. caecutiens</i>	2011	1/1	ARTV-Sc	
Приморский край Primorsky Krai	Владивосток Vladivostok	<i>S. caecutiens</i>	2015	2/6	ARTV-Sc
Сахалинская область Sakhalin region	Холмск Holmsk	<i>S. unguiculatus</i>	2015	1/6	YKSV

от двух видов носителей – *S. caecutiens* и *S. tundrensis* – составило 19,3–20,9% для нуклеотидных и 1,7–2,6% для аминокислотных последовательностей.

Анализ нуклеотидной последовательности, полученной из тканей лёгких *S. roboratus*, отловленной в ЕАО (Nikolaevka-Sr963), установил её принадлежность к вирусу KKMV (рис. 2). Новая нуклеотидная последовательность отличалась от ранее опубликованных из Хабаровска (Galkino-Sr700) и Китая (Fuyuan-Sr326) на 0,7–2,9% и значительно сильнее (15,7–17,6%) – от географически удалённых изолятов из Алтайского края (Solton-Sr54) и Республики Саха (MSB148794). Различие аминокислотных последовательностей составило 0,9–1,7%.

Вирусная последовательность, выявленная от когитистой бурозубки (*S. unguiculatus*) с острова Сахалин, филогенетически группируется с изолятами вируса YKSV от *S. isodon*, ранее найденными в окрестностях Хабаровска (Khekhtsir-Si71, Khekhtsir-Si373) и Китае (Si-210). Уровень различия изолятов вируса YKSV от разных природных носителей составил для L-сегмента 16,0–18,6% для нуклеотидных и 2,8–3,5% – для аминокислотных последовательностей. Анализ последовательности S-сегмента генома (730 н.о.) нового изолята Sakhalin-Su353 выявил 18,9–20,4% нуклеотидных и 3,5% аминокислотных различий в сравнении с последовательностями от *S. isodon*.

Обсуждение

Среди отловленных средних бурозубок не был обнаружен вирус LENV, что могло быть связано с ограниченным числом исследованных животных. Согласно нашим данным, уровень инфицированности бурозубок вирусом LENV относительно низок [14]. Ранее вирус LENV был обнаружен в одном образце от *S. caecutiens*, отловленных в окрестностях Хабаровска, в то время как ARTV-Sc найден в пяти из тех же 59 исследованных образцов. Одна из возможных причин – различная чувствительность к вирусам у природных носителей за счёт разной эволюционной истории. Вирусы SWSV, KKMV и YKSV филогенетически отнесены к роду *Orthohantavirus*. Долговременная коэволюция между вирусом SWSV (вариант ARTV-Sc) и его хозяином обеспечивает лучшую восприимчивость носителя к вирусу SWSV (ARTV-Sc) по сравнению с LENV (род *Mobatvirus*), для которого выявлен межвидовой перебор от другого хозяина в ходе эволюционной истории. Эта гипотеза требует дальнейшей проверки, включая изоляцию вирусов.

Заключение

Таким образом, нами показано широкое распространение хантавируса SWSV (вариант ARTV-Sc) в популяциях средних бурозубок в новых очагах на территории ЕАО, Хабаровского и Приморского краёв и вирусов

