

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 Гвинеи 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 Guaico 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 разности 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 (жёсткий) 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 вируса 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).

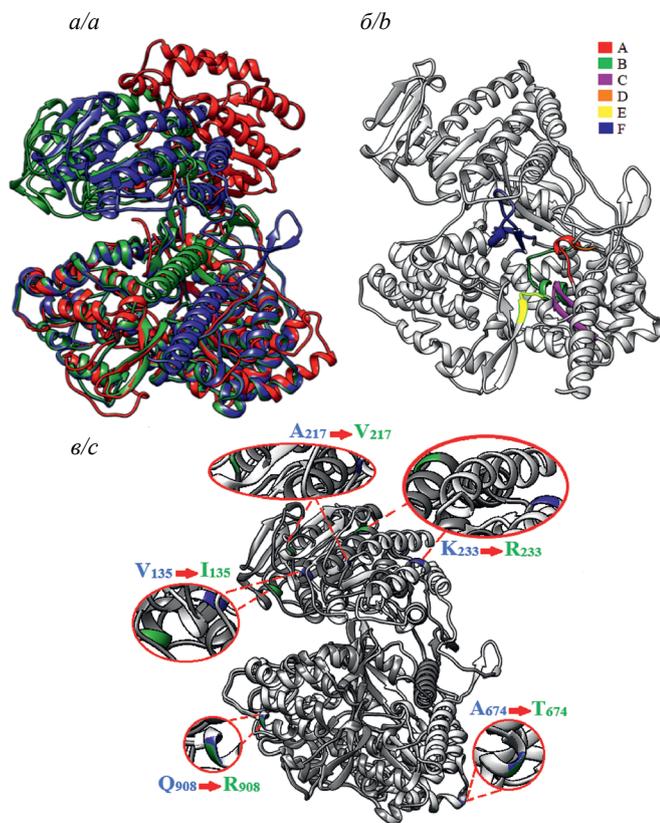


Рис. 1. Модели пространственной организации NS5: *a* – наложение моделей пространственных структур NS5: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный) и вируса денге (красный); *b* – пространственная модель NS5 KITV/2018/1 с консервативными мотивами А–F; *c* – наложение пространственных структур NS5 KITV/2018/1 (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

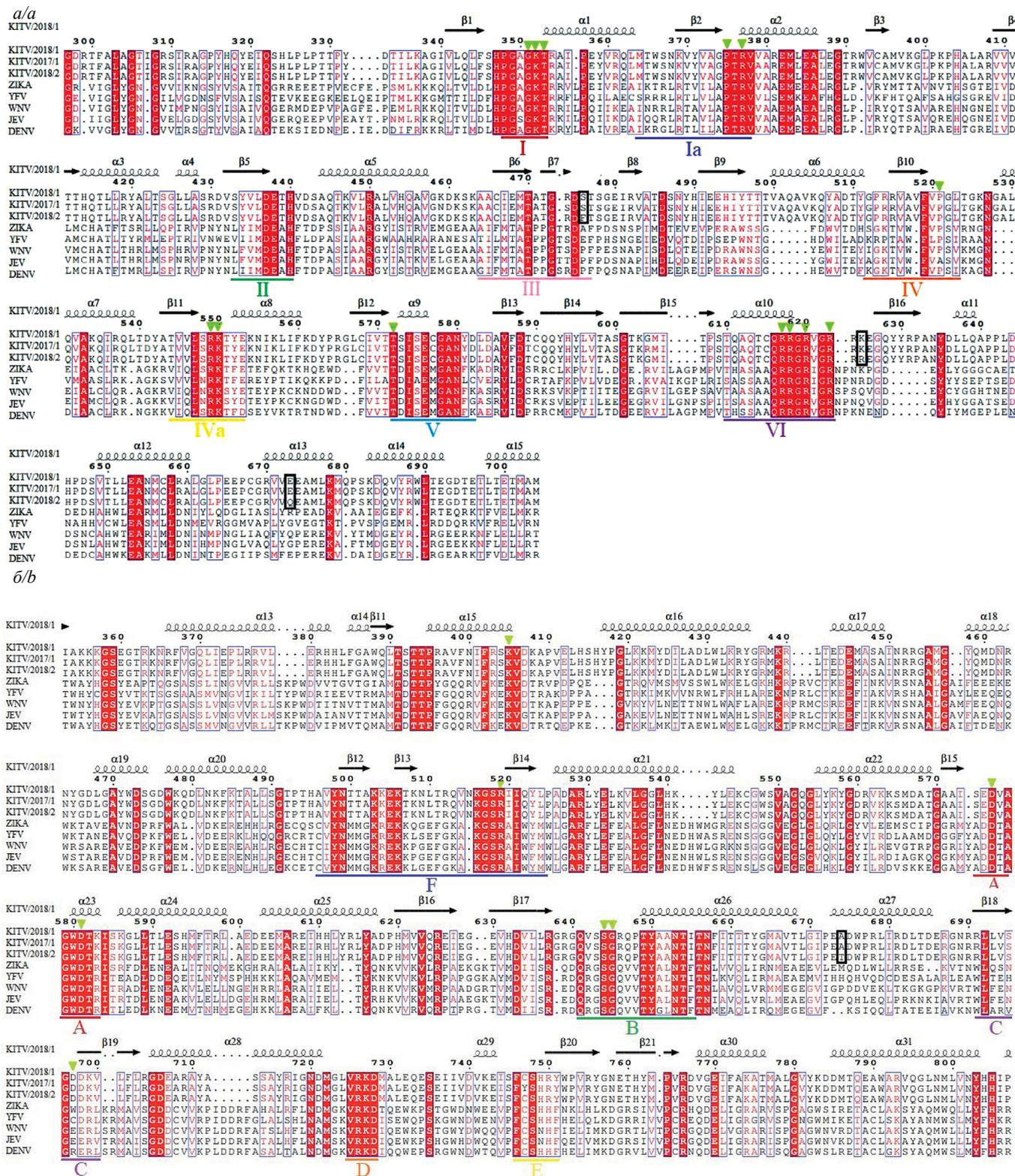


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей NS3 (а) и NS5 (б) KИTV с флавивирусами. Красным цветом выделены высококонсервативные аминокислоты, зелёными стрелочками – высококонсервативные аминокислоты, функции которых известны для флавивирусов. Участки аминокислотных последовательностей, соответствующие 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.

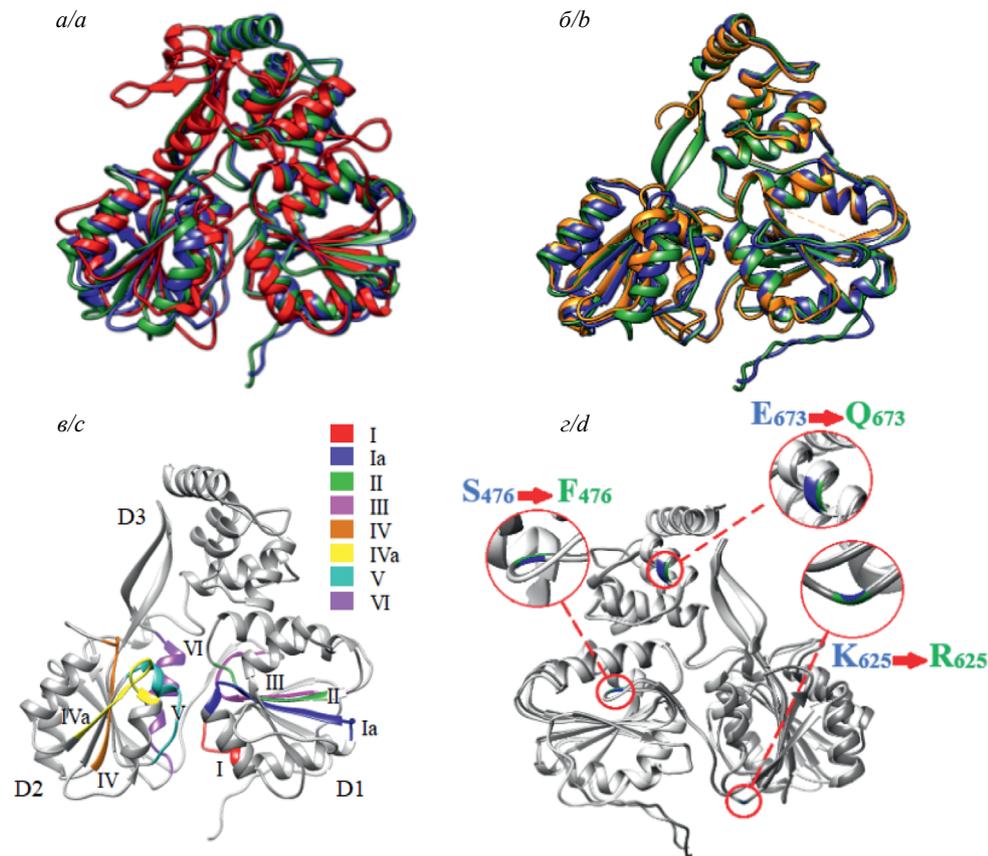


Рис. 3. Модели пространственной организации NS3: *a* – наложение моделей пространственных структур NS3-Hel: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный), вируса клещевого энцефалита (красный); *b* – наложение моделей пространственных структур NS3: KITV/2018/1 (синий), KITV/2018/2 (зелёный), вирус Alongshan (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. Причём 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., Семенцова 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>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

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

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



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 виropорины.

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 аминоадаммантаном 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 $2HCl \cdot H-His-Rim$ 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 коронавирусов.

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, г. Москва, Россия. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Участие авторов: Гараев Т.М. – идея использования производных кластерных 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 30.12.2022
Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

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

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. Larichev¹

¹National 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 30 December 2022

Published 28 February 2023

Введение

Коронавирусы являются зооантропонозными вирусами, способными инфицировать человека и животных. Современные штаммы коронавируса (CoVs) способны вызывать тяжёлые и смертельные заболевания у людей. Возникновение тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002 г. и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 г. подчеркнуло способность CoVs вызывать смертельные заболевания у людей [1–4].

Во время текущей пандемии COVID-19 [5, 6], вызванной новым коронавирусом SARS-CoV-2, меры сдерживания и вакцинация замедлили распространение инфекции, но не смогли полностью предотвратить заболевание среди медицинских работников, пациентов и всего населения планеты.

В связи со вспышкой новых инфекционных заболеваний, вызываемых различными патогенными вирусами, и развитием устойчивости к классическим противовирусным препаратам, фармацевтические компании и многочисленные исследовательские группы ищут новые противовирусные агенты с уникальными химическими и физическими свойствами [7, 8]. На сегодняшний день не существует одобренного терапевтического средства против любого коронавируса человека, но ряд исследуемых противовирусных соединений в данный момент проходят клинические испытания [9–14]. Создание новых противовирусных препаратов против COVID-19 является сложной задачей и требует значительного времени и усилий для разработки и валидации.

В настоящее время разрабатывается целый ряд низкомолекулярных соединений в качестве потенциальных ингибиторов репликации CoVs, направленных на различные этапы репликационного цикла [15]. Некоторые соединения, в частности ингибиторы основной протеазы CoVs, в данный момент проходят заключительные стадии клинических испытаний и ждут одобрения в фармацевтическом комитете. Этот класс соединений представляет собой пептидомиметики, способные ингибировать фермент 3-химотрипсин-подобную протеазу (3CLpro). 3CLpro расщепляет пептид-предшественник по 11 сайтам на отдельные вирусные белки будущего вириона CoVs [16]. Другой класс противовирусных соединений представлен аналогами нуклеозидов, имитирует встречающиеся в природе нуклеозиды для подавления вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы [17].

Альтернативной белковой мишенью могут выступать небольшие вирусные белки, способные образовывать поры в мембранах клетки и оболочки вирусов – виropорины. Ингибиторы виropорин могут составить новый класс противовирусных препаратов, способных действовать как самостоятельное лекарство, как в случае препарата Ремантадин в отношении вируса гриппа А, так и, возможно, в составе комплексной терапии. Белки E SARS-CoV-2 имеют длину полипептида 76 аминокислот и один α -спиральный трансмембранный домен [18, 19]. Белки E способны к образованию пентамерных структур с функцией ионной проводимости [20]. Белок E из CoV представляется наиболее вероятной мишенью для молекул ингибиторов на основе адамантил-аминокислот. Адамантановый карбоциклический остов как липофильный агент в данном случае исполняет роль носителя для остатка аминокислоты или другого физиологически важного соединения. Адамантановый остов является высоко гидрофильным остатком, поэтому в некоторых случаях может быть заменён на другие карбоциклы, такие как норборнен или циклогексан [21].

Нами ранее было показано, что соединение дихлорида L-гистидил-аминоэтиладамантана (2HCl*H-His-Rim) проявляло противовирусный эффект против штаммов вируса гриппа А, резистентных к препаратам Амантадин и Ремантадин. Причём это соединение являлось ингибитором функции ионного канала M2 вируса гриппа А [22]. Виropорин M2 жизненно необходим вирусу гриппа А для инфицирования клетки. Это встроенный в вирусную оболочку ионный канал, избирательно проводящий сквозь себя ионы водорода из клетки внутрь вируса. В клетку-хозяина вирус попадает заключённым в эндосомы (мембранные структуры) – своего рода пузырьки. При определённом значении кислотности среды белок M2 активируется и начинает перекачивать ионы водорода, понижая pH внутри вирусной частицы и тем самым вызывая её распад для высвобождения генетического материала вируса в цитоплазму клетки-хозяина.

Белок M2 вируса гриппа А и белок E из CoV имеют схожую вторичную структуру, сравнимую протяжённость аминокислотной последовательности, а также играют важную роль на этапе сборки вируса. Отсюда можно предположить, что эти два виropорина должны быть чувствительны к гомологичным синтетическим соединениям. Таким образом, существуют все предпосылки к тому, что удастся достигнуть эффекта

подавления функции канала, образованного белком E коронавируса, карбоциклическими производными остатка аминокислоты гистидина.

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

Материалы и методы

Синтетические соединения

Рассматриваемые соединения получены методами органического и пептидного синтеза, описанными нами ранее [21, 23, 24]. На **рис. 1** представлены структуры соединений, которые проявляли противовирусную активность в отношении современных штаммов вируса гриппа А. Дихлоргидрат L-гистидил-аминоэтиладамантан (соединение I – 2HCl*H-His-Rem) [25]; производное *клозо*-декаборатного аниона с остатком метилового эфира гистидина в качестве пendantsкого заместителя, отделённого от борного кластера спейсером $-O(CH_2)_4CO-$ (соединение II – $Na_2[B_{10}H_9-O(CH_2)_4CO-His-OMe]$) [26, 27]; дихлоргидрат гистидил-дициклогексил амид (соединение III – 2HCl*H-His-DCHA); дихлоргидрат гистидил-3-гидрокси-аминоэтиладамантан (соединение IV – 2HCl*H-His-HyRim). Соединения III и IV являются новыми, однако получены методом, аналогичным получению соединения I.

Вирус

В исследованиях использовали штамм коронавируса человека SARS-CoV-2, пассаж 4, с инфекционной

активностью 106 ТЦИД₅₀/мл для клеток Vero E6, депонированный и Государственную коллекцию вирусов РФ ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России № 1301/2 ГКВ.

GISAID: 421275 EPI_ISL

Russia/Moscow PMVL-1/2020 GISAID Clade GR Clade 20B

Вирус SARS-CoV-2 пассировали и титровали на монослойной культуре Vero E6. Инфекционный титр определяли стандартным методом титрования и рассчитывали по методу Рида и Менча. Лизат культуральной жидкости разливали по аликвотам и сохраняли до проведения исследования при -70 ± 10 °C.

Культура клеток

В экспериментальной работе использовали перерабатываемую линию клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6 Всероссийской коллекции клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Культивирование клеток осуществляли на среде DMEM. В 96-луночные культуральные плоскодонные планшеты помещали клетки Vero E6 по 12 000 кл/луночку в объёме 100 мкл свежеприготовленной среды DMEM. Культивировали 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Оценка цитотоксического действия соединений

Эксперимент по оценке цитотоксического действия на культуру клеток проводили в диапазоне 12 концентраций препарата от 2500,0 до 0,5 мкг/мл с шагом два путём разведения исходной концентрации в лунках 96-луночного планшета. После инкубации клеток

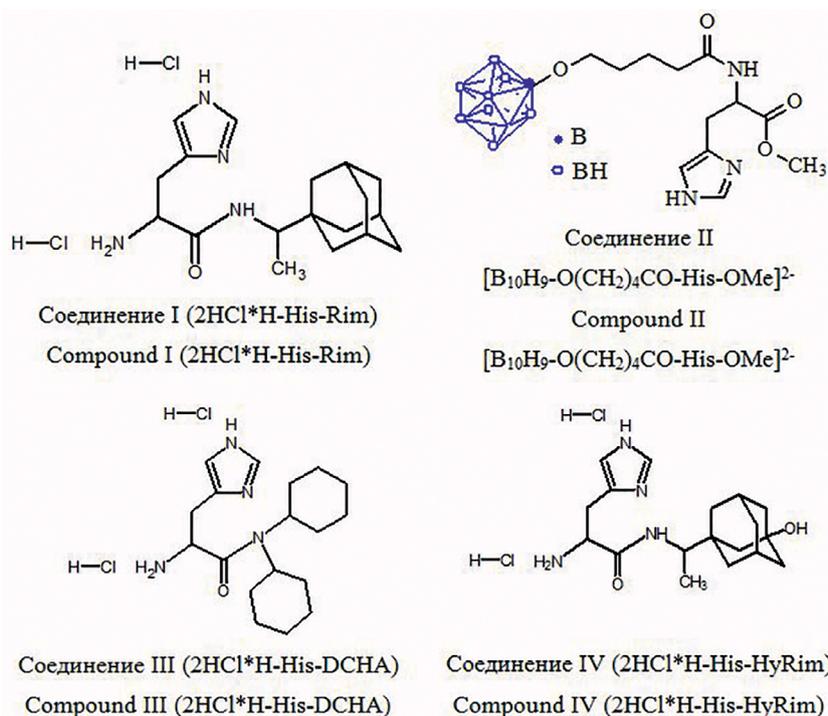


Рис. 1. Синтетические соединения остатка гистидина с объёмными каркасными заместителями.

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

с препаратами в течение 96 ч при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO₂ визуально оценивали состояние клеточного монослоя, сравнивая его с клеточным контролем (без соединений) по четырёхкрестовой схеме, где четыре креста – 100%-я гибель клеток, два креста – 50%-я цитотоксическая концентрация (CC₅₀). Таким образом, на основании сравнения состояния клеточного монослоя без препаратов с клетками, содержащими соединения в соответствующей концентрации, определяли цитотоксическое действие соединений на монослой клеток.

Оценка противовирусного действия соединений

Оценку вирусной продукции по цитопатическому действию (ЦПД) осуществляли на основе анализа жизнеспособности клеток при помощи микроскопирования с целью визуального определения границы вирусного повреждения клеток, а также для осуществления контроля токсичности доз субстанций.