SWSV (вариант ARTV-St) и ККМВ в ЕАО среди тундряных и плоскочерепных бурозубок соответственно. На острове Сахалин обнаружен новый вариант вируса YKSV и его новый природный носитель – *S. unguiculatus* в дополнение к ранее известному носителю *S. isodon*, населяющему материковую часть Дальнего Востока России. Полученные результаты свидетельствуют о коэволюции хантавирусов SWSV, ККМВ и YKSV с природными носителями в ареалах их обитания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Clement J., Maes P., Lagrou K., Van Ranst M., Lameire N. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: hantavirus disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1456-y>
2. Zhang Y.Z. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Res.* 2014; 187: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.035>
3. Arai S., Yanagihara R. Genetic diversity and geographic distribution of bat-borne hantaviruses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2020; 39: 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>
4. Heinemann P., Tia M., Alabi A., Anon J.C., Auste B., Essbauer S., et al. Human infections by non-rodent-associated hantaviruses in Africa. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(10): 1507–11. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw401>
5. Wei Z., Shimizu K., Nishigami K., Tsuda Y., Sarathukumara Y., Muthusinghe D.S., et al. Serological methods for detection of infection with shrew-borne hantaviruses: Thottapalayam, Seewis, Altai, and Asama viruses. *Arch. Virol.* 2021; 166(1): 275–80. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04873-3>
6. Yashina L.N., Abramov S.A., Gutorov V.V., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Panov V.V., et al. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(6): 585–91. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0154>
7. Kang H.J., Gu S.H., Yashina L.N., Cook J.A., Yanagihara R. Highly divergent genetic variants of soricid-borne Altai Virus (Hantaviridae) in Eurasia suggest ancient host-switching events. *Viruses.* 2019; 11(9): 857. <https://doi.org/10.3390/v11090857>
8. Yashina L.N., Abramov S.A., Zhigalin A., Smetannikova N.A., Dupal T.A., Krivopalov A.V., et al. Geographic distribution and phylogeny of soricine shrew-borne Seewis virus and Altai Virus in Russia. *Viruses.* 2021; 13(7): 1286. <https://doi.org/10.3390/v13071286>
9. Arai S., Kang H.J., Gu S.H., Ohdachi S.D., Cook J.A., Yashina L.N., et al. Genetic diversity of Artybash virus in the Laxmann's shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(7): 468–75. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1903>
10. Maes P., Adkins S., Alkhovsky S.V., Avšič-Županc T., Ballinger M.J., Bente D.A., et al. Taxonomy of the order Bunyavirales: Second update 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(3): 927–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04127-3>
11. Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Cook J.A., Yanagihara R. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(6): 593–7. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0159>
12. Яшина Л.Н., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Якименко В.В., Танцев А.К., Малышев Б.С. и др. Хантавирусы в популяциях на секомоядных на территории Сибири. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; (4): 89–93. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-89-93>
13. Yashina L.N., Panov V.V., Abramov S.A., Smetannikova N.A., Luchnikova E.M., Dupal T.A., et al. Academ virus, a novel hantavirus in the Siberian Mole (*Talpa altaica*) from Russia. *Viruses.* 2022; 14: 309 <https://doi.org/10.3390/v14020309>
14. Yashina L.N., Kartashov M.Y., Wang W., Li K., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., et al. Co-circulation of distinct shrew-borne hantaviruses in the far east of Russia. *Virus Res.* 2019; 272: 197717. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197717>
15. Guo W.P., Lin X.D., Wang W., Tian J.H., Cong M.L., Zhang H.L., et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* 2013; 9(2): e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>
16. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
17. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

REFERENCES

1. Clement J., Maes P., Lagrou K., Van Ranst M., Lameire N. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: hantavirus disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1456-y>
2. Zhang Y.Z. Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Res.* 2014; 187: 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.035>
3. Arai S., Yanagihara R. Genetic diversity and geographic distribution of bat-borne hantaviruses. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2020; 39: 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>
4. Heinemann P., Tia M., Alabi A., Anon J.C., Auste B., Essbauer S., et al. Human infections by non-rodent-associated hantaviruses in Africa. *J. Infect. Dis.* 2016; 214(10): 1507–11. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw401>
5. Wei Z., Shimizu K., Nishigami K., Tsuda Y., Sarathukumara Y., Muthusinghe D.S., et al. Serological methods for detection of infection with shrew-borne hantaviruses: Thottapalayam, Seewis, Altai, and Asama viruses. *Arch. Virol.* 2021; 166(1): 275–80. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04873-3>
6. Yashina L.N., Abramov S.A., Gutorov V.V., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Panov V.V., et al. Seewis virus: phylogeography of a shrew-borne hantavirus in Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(6): 585–91. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0154>
7. Kang H.J., Gu S.H., Yashina L.N., Cook J.A., Yanagihara R. Highly divergent genetic variants of soricid-borne Altai Virus (Hantaviridae) in Eurasia suggest ancient host-switching events. *Viruses.* 2019; 11(9): 857. <https://doi.org/10.3390/v11090857>
8. Yashina L.N., Abramov S.A., Zhigalin A., Smetannikova N.A., Dupal T.A., Krivopalov A.V., et al. Geographic distribution and phylogeny of soricine shrew-borne Seewis virus and Altai Virus in Russia. *Viruses.* 2021; 13(7): 1286. <https://doi.org/10.3390/v13071286>
9. Arai S., Kang H.J., Gu S.H., Ohdachi S.D., Cook J.A., Yashina L.N., et al. Genetic diversity of Artybash virus in the Laxmann's shrew (*Sorex caecutiens*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(7): 468–75. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1903>
10. Maes P., Adkins S., Alkhovsky S.V., Avšič-Županc T., Ballinger M.J., Bente D.A., et al. Taxonomy of the order Bunyavirales: Second update 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(3): 927–41. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04127-3>
11. Kang H.J., Arai S., Hope A.G., Cook J.A., Yanagihara R. Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(6): 593–7. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0159>
12. Yashina L.N., Abramov S.A., Dupal T.A., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Malyshev B.S., et al. Hantaviruses in insectivore populations in Siberia. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2018; (4): 89–93. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-89-93> (in Russian)
13. Yashina L.N., Panov V.V., Abramov S.A., Smetannikova N.A., Luchnikova E.M., Dupal T.A., et al. Academ virus, a novel hantavirus in the Siberian Mole (*Talpa altaica*) from Russia. *Viruses.* 2022; 14: 309 <https://doi.org/10.3390/v14020309>
14. Yashina L.N., Kartashov M.Y., Wang W., Li K., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I., et al. Co-circulation of distinct shrew-borne hantaviruses in the far east of Russia. *Virus Res.* 2019; 272: 197717. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197717>
15. Guo W.P., Lin X.D., Wang W., Tian J.H., Cong M.L., Zhang H.L., et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* 2013; 9(2): e1003159. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003159>
16. Klempa B., Fichet-Calvet E., Lecompte E., Auste B., Aniskin V., Meisel H., et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(5): 838–40. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051487>
17. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ



ВЛАДИМИР ИГОРЕВИЧ ЗЛОБИН (к 80-летию со дня рождения)



6 января 2023 г. отпраздновал свой 80-летний юбилей Владимир Игоревич Злобин – крупный вирусолог, академик РАН, профессор, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

С именем В.И. Злобина связано развитие в нашей стране молекулярной эпидемиологии инфекционных заболеваний. Основой для развития данного направления стали многолетние исследования Владимира Игоревича, проводимые в области этиологии, молекулярной биологии, эпидемиологии, профилактики вирусных и бактериальных инфекций. В.И. Злобин – признанный специалист в области молекулярной эпидемиологии клещевого энцефалита. Его исследования позволили существенно расширить понимание изменчивости вируса клещевого энцефалита на территории бывшего СССР и её влияния на эпидемиологическое благополучие и эффективность применяемых средств профилактики клещевого энцефалита. Благодаря разработке диагностических тест-систем, сбору и исследованию уникальной коллекции изолятов вируса, собранных в результате многочисленных экспедиций, всестороннему анализу эпидемического процесса и оценке эффективности средств рутинной и экстренной профилактики, В.И. Злобин сформули-

ровал предложения по совершенствованию стратегии и тактики профилактики клещевого энцефалита, многие из которых были внедрены в медицинскую практику и создали прочную основу для дальнейших исследований в данной области.

После окончания в 1968 г. Свердловского государственного медицинского института по специальности «санитарный врач» Владимир Игоревич в течение трёх лет работал по распределению главным санитарным врачом Мелеузовского района Башкирской АССР, однако позднее перешёл на должность младшего научного сотрудника в Свердловский НИИ вирусных инфекций МЗ РСФСР. В этот период он подготовил кандидатскую диссертацию по специальности «вирусология» на тему «Изучение и оценка генетических признаков штаммов полиомиелита, выделенных в период применения живой полиомиелитной вакцины» (1978). В опытах *in vitro* и на модели обезьян В.И. Злобиным были получены убедительные данные о реверсии вирулентности вакцинных штаммов до уровня дикого полиовируса при их циркуляции среди невакцинированных детей. Острая для здравоохранения тема оказалось очень важной для определения стратегии и тактики эрадикации этого заболевания не только в нашей стране, но и за рубежом. Дальнейшие исследования В.И. Злобина были посвящены преимущественно вирусам комплекса клещевого энцефалита и на первом этапе были развернуты на базе возглавляемой им лаборатории трансмиссивных вирусных инфекций (1980).

В 1984–1988 гг. работа по изучению клещевого энцефалита была продолжена в Омском НИИ природно-очаговых инфекций, где совместные исследования с сотрудниками Новосибирского института биологической химии СО АМН СССР привели В.И. Злобина к разработке метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот для определения и дифференциации вирусов комплекса клещевого энцефалита и других флавивирусов. В этот период изоляты вируса, полученные в результате многочисленных экспедиционных работ В.И. Злобина, стали основой уникальной коллекции вируса клещевого энцефалита, охватывающей весь географический ареал вируса на территории бывшего СССР. Значительная часть штаммов была депонирована в Государственную коллекцию вирусов. Результатом работ стали многочисленные отечественные и зарубежные публикации, авторские свидетельства и патенты, а также докторская диссертация по специальности «вирусология» на тему «Молекулярно-биологическое определение и генетическая дифференциация вируса клещевого энцефалита» (1992).

В этот период В.И. Злобин стал признанным специалистом по проблеме клещевого энцефалита и получил приглашение на должность директора Института эпидемиологии и микробиологии Восточно-Сибирского научного центра СО АМН СССР (Иркутск). Он принял приглашение (1988) и провёл реорганизацию структуры института, внедрил актуальную научную повестку и новейшие методы исследования. Именно в этот период им впервые было сформировано новое научное направление – молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. Впервые коллективом под руководством В.И. Злобина выявлены и описаны генотипы вируса клещевого энцефалита, с помощью классических и молекулярно-биологических методов изучена большая коллекция штаммов, изолированных на территории нашей страны, а также ряда зарубежных государств. Были развёрнуты исследования по проблеме сочетанных вирусных, бактериальных, риккетсиозных и протозойных инфекций, переносимых иксодовыми клещами. На основе внедрения новых экспресс-методов исследования в Иркутске была организована эффективная экстренная профилактика клещевых инфекций, позволившая существенно снизить заболеваемость. Одновременно с научной и административной работой Владимир Игоревич уделял большое внимание подготовке научных кадров и преподаванию: в 1994 г. им была основана и возглавлена кафедра эпидемиологии и бактериологии Иркутского государственного института усовершенствования врачей, а с 1995 г. он стал преподавать молекулярную вирусологию на кафедре физико-химической биологии Иркутского государственного университета. В 1995 г. В.И. Злобин получил учёное звание профессора, а с 1997 г. избран членом-корреспондентом РАМН.

В 2002 г. В.И. Злобин переехал в Москву и сначала перешёл на работу в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, где занимал должность заместителя директора по научной работе и возглавлял лабораторию эпидемиологии и профилактики энцефалитов, а позднее в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, где руководил лабораторией иммунологии (2006–2009). Работы этого периода были посвящены анализу современной эпидемиологической обстановки по природно-очаговым вирусным инфекциям в Российской Федерации и отдельных регионах, оценке эффективности стратегии и тактики профилактики, а также используемых в практике вакцин и препаратов антител для экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита. Именно в этот период В.И. Злобин разработал предложения по усовершенствованию профилактического комплекса клещевого энцефалита, имеющих целью повысить результативность профилактических мероприятий. Проводимые исследования внесли существенный вклад в развитие медицинской науки и здравоохранения, вследствие чего в 2004 г. В.И. Злобин был избран академиком РАМН.

В 2009 г. В.И. Злобин вернулся в Иркутск, где сначала заведовал кафедрой микробиологии, вирусологии

и иммунологии Иркутского государственного медицинского университета, а в 2013 г. организовал и возглавил НИИ биомедицинских технологий в структуре Иркутского государственного медицинского университета. В 2013 г. В.И. Злобин получил учёное звание академика РАН. В этот период под руководством Владимира Игоревича продолжилась активная работа по проблеме молекулярной эпидемиологии клещевого энцефалита. В 2022 г. В.И. Злобин снова вернулся в Москву, где занял должность главного научного сотрудника в ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, где продолжает активно работать по направлению молекулярной эпидемиологии инфекционных заболеваний.

Академик РАН В.И. Злобин является автором более 900 научных работ, в том числе 19 монографий и руководств, 10 авторских свидетельств и патентов на изобретения. За всё время он подготовил 11 докторов и 13 кандидатов наук; является членом редакционных коллегий журналов «Вопросы вирусологии» (Москва), «Эпидемиология и вакцинопрофилактика» (Москва), «Прикладная энтомология» (Москва), «Сибирский медицинский журнал» (Иркутск), «Журнал инфекционной патологии» (Иркутск); организовал ряд крупных российских и международных научных конференций; являлся членом экспертного совета ВАК, консультировал Всемирную организацию здравоохранения, работая в Болгарии, Сербии, Боснии и Герцеговине, Македонии, Украине, Узбекистане, Таджикистане, Туркмении.