Эксперимент по оценке жизнеспособности клеток в тесте на противовирусную эффективность проводили в диапазоне концентраций препарата 2500,0... 0,5 мкг/мл путём разведения исходной концентрации в лунках 96-луночного планшета. Противовирусную активность соединений оценивали визуально под микроскопом через 96 ч после инфицирования по ингибированию ЦПД вируса в культуре клеток Vero E6.

Результаты

Соединение I проявляло устойчивый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при очень узком диапазоне нетоксичных концентраций 75,0...30,0 мкг/мл и вирусной нагрузке 100 доз. 50%-я цитотоксическая доза составила около 70 мкг/мл, концентрация достижения стабильного противовирусного эффекта – около 31 мкг/мл (таблица). Для снижения токсичности и улучшения противовирусных свойств соединения I адамантановый карбоцикл был заменён на два циклогексановых

остатка в виде дициклогексил амина (2HCl*H-His-DCHA, соединение III). Токсичность соединения I, действительно, удалось снизить в несколько раз, CC₅₀ составила 312 мкг/мл, однако противовирусная активность соединения III значительно ниже, чем для соединения I, и составляет около 156 мкг/мл. При этом противовирусный эффект соединения III наблюдался лишь на границе между токсичными и нетоксичными концентрациями. При снижении концентрации ниже 156 мкг/мл противовирусный эффект соединения III исчезал. Причём следует отметить, что произошло ухудшение растворимости соединения III, по сравнению с полностью водорастворимым соединением I. Для растворения соединения III использовали композицию 10% ацетонитрила, 30% 4%-го раствора PEG 1150 в воде и 60% среды DMEM. Другим способом увеличения сродства вещества к белку-мишени для образования дополнительных водородных связей с аминокислотными остатками внутренней поры канала белка E было добавление гидроксильной группы в паразоложение в карбоцикл адамантана (соединение IV).

Противовирусные свойства соединения IV, как и соединения III, проявлялись в более высоких концентрациях по сравнению с соединением I. Более того, соединение IV намного хуже растворялось в водной среде, чем соединение I. Такая модификация не привела к улучшению противовирусных свойств соединения I. При высокой действующей концентрации соединения нет перспектив получения высокого химико-терапевтического индекса (по крайней мере, в экспериментах *in vitro*), что является важным фактором для кандидатного соединения. Из предыдущих исследований сравнения соединения гистидина с кластерным анионом бора (соединение II) и соединения I в отношении вируса гриппа А показано, что соединение II несколько превосходило по противовирусным свойствам соединение I [23], 50%-я ингибирующая доза составляла 3,2 мкг/мл против 7,5 мкг/мл для соединения I. Важно, что соединение II имеет высокую растворимость в водной среде, как и соединение I, так как представляет собой динатриевую соль. Испытания противовирусных свойств соединения II в отношении SARS-CoV-2 показали их наличие в диапазоне концентраций 19,5...4,9 мкг/мл.

Обсуждение

Соединение I 2HCl*H-His-Rem проявляло противовирусный эффект против штаммов вируса гриппа А, резистентных к препаратам Амантадин и Ремантадин. Это соединение являлось ингибитором функции ионного канала M2 вируса гриппа А [22]. Существовали некоторые предпосылки к тому, что удастся достигнуть эффекта подавления функции канала, образованного белком E коронавируса. Белок E слабо представлен на поверхности вириона, зато в инфицированных клетках содержится в большом количестве. Белок E в основном распространён во внутриклеточных мембранах между эндоплазматическим ретикулом (ER) и цистерна-

Таблица. Биологические свойства соединений гистидина с каркасными заместителями

Table. Biological properties of histidine derivatives with cage substituents

№	Соединение Compound	CC ₅₀ [*] мкг/мл CC ₅₀ [*] mkg/ml	IC ₅₀ [*] мкг/мл IC ₅₀ [*] mkg/ml	SI
1	Соединение I Compound I 2HCl*H-His-Rem	78,1	31,2	2,5
2	Соединение II Compound II Na ₂ [B ₁₀ H ₉ -O(CH ₂) ₄ CO-His-OMe]	19,5	9,8	2
3	Соединение III Compound III 2HCl*H-His-DCHA,	312,5	156,3	2
4	Соединение IV Compound IV 2HCl*H-His-HyRim	312,5	156,3	2

ми комплекса Гольджи. В этих местах он участвует в сборке вируса и внутриклеточном транспорте. Соединение I проявляло некоторый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при вирусной нагрузке 100 доз и концентрации 31,2 мкг/мл. J.S. Kim и соавт. [28] в своих исследованиях *in silico* с известным блокатором ионных каналов амантадином (1-аминоадамantan) высказали гипотезу, что амантадин блокирует ионный канал SARS-CoV-2, предотвращая выход вирусного ядра в цитоплазму клетки. Для проведения молекулярного компьютерного моделирования стыковки соединения I и кристаллографической структуры белкового канала E был использован онлайн-сервис BIO-NPC Achilles Blind Docking Server. Этот инструмент выполняет исчерпывающую серию расчётов стыковки по всей поверхности белка, чтобы найти места с наилучшей аффинностью к белку мишени. После расчёта сходства этот сервис группирует результаты в соответствии с пространственным перекрытием полученных положений. Структурная модель лиганда (лекарства) была сгенерирована в программном продукте NuragChem 8.0.8 (Nuragcube). Проведя молекулярное моделирование стыковки поверхностей белка и лиганда на модели трансмембранной области виropорина E (PDB: 5X29), удалось получить положительное решение, а именно обнаружение соединения I в сайте сужения канала в окружении остатков Phe26 и Ala22 (рис. 2). Соединение I стерически блокирует пору канала, составленную из пяти субъединиц белка E, образуя нековалентное взаимодействие с кольцом сопряжения фенильных радикалов от остатков Phe26. Соединение-ингибитор также обнаруживается между спиралями отдельных цепей. На рис. 2 представлены пять положений молекул со-

единения I в межспиральном пространстве, и эти решения не эквивалентны для каждой цепи.

Другим объяснением противовирусного действия соединения I на угнетение репликации SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro* могут являться слабоосновные свойства, которые проявляет соединение I. Известно, что повышение pH эндосомального содержимого препятствует распаковке вирусных частиц. Открытая аминогруппа и имидазольная группа действуют как слабое основание, а карбоцикл способен мигрировать через мембраны как гидрофобный агент. В этом случае механизм действия соединения I, скорее, сходен с действием препарата гидроксихлорохин сульфат, который применяли для лечения заболевших в первые месяцы пандемии COVID-19 [29]. Важно отметить, что в результате молекулярного моделирования для соединения III на той же модели виropорина E удалось получить положительное решение, а именно обнаружение молекулы в сайте сужения насосного механизма (Phe26). Но эксперименты, проведённые *in vitro* для соединения I и III, не подтверждают равноценного действия этих соединений на репликацию вируса. Скорее всего, противовирусный эффект достигается лишь за счёт слабоосновных свойств остатка гистидина и поэтому проявляется лишь в высоких концентрациях соединений в лунке планшета.

Цитотоксический эффект соединения II был выше, чем для соединения I, с другой стороны, действующая концентрация была ниже. Полное подавление ЦПД вируса соединением II наблюдалось при концентрации 9,8 мкг/мл против 31,2 мкг/мл для соединения I. Механизм действия соединения II не установлен. Можно предположить, что обнаруженные противовирусные свойства соединения II, вероятно, связаны со стерическими особенностями молекулы,

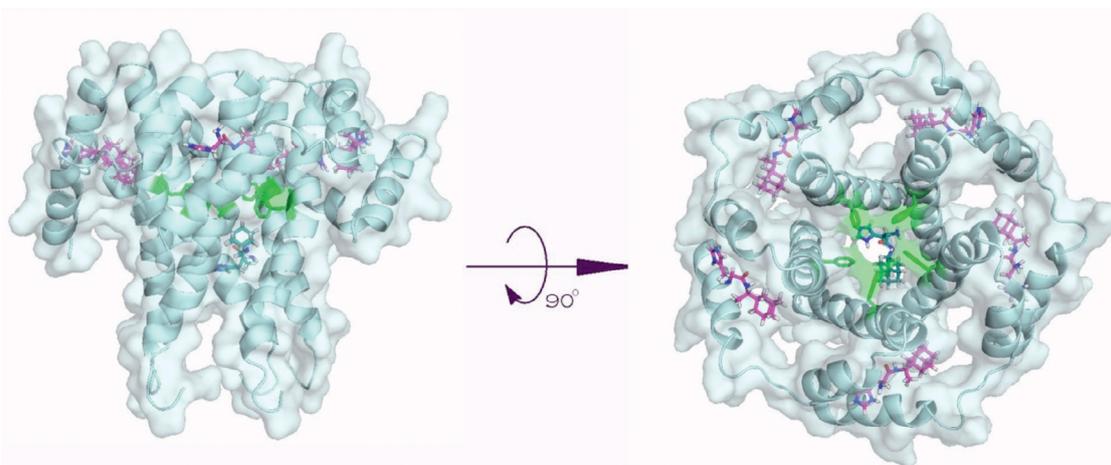


Рис. 2. Комплекс соединения I с трансмембранным доменом пентамера белка E (виropорин) коронавируса SARS-CoV-2 (PDB: 5X29). Представлены виды сверху и сбоку, показаны положения лиганда в поре канала и межспиральном пространстве отдельных субъединиц, сопряжение фенильных колец от остатков Phe26 каждой цепи, которое закрывает и открывает канал для направленного транспорта одновалентных ионов.

Fig. 2. Complex of compound I with the transmembrane domain of the E protein pentamer (viroporin) of the SARS-CoV-2 coronavirus (PDB: 5X29). 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.

позволяющими заблокировать функцию виropорина. Известно, что виropорин E SARS-CoV обладает активностью ионного канала для одновалентных катионов с 10-кратным предпочтением к ионам натрия, по сравнению с ионами калия [30]. Находясь внутри поры канала, анион соединения II обладает способностью захвата в координационную сферу положительно заряженных ионов, что нарушает функцию виropорина, направленную на создание благоприятного гомеостаза, созревания и внутриклеточного транспорта белков вируса.

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. Белок E коронавируса представляется наиболее вероятной мишенью для молекул ингибиторов на основе адамантил-аминокислот. Потенциально полученные результаты можно применить для других виropоринов РНК-содержащих вирусов, таких как Vpu из вируса иммунодефицита человека 1-го типа, p7 из вируса гепатита С, E5 из папилломавируса и вируса бычьей диареи (BVDV), NSP-4 из ротавируса и других вирусных ионных каналов.

ЛИТЕРАТУРА

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- 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)
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schnitz 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Мишин Д.В. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropоринов РНК-содержащих вирусов. *Биоорганическая химия.* 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
- Garaev T.M., Odnorov 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>
- 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>
- Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Оdnorov A.I. Оценка противовирусной активности соединения 2HCl*H-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>
- 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.
- 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 виропоринов РНК-содержащих вирусов. *Биоорганическая 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>

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. Seroprevalence 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., Dinnon 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, Iopinavir, 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., Varattanavech A., Peruvushin 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., Odnovorov 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., Odnovorov A.I. Assessment of the antiviral activity of 2HCl* 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 decahydrocloso-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>

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. Смородинцева» 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 введения

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

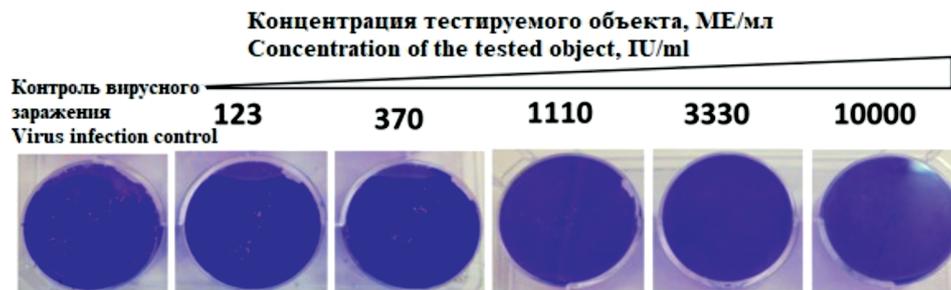


Рис. 1. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при лечебной схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

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.

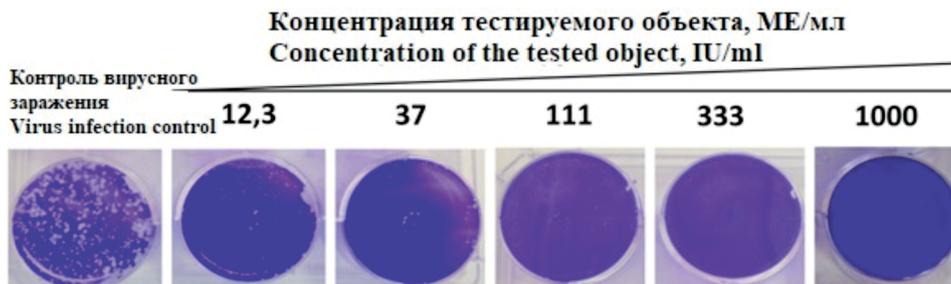


Рис. 2. Результаты анализа противовирусной активности тестируемого объекта «интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат для приготовления раствора для интраназального введения 100 000 МЕ» в отношении SARS-CoV-2 при профилактической схеме применения по ингибированию бляшкообразования.

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
Интерферон гамма Interferon gamma	Профилактическая Preventive	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
		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
Интерферон гамма Interferon gamma	Лечебная Therapeutic	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	0
		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
Интерферон гамма Interferon gamma		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

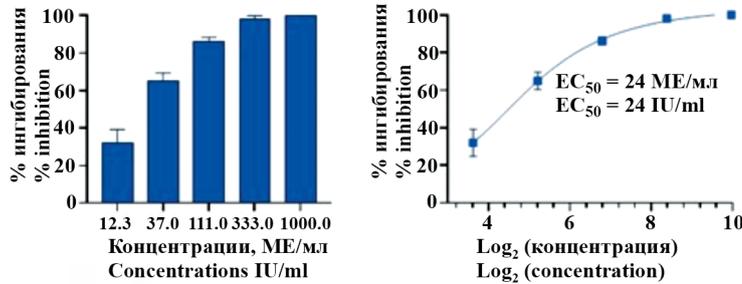


Рис. 3. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в профилактической схеме применения.

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

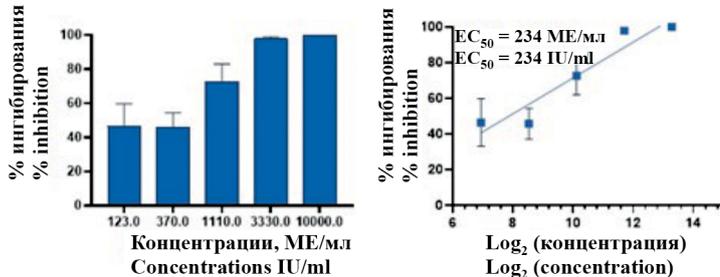


Рис. 4. Результат оценки действия на ингибирование бляшкообразования при заражении клеточного монослоя SARS-CoV-2 в дозе 100 TCID₅₀ (3 × 10 БОЕ) в лечебной схеме применения.

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%. Полумаксимальная 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 полумаксимальной 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., Щукина 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>
 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 [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая]. 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)

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)

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 углубленного 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 сильновыраженной пигментацией, 28,6% – слабовыраженной 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-

тренных 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., Faghiloo 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 BART1-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/10.1008/01676830.2017.1279659>
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., Склярва 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. *Ophthalmology.* 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>

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 пасажа. 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 энцефаломиелита 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. 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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

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

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, Abdukakhhor 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 Antiplateau 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; chiroptera

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-poleshchuk@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 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

Введение

Лиссавирусы являются широко распространёнными нейротропными РНК-вирусами, поражающими теплокровных животных и человека, вызывая смертельный энцефалит или бешенство (синонимы – гидрофобия, лиссавирусный энцефалит). У человека инфекция проявляется в форме острого энцефаломиелита, как правило, приводящего к смерти в течение 10–15 дней после появления клинических симптомов болезни. Глобальные масштабы распространения лиссавирусов, их высокая патогенность для человека и млекопитающих, практически абсолютная летальность, отсутствие средств лечения развившегося заболевания определяют их первостепенную значимость для здоровья человека и животных [1, 2].

Лиссавирусы объединены в род *Lyssavirus*, относящийся к семейству *Rhabdoviridae*, отряду *Mononegavirales*, который на сегодняшний день включает 17 видов, признанных Международным комитетом по таксономии [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).

Ещё один вирус ожидает подтверждения статуса вида – *Kotalahti bat lyssavirus* (KBLV) [3]. К началу 2023 г. из 17 утверждённых видов 15 были обнаружены у рукокрылых. Только два лиссавируса (*Lyssavirus mokola* и *Lyssavirus ikoma*) пока не найдены среди представителей указанного отряда [4–7].

Рукокрылые являются важнейшим резервуаром лиссавирусов. Их разнообразие и глобальное распространение определяет биологическое разнообразие патогенов, а целенаправленное изучение позволяет обнаруживать их новые виды. За последние 20 лет 8 новых видов были открыты в Европе, Азии, Африке. Гибель людей зафиксирована от 7 видов: RABV – около 60 000 случаев в год при заражении от наземных млекопитающих и 2–3 случая в год при заражении от летучих мышей в Северной Америке; EBLV-1 – 2 случая; EBLV-2 – 2 случая,

ABLV – 3 случая, DUVV – 3 случая, IRKV – 1 случай, MOKV – 2 случая) [8–13].

Самым широко распространённым видом как в географическом плане, так и с точки зрения видового разнообразия поражаемых и поддерживающих циркуляцию патогена млекопитающих является лиссавирус бешенства (*Lyssavirus rabies*). Он циркулирует в популяциях наземных млекопитающих, главным образом хищных (отряд *Carnivora*), по всему миру и в популяциях рукокрылых (отряд *Chiroptera*) в Северной и Южной Америке. *Lyssavirus rabies* является причиной подавляющего большинства случаев гибели человека и животных. Другие виды лиссавирусов встречаются только за пределами Америки, по-видимому, более ограничены географически и имеют узкий круг хозяев. В Европе, включая европейскую часть России, кроме лиссавируса бешенства были выявлены ещё 5 видов лиссавирусов, в Африке – 6, в Австралии – 1, в Азии, включая территорию России, – 5 [7, 11, 12, 14].

В природных очагах России повсеместно циркулирует лиссавирус бешенства [15, 16], преимущественно в популяциях диких псовых (семейство *Canidae*) – лисиц, корсаков, енотовидных собак, волков, песцов [17–21].

У рукокрылых России известны находки лиссавируса Иркут (*Lyssavirus irkut*) в 2002 г. у трубконоса большого (*Murina leucogaster*) в Иркутской области и лиссавируса западно-кавказских летучих мышей (*Lyssavirus caucasicus*), выделенного от длиннокрыла обыкновенного (*Miniopterus schreibersii*) из Краснодарского края [22, 23].

Случаи гидрофобии, описанные в стране с 1534 по 2018 г., в подавляющем большинстве были связаны с контактами с дикими и домашними хищниками (собака, кошка, волк, лисица, енотовидная собака и др.) [24]. Молекулярно-генетическое типирование вирусов, выделенных от погибших после контактов с этими животными, выявило их принадлежность виду *Lyssavirus rabies* [15, 25, 26].

Исключением являлись два задокументированных случая гибели людей, связанных с нападением летучих мышей. Первый случай был зафиксирован в 1985 г. в Белгородской области. От погибшей 11-летней девочки был выделен лиссавирус европейских летучих мышей I типа, современное название которого – лиссавирус Гамбург (*Lyssavirus hamburg*) [3]. Работа с этим лиссавирусом, штаммом Юли (Rabies-related Yuli virus), после его выделения профессором М.А. Селимовым [27] параллельно проводилась в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского под руководством доктора медицинских наук С.В. Грибенча. Второй случай был выявлен в 2007 г. от погибшей в Приморском крае 20-летней девушки; тогда выделили лиссавирус Озёрное – аналог вируса Иркут [28].

Гибель людей после укусов рукокрылыми на территории России фиксировали ещё дважды. В этих случаях лиссавирусы не были идентифицированы до вида, а гибель от лиссавирусной инфекции установлена по клинико-эпидемиологическим данным. Первый, самый ранний по времени регистрации случай смерти человека, был отмечен в 1977 г. в Ворошиловграде

(ныне Луганск, Луганская Народная Республика РФ), когда летучая мышь укусила девочку 15 лет [29]. Вторым случаем был выявлен в 2002 г. в Молодогвардейске (Луганская Народная Республика РФ): летучая мышь укусила мужчину 34 лет [30].

Таким образом, из выявленных на территории России 4 видов лиссавирусов – *Lyssavirus rabies*, *Lyssavirus hamburg*, *Lyssavirus irkut*, *Lyssavirus caucasicus* – представители первых трёх являлись причиной гибели людей. Три последних были выделены от летучих мышей: *Lyssavirus hamburg* только на территории Европы, *Lyssavirus irkut* – на территории России и Китая, *Lyssavirus caucasicus* – на территории России и в Африке [12, 31, 32]. В период 1977–2007 гг. гибель людей после укусов рукокрылыми была установлена 4 раза.

В 2018–2021 гг. в Дальневосточном регионе России были зафиксированы три новых анализируемых в этой работе случая лиссавирусной инфекции у человека после контактов с летучими мышами.

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 (Благовещенск) в июне 2019 г., в Приморском крае в сентябре 2019 г. (Фокино) и в августе 2021 г. (с. Заветное). По клинико-эпидемиологическим данным в двух первых случаях был диагностирован энцефалит неустановленного генеза (менингоэнцефалит неясной этиологии, вирусный энцефалит неуточнённый), в последнем – острый энцефалит лиссавирусной этиологии, тяжёлое течение.

Специфический антиген вируса бешенства выявляли методом флуоресцирующих антител [33] с использованием поликлонального антирабического иммуноглобулина, меченного флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ-иммуноглобулин) производства ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт здоровья животных» (ВНИИЗЖ).

Выделение вирусов Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019 и Rus(Primorsky)9220H_2021 выполнено в ходе биопробы на беспородных белых мышцах массой 8–12 г путём интрацеребральной инокуляции 0,03 мл 10% суспензии головного мозга погибших людей, приготовленной на растворе Хенкса [34]. Специфическую гибель мышей от рабдовируса подтверждали обнаружением его антигена методом флуоресцирующих антител в отпечатках головного мозга животных. Инфекционную активность вирусов в нативном материале, а также на уровне 2-го и 4-го пассажа определяли путём интрацеребральной инокуляции 0,03 мл суспензий головного мозга погибших людей, 10-кратно раститрованных на растворе Хенкса от 10^{-1} до 10^{-7} . Расчёт титра вируса проводили по Reed и Munch [35]. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal

Use (IAVES, July 23, 2010). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей пациентов. Исследования одобрены Этическим комитетом ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (протокол б/н от 27.01.2021).

Real-time ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) проводили с наборами реагентов для выявления РНК вируса бешенства от ООО «Синтол» (Москва) и ООО «Фрактал Био» (Санкт-Петербург) на амплификаторе Rotor-Gene 6000.

Суммарную вирусную РНК выделяли из головного мозга мышей, погибших в ходе 1-го пассажа, с использованием реагента TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. ОТ-ПЦР и получение кДНК (комплементарной) проводили с использованием случайных гексануклеотидных праймеров в составе набора для реверсии «Реверта-Л» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва).

Для определения первичной нуклеотидной последовательности фрагмента гена нуклеопротеина амплифицировали перекрывающиеся фрагменты [36]. Для получения ПЦР-фрагментов выделенных вирусов Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019, Rus(Primorsky)9220H_2021 использовали пары праймеров, описанные ранее P.R. Heaton и соавт. [37] для гена, кодирующего нуклеопротеин: JW12-JW6 (DPL), JW6 (M), JW6 (E), а затем f1 и r1, описанные Y. Liu и соавт. [38]. Амплификацию проводили на амплификаторе Axygen MaxyGene II Thermal Cycler (Axygen Scientific Inc., США).

Наличие ПЦР-продукта необходимой длины контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле ($1 \times$ ТАЕ (трис-ацетатный буфер)) с добавлением бромистого этидия. Очистку ПЦР-продуктов и их концентрацию осуществляли с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Очищенный ПЦР-продукт секвенировали, используя вышеуказанные пары праймеров и набор реагентов BigDye™ Terminator v1.1. Cycle Sequencing Kit, с последующим анализом продуктов реакции на генетическом анализаторе SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Структуру полученных хроматограмм анализировали с помощью компьютерной программы Chromas 2.6.6.0 (Technelysium Pty Ltd, Австралия). Полученные фрагменты генома вирусов выравнивали в BioEdit 7.0.5.3 (Inform Technology, Inc., США). Длина полученных продуктов амплификации фрагментов генов нуклеопротеина лиссавирусов составила 1258 н.о. (позиция генома – 71-1328 относительно Reference Sequence NC_001542.1).

Поиск идентичности нуклеотидов полученных сиквенсов выполняли с помощью программы BLASTN 2.12.0+ в базе данных NCBI¹.

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

Анализ филогенетических отношений полученных последовательностей нуклеопротеина и построение дендрограмм выполняли в программе MEGA7 [39] с применением алгоритма Neighbor-Joining, используя депонированные последовательности фрагментов гена *N* из электронной базы данных GenBank ($n = 51$).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами, используя Microsoft Office Excel 2016.

Результаты

Территория России характеризуется наличием природных очагов бешенства, в которых циркуляцию вируса поддерживают дикие хищники преимущественно семейства псовых (*Canidae*) [18, 21]. Однако с 2019 г. стала наблюдаться нетипичная для России картина: за три года было выявлено три случая гибели людей после укусов рукокрылыми – все на территории Дальнего Востока.

Первый пострадавший от рукокрылых – работающий мужчина 36 лет. В мае 2019 г. он находился на даче в Благовещенске Амурской области. При надевании рабочей рукавицы был дважды укушен в безмянный палец левой руки оказавшимся там рукокрылым. Отмечалось небольшое кровотечение. Пострадавший самостоятельно обработал раны, за медицинской помощью не обращался. Заболевание начало развиваться на 21-й день после укуса. Кома развилась на 10-й день заболевания. Смерть наступила на 15-й день болезни.

Второй пострадавший – пенсионер 73 лет. Подвергся нападению летучей мыши в г. Фокино Приморского края в конце августа 2019 г. Мужчина работал в гараже. Рукокрылое напало и нанесло укус в шею. За медицинской помощью не обращался. Инкубационный период составил около 15 суток. На 2-е сутки заболевания наступила смерть.

Третий пострадавший – работающий мужчина на 35 лет. Находясь на реке в с. Заветное Чугуевского района Приморского края в середине июня 2021 г.,

был укушен летучей мышью за верхнюю губу. Рану обработал самостоятельно, за медицинской помощью не обращался. Заболел на 52-й день после укуса. Кома зафиксирована на 5-е сутки болезни. Смерть наступила на 8-е сутки.

У всех пострадавших заболевание развивалось по типу менингоэнцефалита, осложнённого гипертермическим синдромом (до 39–40, 39 и 37,2 °С соответственно), интоксикацией, судорожным синдромом, нарушением речи, сознания с выраженной сердечно-сосудистой, дыхательной и церебральной недостаточностью. Во всех случаях зафиксирован отёк мозга. В первом случае отметили отёк лёгких и двустороннюю пневмонию, в третьем – выраженные генерализованные миоклонии, опсоклонус, миоклоническую ретракцию век, бульбарный синдром, тетрапарез, тромбоз центральных вен сетчатки обоих глаз, кератоконъюнктивит. В первом случае исключали отравление суррогатами алкоголя и пневмонию, в третьем – ишемический инсульт.

Особенности случаев лиссавирусной инфекции у пострадавших после укусов летучими мышами в Дальневосточном регионе обобщены в табл. 1. Виды рукокрылых, явившиеся источниками заражения в описываемых случаях, не установлены.

Материал от погибших был доставлен в референс-центр по мониторингу за бешенством, действующий на базе ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора в соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116. Необходимо отметить, что благодаря бдительности медицинских специалистов и наличию референс-центра на эти случаи обратили внимание специалисты и удалось расшифровать этиологию инфекции.

Для исследования материала в ПЦР-реакции формата Real-time использовали набор реактивов для выявления РНК вируса бешенства от ООО «Синтол» (Москва), зарегистрированный для использования в медицинских целях. Тест-система проводит детекцию специфиче-

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

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

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

ской РНК лиссавируса бешенства (вид *Lyssavirus rabies* – классический вирус бешенства) по двум каналам – Yellow и Orange. Регистрация роста сигнала по одному из каналов свидетельствует о наличии в образце специфических фрагментов РНК генома указанного патогена.

Материал от людей, погибших после укуса рукокрылых, тестировали параллельно с положительными образцами, принадлежащими диким хищным животным.

В образцах от всех погибших людей положительный сигнал, свидетельствующий о наличии в секционном материале возбудителя бешенства, был получен по каналу Yellow (рис. 1 а, б, в). Наличие патогенов в образцах от наземных диких хищников традиционно регистрировали положительно по каналу Orange (рис. 1 г).

С помощью тест-системы от ООО «Фрактал Био», зарегистрированной для ветеринарных целей, которая адаптирована для выявления классического лиссавируса бешенства, специфической РНК лиссави-

русов в образцах от людей не выявили, тогда как все образцы от хищников прошли положительно.

Опираясь на известные данные, согласно которым в популяциях наземных хищных циркулирует классический лиссавирус бешенства, предположили, что выявленный с помощью тест-системы от ООО «Синтол» возбудитель лиссавирусной инфекции может относиться к отличному от классического виду лиссавирусов, а также что патогены могут относиться к филогруппе I, общей с классическим лиссавирусом.

В отпечатках головного мозга, приготовленных с секционного материала погибших, в реакции иммунофлуоресценции с поликлональным антирабическим иммуноглобулином производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» был обнаружен специфический антиген вируса бешенства (рис. 2). Интенсивность специфического свечения двух образцов (рис. 2 а, в) была оценена на 4 балла (чётко видимое жёлто-зелёное свечение), ещё одного (рис. 2 б) – на 2 балла.

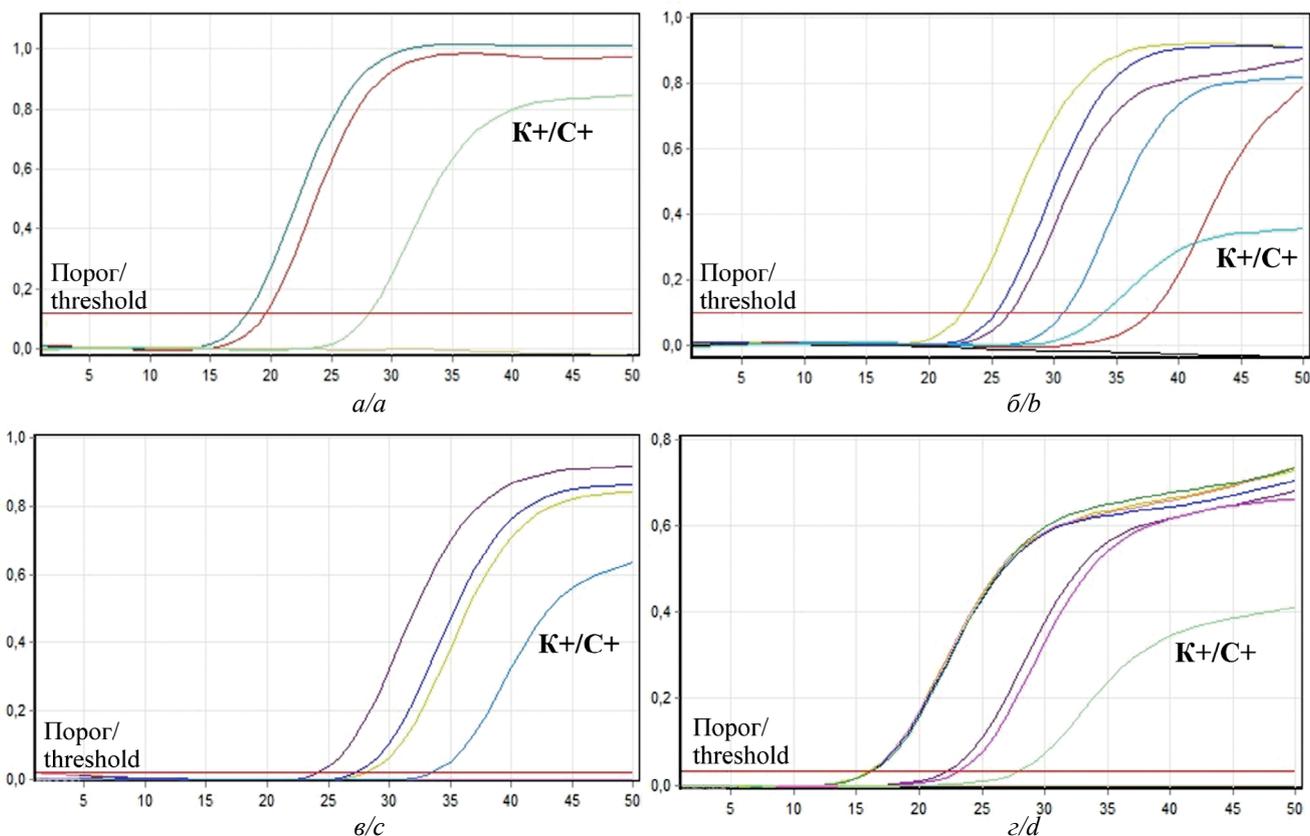


Рис. 1. Результаты диагностики образцов от людей, погибших после укусов рукокрылыми, и материала от диких хищников в ПЦР Real-time с набором реагентов для выявления РНК вируса бешенства от ООО «Синтол» по каналам детекции специфики: Yellow: а – человек, Амурская область, 2019 г.; б – человек, Приморский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

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: а – human, Amurskaya region, 2019; б – human, Primorsky Krai, 2019; в – human, Primorsky Krai, 2021 and Orange: г – samples of wild carnivores, Amur Region, 2019. In illustrations а, б, в, г 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.

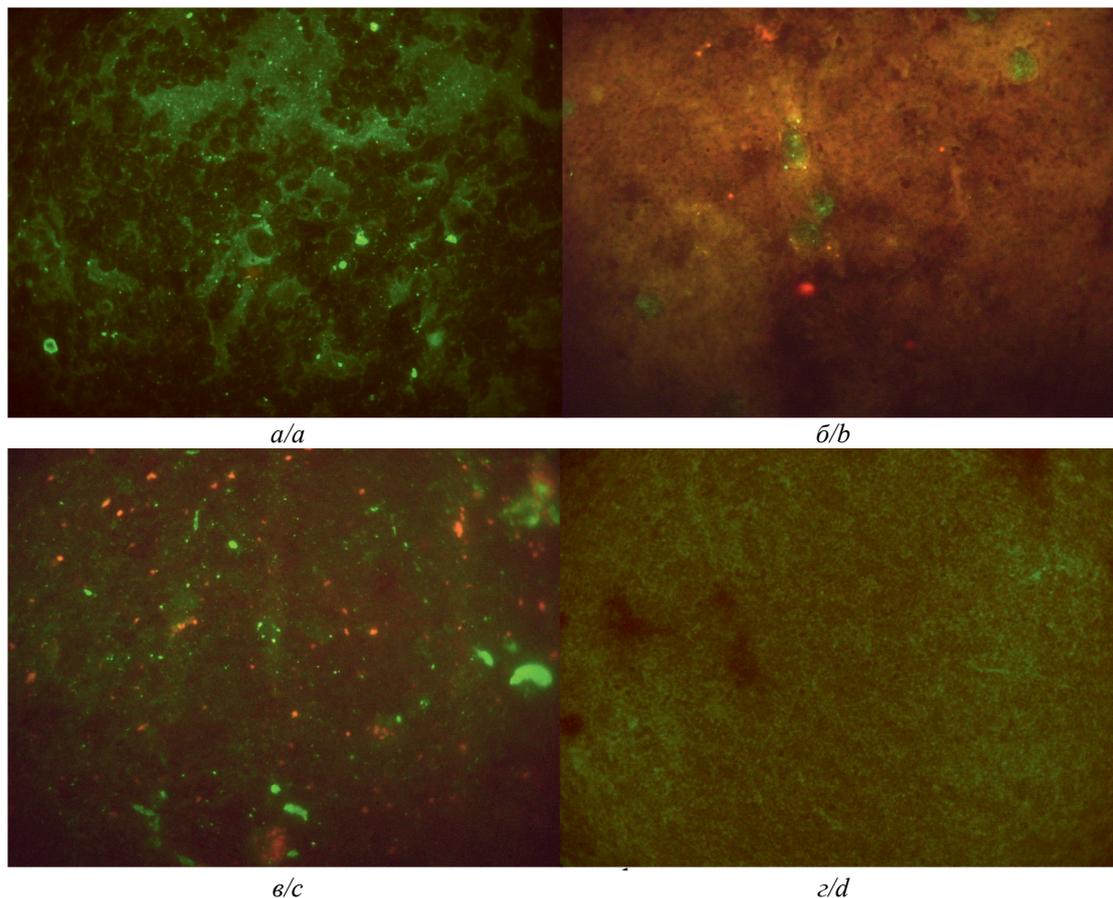


Рис. 2. Специфическая иммунофлуоресценция антигена лиссавируса бешенства в отпечатках головного мозга, полученная методом флуоресцирующих антител с использованием поликлонального Ig (ФГБУ «ВНИИЗЖ»). Отпечатки сделаны с первичного материала (головной мозг): *a* – человек, Амурская область, 2019 г.; *б*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

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.

В ходе биопробы на беспородных белых мышах путём их интрацеребрального заражения выделили вирусы, обозначенные Rus(Amur)_8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019 и Rus(Primorsky)9220H_2021. Инкубационный период для изолята Rus(Amur)_8947H_2019 составил 10–13 дней (в среднем $11,5 \pm 0,3$), для Rus(Primorsky)_8949H_2019 – 7–10 дней (в среднем $8,6 \pm 0,7$), для Rus(Primorsky)_9220H_2021 – 6–8 дней (в среднем $7,1 \pm 0,1$) (табл. 2).

Все животные, заражённые первичным материалом, заболели с типичными клиническими признаками, из которых преобладали параличи, парезы. Наблюдались вялость, слабость, судороги, снижение активности, подвижности. Гибель животных наступала в течение суток. Гибель мышей от лиссавирусной инфекции подтверждали путём обнаружения специфического антигена в отпечатках, приготовленных с головного мозга животных, павших либо умерщвлённых на высоте клинических признаков.

Для выделенных вирусов провели пассаж на беспородных белых мышах массой 8–12 г. На уровне 3-го пассажа инкубационный период для возбудителей Rus(Amur)8947H_2019 и Rus(Primorsky)8949H_2019 сократился до 5 дней, для Rus(Primorsky)9220H_2021 – до 4–5 дней. Титр вируса Rus(Amur)8947H_2019, составивший в первичном материале $4,4 \lg LD50_{0,03}$, на уровне 4-го пассажа составил $4,7 \lg LD50_{0,03}$. Для вируса Rus(Primorsky)8949H_2019 инфекционная активность соответственно составила $4,6 \lg LD50_{0,03}$ в первичном материале и $5,6 \lg LD50_{0,03}$ – на уровне 6-го пассажа. Титр вируса Rus(Primorsky)9220H_2021 в первичном материале составил $4,3 \lg LD50_{0,03}$, на уровне 4-го пассажа – $5,4 \lg LD50_{0,03}$ (табл. 2).

В ходе ПЦР и секвенирования для изолятов Rus(Amur)8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019 и Rus(Primorsky)9220H_2021 получили фрагменты последовательностей генов нуклеопротеина, длина которых составила 1258 н.о. (номера в GenBank: OQ377548 – OQ377550).

Таблица 2. Характеристика выделенных лиссавирусов, вызвавших гибель людей после укусов рукокрылыми
Table 2. Characteristics of the isolated lyssaviruses that caused the death of people after being bitten by bats

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

Таблица 3. Поиск идентичности нуклеотидов полученных сиквенсов с помощью BLASTN 2.12.0+
Table 3. Search for nucleotide identity of obtained sequences using BLASTN 2.12.0+

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

С помощью программы BLASTN 2.12.0+ было установлено, что последовательности вирусов Rus(Amur)_8947H_2019, Rus(Primorsky)_8949H_2019 и Rus(Primorsky)_9220H_2021 идентичны лиссавирусам Иркут: вирусу Озёрное, выделенному от человека, погибшего в 2007 г. в Приморском крае, – на 98,17–99,68%; вирусу IRKV-THChina12, выделенному в 2012 г. от летучей мыши в Китае (уезд Тунхуа, провинция Гири), – на 98,17–98,97%; вирусу FX17, выделенному в 2017 г. от собаки в Китае (городской округ Фусинь), – на 98,01–98,81%; вирусу Иркут, выделенному от летучей мыши в 2002 г. в Иркутске, – на 92,75–93,15% (табл. 3).

Сходство с лиссавирусом Гамбург (EBLV-1, изолят 13424, Испания, 1989 г.) составило 79,08–79,28%, с лиссавирусами классического бешенства – 76,75–77,64% (табл. 3).

Было установлено, что вирусы, вызвавшие гибель людей в Амурской области и Приморском крае, образуют отдельный монофилетический кластер с лиссавирусами, относящимися к виду Иркут со 100%-й бутстреп-поддержкой (рис. 3).

Обсуждение

У описываемых трёх погибших типичной клинической картины бешенства (гидрофобии, аэрофобии, фотофобии), позволяющей без труда констатировать лиссавирусную этиологию энцефалита, не отмечали. С учётом нарастания тяжести заболевания на основании клинико-эпидемиологических данных был установлен диагноз «вирусный энцефалит неуточнённый», а в двух случаях на основании эпиданамнеза предположили энцефалит лиссавирусной этиологии.

Непохожий по клиническим проявлениям случай гибели 45-летней женщины зафиксировали в 2020 г. в Завитинске Амурской области после укуса собакой. Из-за неправильного отбора материала случай лабораторно не подтверждён. Но выраженная гидрофобия, аэрофобия, фотофобия, гипертермия, гиперсаливация, агрессия, наличие в анамнезе укуса собакой позволили констатировать гибель пострадавшей от бешенства по клинико-эпидемиологическим данным.

Важно помнить, что контакт с рукокрылым может пройти незамеченным для человека, и данные о нём могут отсутствовать в эпиданамнезе. Инфекция,

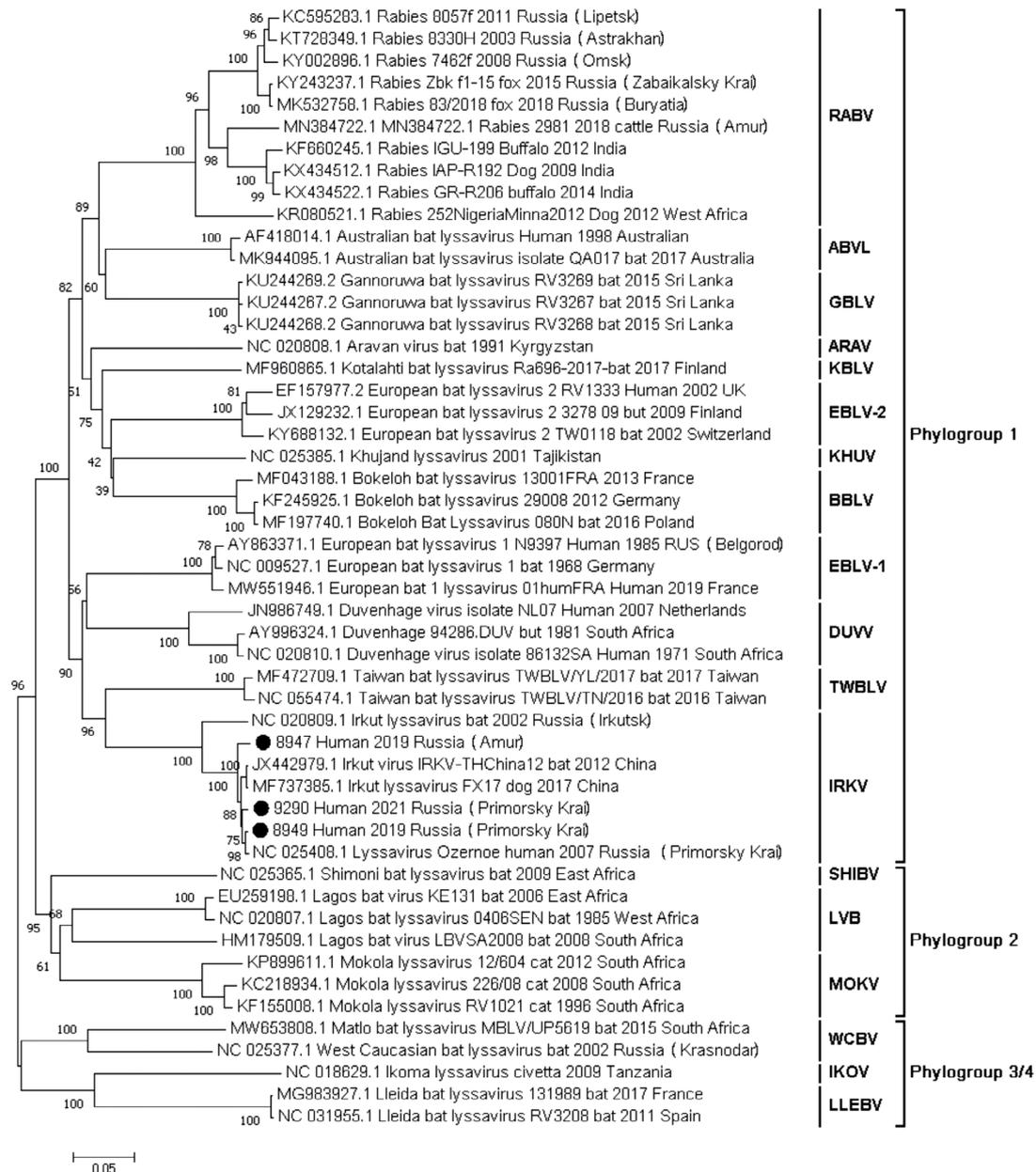


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма, полученная методом Neighbor-Joining для 51-го изолята лиссавирусов известных видов на основании выравнивания последовательностей гена нуклеопротеина (*N*, 1258 н.о.). В узлах указана доля дублирующих деревьев (бутстреп-поддержка, %), в которых ассоциированные таксоны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

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.

связанная с лиссавирусами, отличными от классического бешенства, может протекать без типичных клинических признаков. Имеются сообщения об атипичной симптоматике бешенства у человека, связанной с укусами рукокрылых (Всемирная организация здравоохранения, 2018), что затрудняет постановку диагноза. В связи с этим в случае смерти человека от острого энцефаломиелита неустановленной этио-

логии в пределах 10–15 дней от начала болезни, настоятельно рекомендуется проводить исследование секционного материала на лиссавирусную инфекцию. В СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (раздел XXII) нами актуализированы правила по профилактике бешенства и определена необходимость таких исследований.

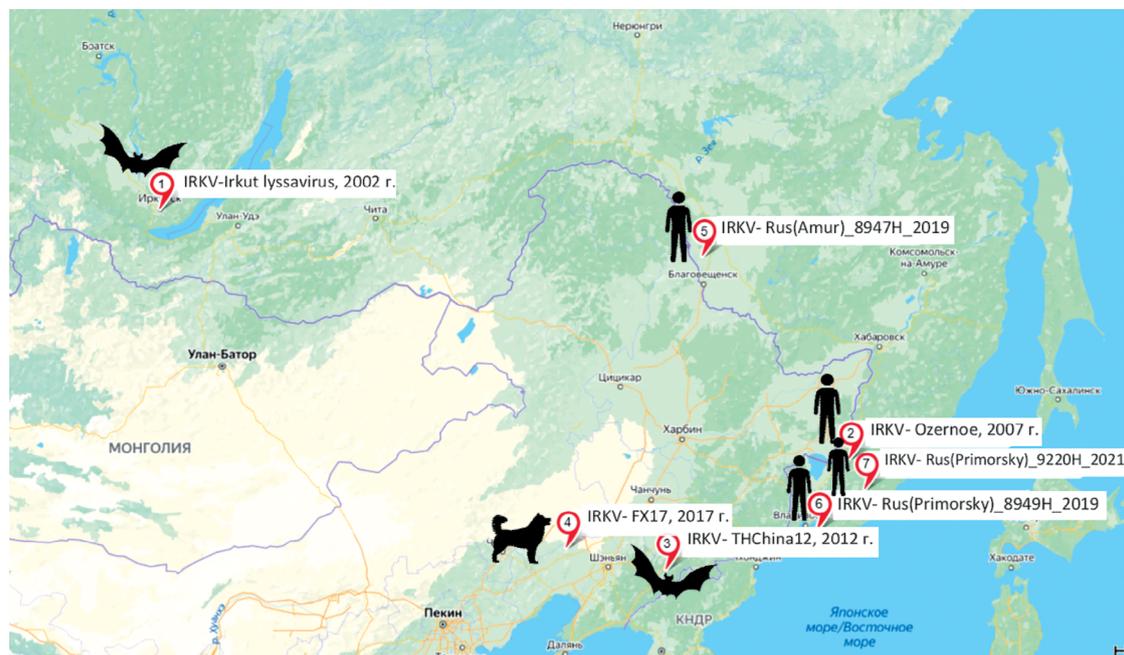


Рис. 4. Случаи выявления лиссавируса Иркут (IRKV) в хронологическом порядке: 2002 – Россия, Иркутск, большой трубконос; 2007 – Россия, Приморский край, Яковлевский район, с. Озёрное, человек; 2012 – Китай, провинция Гири, большой трубконос; 2017 – Китай, округ Фусинь, домашняя собака; 2019 – Россия,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

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.

Юг Дальнего Востока характеризуется активностью южно-дальневосточного природно-очагового региона [40], где лиссавирус бешенства циркулирует в популяциях лисиц и енотовидных собак. Периодически в эпизоотический процесс вовлекаются волки. В различные периоды эпизоотий регистрируют 40–60% случаев бешенства у домашних собак [20, 21].

За последние 20 лет на Дальнем Востоке зарегистрировали 11 случаев гибели людей от энцефалита лиссавирусной этиологии. Источниками лиссавируса бешенства в 3 случаях были домашние собаки, в 4 – дикие хищники (лисица – 3 случая, волк – 1) [20]. Рукокрылые являлись источником лиссавируса Иркут ещё в 4 случаях [28], в том числе описанных в данной работе.

Первоначально лиссавирус Иркут был выявлен у большого трубконоса (*Murina leucogaster*) в Иркутске в 2002 г. [23]. В 2007 г. была зафиксирована гибель человека от этого лиссавируса в с. Озёрное Приморского края [28] (рис. 4).

Изучаемый возбудитель обнаружен не только на территории России. В 2012 г. лиссавирус Иркут был выделен от большого трубконоса в провинции Гири (Цзилинь) в центре Северо-Восточного Китая [38]. Повторное обнаружение возбудителя у того же вида рукокрылых может указывать на его видоспецифичность. Через несколько лет, в 2017 г., в Китае в округе Фусинь вирус Иркут был выявлен у павшей домашней собаки, укусившей человека [41]. Это первое свиде-

тельство вероятной передачи вируса летучих мышей Иркут наземным плотоядным, а через них – человеку.

Анализ идентичности с помощью программы BLASTN и филогенетический анализ продемонстрировали, что полученные последовательности выявленных в 2019 и 2021 гг. вирусов Rus(Amur) 8947H_2019, Rus(Primorsky)8949H_2019 и вирус Rus(Primorsky) 9220H_2021 кластеризуются с лиссавирусами IRKV и идентичны представителям вида более чем на 90%. Известно, что порог идентичности нуклеотидов *N*-гена, обеспечивающий однозначное разделение всех лиссавирусов на виды, составляет 82% [42]. Идентичность с другими видами (EBLV-1 и RABV) составляла от 79,28 до 76,75%, что указывает на то, что выявленные вирусы относятся к виду IRKV.

Анализ филогенетических отношений, выполненный в программе MEGA7 для последовательностей фрагмента гена *N* всех известных видов лиссавирусов из GenBank (1258 н.о., $n = 51$), установил, что вирусы, вызывавшие гибель людей в Амурской области и Приморском крае, образуют отдельный монофилетический кластер с лиссавирусами Иркут, бутстреп-поддержка которого составляет 100% (рис. 3).

Все вирусы IRKV, несмотря на то что были выявлены в относительно отдалённых географических местах, очень близки (рис. 3, 4). Известно минимум три случая гибели людей от бешенства, связан-

ные с летучими мышами на северо-востоке Китая: в округе Тунгхуа в 1990-х гг. и в 2002 г. и в городе Лунцзин в 2010 г. Эти случаи были диагностированы только клинически, без лабораторного подтверждения. Видовая принадлежность рукокрылых, послуживших источниками гибели людей, не была установлена. Относительно редко сообщалось о случаях нападения летучих мышей на людей [38]. Ранее в Азии было зарегистрировано несколько неохарактеризованных случаев лиссавирусной инфекции у рукокрылых [11]. В 1967 г. в Таиланде антигены лиссавируса выявили у двух малайских коротконосых крыланов (*Cynopterus brachyotis*) методом флуоресцирующих антител [43]. В 1978 г. лиссавирус был обнаружен у сероголовой летучей лисицы (*Pteropus poliocephalus*) в Индии [44]. Эти данные указывают на возможность более широкого распространения лиссавируса Иркут. Он может быть распространён по всему ареалу большого трубконоса, в том числе в Сибири и на Дальнем Востоке. В циркуляцию патогена могут быть вовлечены другие виды рукокрылых.

На данном этапе нами показана перспективность использования молекулярно-генетических методов для детекции представителей рода *Lyssavirus*, не относящихся к классическому лиссавирусу бешенства, актуальность их использования для расшифровки случаев гибели людей от энцефалитов неясной этиологии, определены диагностические возможности ПЦР-тест-систем отечественного производства. Успешное выявление лиссавирусов неклассического бешенства с помощью одного из отечественных диагностикумов – случай исключительный, так как доступные отечественные ПЦР-тест-системы сконструированы специфичными для выявления классического лиссавируса бешенства.

Так, использованная для диагностики ПЦР-тест-система от ООО «Синтол» была разработана для выявления специфической РНК лиссавируса классического бешенства путём детекции двух участков генома: участка, кодирующего ген нуклеопротеина (*N*), и участка, кодирующего ген РНК-зависимой РНК-полимеразы (*L*). Все классические вирусы бешенства в данной системе детектировались по каналу, выявляющему фрагменты нуклеопротеина. Специфические фрагменты РНК лиссавирусов от погибших после укусов летучих мышей были выявлены только по каналу детекции гена *L*, а их участок нуклеопротеина данной тест-системой не детектировался. Исходя из этого, мы предположили, что тест-система ООО «Синтол» выявила другой лиссавирус, не относящийся к классическому лиссавирусу бешенства, возможно, относящийся к филогруппе I (см. ниже). При этом другая система, разработанная для детекции участка нуклеопротеина классического вируса бешенства, распространённого в России, не зарегистрировала указанные вирусы, продемонстрировав отсутствие их специфичности для выявления данного патогена.

В ходе вирусологического изучения вирусы были выделены в биопробе на беспородных белых мы-

шах, а их специфичность была подтверждена методом флуоресцирующих антител с поликлональным антирабическим иммуноглобулином. Такая возможность имеется благодаря тому, что ген *N* является высококонсервативным, индуцирует формирование перекрёстно реагирующих и комплемент-связывающих антител, а лиссавирусы разных видов показывают широкую антигенную перекрёстную активность на уровне детекции антигена *N*-белка [3]. Это позволяет стандартным диагностическим методам, направленным на детекцию нуклеопротеина (например, методом флуоресцирующих антител), путём реакции с поликлональным антирабическим иммуноглобулином, используя одинаковые диагностикумы, обнаруживать все лиссавирусы без видовых различий.

В соответствии с генетическими расстояниями и серологической перекрёстной активностью лиссавирусы делятся как минимум на три филогруппы. Филогруппу 1 составляют RABV, DUVV, EBLV-1, EBLV-2, ABLV, ARAV, KHUV, IRKV, BBLV, GBLV, TWBLV, KBLV. Филогруппу 2 составляют LBV, MOKV, SHIBV. Остальные виды – WCBV, IKOV и LLEBV – не могут быть включены ни в одну из этих филогрупп. В пределах каждой филогруппы наблюдается относительная консервативность гликопротеиновых антигенов, индуцирующих синтез вируснейтрализующих антител, обеспечивающих противовирусный иммунитет (идентичность аминокислот в эктодомене > 74%). Перекрёстная нейтрализация между лиссавирусами разных филогрупп отсутствует (идентичность аминокислот в эктодомене < 62%). В результате коммерчески доступные вакцины и иммуноглобулины против бешенства, сконструированные на основе штаммов классического вируса, в основном индуцируют иммунную защиту от лиссавирусов филогруппы I, но не от других лиссавирусов [7].

Лиссавирус Иркут относится к филогруппе I [7], и имеющиеся антирабические препараты должны от него защищать. Однако результаты экспериментальных данных американских и китайских исследователей показали, что коммерческие биопрепараты от бешенства не обеспечивают 100%-й защиты от инфекции, вызванной IRKV, столь же надёжной, как защита от заражения классическим лиссавирусом бешенства [45–47].

Заключение

1. За период 1977–2021 гг. в России гибель людей от укусов летучих мышей была зафиксирована семь раз: два – Луганская Народная Республика РФ, Луганск (Ворошиловград) и Молодогвардейск; один – Белгородская область, Белгород; один – Амурская область, Благовещенск; три – Приморский край, с. Озерное, г. Фокино, с. Заветное.

2. Из циркулирующих на территории России четырёх видов лиссавирусов – *Lyssavirus rabies*, *Lyssavirus hamburg*, *Lyssavirus irkut*, *Lyssavirus caucasicus* – представители первых трёх являлись

причиной гибели людей, три последних выделялись от летучих мышей.

3. Выявление случаев гибели людей от лиссавирусной инфекции на юге Дальневосточного региона указывает на недостаточную оценку роли рукокрылых в эпидемиологии этой инфекции в России, а также на возможность гиподиагностики лиссавирусной инфекции после контактов с этими животными.

4. На территории России актуален мониторинг популяций летучих мышей на заражённость лиссавирусами, при планировании которого необходимо принимать во внимание факты обнаружения лиссавируса Иркут в России и Китае у большого трубконоса, указывающие на возможную видоспецифичность патогена.

5. Органы санэпиднадзора и здравоохранения должны быть осведомлены о потенциале рукокрылых в передаче лиссавирусов. Учитывая большое видовое разнообразие летучих мышей и стремительный рост открытия новых видов лиссавирусов, ни один регион России нельзя считать свободным от этих возбудителей.

6. Ввиду сложности клинической диагностики этиологии энцефалита, связанного с лиссавирусами, отличными от классического лиссавируса бешенства, необходимо исследование секционного материала погибших от энцефаломиелита неустановленной этиологии в пределах 10–15 дней от начала болезни на выявление лиссавирусного патогена.

7. Отечественные коммерческие диагностические препараты для метода флуоресцирующих антител позволяют выявлять антиген лиссавируса Иркут. Отечественная ПЦР-тест-система от ООО «Синтол», видимо, позволяет детектировать лиссавирус Иркут, но необходима разработка диагностикумов, включающих родоспецифичные праймеры. Применение молекулярно-биологических методов представляется перспективным в плане развития диагностики бешенства для совершенствования эпидемиологического надзора и повышения эффективности системы биологической защиты населения Российской Федерации.

8. Принадлежность к вирусу Иркут выявленных патогенов свидетельствует о том, что отечественные вакцины, присутствующие на рынке, должны защищать от этого возбудителя. Тем не менее оценка существующих иммунобиологических препаратов относительно вируса Иркут и необходимость разработки новых являются актуальной задачей.

9. Обобщение данных по выявлению лиссавируса Иркут и установленные факты его передачи в популяции собак актуализируют необходимость вакцинации домашних животных с целью предотвращения их возможного заражения этим возбудителем.

10. Необходимо обязательное усиление санпросветработы с целью предотвращения контактов населения с бешеными животными, в том числе летучими мышами, а также стимулирования своевременного обращения за медицинской помощью после укусов животными. Травмы, нанесённые рукокрылыми, требуют обязательной регистрации.

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-ra-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., Troade 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., Botvinkina 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. 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 эпизоотолого-эпидемической 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 вакцинационной 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., Поleshuk E.M., 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., Поleshuk E.M., 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., Sabetta 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>

REFERENCES

- 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)
- 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 infeksionnykh bolezney. Tom 2]*. Moscow: MIA; 2019: 199–223. (in Russian)
- 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
- 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>
- 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>
- Coertse J., Markotter W., le Roux K., Stewart D., Sabetta 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>
- WHO expert consultation on rabies: third report. Geneva; 2018. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>
- 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>
- 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>
- 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>
- Markotter W., Coertse J. Bat lyssaviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2): 385–400. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2809>
- Shiple 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Deviatkin A.A., Lukashev A.N., Poleschuk 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. *Zoologicheskiy 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., Paksina N.D., Popova I.V. Rabies in the Russian Federation: INFORMATIONAL and Analytical Bulletin [Beshestvo v Rossiyskoy Federatsii: Informatsionno-analiticheskiy 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 osobo opasnykh 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., Poleshchuk 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. *Zoologicheskiy 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 infektsionnoy 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 zabolovaniya]*. 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., Seemark 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. Anounc.* 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'edinenogo s'ezda gigienistov, epidemiologov, mikrobiologov, parazitologov i infektsionistov 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>

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 одноимённым 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-

жение устойчивой спорадической заболеваемости эпидемиологическим паротитом в Российской Федерации (2021–2025 гг.)», подразумевающей в том числе постепенную интеграцию надзора за ЭП в существующую систему надзора за корью и краснухой [1]. Важная роль в эпидемиологическом надзоре за корью, краснухой и ЭП отводится их лабораторному подтверждению, которое позволяет классифицировать случаи даже при сомнительной клинической картине, атипичном течении болезни или инаппарантной форме.

В настоящее время в РФ отсутствует требование к обязательной лабораторной верификации случаев ЭП, однако предполагаемая имплементация надзора за этой инфекцией в систему надзора за корью и краснухой подразумевает отработку и внедрение методов лабораторного подтверждения. Позиция Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в отношении лабораторного подтверждения случаев ЭП до 2017 г. основывалась на определении специфических IgM в сыворотке крови у лиц с подозрением на инфекцию, однако эти рекомендации подверглись пересмотру.

В руководстве по эпидемиологическому надзору за вакциноуправляемыми инфекциями ВОЗ рекомендует ввести критерии лабораторного подтверждения ЭП на основании:

- 1) изоляции ВЭП из образцов от больных или положительного результата полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией;
- 2) тестирования парных сывороток, взятых с интервалом 10–14 дней, для определения увеличения уровня IgG к ВЭП;
- 3) определения сероконверсии IgG в парных сыворотках [3].

Определение IgM к ВЭП может служить основанием для классификации случая только как вероятного [3].

Внедрение в эпидемиологический надзор методик молекулярно-генетических исследований ВЭП имеет несомненное значение не только для лабораторной верификации случаев, но и для мониторинга циркуляции возбудителя. Как было показано ранее, отсутствие единой глобальной инициативы в отношении мониторинга за возбудителем ЭП стало причиной крайне неравномерного распределения данных о его глобальном генетическом разнообразии [4]. Согласно информации, содержащейся в репозитории GenBank, из 12 известных генотипов вируса ЭП с 2004 г. доминирующим является генотип G. По состоянию на 2021 г. из 9389 записей о нуклеотидных последовательностях 316 нт (нуклеотидов) *SH*-гена вируса, применяемых для генотипирования, 3587 последовательностей, относящихся к генотипу G, выделены на территории США, 2621 – Канады и 1179 – Испании. Данные о генетической принадлежности ВЭП, выделенных на территории РФ, ограничены четырьмя записями, одна из которых относится к вакцинному штамму Leningrad-3 [4].

Заболеваемость ЭП на территории Российской Федерации с 2016 г. регистрируется преимущественно на территории Северо-Кавказского федерального

округа: в 2021 г. 81,4% (2,24 на 100 тыс. населения) всех случаев ЭП в стране было выявлено в субъектах, входящих в его состав. Наибольшее количество заболевших зарегистрировано в Республике Дагестан – 212 (77,4% от всех случаев в стране); показатель заболеваемости составил 6,79 на 100 тыс. населения, превысив в 35,7 раза среднероссийский уровень [5]. По данным за 6 месяцев 2022 г., на территории страны зафиксирован 271 случай ЭП, при этом 234 случая – в Республике Дагестан [6]. На остальных территориях страны были зарегистрированы единичные случаи ЭП или отсутствие заболеваемости [5, 6].

Цель настоящей работы – молекулярно-генетическая характеристика ВЭП, циркулировавших в Российской Федерации в 2022 г.

Материалы и методы

В рамках исследования проанализировано 11 образцов мазков, взятых со слизистой оболочки щеки у больных ЭП со стороны поражённой слюнной железы. Все образцы были собраны в течение $2 \pm 1,2$ дня от начала клинических проявлений заболевания. Все случаи эпидемиологически классифицированы как местные, зарегистрированы в мае – октябре 2022 г. в Республике Дагестан. Исследование проводилось при информированном добровольном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (Протокол № 56 от 10 февраля 2022 г.). Исследование проводилось в рамках реализации мероприятий национальной программы «Элиминация кори и краснухи, достижение устойчивой спорадической заболеваемости эпидемиологическим паротитом в Российской Федерации (2021–2025 гг.)»; образцы для исследования поступали в лабораторию в обезличенном формате под эпидномерами.

Тотальная РНК была экстрагирована с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, США) по инструкции производителя. Амплификация участка 316 нт гена *SH* была проведена двухстадийно с использованием набора OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, США) с праймерами, описанными J.Y. Lee et al. [7]. Первая реакция была проведена по протоколу 50 °C 30 мин; 95 °C 15 мин; 94 °C 30 сек, 55 °C 30 сек, 72 °C 1 мин 40 циклов; 72 °C 10 мин. Для второй реакции в качестве матрицы был взят 1 мкл продукта первой реакции и применялись следующие параметры термоциклирования: 94 °C 2 мин; 94 °C 30 сек, 55 °C 30 сек, 72 °C 1 мин 40 циклов; 72 °C 5 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили при горизонтальном электрофорезе в 2% геле агарозы с добавлением 1 мкл бромистого этидия в 1× трис-ацетатном (ТАЕ) буфере в течение 60 мин. Для очистки ПЦР-продукта из геля использован набор Qiagen QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Секвенирование ампликонов проводили по методу Сенгера на генетическом анализаторе ABI 3500 с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific, США) по ме-

тодике, рекомендованной производителем, и праймерами второго раунда ПЦР.

Полученные хроматограммы анализировали в программе Seq Scape Software 3 (Thermo Fischer Scientific, США). Реконструкцию филогенетических событий проводили в программе MEGA-X на основании нуклеотидной последовательности 316 нт гена *SH* с использованием трёхпараметрической модели Тамуры T92 (Tamura 3-parameter) по k-алгоритму ближайших соседей [8]. В качестве показателя устойчивости дерева использовался индекс бутстреп-поддержки при 500 репликациях. Показатель статистической надёжности узлов считался достоверным при значении выше 70. Эволюционная дистанция между штаммами и группами определена по трёхпараметрическому методу Тамуры [9]. Референсные последовательности генотипов ВЭП приведены в соответствии с номенклатурой [10]. Наименование штаммов ВЭП осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [10]. Нуклеотидные последовательности 316 нт гена *SH* ВЭП, полученные в ходе исследования, депонированы в GenBank под номерами OQ102499–OQ102509.

Результаты

Во всех образцах соскобов со слизистой оболочки щеки была выявлена РНК ВЭП. Все проанализированные образцы принадлежали генотипу G. Полученные нуклеотидные последовательности в результате проведенного филогенетического анализа были раз-

делены на две группы, обозначенные нами как G-1 и G-2 (табл. 1, рисунок).

Группа вирусов G-1, выделенных в ходе исследования, представлена семью нуклеотидными последовательностями. Внутригрупповая дистанция (d) в группе G-1 составила 0,0016. Представители группы циркулировали на достаточно обширной территории (с. Новолаское – г. Махачкала – с. Магарамкент – г. Хасавюрт) в период с мая по октябрь 2022 г. Кроме последовательностей, выделенных в ходе исследования, в группу G-1 были включены последовательности вирусов, выделенных в 2017–2018 гг. в Швеции и Нидерландах.

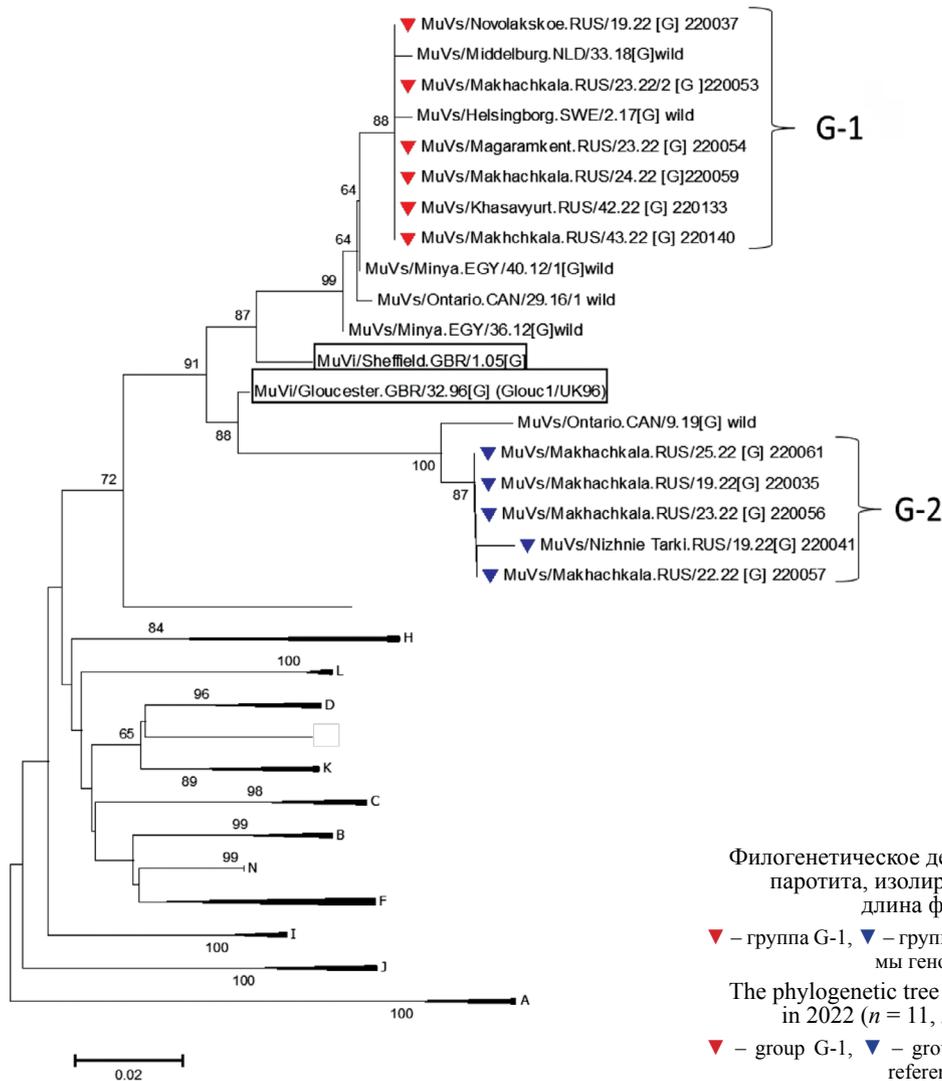
Вторая группа G-2 – более гетерогенная ($d = 0,029$) и малочисленная, представлена четырьмя нуклеотидными последовательностями. Вирусы, вошедшие в группу, циркулировали на ограниченной территории в мае – июне 2022 г.: её представители зафиксированы в г. Махачкале и п. Нижние Тарки, административно относящегося к г. Махачкале. По данным GenBank, ближайший родственник группе G-2 ВЭП был изолирован в Канаде в 2019 г., однако филогенетически группа G-2 и штамм MuVs/Ontario.CAN/9.19[G] разделены на разные субкластеры. Межгрупповая дистанция между G-1 и G-2 составила 0,08.

Все штаммы группы G-1, выделенные в ходе исследования, были идентичны друг другу на проанализированном участке 316 нт гена *SH*. Отличия от референс-штамма MuVi/Sheffield.GBR/1.05 составили 11 нт замен (табл. 2). Группа G-2 включала в себя три иден-

Таблица 1. Штаммы вируса эпидемического паротита, выделенные на территории Республики Дагестан в 2022 г.

Table 1. Mumps virus strains isolated in the Republic of Dagestan in 2022

№	Наименование Name	Географическая локализация Geographical localization	Дата заболевания Date of disease onset	Генотип-группа Genotype-group
1.	MuVs/Novolaskoe.RUS/19.22	с. Новолаское Novolaskoe village	15 мая 2022 г. 15 May 2022	G-1
2.	MuVs/Magaramkent.RUS/23.22	с. Магарамкент Magaramkent village	6 июня 2022 г. 6 Jun 2022	G-1
3.	MuVs/Makhachkala.RUS/23.22/2	г. Махачкала Makhachkala city	7 июня 2022 г. 7 Jun 2022	G-1
4.	MuVs/Makhachkala.RUS/24.22	г. Махачкала Makhachkala city	19 июня 2022 г. 19 Jun 2022	G-1
5.	MuVs/Makhachkala.RUS/25.22	г. Махачкала Makhachkala city	20 июня 2022 г. 20 Jun 2022	G-1
6.	MuVs/Khasavyurt.RUS/42.22	г. Хасавюрт Khasavyurt city	18 октября 2022 г. 18 Oct 2022	G-1
7.	MuVs/Makhachkala.RUS/43.22	г. Махачкала Makhachkala city	26 октября 2022 г. 26 Oct 2022	G-1
8.	MuVs/Makhachkala.RUS/19.22	г. Махачкала Makhachkala city	11 мая 2022 г. 11 May 2022	G-2
9.	MuVs/Nizhnie Tarki.RUS/19.22	пгт Нижние Тарки, г. Махачкала Nizhnie Tarki urban-type settlement, Makhachkala city	17 мая 2022 г. 17 May 2022	G-2
10.	MuVs/Makhachkala.RUS/22.22	г. Махачкала Makhachkala city	30 мая 2022 г. 30 May 2022	G-2
11.	MuVs/Makhachkala.RUS/23.22/3	г. Махачкала Makhachkala city	7 июня 2022 г. 7 Jun 2022	G-2



Филогенетическое дерево штаммов вируса эпидемического паротита, изолированных в России в 2022 г. ($n = 11$, длина фрагмента *SH*-гена 316 нт).

▼ – группа G-1, ▼ – группа G-2, ◀ – прочие генотипы. Референс-штаммы генотипа G выделены рамками.

The phylogenetic tree of mumps virus strains isolated in the RF in 2022 ($n = 11$, *SH*-gene fragment 316 nt in length).

▼ – group G-1, ▼ – group G-2, ◀ – the other genotypes. Genotype G reference strains are in the frames.

тичных штамма, содержащих 14 нт замен по сравнению с референс-штаммом MuVi/Gloucester.GBR/32.96, и один штамм (MuVs/Nizhnie Tarki.RUS/19.22), отличающийся от других вирусов группы ещё на две дополнительные нуклеотидные замены (табл. 2).

Точечные замены в обеих группах представлены преимущественно транзициями, в группе G-1 на участке 316 нт отмечена только одна трансверсия Т (216) А, в группе G-2 – от четырех (Т (61) А, С (144, 191, 234) А) до пяти (Т (61) А, С (144, 191, 234) А, G (32) С).

Обсуждение

В рамках настоящей работы проанализирован участок 316 нт гена *SH*, кодирующего малый гидрофобный белок, – наиболее вариабельного гена ВЭП, на определении нуклеотидной последовательности которого основано генотипирование вируса [10]. На основании секвенирования этого участка выделено 12 генотипов ВЭП (А, В, С (Е), D, F, G, H, I, J, K (M), L, N), генетическая вариабельность гена *SH* между которыми составляет от 3,8 до 17,9%; вну-

три каждого генотипа – до 9,6% [11]. Также описаны неклассифицированные до настоящего времени штаммы – AF142774 и AY380077, выделенные в Великобритании, и AY380077, выделенный в Японии.

Для разработки подходов к молекулярно-генетическому мониторингу циркуляции вирусов и для применения этих методов к установлению источника импортирования вируса необходимо накопление достаточного количества данных, позволяющих определить преобладающий на той или иной территории генотип/геновариант. Отсутствие глобальной инициативы по мониторингу штаммов ВЭП и, следовательно, систематических исследований в этой области накладывает существенные ограничения на внедрение методов молекулярно-эпидемиологических исследований в надзор за инфекцией.

Согласно данным, содержащимся в глобальном репозитории GenBank, куда ВОЗ рекомендует депонировать последовательности 316 нт ВЭП, выделенные как в ходе надзорных мероприятий, так и в результате научных исследований, доминирующим в мире в настоящее время генотипом является генотип G. Принадлежащие

Таблица 2. Нуклеотидные замены в последовательностях 316 нт вируса эпидемического паротита, выделенных в 2022 г.
Table 2. The nucleotide substitutions in 316 nt fragment of mumps virus sequences isolated in 2022

Штамм/группа Strain/group	Нуклеотидная замена Nucleotide substitution	Тип нуклеотидной замены Nucleotide substitution type
MuVs/Novolakscoe. RUS/19.22 Группа G-1 G-1 group	T (84, 143, 146, 150, 190, 284) C	Транзиция Transition
	T (216) A	Трансверсия Transversion
	A (224, 276) G	Транзиция Transition
	G (251, 265) A	Транзиция Transition
MuVs/Makhachkala. RUS/22.22 Группа G-2 G-2 group	T (6, 73, 86) C	Транзиция Transition
	T (61) A	Трансверсия Transversion
	G (92, 161) A	Транзиция Transition
	A (95, 116, 274) G	Транзиция Transition
MuVs/Nizhnie Tarki. RUS/19.22 Группа G-2 G-2 group	C (128, 134) T	Транзиция Transition
	C (144, 191, 234) A	Трансверсия Transversion
	G (32) C	Трансверсия Transversion
	A (35) G	Транзиция Transition

ему штаммы ВЭП этому впервые выявлены во время вспышки ЭП Великобритании в начале 1990-х гг., куда были предположительно импортированы из Индии или Непала [12]. Выделенный во время этой вспышки штамм MuVi/Gloucester.GBR/32.96[G] в настоящее время является одним из референс-штаммов генотипа. Второй референс-штамм генотипа – MuVi/Sheffield.GBR/1.05[G] – вероятно, имеет европейское происхождение. В 2000-х гг. близкородственные штаммы активно циркулировали в Великобритании [13], Хорватии [14], Ирландии [15], Израиле [16], Германии [17], Испании [18]. Последние крупные вспышки ЭП произошли в США [19], Канаде [20–22], Норвегии [23] и Швеции [24, 25] и были связаны с вирусами генотипа G.

В рамках настоящего исследования все выявленные штаммы ВЭП относились к генотипу G. Определение двух эволюционно удалённых групп с генетической вариабельностью 8% в полной мере согласовывается с данными других исследователей об уровне внутригенотипического разнообразия вируса. Однако проведённое J. Li и соавт. исследование генов *HN*, *F* и *SH* 1250 штаммов ВЭП разных генотипов показывает, что, несмотря на позицию ВОЗ по изучению нуклеотидной последовательности *SH*-гена как наиболее

гипервариабельного и оптимального для генотипирования, для генотипа G этот ген таковым не является [11]. Также показана циркуляция субгенотипов в рамках генотипа G [26]. Оба этих факта, а также наличие вирусов, не поддающихся классификации, отражают несовершенство номенклатуры ВЭП и необходимость проведения систематических исследований для использования результатов генетического мониторинга трансмиссии патогена в эпидемиологическом надзоре.

Заключение

В настоящем исследовании выявлены две группы ВЭП, циркулировавшие на территории Республики Дагестан в 2022 г. Все выделенные последовательности относились к широко распространённому в мире генотипу G, однако для каждой группы показано наличие существенных отличий от вирусов, ранее выделенных в других странах. Поскольку все случаи, проанализированные в настоящей работе, были классифицированы как местные, можно предполагать наличие на ограниченной территории социркуляции по меньшей мере двух геногрупп ВЭП. Дальнейшие исследования по определению генетической принадлежности ВЭП у больных ЭП позволят не только подтверждать случаи заболевания, но и давать расширенную характеристику генетического разнообразия вируса на территории страны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Национальная программа «Элиминация кори и краснухи, достижение устойчивой спорадической заболеваемости эпидемическим паротитом в Российской Федерации (2021–2025 гг.)». М.; 2020.
2. СанПиН 3.3686–21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. М.; 2020.
3. ВОЗ. Позиция ВОЗ в отношении вакциноуправляемых инфекций. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-mumps>
4. Чехляева Т.С., Ерохов Д.В., Андриевская И.Ю., Жердева П.Е., Тихонова Н.Т. Обзор генетического разнообразия вируса эпидемического паротита (Paramyxoviridae: Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(2): 95–106. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-98>
5. Государственный доклад главного санитарного врача «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году»; 2021. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21796
6. Информационный бюллетень «Заболеваемость корью, краснухой, эпидемическим паротитом в Российской Федерации за 2022 год (6 месяцев)». Available at: <http://www.gabrich.ru/measles-center.html>
7. Lee J.Y., Kim Y.Y., Shin G.C., Na B.K., Lee J.S., Lee H.D., et al. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998–2001. *Virus Res*. 2003; 97(2): 111–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.08.006>
8. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
9. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 1992; 9(4): 678–87. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
10. WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec*. 2012; 87(22): 217–24.
11. Li J., Claes Ö., Myers R., Rota P.A., Nakayama T., Forcic D., et al. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev. Med. Virol.* 2014; 25(2): 85–101. <https://doi.org/10.1002/rmv.1819>

12. Afzal M.A., Buchanan J., Heath A.B., Minor P.D. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch. Virol.* 1997; 142(2): 227–38. <https://doi.org/10.1007/s007050050073>
13. Cohen C., White J.M., Savage E.J., Glynn J.R., Choi Y., Andrews N., et al. Vaccine effectiveness estimates, 2004–2005 mumps outbreak, England. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(1): 12–7. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060649>
14. Šantak M., Košutić-Gulija T., Tešović G., Ljubin-Sternak S., Gjen-ero-Margan I., Betica-Radić L., et al. Mumps virus strains isolated in Croatia in 1998 and 2005: Genotyping and putative antigenic relatedness to vaccine strains. *J. Med. Virol.* 2006; 78(5): 638–43. <https://doi.org/10.1002/jmv.20587>
15. Carr M.J., Moss E., Waters A., Dean J., Jin L., Coughlan S., et al. Molecular epidemiological evaluation of the recent resurgence in mumps virus infections in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(9): 3288–94. <https://doi.org/10.1128/JCM.00434-10>
16. Anis E., Grotto I., Moerman L., Warshavsky B., Slater P.E., Lev B. Mumps outbreak in Israel's highly vaccinated society: are two doses enough? *Epidemiol. Infect.* 2012; 140(3): 439–46. <https://doi.org/10.1017/S095026881100063X>
17. Otto W., Mankertz A., Santibanez S., Saygili H., Wenzel J., Jilg W., et al. Ongoing outbreak of mumps affecting adolescents and young adults in Bavaria, Germany, August to October 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(50): 19748.
18. Echevarria J.E., Castellanos A., Sanz J.C., Pérez C., Palacios G., Martínez de Aragón M.V., et al. Circulation of mumps virus genotypes in Spain from 1996 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4): 1245–54. <https://doi.org/10.1128/JCM.02386-09>
19. Rivaiiller P., Hickman C., Rota P. Mumps surveillance in the United States. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF143768.1>
20. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=MN911767.1>
21. Hiebert J., Schulz H., Zubach V., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796908945
22. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796906304
23. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
24. Tallo T., Brytting M. Mumps orthorubulavirus small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1479792882
25. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
26. Mishra B., Pujhari S.K., Dhiman V., Mahalakshmi P., Bharadwaj A., Pokhrel S., et al. Genotyping and subtyping of mumps virus isolates from the Indian subcontinent. *Arch. Virol.* 2013; 158(11): 2359–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1717-4>
6. Newsletter «Incidence of measles, rubella, mumps in the Russian Federation for 2022 (6 months)». Available at: <http://www.gabrich.ru/measles-center.html> (accessed 14.12.2022) (in Russian)
7. Lee J.Y., Kim Y.Y., Shin G.C., Na B.K., Lee J.S., Lee H.D., et al. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998–2001. *Virus Res.* 2003; 97(2): 111–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.08.006>
8. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
9. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 1992; 9(4): 678–87. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
10. WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012; 87(22): 217–24.
11. Li J., Claes Ö., Myers R., Rota P.A., Nakayama T., Forcic D., et al. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev. Med. Virol.* 2014; 25(2): 85–101. <https://doi.org/10.1002/rmv.1819>
12. Afzal M.A., Buchanan J., Heath A.B., Minor P.D. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch. Virol.* 1997; 142(2): 227–38. <https://doi.org/10.1007/s007050050073>
13. Cohen C., White J.M., Savage E.J., Glynn J.R., Choi Y., Andrews N., et al. Vaccine effectiveness estimates, 2004–2005 mumps outbreak, England. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(1): 12–7. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060649>
14. Šantak M., Košutić-Gulija T., Tešović G., Ljubin-Sternak S., Gjen-ero-Margan I., Betica-Radić L., et al. Mumps virus strains isolated in Croatia in 1998 and 2005: Genotyping and putative antigenic relatedness to vaccine strains. *J. Med. Virol.* 2006; 78(5): 638–43. <https://doi.org/10.1002/jmv.20587>
15. Carr M.J., Moss E., Waters A., Dean J., Jin L., Coughlan S., et al. Molecular epidemiological evaluation of the recent resurgence in mumps virus infections in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(9): 3288–94. <https://doi.org/10.1128/JCM.00434-10>
16. Anis E., Grotto I., Moerman L., Warshavsky B., Slater P.E., Lev B. Mumps outbreak in Israel's highly vaccinated society: are two doses enough? *Epidemiol. Infect.* 2012; 140(3): 439–46. <https://doi.org/10.1017/S095026881100063X>
17. Otto W., Mankertz A., Santibanez S., Saygili H., Wenzel J., Jilg W., et al. Ongoing outbreak of mumps affecting adolescents and young adults in Bavaria, Germany, August to October 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(50): 19748.
18. Echevarria J.E., Castellanos A., Sanz J.C., Pérez C., Palacios G., Martínez de Aragón M.V., et al. Circulation of mumps virus genotypes in Spain from 1996 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4): 1245–54. <https://doi.org/10.1128/JCM.02386-09>
19. Rivaiiller P., Hickman C., Rota P. Mumps surveillance in the United States. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF143768.1>
20. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=MN911767.1>
21. Hiebert J., Schulz H., Zubach V., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796908945
22. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796906304
23. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
24. Tallo T., Brytting M. Mumps orthorubulavirus small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1479792882
25. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
26. Mishra B., Pujhari S.K., Dhiman V., Mahalakshmi P., Bharadwaj A., Pokhrel S., et al. Genotyping and subtyping of mumps virus isolates from the Indian subcontinent. *Arch. Virol.* 2013; 158(11): 2359–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1717-4>

REFERENCES

1. National Program «Elimination of measles and rubella and achievement of a stable sporadic incidence of epidemic mumps in the Russian Federation (2021–2025)». Moscow; 2020. (in Russian)
2. SanPiN 3.3686–21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. (in Russian)
3. WHO. Mumps: Vaccine Preventable Diseases Surveillance Standards. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/vaccine-preventable-diseases-surveillance-standards-mumps>
4. Chekhlyayeva T.S., Erokhov D.V., Andrievskaya I.Yu., Zherdeva P.E., Tikhonova N.T. Genetic diversity of the mumps viruses (Paramyxoviridae: Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus): an overview. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(2): 95–106. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-98> (in Russian)
5. State report of the Chief Sanitary Doctor «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2021»; 2021. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21796 (in Russian)
6. Newsletter «Incidence of measles, rubella, mumps in the Russian Federation for 2022 (6 months)». Available at: <http://www.gabrich.ru/measles-center.html> (accessed 14.12.2022) (in Russian)
7. Lee J.Y., Kim Y.Y., Shin G.C., Na B.K., Lee J.S., Lee H.D., et al. Molecular characterization of two genotypes of mumps virus circulated in Korea during 1998–2001. *Virus Res.* 2003; 97(2): 111–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.08.006>
8. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; 4(4): 406–25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
9. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 1992; 9(4): 678–87. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
10. WHO. Mumps virus nomenclature update: 2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2012; 87(22): 217–24.
11. Li J., Claes Ö., Myers R., Rota P.A., Nakayama T., Forcic D., et al. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev. Med. Virol.* 2014; 25(2): 85–101. <https://doi.org/10.1002/rmv.1819>
12. Afzal M.A., Buchanan J., Heath A.B., Minor P.D. Clustering of mumps virus isolates by SH gene sequence only partially reflects geographical origin. *Arch. Virol.* 1997; 142(2): 227–38. <https://doi.org/10.1007/s007050050073>
13. Cohen C., White J.M., Savage E.J., Glynn J.R., Choi Y., Andrews N., et al. Vaccine effectiveness estimates, 2004–2005 mumps outbreak, England. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(1): 12–7. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060649>
14. Šantak M., Košutić-Gulija T., Tešović G., Ljubin-Sternak S., Gjen-ero-Margan I., Betica-Radić L., et al. Mumps virus strains isolated in Croatia in 1998 and 2005: Genotyping and putative antigenic relatedness to vaccine strains. *J. Med. Virol.* 2006; 78(5): 638–43. <https://doi.org/10.1002/jmv.20587>
15. Carr M.J., Moss E., Waters A., Dean J., Jin L., Coughlan S., et al. Molecular epidemiological evaluation of the recent resurgence in mumps virus infections in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(9): 3288–94. <https://doi.org/10.1128/JCM.00434-10>
16. Anis E., Grotto I., Moerman L., Warshavsky B., Slater P.E., Lev B. Mumps outbreak in Israel's highly vaccinated society: are two doses enough? *Epidemiol. Infect.* 2012; 140(3): 439–46. <https://doi.org/10.1017/S095026881100063X>
17. Otto W., Mankertz A., Santibanez S., Saygili H., Wenzel J., Jilg W., et al. Ongoing outbreak of mumps affecting adolescents and young adults in Bavaria, Germany, August to October 2010. *Euro Surveill.* 2010; 15(50): 19748.
18. Echevarria J.E., Castellanos A., Sanz J.C., Pérez C., Palacios G., Martínez de Aragón M.V., et al. Circulation of mumps virus genotypes in Spain from 1996 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4): 1245–54. <https://doi.org/10.1128/JCM.02386-09>
19. Rivaiiller P., Hickman C., Rota P. Mumps surveillance in the United States. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF143768.1>
20. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset/?term=MN911767.1>
21. Hiebert J., Schulz H., Zubach V., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796908945
22. Hiebert J., Severini A. Mumps surveillance in Canada. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1796906304
23. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
24. Tallo T., Brytting M. Mumps orthorubulavirus small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/popset?DbFrom=nuccore&Cmd=Link&LinkName=nuccore_popset&IdsFromResult=1479792882
25. Dembinski J.L. Mumps virus genotype G strain MuVs/Fredrikstad. NOR/13.20[G] small hydrophobic protein (SH) gene, complete cds. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MT339438.1>
26. Mishra B., Pujhari S.K., Dhiman V., Mahalakshmi P., Bharadwaj A., Pokhrel S., et al. Genotyping and subtyping of mumps virus isolates from the Indian subcontinent. *Arch. Virol.* 2013; 158(11): 2359–63. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1717-4>



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

Кузнецова А.И.¹, Мунчак Я.М.¹, Лебедев А.В.¹, Туманов А.С.¹, Ким К.В.¹, Антонова А.А.¹, Ожмегова Е.Н.¹, Пронин А.Ю.², Дробышевская Е.В.², Казеннова Е.В.¹, Бобкова М.Р.¹

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

²ГКУЗ Московской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями», 129110, г. Москва, Россия

Введение. Белок p24 вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) играет важную роль в жизненном цикле вируса, а также является объектом для диагностических тестов и разработки новых антиретровирусных препаратов и терапевтических вакцин. Наиболее изученным вариантом ВИЧ-1 в мире является субтип В. В России наиболее распространённым вариантом является суб-субтип А6, отмечается появление и распространение новых рекомбинантных форм (CRF63_02A6 и CRF03_A6B) наряду с сохранением циркуляции субтипа G и рекомбинантной формы CRF02_AG. Детального изучения белка p24 у этих вариантов пока не проводилось.

Цель работы. Изучение особенностей белка p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, и оценка вероятности наличия предсуществующих мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру – первому антиретровирусному препарату в классе ингибиторов капсида.

Материалы и методы. Материалом для работы послужили нуклеотидные последовательности ВИЧ-1, полученные из международной базы данных Los Alamos, а также клинические образцы от ВИЧ-инфицированных пациентов.

Результаты и обсуждение. Определены особенности p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России. Мутации V86A, N87Q, I91F являются характеристическими заменами для А6. Показано, что наличие предсуществующих мутаций устойчивости к ленакапавиру маловероятно.

Заключение. Особенности в белке p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, позволяют отличить их от других вариантов и различить между собой. Прогноз применения ленакапавира у пациентов в России в целом благоприятный. Полученные результаты могут быть учтены в будущем при разработке и применении антиретровирусных препаратов и терапевтических вакцин.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека 1-го типа; суб-субтип А6; белок p24; мутации; полиморфизм

Для цитирования: 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. и Бобкова М.Р. Генетическое разнообразие капсидного белка (p24) у вариантов вируса иммунодефицита первого типа (ВИЧ-1), циркулирующих в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(1): 66-78. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-161>

Для корреспонденции: Кузнецова Анна Игоревна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: a-myznikova@list.ru

Участие авторов: Кузнецова А.И. – методология, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, разработка окончательного варианта; Мунчак Я.М. – проведение экспериментов, работа с базой данных Los Alamos; Лебедев А.В. – литературный поиск, анализ и интерпретация полученных данных; Туманов А.С. – проведение экспериментов; Ким К.В. – работа с базой данных Los Alamos, статистическая обработка; Антонова А.А. – литературный поиск, филогенетический анализ; Ожмегова Е.Н. – литературный поиск, филогенетический анализ; Пронин А.Ю. – сбор данных, редактирование текста; Дробышевская Е.В. – сбор данных, редактирование текста; Казеннова Е.В. – методология, разработка окончательного варианта; Бобкова М.Р. – разработка концепции, редактирование, разработка окончательного варианта.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>.

Благодарности. Авторы выражают благодарность д.б.н., заведующему лабораторией молекулярной генетики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Прилипову Алексею Геннадьевичу за оказанную помощь в секвенировании провирусной ДНК ВИЧ-1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 16 от 08.02.2019 г. и № 20 от 17.03.2022 г.).

Поступила 06.01.2023
Принята в печать 17.02.2023
Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-161>

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

Anna I. Kuznetsova¹, Iana M. Munchak¹, Aleksey V. Lebedev¹, Alexander S. Tumanov¹, Kristina V. Kim¹, Anastasiia A. Antonova¹, Ekaterina N. Ozhmegova¹, Alexander Yu. Pronin², Elena V. Drobyshevskaya², Elena V. Kazennova¹, Marina R. Bobkova¹

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia;

²Moscow Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, 129110, Moscow, Russia

Introduction. The human immunodeficiency virus (HIV) protein p24 plays an important role in the life cycle of the virus, and also is a target for diagnostic tests and for new antiretroviral drugs and therapeutic vaccines. The most studied variant of HIV-1 in the world is subtype B. In Russia, the most common variant is A6, the spread of recombinant forms (CRF63_02A6, CRF03_A6B) is observed as well as circulation of G and CRF02_AG variants. However, a detailed study of the p24 protein in these variants has not yet been conducted.

The aim was to study the features of the p24 protein in HIV-1 variants circulating in Russia and estimate the frequency of occurrence of pre-existing mutations associated with resistance to lenacapavir, the first antiretroviral drug in the class of capsid inhibitors.

Materials and methods. The objects of the study were the nucleotide sequences obtained from the Los Alamos international database and clinical samples from HIV infected patients.

Results and discussion. The features of HIV-1 variants circulating in Russia have been determined. V86A, H87Q, I91F are characteristic substitutions in A6 genome. It is shown that the presence of preexisting mutations associated with resistance to lenacapavir is unlikely.

Conclusion. Features of the p24 protein in HIV-1 variants circulating in Russia allow them to be distinguished from others variants and among themselves. The prognosis for the use of lenacapavir in Russia is generally favorable. The results obtained could be taken into account in developing and using antiretroviral drugs and therapeutic vaccines.

Keywords: HIV-1; sub-subtype A6; p24; mutations; polymorphism

For citation: Kuznetsova A.I., Munchak I.M., 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. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 66-78 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-161>

For correspondence: Anna I. Kuznetsova, PhD (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia. E-mail: a-myznikova@list.ru

Information about authors:

Kuznetsova A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

Munchak I.M., <https://orcid.org/0000-0002-4792-8928>

Lebedev A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Tumanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Kim K.V., <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Antonova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Ozhmegova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Pronin A.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6673-1218>

Drobyshevskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0002-0654-8646>

Kazennova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Bobkova M.R., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Contribution: Kuznetsova A.I. – methodology, data analysis and interpretation, text preparation and editing, final version development; Munchak I.A. – conducting of the experiments, working with Los Alamos database; Lebedev A.V. – thematic literature search, data analysis and interpretation; Tumanov A.S. – conducting of the experiments; Kim K.V. – working with Los Alamos database, statistical analysis; Antonova A.A. – thematic literature search, phylogenetic analysis; Ozhmegova E.N. – thematic literature search, phylogenetic analysis; Pronin A.Yu. – data collection, text editing; Drobyshevskaya E.V. – data collection, text editing; Kazennova E.V. – methodology, final version development; Bobkova M.R. – conceptualization, text editing, final version development

Funding. The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>.

Acknowledgement. The authors are grateful to Dr Sci. (Biol.), chief of the Laboratory of Molecular Genetics of D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI "National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia Alexey G. Prilipov for assistance in sequencing HIV-1 proviral DNA.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of patients. The protocol of the study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya», 123098, Moscow, Russia (Protocol No. 16 of 02/08/2019 and No. 20 of 03/17/2022).

Received 06 January 2023
Accepted 17 February 2023
Published 28 February 2023

Введение

ВИЧ-инфекция остаётся актуальной проблемой во всём мире. В результате широкого применения современной антиретровирусной терапии в настоящее время продолжительность жизни ВИЧ-инфицированных людей практически сопоставима со средней продолжительностью жизни в общей популяции [1]. Тем не менее методов полного излечения пока не существует, и лечение ВИЧ-инфекции предполагает ежедневный пожизненный приём комбинированных схем терапии, включающих в среднем 2–3 антиретровирусных препарата разных классов [2–4]. Проблемы лекарственной устойчивости ВИЧ, токсичности препаратов и становящийся всё более актуальным вопрос межлекарственных взаимодействий формируют постоянную необходимость в создании новых антиретровирусных препаратов.

Одной из основных характеристик ВИЧ является его чрезвычайное генетическое разнообразие, которое обеспечивается высокой скоростью возникновения мутаций и рекомбинацией и является результатом работы вирусного фермента – обратной транскриптазы, осуществляющей синтез ДНК на матрице вирусной РНК [5]. В мире существуют разнообразные субтипы и рекомбинантные формы ВИЧ, которые крайне неравномерно распределены по всему земному шару [6, 7]. Генетические различия между различными вариантами ВИЧ-1 определяются мутациями полиморфизма, понимаемыми как единичные замены с частотой встречаемости более 1% и не связанными с лечением [8]. Вопрос о возможном влиянии полиморфных мутаций и субтипа ВИЧ-1 на функциональные свойства вируса, в том числе на скорость возникновения и степень лекарственной устойчивости к антиретровирусной терапии, обсуждается уже много лет и до сих пор остаётся нерешённым [9–11].

Состав вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, кардинально отличается от других стран. На протяжении многих лет доминирующим циркулирующим вариантом ВИЧ-1 является суб-субтип А6, а наиболее часто встречающимся не-А-вариантом – субтип В [12, 13].

Кроме того, на территорию России попал вариант вируса субтипа G, вызвав нозокомиальную вспышку ВИЧ-инфекции в нескольких городах юга России в 1988–1990 гг.; в настоящее время варианты ВИЧ-1 субтипа G выявляются крайне редко [14]. Как и во всём мире, в последнее время в России отмечается тенденция к появлению и распространению рекомбинантных форм вируса. Например, ранее выявляемая в Калининградской области рекомбинантная форма CRF_03AB в настоящее время доминирует в Вологодской области [15, 16]. Рекомбинантная форма CRF_02AG детектируется с небольшой частотой в различных регионах России [13, 17–19], при этом возникшая в результате рекомбинации между CRF_02AG и суб-субтипом А6 рекомбинантная форма CRF63_02A6 активно распространяется в Сибирском регионе [18, 20–22].

Проведённые ранее исследования гена *pol* [23, 24], области гена *gag*, кодирующей белок SP1 [25], области гена *env*, кодирующей белки gp 41 [26] и gp120 [27], а также генов, кодирующих некоторые неструктурные белки [28, 29], показали, что циркулирующие в России варианты ВИЧ-1 обладают рядом особенностей и определили характерные для них мутации полиморфизма. Некоторые из выявленных мутаций полиморфизма связаны с лекарственной устойчивостью ВИЧ [30–32] и изменением функциональных свойств вирусных белков [29].

Капсидный белок p24, играющий важную структурную и функциональную роль в жизненном цикле ВИЧ, является как объектом диагностических тестов, так и мишенью для разработки новых антиретровирусных препаратов и терапевтических вакцин [33–37]. Кроме формирования капсида, p24 активно участвует в различных этапах жизненного цикла вируса: обратной транскрипции ВИЧ, цитоплазматическом переносе посредством микротрубочек, декапсидации и ядерном импорте преинтеграционного комплекса вируса, интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина и сборке вириона, а также взаимодействует с несколькими факторами клетки-хозяина, которые могут как способствовать, так и предотвращать развитие вирусной инфекции [33, 34, 38].

Белок p24 (капсидный белок) кодируется участком гена *gag*. При экспрессии этого гена образуются два возможных варианта полипротеина: предшественник внутренних белков ВИЧ Pr55^{Gag} и общий предшественник внутренних белков и всех трёх ферментов – Gag-Pol в соотношении 20 : 1 (рис. 1); этот феномен объясняется рибосомным сдвигом рамки считывания. Pr55^{Gag}, имеющий молекулярную массу ~55 кДа, содержит четыре основных домена: матрикс (MA), капсид (CA), нуклеокапсид (NC) и p6 и два небольших спейсерных пептида SP1 и SP2. Gag-Pol с молекулярной массой 160 кДа содержит те же домены Gag, за исключением домена p6, вместо которого имеется межрамочный домен, известный как p6*, или p6pol. Кроме того, Gag-Pol включает домены протеазы (PR), обратной транскриптазы (RT) и интегразы (IN) [33, 34].

Структура зрелого капсида имеет форму фуллеренового конуса, который состоит примерно из 1100 мономеров p24, собранных в гексамерной решётке. Каждая молекула p24 ВИЧ-1 состоит из двух доменов: N-концевого домена (NTD), состоящего из 146 аминокислот, и C-концевого домена (CTD), состоящего из 85 аминокислот (рис. 2). NTD состоит из N-концевой β-шпильки и 7 следующих за ней α-спиралей,

в то время как CTD имеет 4 α-спирали и C-концевую неструктурированную область из 11 остатков. NTD и CTD соединены междоменной линкерной областью (остатки 146–150). CTD содержит высококонсервативный среди различных ретровирусов регион, состоящий из 20 аминокислот (AK), остатки 153–172, называющийся основной областью гомологии (MHR) [34, 39]. В NTD находится СурА-связывающая петля (85–93 АК), которая связывает клеточный белок циклофилин А [34], регулирующий инфекционность ВИЧ-1 [40]. Проведённые ранее исследования показали высокую консервативность капсида и вместе с тем уязвимость его функциональных свойств к возникающим мутациям [34, 39], а также определили мутации, способные повлиять на его функциональность [41].

Среди препаратов, применяемых для лечения ВИЧ-инфекции, до недавнего времени не было лекарств, имеющих мишенью внутренние белки вируса, однако недавно появился первый экспериментальный препарат класса ингибиторов капсида (p24) – ленакапавир, который одновременно воздействует на три стадии жизненного цикла ВИЧ: «разделение» вириона после его проникновения в клетку, доставку преинтеграционного комплекса в ядро и правильное формирование капсида в ходе созревания. Планируется

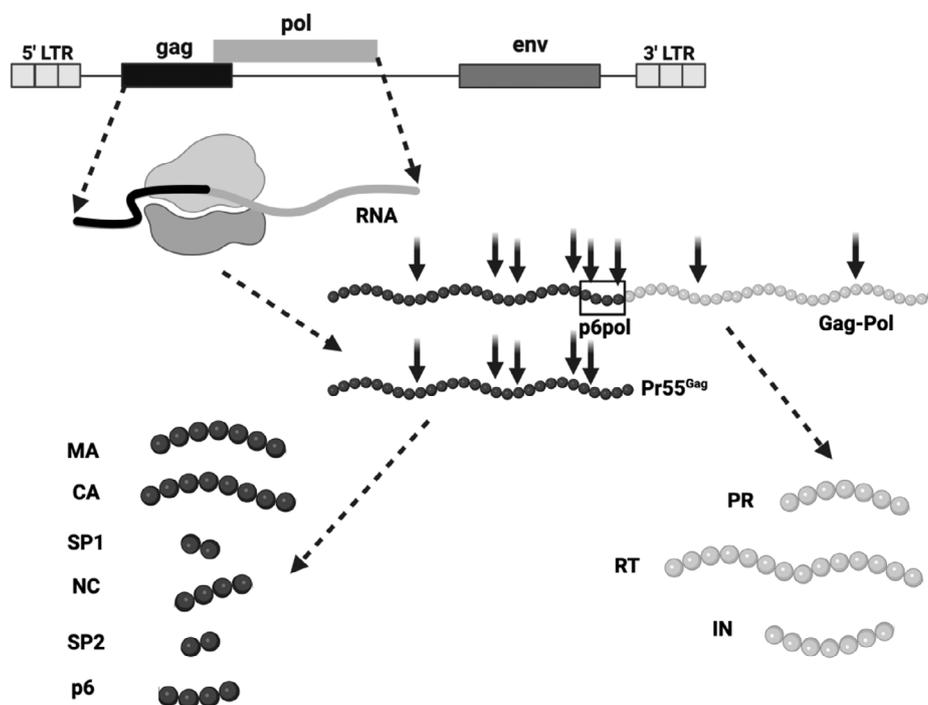


Рис. 1. Экспрессия гена *gag*: 5' LTR и 3' LTR – длинные концевые повторы в составе провирусной ДНК на 5'- и 3'-концах соответственно; *gag* – область гена *gag*; *pol* – область гена *pol*; *env* – область гена *env*; RNA – вирусная РНК на рибосоме; Gag-Pol – общий предшественник внутренних белков и трёх ферментов ВИЧ-1; Pr55^{Gag} – предшественник внутренних белков ВИЧ-1; MA – матрикс; CA – капсид; SP1 – спейсерный пептид 1; NC – нуклеокапсид; SP2 – спейсерный пептид 2; p6 – белок p6; p6pol – межрамочный домен p6pol; PR – протеаза; RT – обратная транскриптаза; IN – интеграза.

Fig. 1. *Gag* gene expression: 5' LTR and 3' LTR – long terminal repeats in proviral DNA at the 5' and 3' ends, respectively; *gag* – *gag* gene; *pol* – *pol* gene; *env* – *env* gene; RNA – viral RNA (ribonucleic acid) on the ribosome; Gag-Pol – common precursor for internal proteins and three HIV-1 enzymes; Pr55^{Gag} – precursor for HIV-1 internal proteins; MA – matrix; CA – capsid; SP1 – spacer peptide 1; NC – nucleocapsid; SP2 – spacer peptide 2; p6 – p6 protein; p6pol – p6pol trans-frame domain; PR – protease; RT – reverse transcriptase; IN – integrase.

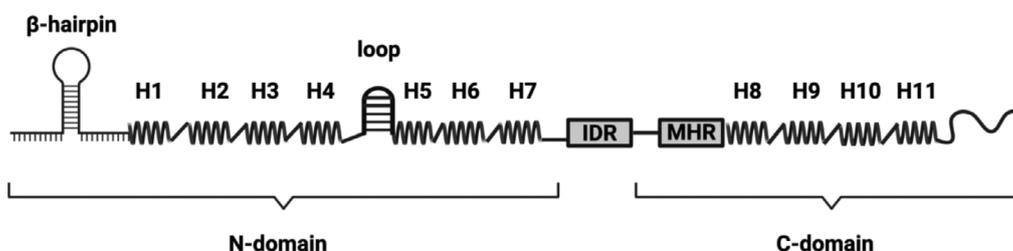


Рис. 2. Вторичная структура p24: N-domain – N-концевой домен; C-domain – C-концевой домен; β -hairpin – N-концевая β -шпилька; H1 – H11 – α -спирали 1–11 соответственно; loop – CysA-связывающая петля; IDR – междоменная линкерная область; MHR – основная область гомологии.

Fig. 2. Secondary structure of p24: N-domain – N-terminal domain; C-domain – C-terminal domain; β -hairpin – N-terminal β -hairpin; H1 – H11 – α -helices 1–11 respectively; loop – CysA-binding loop; IDR – interdomain linker region; MHR – the major homology region.

применение ленакапавира в составе инъекционной терапии пролонгированного действия с интервалом введения до 6 месяцев либо в схемах с пероральным применением с интервалом между приёмами до 7 суток [42].

В настоящее время ленакапавир проходит фазу II/III клинических испытаний [43]. На стадии доклинических испытаний в культуре клеток был определён перечень мутаций в белке p24, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к препарату: L56I, M66I, Q67H, K70N, N74D, N74S и T107N [44, 45]. Анализ последовательностей ВИЧ-1 субтипа В, суб-субтипа А1, субтипа F1, субтипа D и рекомбинантной формы CRF02_AG, полученных из клинических образцов как наивных, так и ранее леченных ВИЧ-инфицированных пациентов, не выявил наличия мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру [46]. Более позднее исследование варибельности белка p24 во всех 4 группах ВИЧ-1 (M, N, O, P) и её возможного влияния на эффективность ленакапавира показало, что естественная резистентность ВИЧ к ленакапавиру на сегодняшний день маловероятна [34]. Вместе с тем детальный анализ генетических особенностей белка p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, до сих пор не проводился.

Целью данной работы является исследование особенностей белка p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих на территории России (суб-субтипа А6, рекомбинантных форм CRF63_02A6, CRF_03AB, CRF02_AG и субтипа G):

- проведение филогенетического анализа фрагмента гена *gag*, кодирующего белок p24;
- анализ особенностей консенсусных последовательностей белка p24 для каждого варианта вируса;
- сравнение профиля естественных полиморфизмов p24 наиболее широко распространённого в России суб-субтипа А6 с наиболее изученным в мире субтипом В и с наиболее близким ему вариантом – суб-субтипом А1;
- анализ наличия мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру.

Полученные данные помогут спрогнозировать эффективность применения ленакапавира в России, обозначат характерные особенности белка p24 у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, что может

стать платформой для создания новых лекарственных препаратов в будущем.

Материалы и методы

Из международной базы данных Los Alamos (www.hiv.lanl.gov/content/index) были отобраны 962 нуклеотидные последовательности фрагмента гена *gag*, кодирующего белок p24, из них 200 – суб-субтипа А6, 180 – суб-субтипа А1, 229 – субтипа В, 200 – субтипа С, 73 – субтипа G, 22 – рекомбинантной формы CRF63_02A6, 7 – рекомбинантной формы CRF03_AB, 51 – рекомбинантной формы CRF02_AG. Субтиповая принадлежность указанных последовательностей была дополнительно проверена с применением программы идентификации рекомбинантных форм RIP (RIP 3.0 submission form (lanl.gov)). Попарное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с помощью алгоритма программы MEGA v.10.2.2. Затем для всех отобранных последовательностей был проведён филогенетический анализ методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием программы IQ-TREE [47].

При проведении исследования особенностей консенсусных последовательностей белка p24 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России (суб-субтипа А6, CRF63_02A6, CRF_03AB, CRF02_AG и субтипа G), проводили сравнение консенсусных последовательностей каждого варианта с референс-штаммом HXB2 (K03455), с консенсусной последовательностью субтипа В и между собой. Для каждого варианта вируса консенсусные последовательности были сформированы при помощи программного обеспечения Advanced Consensus Maker tool на сайте базы данных Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/AdvCon.html>) с последующей «ручной» проверкой собранных консенсусов и анализом с применением программы MEGA v.10.2.2.

Для проведения сравнения естественных полиморфизмов суб-субтипа А6 и субтипа В первоначально посредством программы MEGA v.10.2.2 выявляли естественные полиморфизмы обоих вариантов относительно референсного штамма HXB2; под полиморфизмами понимали мутации – единичные замены, встречающиеся в $\geq 1\%$ наблюдений [8]. Далее с применением

программного модуля Nonparametric Statistics из пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) выявляли сайты со статистически достоверными различиями ($p < 0,05$ при использовании критерия χ^2). В дальнейшем анализе для большей наглядности из выявленных позиций со статистически значимыми различиями учитывали только те, в которых частота полиморфизма одного из сравниваемых вариантов составляла 20% и более. Аналогично проводили сравнение естественных полиморфизмов между суб-субтипами А6 и А1.

При исследовании наличия мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру у вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, анализировали последовательности области гена *gag*, кодирующие белок p24, как загруженные из международной базы данных Los Alamos (суб-субтипа А6, рекомбинантных форм CRF63_02A6, CRF_03AB, CRF02_AG и субтипа G), так и полученные *de novo* из 30 клинических образцов наивных ВИЧ-инфицированных пациентов (табл. 1). Все пациенты наблюдались в ГКУЗ Московской области «Центр по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями». Весь полученный клинический материал использовали с информированного добровольного согласия пациента на основании одобрения Комитета по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 16 от 08.02.2019). Забор клинических образцов осуществляли в 2019–2020 гг. Анализ мутаций лекарственной устойчивости проводили с применением программы MEGA v.10.2.2. на основе перечня мутаций, выявленных в экспериментах *in vitro* в культуре клеток: L56I, M66I, Q67H, K70N, N74P, N74S, T107S [44, 45].

Выделение геномной ДНК, включающей интегрированную провирусную ДНК, из клеток крови ВИЧ-инфицированных пациентов проводили методом высаливания [48]. Получение ПЦР-продуктов (ПЦР – полимеразная цепная реакция) области гена *gag*, кодирующей белок p24, проводили методом гнездовой ПЦР при помощи подобранных праймеров: два внешних праймера – p24F1 (5'-СТС ТАТТГТГТАСАТСААССГАТАГ-3' 1042 → 1066) и p24R1 v1 (5'-СТАГГТГТСТТСТТТГССАСА ГТТГ-3' 1968 → 1993) и два внутренних – p24F2 (5'-GACACCAAGGAAGCTTTAG-3' 1075 → 1093) и p24R2 v1 (5'-GТАСТТГАСТСАТТГСССТСГГ-3' 1880 → 1900), после чего были получены и секвенированы 30 p24-ампликонов. Полученные последовательности анализировали, как описано выше.

Результаты

Анализ с применением программы RIP и последующий филогенетический анализ подтвердили субтипую специфичность отобранных из международной базы Los Alamos нуклеотидных последовательностей.

В результате проведения филогенетического анализа было сформировано 6 кластеров: А1, А6, CRF02_AG + CRF63_02A6, G, В и С (рис. 3).

В кластер А6 вошли все последовательности суб-субтипа А6, две последовательности варианта CRF63_02A6 и все последовательности рекомбинантной формы CRF_03AB. В кластер CRF02_AG + CRF63_02A6 вошли все последовательности рекомбинантной формы CRF02_AG, при этом две из двух последовательностей, полученных от пациентов из России, сгруппировались в середине кластера CRF02_AG, а 20 из 22 нуклеотидных последовательностей CRF63_02A6 сформировали подкластер. Для двух последовательностей CRF63_02A6, сгруппированных с субтипом А6, дополнительно из базы данных Los Alamos были загружены полногеномные последовательности и проанализированы с применением программы RIP. Результаты анализа подтвердили их принадлежность к рекомбинантной форме CRF63_02A6.

В кластере G 24 из 25 последовательностей, полученных от российских пациентов, сформировали подкластер. Принимая это во внимание, для формирования консенсуса субтипа G и последующего анализа мутаций лекарственной устойчивости к ленакапавиру были использованы только нуклеотидные последовательности, полученные от пациентов из России.

При анализе особенностей консенсусных последовательностей вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, была определена 31 позиция АК, в которых анализируемые консенсусы отличались от референс-последовательности НХВ2 (К03455) (табл. 2).

Сравнение профилей естественных полиморфизмов суб-субтипа А6 и субтипа В показало, что 83 из 231 позиции АК в белке p24 у обоих вариантов вируса были полностью консервативны, т.е. не содержали АК замен относительно референс-штамма НХВ2. Допол-

Таблица 1. Эпидемиологические и демографические характеристики пациентов

Table 1. Epidemiological and demographic characteristics of patients

Показатель Characteristic	n
Общее число пациентов Total number of patients	30
Средний возраст, лет Average age, years	39
Пол/Gender:	
– мужской/male;	18
– женский/female	12
Путь инфицирования/Route of infection:	
– гетеросексуальный/heterosexual;	19
– мужчины, имеющие секс с мужчинами/MSM;	8
– потребители инъекционных наркотиков/people who inject drugs	3
Генотипы ВИЧ-1/HIV-1 genotypes*:	
– А6;	28
– В;	1
– G	1

Примечание. *Субтип ВИЧ-1 был предварительно определен на основе анализа области гена *pol*.

Note. *The HIV-1 subtype was preliminarily determined based on the analysis of the *pol* gene region.

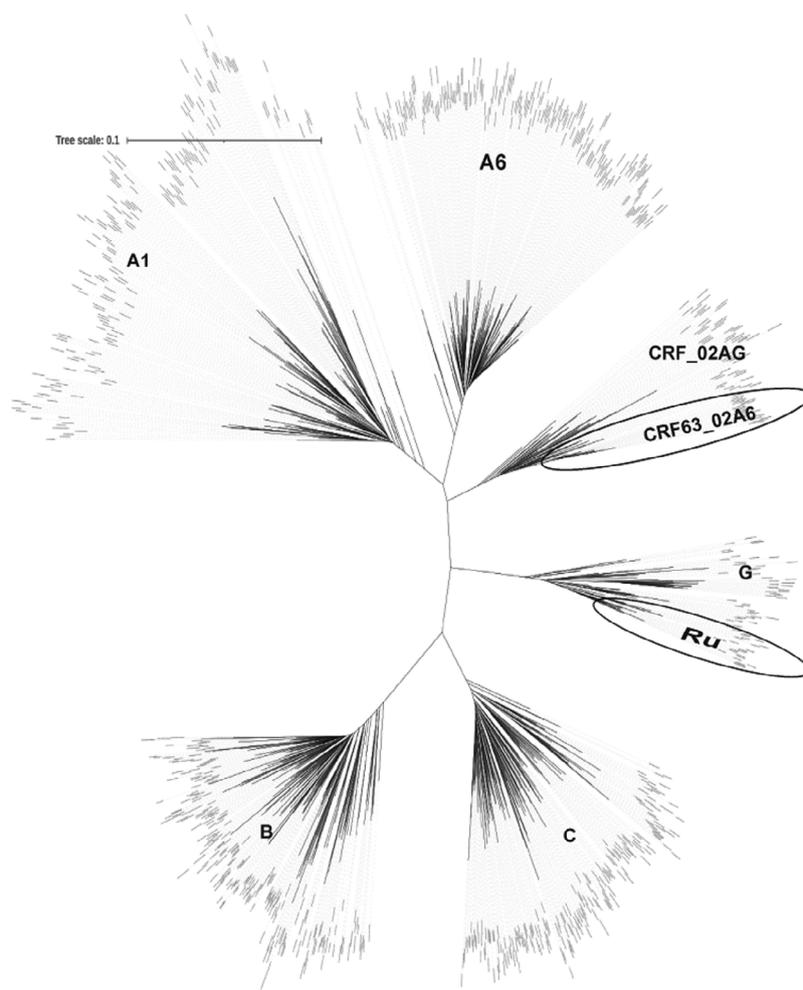


Рис. 3. Результаты филогенетического анализа фрагмента гена *gag*, кодирующего белок p24, методом максимального правдоподобия: A1 – кластер, сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 суб-субтипа A1; A6 – кластер, преимущественно сформированный нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 суб-субтипа 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 G, полученными в России; C – кластер, 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	–	–
H1	I15	I15M	I15M	I15M	I15M	–	–
	V27	V27I	V27I	V27I	V27I	–	–
	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
СупА-связывающая петля СупА 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. Cilelto 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., 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. 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. *Virus 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., Minsky 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., Awerkiw 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 насекомоядных 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 насекомоядных и рукокрылых в Азии и Африке [4, 5].

В России исследования проводились на территории азиатской части страны. В Сибири среди насекомоядных 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, тундряную (*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 насекомоядных 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

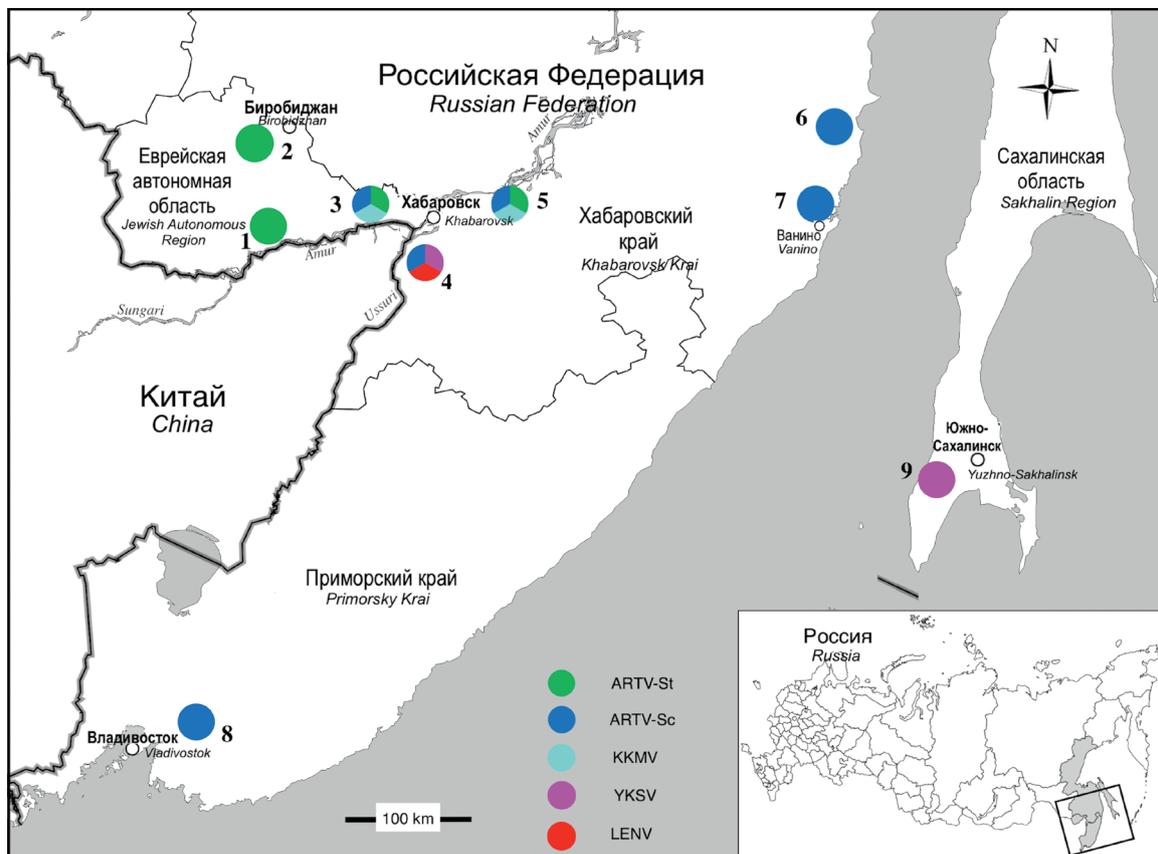


Рис. 1. Расположение точек отлова на территории Дальнего Востока России (включая ранее проведённые исследования), где были выявлены инфицированные хантавирусами бурозубки рода *Sorex*: 1) Ленинское, 2) Биробиджан, 3) Николаевка, 4) Хехцир, 5) Галкино, 6) Ландыши, 7) Токи, 8) окрестности Владивостока, 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).

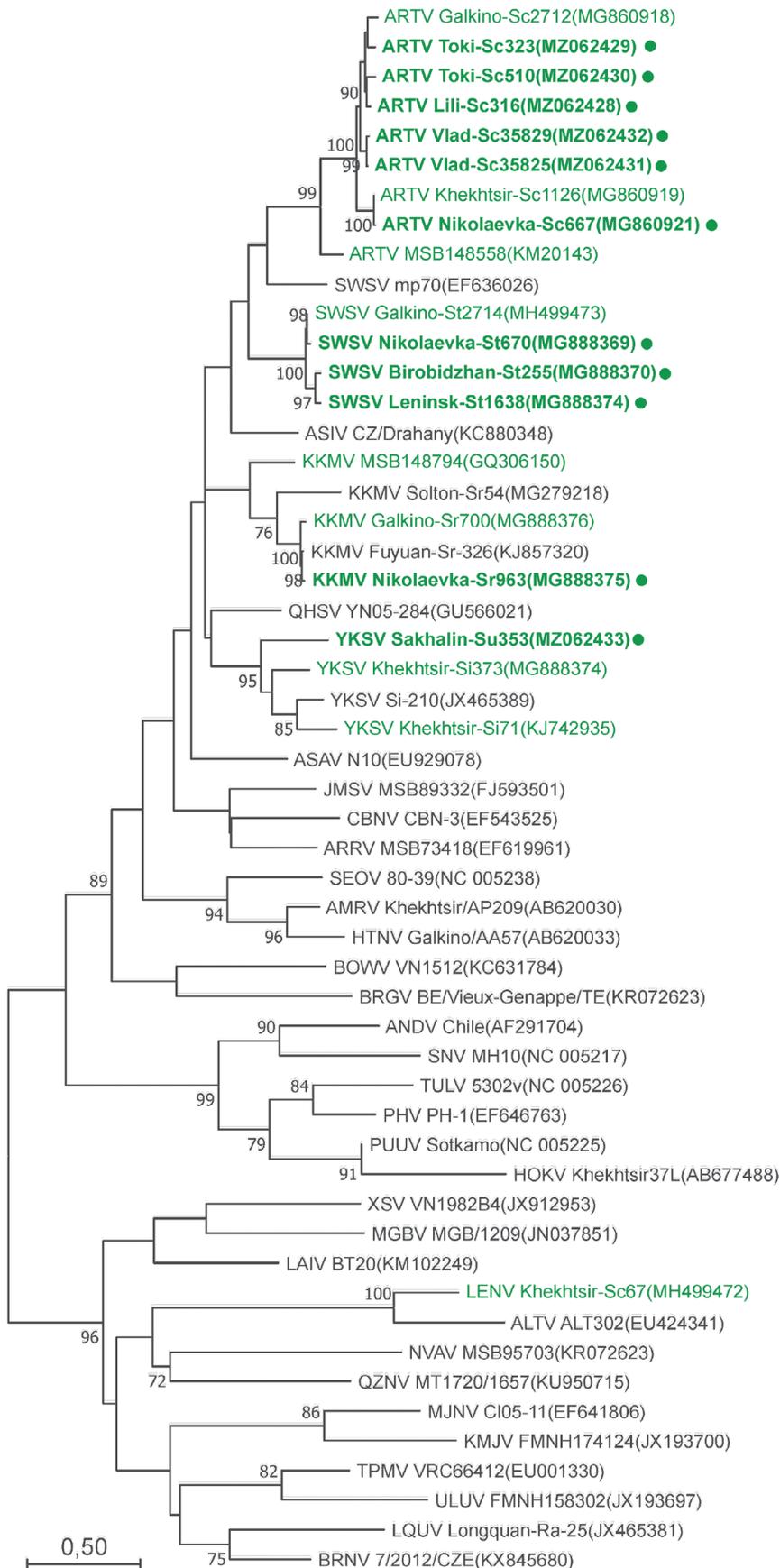


Рис. 2. Филогенетическое дерево, отображающее взаимосвязи российских РНК-изолятов хантавирусов, ассоциированных с бурозубками рода *Sorex* (зелёный шрифт), выявленных на Дальнем Востоке России, и штаммов хантавирусов из других регионов мира от насекомоядных, грызунов и летучих мышей. Деревья построены 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 KKMV 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, KKMV и YKSV с природными носителями в ареалах их обитания.

ЛИТЕРАТУРА

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- Яшина Л.Н., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Якименко В.В., Танцев А.К., Малышев Б.С. и др. Хантавирусы в популяциях насемоядных на территории Сибири. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; (4): 89–93. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-89-93>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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 РАН.

В 2002 г. В.И. Злобин переехал в Москву и сначала перешёл на работу в Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН, где занимал должность заместителя директора по научной работе и возглавлял лабораторию эпидемиологии и профилактики энцефалитов, а позднее в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАН, 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 РАН.

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.

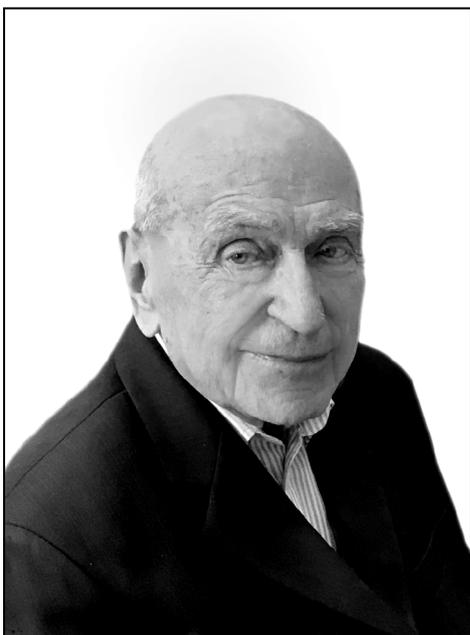
За научные достижения и их внедрение в здравоохранение В.И. Злобин награждён медалью Монголии, медалью Республики Южная Осетия, медалью имени Роберта Коха (Германия), медалью имени академика В.И. Покровского, ведомственными почётными грамотами и дипломами российского и регионального уровня; удостоен 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 РАН 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