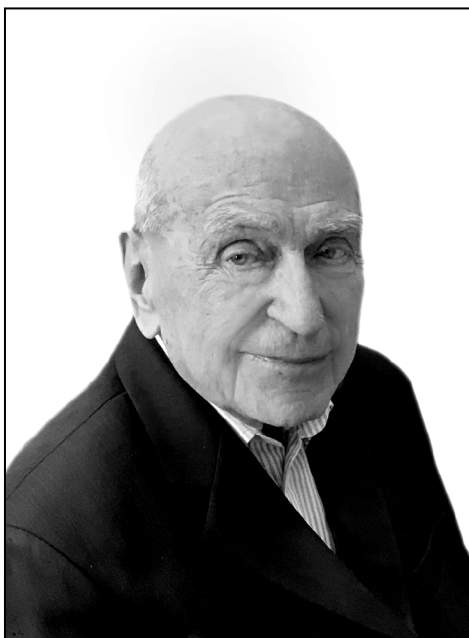
За научные достижения и их внедрение в здравоохранение В.И. Злобин награждён медалью Монголии, медалью Республики Южная Осетия, медалью имени Роберта Коха (Германия), медалью имени академика В.И. Покровского, ведомственными почётными грамотами и дипломами российского и регионального уровня; удостоен почётных званий «Заслуженный деятель науки Российской Федерации» и «Заслуженный деятель науки Республики Бурятия», «Почётный профессор Уральской государственной медицинской академии» (2012), «Почётный профессор Харбинского медицинского университета (КНР)» (2013), «Почётный профессор Медицинского университета в Да Цине (КНР)» (2014), «Почётный профессор Иркутского государственного медицинского университета» (2018); является лауреатом научной премии РАМН по молекулярной вирусологии имени В.М. Жданова, премии губернатора Иркутской области в сфере науки и техники, также удостоен золотого знака и благодарности Всемирной организации здравоохранения за вклад в искоренение полиомиелита в регионе Европы.

Коллектив ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и члены редколлегии журнала «Вопросы вирусологии» поздравляют Владимира Игоревича с юбилеем и желают ему здоровья, долгих лет жизни, успешной научной и творческой деятельности.

НЕКРОЛОГИ



Святослав Георгиевич Чешик (01.01.1930 – 30.12.2022)



30 декабря 2022 г. на 93-м году жизни скончался профессор, доктор медицинских наук, заслуженный врач Российской Федерации Святослав Георгиевич Чешик.

Святослав Георгиевич родился в 1930 г. в Витебской области. Окончил Минский медицинский институт в 1953 г., клиническую ординатуру по специальности «инфекционные болезни» – в 1957 г. в Витебске.

Научно-практическая деятельность Святослава Георгиевича на протяжении 64 лет была связана с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, где он прошёл славный путь от аспиранта до профессора. С 1988 по 2008 г. являлся руководителем отдела вирусных гепатитов и клинической вирусологии института.

С.Г. Чешик был известным и авторитетным учёным в области вирусных инфекций человека. Им была разработана концепция вирусно-бактериальных ассоциаций как причинных факторов пневмонии у детей. Внедрена в практическое здравоохранение система диагностики и лечения тяжёлых форм смешанных вирусных и вирусно-бактериальных заболеваний органов дыхания у детей, что позволило улучшить исходы заболеваний и уменьшить летальность. Круг научных интересов Святослава Георгиевича включал вопросы лечения не только различных респираторных инфекций, но и вирусных гепатитов, цитомегаловирусной инфекции в функциональной системе «мать – плацента – плод» и других герпесвирусных инфекций.

С.Г. Чешик – автор 250 научных публикаций и соавтор отдельных глав в руководствах по инфекционным болезням. Им подготовлены 2 доктора и 10 кандидатов медицинских наук.

С.Г. Чешик вёл активную общественную деятельность, на протяжении 25 лет являлся главным детским инфекционистом. Благодаря его участию в Москве была ликвидирована младенческая смертность от вирусного гепатита В и начаты профилактические прививки школьникам в возрасте 13–14 лет. Существенный вклад Святослав Георгиевич внёс в организационную работу по ликвидации полиомиелита, являлся председателем экспертного совета по диагностике острых вялых параличей у детей. Святослав Георгиевич был членом редакционного совета журналов «Инфекционные болезни», «Детские болезни» и «Биопрепараты».

Научная, врачебная и общественная деятельность С.Г. Чешика была отмечена государством присвоением звания заслуженного врача Российской Федерации и значком «Отличник здравоохранения».

Для тех, кто долгие годы работал со Святославом Георгиевичем, это невосполнимая и тяжёлая утрата.

Светлая память о Святославе Георгиевиче навсегда сохранится в наших сердцах.

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii